

Estudios biológicos in vitro de materiales utilizados en osteosíntesis

Daniel Castrogiovanni¹, Julieta Parisi¹, Miguel Reigosa¹⁻²

1 Sector de Cultivos Celulares del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), CCT- La Plata CONICET, CICPBA.

2 Cátedra de Citología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

Rev Fac Cien Med (Quito), 2014; 39(1):15-21

Resumen

Contexto: diferentes materiales son utilizados para fabricar prótesis empleadas en medicina reparadora siendo el titanio, por sus características químicas, el más frecuentemente empleado.

Propósito: en el presente trabajo se evalúa la biocompatibilidad de diferentes muestras de prótesis médicas fabricadas por la Empresa FICO S.A.

Métodos: mediante técnicas de citotoxicidad y genotoxicidad se estudió su potencial capacidad de integrarse a los tejidos, empleándose en los bioensayos cultivos celulares de las líneas UMR-106 y L929. Por medio de las técnicas de rojo neutro, colorimétrico de MTT, contacto directo, difusión en agar y producción de colágeno se estudiaron los niveles de citotoxicidad. Además, a través de la técnica de naranja de acridina se determinó la viabilidad celular. El "ensayo cometa" se empleó para determinar la genotoxicidad.

Resultados: los resultados de los bioensayos empleados mostraron una alta biocompatibilidad, y no se evidenciaron diferencias significativas con los controles negativos.

Conclusión: las técnicas empleadas en el presente trabajo pueden constituirse en herramientas para el análisis de materiales de uso biomédico.

Palabras clave: biocompatibilidad; citotoxicidad; genotoxicidad; prótesis.

In vitro biological essays of material used in osteosynthesis

Abstract

Context: some materials are used to factory medical prosthesis, in repairing medicine. Titanium is the most common used material bi their chemical characteristics.

Aim: to evaluate biocompatibility in different samples of medical prosthesis, manufactured by FICO S.A. enterprise.

Methods: through cytotoxicity and genotoxicity techniques, it analyzed the potential capability to integrate into the tissues, working with cell cultures and cell lines UMR-106 y L929. Also it used techniques such as, neutro red, colorimetric of MTT, direct contact, diffusion on agar and collagen production, it evaluated the cytotoxicity levels. Also with acridine orange technique it sets cell viability. Comet essay was used to establish genotoxicity.

Results: the study shows high biocompatibility, and it does not found significant difference in negative controls.

Conclusion: It recommends these techniques to evaluate biomedical prosthesis.



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons de tipo Reconocimiento - No comercial - Sin obras derivadas 4.0 International Licence

Keywords: biocompatibility; cytotoxicity; genotoxicity; prosthesis.

Correspondencia: Dr. Miguel Reigosa, Sector Cultivos Celulares, IMBICE, Casilla de Correo 403 • La Plata, Buenos Aires, Argentina • Correo electrónico: cultivos@imbice.gov.ar
Recibido: 12/12/13 • Aceptado: 10/02/14

Introducción

Los biomateriales están diseñados para actuar en interfase con sistemas biológicos; son utilizados para fabricar implantes, dispositivos de uso odontológico y prótesis óseas, para citar algunos ejemplos. El titanio y sus aleaciones, caracterizados por su gran resistencia a la corrosión, son biomateriales de elección para fabricar prótesis e implantes óseos. Dependiente de su objetivo de uso, el material está diseñado para generar un efecto interactivo en su lugar de destino¹. Para decidir la colocación y mantenimiento de una osteosíntesis, se consideran factores físicos como son la característica del material empleado, la superficie y la composición química del mismo. Diversos estudios centran su atención sobre la superficie del material, orientados fundamentalmente a lograr la tolerancia y favorecer la osteointegración², mediante el recubrimiento por capas adherentes de óxido de titanio, aleaciones de cobalto (Co), aluminio (Al) o vanadio (V).

