

Avaliação do Potencial Genotóxico de uma Importante Liga Metálica Utilizada em Próteses

Gomes, C. C., Santos, V. J. S. V., Ramos, A. S., Pacheco-Soares, C., Santos, F. V.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hiufumi, 2911, São José dos Campos – SP
fvsantos@univap.br

Resumo- O presente trabalho teve como objetivo o estudo de uma possível genotoxicidade da liga metálica Ti-6Al-4V, amplamente utilizada em próteses médicas. Para obtenção do extrato da liga utilizado nos experimentos, as peças da liga foram submersas em meio HAM-F12 sem soro fetal bovino, de acordo com a NBR (ISO) 10.993-12, a 37°C e sob agitação (90 RPM) por 6 dias (144 horas). A partir deste extrato realizaram-se os experimentos do teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese em culturas de células CHO-K1. Os resultados apontaram um aumento no número de micronúcleos, em relação ao controle negativo, para todas as concentrações do extrato da liga Ti-6Al-4V avaliadas (100%, 75% e 50%). De acordo com esses resultados, podemos inferir que íons metálicos liberados da liga metálica no meio de cultura foram capazes de induzir alterações genéticas nas condições empregadas. Isso serve de alerta e demonstra a necessidade de estudos mais profundos para elucidação dos mecanismos de origem dessas alterações.

Palavras-chave: Ti-6Al-4V; Genotoxicidade, Biomateriais, Micronúcleo.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

As mutações despertam grande interesse por estarem diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas, tais como câncer e arteriosclerose (DE FLORA, 1998; SEO et al., 2000). Em nosso cotidiano estamos constantemente em situações de exposição à agentes potencialmente genotóxicos, seja em nossa alimentação, no ar, na água ou mesmo em tratamentos médicos, nos quais podemos vir a ter contato com agentes químicos ou físicos potencialmente danosos aos sistemas biológicos.

Dentre os materiais utilizados para a confecção de implantes, o titânio comercialmente puro é considerado o melhor do ponto de vista tecidual (osseointegração), porém, devido às suas propriedades físicas, ele não é o material ideal para suportar cargas (CHOE et al., 2005). Assim, uma importante alternativa no campo dos biomateriais é a liga Ti-6Al-4V (90% de Titânio, 6% de Alumínio e 4% de Vanádio) que possui grande resistência à fratura. Entretanto, esse material apresenta menor taxa de osseointegração e maior susceptibilidade à corrosão *in vivo* (SERRA et al., 2007).

Tendo em vista a presença de elementos potencialmente genotóxicos na composição dessa liga metálica, é imperativa a necessidade de avaliação dos riscos genéticos inerentes ao uso da mesma como biomaterial. Assim, no presente trabalho avaliamos, através do teste do micronúcleo em cultura de células CHO-K1, o

potencial genotóxico de um extrato obtido a partir da liga Ti-6Al-4V.

Metodologia

Preparo do Extrato

Para o preparo dos extratos avaliados, peças da liga Ti-6Al-4V estéreis, com medidas 2,7 cm x 2,6 cm x 0,5 cm (área superficial = 18,7 cm²), foram mantidas em contato com meio de cultura Ham-F12 sem soro, a 37°C e sob agitação (90 RPM), por 6 dias (144 horas). Foi obedecida a relação 1,25 cm²/mL de meio de cultura, de acordo com a NBR (ISO) 10993-12, que versa sobre o preparo de amostras para avaliação biológica de biomateriais.

O meio de cultura utilizado como controle negativo passou pelo mesmo processo, porém sem ter contato com as peças metálicas.

Todos os extratos obtidos foram alíquotados e congelados até o momento do uso.

Culturas Celulares

Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO-K1) foram utilizadas no presente estudo. O crescimento celular foi realizado em meio de cultura Ham-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1,2 g/L de bicarbonato de sódio e antibióticos (meio de cultura completo). A manutenção das células foi realizada em frascos de cultivo celular de 25 cm², a 37°C e 5% CO₂.