Cuando un metal entra en contacto directo con las células, se produce en mayor o menor grado, liberación de iones que pueden alterar la respuesta tisular, provocar toxicidad y generar una menor tolerancia³, por lo que, es indispensable estudiar el efecto biológico de los biomateriales, mediante técnicas predictivas in vivo e in vitro que ponen en evidencia, eficientemente, las propiedades de los materiales y además anticipar los posibles efectos que pueden producirse en luego de su implantación. Es indudable que los ensayos in vivo reflejan completamente las reacciones tisulares al biomaterial, sin embargo, existe presión social en países desarrollados contra la experimentación en animales y gracias a los notables avances de distintas técnicas in vitro, es factible realizar estudios experimentales en cultivos celulares como metodología de uso corriente para evaluar el efecto biológico de los biomateriales in vitro⁴. El análisis de la citotoxicidad y la genotoxicidad pueden evidenciar eventuales daños morfológicos, fisiológicos y genéticos generados por la interacción del material de implante y el tejido circundante.

En el presente estudio se analizaron muestras comerciales de biomateriales fabricados por la Empresa Fico SRL, utilizando técnicas in vitro sugeridas en las normas ISO 10993-5⁵. Se usaron

las líneas celulares establecidas L929 CCL-1 (tejido conectivo de ratón, ATCC) (W.R. Earle en el año 1943) y UMR-106, CRL-1661 (osteosarcoma de rata Sprague-Dawley, ATCC) (T.J Martin de la Universidad de Sheffield, Inglaterra). La línea celular L929 es una de las recomendadas por las normas ISO 10993-5 para este tipo de bioensayos, razón por la cual, fue incluida en el presente trabajo. Dado el destino del biomaterial, se incluyó una línea celular similar a una célula del tejido óseo razón, denominada UMR-106.

Material y métodos

Líneas celulares: la línea celular UMR-106 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC CRL 1661 Rockville, MD, USA), la cual fue mantenida en medio de cultivo D-MEM (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Internegocios, Mercedes, Bs. As. Argentina), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Richtel, Bs As. Argentina), mantenida en una atmosfera humidificada al 95% con 5% de CO₂ a 37°C. Las células fueron subcultivadas con tripsina (Gibco) 0,25% en PBS carente de calcio y magnesio.

La **línea L929** procedente de la American Type Culture Collection (ATCC CCL-1 Rockville, MD, USA), mantenida en medio de cultivo MEM (Gibco, Grand Island, NY), suplementado con 10% de suero bovino fetal (Internegocios, Mercedes, Bs. As. Argentina), 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomycin (Richtel, Bs As. Argentina); el cultivo se mantuvo en atmosfera humidificada al 95% con 5% de CO₂ a 37°C. Las células fueron subcultivadas con tripsina (Gibco) 0,25% en PBS carente de calcio y magnesio.

Obtención del vehículo de extracción (VE): se obtuvieron por inmersión de las muestras en medio de cultivo D-MEM, suplementado con 10% de suero bovino fetal y antibióticos manteniendo una relación superficie geométrica-volumen de 2 cm² por cada mililitro, según las normas ISO 10993-5. Las muestras fueron incubadas durante 72 horas a 37°C. Como control negativo se utilizó medio de cultivo completo, el cual fue previamente incubado bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Como control positivo se usó medio de cultivo completo con 5% de etanol. Las muestras consideradas para el estudio fueron un tornillo monoaxial (muestra 1) y Winglock (muestra 2).

Ensayo de contacto directo: permite evaluar la citocompatibilidad del material analizado⁶. Se utilizaron muestras con forma de disco de 5 mm de diámetro por 2 mm de espesor, las cuales tienen la misma composición, tratamiento y propiedades que el material comercial analizado. El disco, se fijó en la superficie de cajas de Petri de 35 mm x 10mm, con grasa de silicona estéril; posteriormente se sembró una suspensión celular que contiene 3×10^5 células por cada 3 mililitros de medio. La placa de Petri se incubó en estufa a 37°C, en una atmósfera humidificada al 95% y 5% de CO_2 durante 120 horas.