Teste do Micronúcleo

Para a realização do teste do micronúcleo foram utilizadas culturas celulares entre a 3ª e a 8ª passagens. 2×10^5 células foram semeadas em placas de cultivo celular de 35 mm de diâmetro, contendo 1 mL de meio de cultura completo e uma lamínula 20x20 mm. Passadas 25 horas (2 ciclos celulares completos) o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Nas placas controle-negativo foi adicionado 1 mL de meio de cultura sem soro. O grupo controle positivo foi tratado com 1 mL de meio de cultura sem soro contendo 0,3 µg/mL de Mitomicina-C (MMC), um potente agente mutagênico. Para avaliação da genotoxicidade da liga Ti-6Al-4V, 3 grupos de tratamento foram realizados, recebendo 1 mL de meio de cultura sem soro contendo, respectivamente, 100%, 75% e 50% (v/v) do extrato. Transcorridas 2 horas dos tratamentos, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e 1 mL de meio de cultura completo, contendo Citocalasina-B (2,1 µg/mL), foi adicionado. Após 15 horas (1 ciclo celular completo), as células foram lavadas 2 vezes com PBS e 1 mL de solução hipotônica (Citrato de Sódio 1%) por 10 minutos, em temperatura ambiente. Após a hipotonização, as células foram fixadas com uma solução de metanol e ácido acético (20:1) por 5 minutos e secas ao ar. Após a completa secagem das lamínulas contendo as células aderidas e fixadas, as mesmas foram coradas com Giemsa 5% por 15 minutos, para posterior análise citológica.

Na análise citológica foram avaliadas 1000 células binucleadas (Figura 1) por tratamento, anotando-se a frequência de células micronucleadas.

Análise Estatística

Foram realizados 3 experimentos totalmente independentes. A partir dos dados obtidos em cada um deles foram calculadas as médias de células micronucleadas e os desvios-padrão para cada tratamento. Para a análise estatística foi empregado o software INSTAT (Graphpad), realizando-se uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste Student-Newman-Keuls, buscando-se uma comparação dos resultados entre os diferentes grupos de tratamento.

Resultados

A Tabela 1 e a Figura 2 mostram que as três diferentes concentrações do extrato da liga Ti-6Al-4V foram capazes de alterar significativamente as frequências de micronúcleos em relação ao grupo controle negativo, indicando o potencial de indução de quebras cromossômicas ou processos de aneuploidia em culturas de células CHO-K1.



Figura 1. Célula CHO-K1 binucleada com micronúcleo (seta) em aumento de 1000x.

Tabela 1. Frequência de células micronucleadas em cada experimento, médias e desvios-padrão após tratamento com diferentes concentrações do extrato obtido da liga Ti-6Al-4V em culturas de CHO-K1.

Tratamento	Experimento			Média ± SD
	I	II	III	
Controle	11	17	15	14,3 ± 3,06
Mitomicina-C	38	41	39	39,3 ± 1,53
Extrato				
50%	20	27	25	24,0 ± 3,61*
75%	17	24	25	22,0 ± 4,36*
100%	21	26	26	24,3 ± 2,89*

SD: Desvio-Padrão; * Valores estatisticamente diferentes do controle negativo ($P < 0,01$)

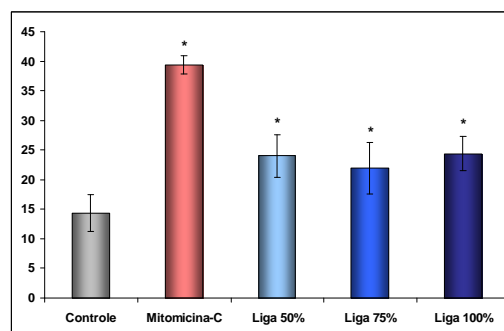


Figura 2. Frequência média de células micronucleadas e desvios-padrão após tratamento com diferentes concentrações do extrato obtido da liga Ti-6Al-4V, em culturas de CHO-K1. * Valores estatisticamente diferentes do controle negativo ($P < 0,01$).