Ensayo colorimétrico de rojo neutro (RN): técnica basada en la incorporación por endocitosis del colorante supravital rojo neutro (RN) por los lisosomas de las células vivas⁷. Para este análisis se sembraron 1×10^4 células por pozo en placas 96 multipozos y se cultivaron durante 24 horas. Posteriormente se reemplazó el medio de cultivo por el VE, con sus correspondientes controles (negativos, medio sin acondicionar y positivos, medio con etanol al 5%) y se cultivaron 24 horas adicionales; el siguiente paso fue poner las células en contacto con el reactivo de rojo neutro disuelto en medio de cultivo durante 3 horas para culminar el proceso con la lectura de la absorbancia a 540 nanómetros en un lector ELISA multipozos. Una disminución de la absorbancia indica la pérdida de funcionalidad de los lisosomas.

Ensayo colorimétrico MTT (3(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro): ensayo desarrollado por Mosmann⁸ y modificado por Twentymen y Luscombe⁹. Permite medir el formazán (color violeta) obtenido por reducción del MTT cuando éste es puesto en contacto con células vivas. La reducción del compuesto ocurre por acción de enzimas mitocondriales (deshidrogenasas) de células vivas. Para esta prueba fue necesario sembrar 1×10^4 células por pozo en placas de 96 pozos. Se cultivaron durante 24 horas y luego se reemplazó el medio de cultivo por el VE con sus correspondientes controles (negativos, medio sin acondicionar y positivos, medio con etanol al 5%) cultivándose 24 horas adicionales y por último, se adicionó una solución de sal de tetrazolium (0,5 mg/ml) a cada uno de los pozos con las células, sometiendo a incubación por 3 horas. Finalmente se lavaron los pozos con PBS y se adicionó DMSO para disolver el colorante y luego medir la absorbancia a 540

nanómetros en un lector de ELISA multipozo.

Técnica de difusión en agar noble: se siembra 3 ml de suspensión del cultivo de células UMR-106 (5×10^4 células/ml) en cajas Petri de 3,5 mm de diámetro e incuban durante 48 horas a 37°C en una estufa humidificada al 95% con 5% de CO_2 . Posteriormente, se reemplaza el medio de cultivo por 3 ml de medio fresco compuesto por una mezcla de agar (4%) y medio (2X) con doble concentración de suero, adicionando 10 ml de solución de rojo neutro. El cultivo se incubaba en oscuridad durante 30 minutos a 37°C para finalmente colocar los discos de los materiales a ser evaluados. Paralelamente se ingresa un control positivo y un control negativo durante 24 horas a 37°C¹⁰.

Se valorará la zona de decoloración alrededor de la muestra (disco) y de los controles para determinar el índice de zona (IZ) y el índice de lisis (IL) en cada muestra ensayada. Con estos datos se calcula el índice de respuesta (IR) (ver **tabla N° 1**).

Tabla 1. Índices de respuesta en el método de difusión en agar.

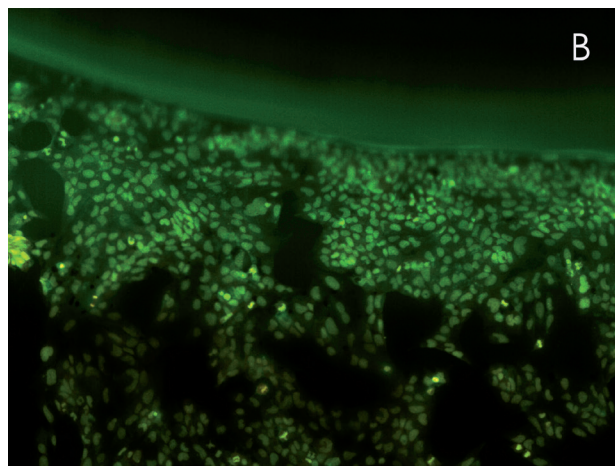
IR	Respuesta celular	Interpretación
0	0/0	No tóxico
1	1/1	Ligeramente tóxico
2	de 2/2 a 3/3	Moderadamente tóxico
3	de 4/4 a 5/5	Severamente tóxico