Discussão

Documentos de padronização internacional, como, por exemplo, a ISO 10993, determinam condições específicas para realização dos testes de biocompatibilidade de biomateriais.

Tais padrões estipulam que todos os materiais que entrarem em contato por um período superior a 30 dias com mucosas, ossos ou tecido dental, bem como todos os dispositivos de implante, cujo contato exceder 24 horas, deverão ser avaliados quanto à genotoxicidade (CHAUVEL-LEBRET et al., 2001).

Para Papageorgiou et al. (2007), há uma grande preocupação atualmente em relação aos possíveis efeitos decorrentes de uma exposição a partículas de metálicas a longo prazo. De acordo com Morais et al. (2007), mini-implantes ortodônticos constituídos da liga Ti-6Al-4V podem liberar íons metálicos devido à corrosão *in vivo* desse material em fluidos corporais, o que pode representar um risco importante à saúde dos usuários.

Essa informação é reforçada por Sedarat. (2001), que mediu a liberação de íons metálicos a partir da liga Ti-6Al-4V em uma solução que simulava os fluidos corpóreos, com análises num período de 96 dias. Seus resultados de espectroscopia de absorção atômica demonstraram uma considerável liberação de íons metálicos, com o Titânio e o Alumínio sendo liberados em quantidades maiores, durante todo o período, e o Vanádio sendo liberado em maior quantidade nos 6 primeiros dias de análise.

Assim, no presente trabalho, buscamos avaliar o potencial de danos genéticos proporcionado pela exposição de culturas celulares CHO-K1 a um extrato obtido após o contato de 6 dias de peças da liga Ti-6Al-4V com o meio de cultura Ham-F12. Foi empregado o Teste do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese, amplamente utilizado para a identificação de agentes causadores de mutações cromossômicas.

De acordo com nossos resultados, uma frequência significativamente maior de células micronucleadas foi observada nos grupos expostos ao extrato da liga metálica, em relação aos valores observados no grupo controle negativo. A formação de micronúcleos após a exposição a um agente químico ou físico pode ser resultado de processos de clastogênese (quebra de cromossomos) ou de aneugênese (perda de cromossomos inteiros).

Assim, podemos inferir que íons possivelmente liberados no meio de cultura durante o processo de extração, foram capazes de ocasionar quebras nas moléculas de DNA ou a perda de cromossomos inteiros durante o processo de divisão celular.

A literatura científica não apresenta muitos dados acerca da genotoxicidade/mutagenicidade de produtos utilizados como biomateriais. Porém, alguns trabalhos têm demonstrado que muitos compostos utilizados em implantes médicos apresentam potencial para ocasionar danos genéticos.

De acordo com um estudo realizado por Doherty et al. (2001), células de pacientes portadores de implantes da liga Ti-6Al-4V apresentaram uma maior frequência de aneuploidias (variação no número cromossômico) do que o observado no grupo controle.

O TiO_2 teve a sua genotoxicidade avaliada por Lu et al. (1998), demonstrando resultados positivos tanto no teste do micronúcleo, quanto na avaliação de trocas entre cromátides irmãs em culturas celulares de CHO-K1. Em 2002, Rahman et al demonstraram que o pó ultrafino de TiO_2 foi capaz de induzir a formação de micronúcleos e morte celular (apoptose) em cultura de fibroblastos SHE.

O Cloreto de Alumínio, de acordo com Lankoff et al. (2006), apresentou potencial genotóxico e citotóxico em culturas de linfócitos humanos. Além disso, de acordo com esses mesmos autores, o alumínio foi responsável por atrasos no ciclo celular e por interferir nos processos de reparo do DNA.