Determinación de colágeno tipo I: se siembran 8×10^3 células (por ejemplo, del cultivo celular UMR-106) por pozo con medio D-MEM 10% SBF con bicarbonato e incuban en estufa a 37°C con intercambio gaseoso durante 24 horas. Luego se adiciona en cada pozo 100 μl del medio acondicionado o del medio de cultivo con la droga a ensayar y se incuban durante un periodo de 7 días¹¹. Cumplido el tiempo de cultivo, se lava dos veces con 100 μl de PBS no estéril cada pozo. Posteriormente se agregan 100 μl de fijador (15 ml de solución de ácido pícrico saturado + 5 ml de formaldehído al 37% + 1 ml. de ácido acético glacial) por pozo y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora.

Terminada la etapa de fijación, se lava con 100 μl de agua destilada por dos ocasiones dejando reposar en el segundo lavado el agua durante 15 minutos (se agitará ligeramente). El proceso continúa con la adición de 100 μl de solución de

colorante Sirius Red (100 mg de Sirius Red en 100 ml de solución saturada en ácido pícrico), se agita suavemente e incuba durante 1 hora, luego se lava con 100 μ l de HCl 0,01N por dos ocasiones o hasta eliminar por completo el resto de colorante Sirius Red presente. El colágeno, producido por las células, podrá observarse en microscopio óptico y si es necesario fotografiar. Finalmente se cuantifica, extrayendo el colorante fijado en las células, agregando a cada pozo 100 μ l de solución de NaOH 0,1N, agitando suavemente durante unos 30 minutos.

Figura N° 1. Ensayo de contacto directo en células UMR-106. Foto micrografía de células UMR106 tratadas con naranja de acridina. Magnificación de 10 X.



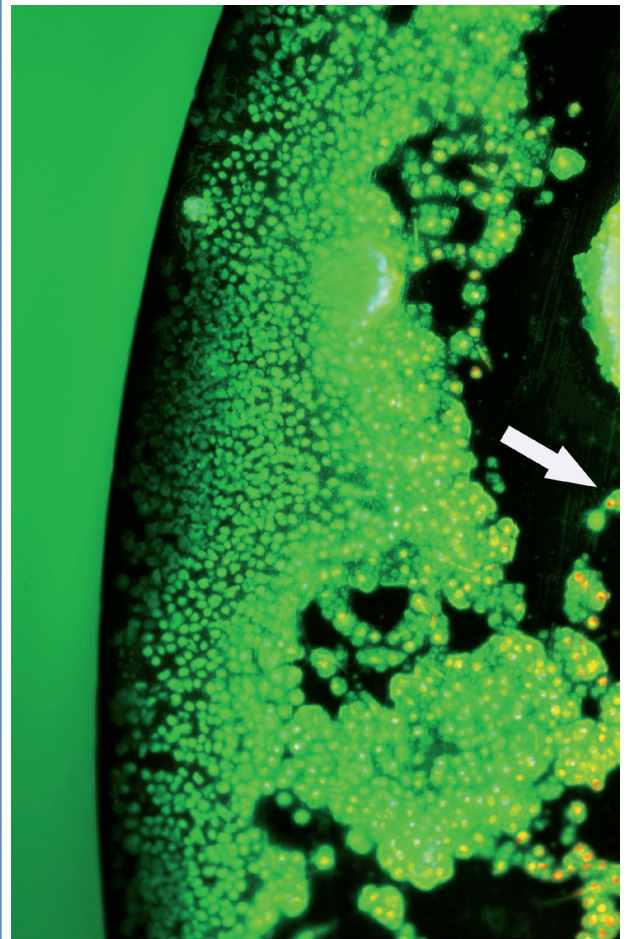
Flecha A. Indica el material en estudio
Flecha B. Indica las células creciendo sobre la superficie de la caja de Petri. Las células viables tratadas con naranja de acridina tienen color verde cuando son observadas en microscopio con fluorescencia.

La lectura se hace en el contador de Elisa para placas multipozo, a una longitud de onda de 550 nanómetros; la cuantificación puede realizarse ejecutando conjuntamente una curva de calibración de colágeno, a partir de una solución de colágeno tipo I de concentración conocida (optativo).

Ensayo cometa: procedimiento descrito por Singh y colaboradores¹² con ligeras modificaciones que se explican a continuación. Se procesan con tripsina las células tratadas con el vehículo de extracción y los controles. Las células suspendidas en PBS se mezclan a 37°C con agar de bajo punto de fusión al 0,5%, distribuyendo la mezcla obtenida sobre un portaobjeto previamente tratado con una capa de agar común que actúa como base. Luego de la gelificación del agar, las células se lisan con buffer de lisis (2,5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10)

durante 2 horas a 4°C. Previa la electroforesis, el portaobjetos se incuba 20 minutos a un pH 13,0 (300mM NaOH, 1 mM EDTA) para favorecer el desenrollamiento del ADN. Para generar la migración del ADN, se aplican 300 mA por 30 minutos.

Figura N° 2. Ensayo de contacto directo en células L929. Microfotografía de células L929 coloreadas con naranja de acridina. Magnificación de 10 X.



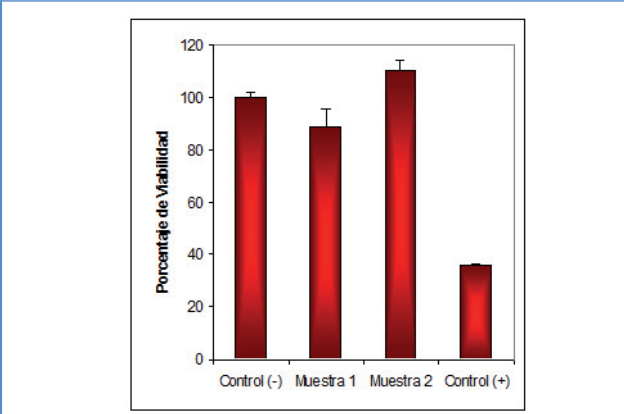
La flecha indica el crecimiento de células sobre la superficie de la muestra 1. Las células viables se colorean de verde con naranja de acridina. Se observa con microscopio de fluorescencia.

Una vez realizada la corrida, se neutralizó el pH con 0,4 M Tris-HCl (pH 7,5). El material se tiñó con el colorante Syber Green (Sigma Chemical Co., St. Luis, Mo, USA) para visualizar el ADN. Se toman fotografías y se evalúa la presencia, tamaño y cantidad de cometas. Es necesario evaluar al menos 50 células por condición experimental. Como control positivo, se trata a las células por 20 minutos con bleomicina 0,1 μ g/ml en medio de cultivo. Para el control negativo se utilizó medio de cultivo completo. El análisis se realiza con el software cometScore (Free comet scoring

software).

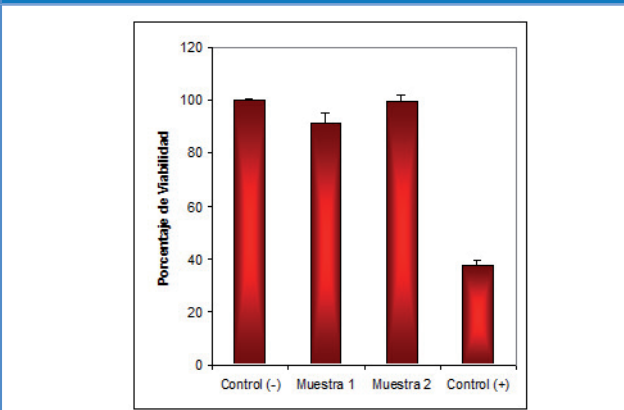
Resultados

Figura 3. Ensayo de Rojo Neutro en células UMR-106 con las muestras 1 y 2. Cada muestra se ensayo por cuadruplicado.