O Vanádio, também presente na liga estudada, apresenta potencial genotóxico. De acordo com Cirani et al. (1995), vários sais de Vanádio (SVO_5 , Na_3VO_4 e NH_4VO_3) induziram micronúcleos em sistemas animais. Um relatório sobre a tolerância ao Vanádio presente em alimentos realizado pela EFSA (European Food Safety Authority) cita um estudo que demonstra a mutagenicidade do NH_4VO_3 no Teste de Ames (ARLAUSKAS et al., 1985 *apud* EFSA, 2004). Porém, esse mesmo relatório cita estudos com compostos contendo Vanádio e que apresentaram resultados negativos quanto à genotoxicidade.

Como podemos verificar, estudos com a liga Ti-6Al-4V e seus componentes demonstram potencial genotóxico. Assim, os dados da literatura, associados aos resultados por nós obtidos, reforçam a necessidade de que estudos mais profundos sejam realizados com os materiais destinados à confecção de implantes médicos ou odontológicos.

Porém, vale ressaltar que, segundo Rahman et al. (2002), a indução de micronúcleos é resultado de um dano genético bastante primário sendo assim precoce a associação desses eventos diretamente ao desenvolvimento de tumores.

Conclusão

O Teste do Micronúcleo realizado no presente estudo demonstrou que diferentes concentrações de um extrato obtido da liga Ti-6Al-4V foram capazes de induzir danos cromossômicos em células da linhagem CHO-K1 *in vitro*. Assim, esses resultados servem de alerta para que estudos mais profundos sejam realizados

com esse liga metálica, uma vez que a mesma é utilizada em implantes médicos de longa duração.

Referências

CHAUVEL-LEBRET, D. J., et al. Evaluation of the capacity of the SCGE assay to assess the genotoxicity of biomaterials. **Biomaterials**. V.22 p. 1795-1801, 2001.

CHOE, H. et al. Effect of tungsten addition on the mechanical properties of Ti-6Al-4V. **Materials Science and Engineering**, V.A396, p.99-106, 2005.

CIRANNI R.; ANTONETTI, M., MIGLIORE, L. Vanadium salts induce cytogenetic effects in vivo treated mice. **Mutat. Res.** V.343, p.53-60, 1995.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutat. Res.**, V.402, p.151-158, 1998.

DOHERTY, A. T. et. al. Increased chromosome translocations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients having revision arthroplasty of the hip. **J Bone Joint Surg**. V.83-B, n.7,p.1075-1081, 2001.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Vanadium. **The EFSA J**. V 33, p.1-22, 2004 (Request N° EFSA-Q-2003-018).

ISO (International Standard Organization) Avaliação biológica de produtos para saúde.– Parte 12: Preparação de amostras e materiais de referência.ISO 10993-12, 2005.

LANKOFF, A. et al. A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. **Toxicol. Lett**. V.161, p.27-36, 2006.

LU, P.; HO, I.; LEE, T. Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells. **Mutat. Res.** p.15-20, 1998.

MORAIS, L S et al. Liberação in vivo de íons metálicos por mini-implantes ortodônticos de Ti-6Al-4V. **Revista Matéria**, V.12, n.2, p. 290 – 297, 2007.

PAPAGEORGIOU, I. et al. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on

human fibroblasts in vitro **Biomaterials** V. 28 p 2946–2958, 2007.

RAHMAN, Q. et al. Evidence That Ultrafine Titanium Dioxide Induces Micronuclei and Apoptosis in Syrian Hamster Embryo Fibroblasts. **Environ. Health Perspect.** V 110 n 8, p.797-800, 2002.

SEDARAT, C. et al. In vitro kinetic evaluation of titanium alloy biodegradation. **J. Periodont. Res.** V.36, p.269-274, 2001.

SEO, K.Y.; JELINSKY, S. A.; LOECHLER, E. L. Factors that influence the mutagenic patterns of DNA adducts from chemical carcinogens.**Mutat. Res.**, V.463, p.215–246, 2000.

SERRA, G.G. et al. Mini-implantes Ortodônticos Carregados Imediatamente – Estudo in vivo. **Revista Matéria**, V.12, n.1 p.111 -119, 2007.