* $p < 0.05$ versus Control (-). ** $p < 0.01$ versus Control (-)

Figura 4. Ensayo de Rojo Neutro en células L929 con las muestras 1 y 2. Cada muestra se ensayo por cuadruplicado.



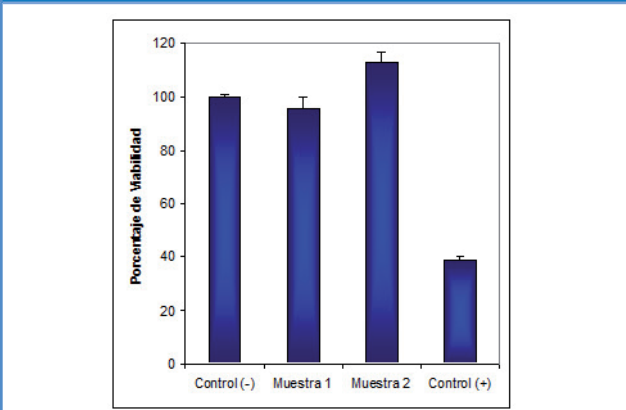
** $p < 0.01$ versus control (-)

Ensayo de contacto directo: el bioensayo usó las líneas celulares L929 y UMR-106. El análisis cualitativo no demuestra diferencias morfológicas significativas entre los controles negativos y las muestras. Como se aprecia en las **figuras 1 y 2**, las células tratadas con naranja de acridina se encuentran en contacto con los materiales y sobre la superficie de los mismos, demostrando ser compatibles para el crecimiento de las células.

Ensayo de rojo neutro: la actividad lisosomal de las líneas celulares UMR-106 y L929 fue evaluada por medio del ensayo de rojo neutro; se utilizaron medios acondicionados de las muestras 1 y 2, un control negativo (medio sin acondicionar)

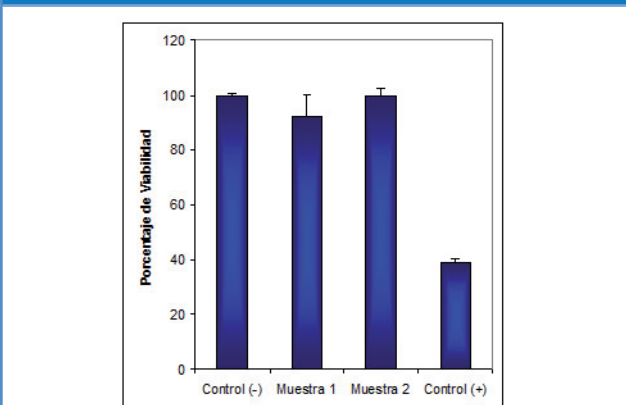
y un control positivo (medio de cultivos con etanol 5%). Cada muestra, por experimento, fue ensayada por cuadruplicado ($n=4$). El número de experimento fue de $n=3$.

Figura 5. Ensayo de MTT en células UMR-106 con las muestras 1 y 2. Cada muestra se ensayo por cuadruplicado.



* $p < 0.05$ vs. Control (-). ** $p < 0.01$ vs. Control (-)

Figura 6. Ensayo de MTT en células L929 con las muestras 1 y 2. Cada muestra se ensayo por cuadruplicado.



** $p < 0.01$ vs. Control (-)

Las **figuras 3 y 4** muestran el porcentaje de viabilidad calculado respecto del control negativo en células UMR-106 y L929 respectivamente. En la figura 3 se observa diferencia significativa de la muestra 2 respecto del control (-) con un aumento de la viabilidad celular, mientras que en la muestra 1 no existe diferencia alguna. La figura 3 evidencia que no existe diferencia significativa de las muestras 1 y 2 respecto al control negativo.

Ensayo de MTT: usó las líneas celulares UMR-106 y L929, los medios acondicionados de las muestras (1 y 2), un control negativo (medio sin acondicionar) y un control positivo (medio de cultivos con etanol 5%). Cada muestra, por

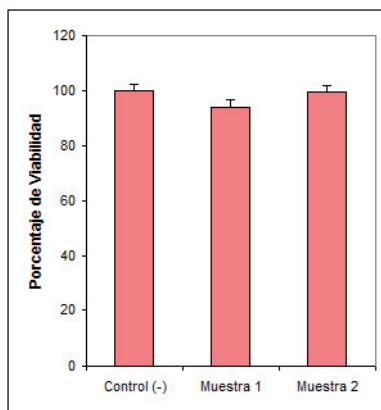
experimento, fue ensayada por cuadruplicado ($n=4$); el número de experimento fue de $n=3$. Las **figuras 5 6 6** muestran los porcentajes de viabilidad calculados respecto del control negativo en células UMR-06 y L929 respectivamente. La figura 5 muestra la diferencia significativa de la muestra 2 respecto del control (-), sin determinarse diferencia con la muestra 1. En la **figura 5 4** no se evidencia diferencia significativa de las muestras 1 y 2, respecto del control (-).

Técnica de difusión en agar noble: permite colegir que tanto las muestras y el control negativo no presentan citotoxicidad, mientras que el control positivo es ligeramente tóxico. Los resultados son mostrados en el **cuadro 2**.

Cuadro 2. Resultados del método de difusión en agar en las muestras.

Muestras	Respuesta	Clasificación
Control (-)	0/0	No tóxico
Muestra 1	0/0	No tóxico
Muestra 2	0/0	No tóxico
Control(+)	3/1	Ligeramente tóxico

Figura 7. Ensayo de producción de colágeno tipo I usando las muestras 1 y 2.

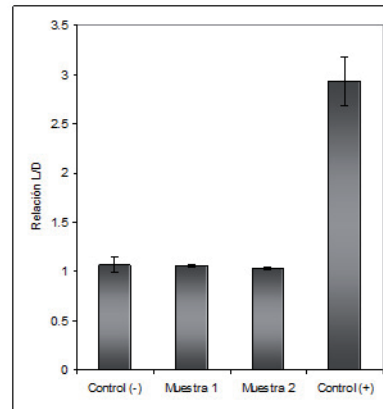


Cada muestra se procesó por octuplicado ($n=4$), el número de experimento fue de $n=2$.

Ensayo cometa: luego de realizada la corrida, se tomaron microfotografías previo agregado de una solución de Cyber Green Invitrogen (dilución 1:5000). Para esto se utilizó un microscopio Nikon con el cubo correspondiente (FITC). Las fotos fueron analizadas con el software CometScore, registrándose distintos parámetros de los cometas. Los parámetros utilizados en el cálculo fueron: longitud del cometa y diámetro de la cabeza expresados en el cociente L/D. Se graficó este cociente en cada uno de los tratamientos.

Se evidenció que las muestras no presentan diferencia significativa respecto al control, sin embargo, si presentan diferencia estadística la muestra y el control negativo respecto al control positivo, lo que es indicativo de inocuidad para la molécula de ADN (ver **figuras 7 y 8**).

Figura 8. Ensayo cometa versión alcalina realizada en células UMR-106 tratadas con medios acondicionados de las muestras 1 y 2.



También se incluye el control (-) (medio sin acondicionar) y control (+) (medio con bleomicina).

Discusión

Los bioensayos de citotoxicidad realizados con los VE demuestran que no afectan las funciones de las mitocondrias y lisosomas de las líneas celulares empleadas, sobre la base de los diferentes valores de absorbancia detectados entre las muestras 1 y 2 y el control positivo; además, se comprueba la ausencia de productos citotóxicos que pudieran generarse por el deterioro corrosivo de la superficie de las muestras al estar en contacto con el medio de cultivo celular que simula las condiciones del ambiente in vivo¹³⁻¹⁵. Adicionalmente, no se detectaron cargas o sustancias que afecten la adhesividad y viabilidad celular, demostrado por la prueba de contacto directo donde se puede apreciar el crecimiento de células alrededor de las muestras y el crecimiento sobre la superficie descartando un fenómeno de anoikis celular¹⁶. Los resultados obtenidos por el ensayo cometa en solución alcalina, sugieren que no se liberan compuestos tóxicos al medio de cultivo durante su acondicionamiento que podrían afectar la molécula de ADN de las células utilizadas (ver **figura 7**).

Los análisis realizados sobre los vehículos de

extracción obtenidos a partir de las muestras provistas por los fabricantes, no evidenciaron efectos citotóxicos frente a los ensayos colorimétricos de MTT (3(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro) y rojo neutro, ni con la técnica de difusión en agar noble. Tampoco se observó un efecto genotóxico en la evaluación realizada por medio del ensayo cometa en solución alcalina. Además, las líneas celulares puestas en contacto directo con las muestras no alteraron su morfología y lograron adherirse con efectividad a la superficie de las muestras metálicas analizadas (ver **figuras 1 y 2**).

De acuerdo a los resultados analizados se concluye que el recubrimiento realizado sobre las superficie de las muestras 1 y 2 no sufre alteraciones corrosivas que liberen compuestos de naturaleza citotóxica y se presenten en los VE. Las líneas celulares en contacto directo con los materiales logran adherirse sobre la superficie, propagándose sin alterar la morfología celular. Asimismo será necesario incluir líneas celulares semejantes al tejido donde se implantarán los

biomateriales, como en el presente trabajo que incorporó la línea UMR-106 que posee características de células óseas.

Finalmente, el estudio demostró que las prótesis entregadas por la Empresa FICO SRL no son citotóxicas y genotóxicas con las técnicas empleadas.

Agradecimientos

Agradecemos a la empresa FICO S.R.L. por suministrar las muestras empleadas en el presente trabajo.

Conflicto de interés

Ninguno declarado por el autor o autores.

Financiamiento

Fondos propios de los investigadores

Referencias:

- Black J. Systemic effects of biomaterials. *Biomaterials* 1984; 5:11-18.
- Sukenik CN, Balachander N, Culp LA, Merritt K. Modulation of cell adhesion by modification of titanium surfaces with covalently attached self-assembled monolayers. *J Biomed Mater Res* 1990; 24:1307-23.
- Grillo, C. Reigosa, M. Fernandez Lorenzo de Mele, M. Does over-exposure to copper ions released from metallic copper induce cytotoxic and genotoxic effects on mammalian cells? *Contraception* 2010; 456-467.
- Velasco-Ortega E, Jos A, Cameán AM, Pato-Mourelo J, Segura-Egea JJ. In vitro evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of a commercial titanium alloy for dental implantology. *Mutat Res*. 2010; 702(1):17-23
- International Standard ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices, 2ed. 1999.
- Reigosa M, Labarta V, Molinari G, Bernaldes D. Cytocompatibility, cytotoxicity and genotoxicity analysis of dental implants. *Journal of Basic & Applied Genetics*. 2008; 19:43-48.
- Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*. 1985; 24(2-3):119-24.
- Mosmana T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *J Immunol Metabol* 1983; 65:55-63
- Twentyman PR, Luscombe M. A study if some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *BR J Cancer* 1987; 56:279-85
- Wallace L. Guess, S. Rosenbluth A, Schmidt B, Autian J. agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1965; 54(10): .
- Walsh BJ, Thornton SC, Penny R, Breit S. Microplate reader-based quantitation of collagens. *Anal Biochem* 1992; 203:187-90
- Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantification of low level of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175:184-91
- Huataha JC, Malcolm CT, Hanks CT. Correlation between cytotoxicity and elements released by dental casting alloys. *Int J Prosthodont* 1995; 8:9-14.
- Regina L, Messer W, Bishop S, Lucas LC. Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials* 1999; 20:1647-1657
- Mockers O, Deroze D, Camps J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. *Dent Mater* 2002; 18(4):311-7.
- Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anokis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(12):3481-98.