

# Comparación del efecto citotóxico del cobre sobre líneas celulares de ovario y osteoblastos

Miguel Reigosa <sup>(1,2)</sup>, Verónica Labarta <sup>(1,2)</sup>, Sandra G. Gómez de Saravía <sup>(2,3)</sup>  
Mónica Fernández Lorenzo de Mele <sup>(4)</sup>

## Resumen

**Contexto:** El cobre es empleado en su forma pura o como constituyente de aleaciones en biomateriales dentales y dispositivos intrauterinos (DIU) utilizados para la anticoncepción.

**Objetivo:** Analizar el efecto citotóxico del cobre sobre las células UMR106 de origen osteoblástico y sobre las células ováricas de hamsters chinos (CHO K1).

**Métodos:** Se cultivaron células UMR106 y células CHO K1 en presencia de discos de cobre puro ubicados en el centro de las cápsulas utilizadas para cultivo, evaluando simultáneamente controles sin cobre. Se determinó el número de células vivas y muertas luego de distintas exposiciones entre 3 h y 72 h. Se midió la concentración de cobre liberado en condiciones similares en el medio de cultivo sin células después de distintos tiempos de inmersión.

**Resultados:** Se pudo constatar que en presencia de cobre el número de células muertas decrecía al aumentar la distancia cobre-célula y crecía con el tiempo de exposición, encontrándose ciertos tiempos y concentraciones umbrales por debajo de los cuales no se observaba efecto. Se notó también que la velocidad de reproducción celular decrecía en presencia de los iones metálicos evidenciándose un mayor efecto citotóxico en las líneas celulares de origen óseo.

**Conclusiones:** La exposición al cobre no reduce de manera importante el número de células vivas pero provocan cambios en la velocidad de reproducción en ambas líneas celulares.

**Rev Fac Cien Med (Quito) 2008; 33: 78-83.**

1 Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE),  
2 Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CICBA)  
3 Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA),  
Universidad Nacional de La Plata – Argentina  
4 Facultad de Ingeniería,  
Universidad Nacional de La Plata – Argentina.

**Dirección para correspondencia:**  
Dr. Miguel Reigosa. Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE); Calle 526 y Camino General Belgrano (entre 10 y 11); B1900BTE; La Plata – Argentina.  
**E-mail:**  
cultivos@imbice.org.ar

**Palabras clave**  
Citotóxico, cobre, osteoblastos, dispositivo intra uterino, DIU.

**Recibido:**  
02 - Mayo - 2008  
**Aceptado:**  
25 - Junio - 2008

## Introducción

La liberación de cobre desde biomateriales dentales a través de procesos corrosivos <sup>(1-4)</sup> puede producir reacciones tóxicas, alérgicas, mutagénicas o inflamatorias. Los iones metálicos difunden a través de los tejidos duros y blandos produciendo síntomas clínicos tales como dolor, lisis y necrosis de tejidos <sup>(5, 11)</sup>. En el caso de los dispositivos intra-uterinos (DIU), los iones cobre liberados son los que otorgan características anticonceptivas al dispositivo <sup>(12, 18)</sup>. La velocidad de liberación de iones es mayor durante los primeros días de implantación y podría estar relacionada con reacciones de inflamación locales durante dicho período <sup>(13)</sup>.

Los estudios de citotoxicidad de iones metálicos consisten frecuentemente en evaluar el efecto tóxico del ión sobre determinadas funciones celu-

lares. Se utilizan a menudo líneas de células clonadas como la UMR106. Esta línea celular conserva ciertas características del fenotipo osteoblástico. Las células de ovario de hamster chino (CHOK1) se consideraron adecuadas para estudiar los efectos de la presencia de iones cobre en el aparato genital, especialmente en lo que respecta al efecto sobre la velocidad de reproducción celular, debido a su alta velocidad de reproducción.

En la bibliografía se reportan ensayos de citotoxicidad realizados utilizando distintas fuentes de iones: cobre metálico "in situ", extractos provenientes de la disolución de cobre "ex situ", o adición de sales de cobre <sup>(19-22)</sup>. En los últimos dos casos se trabaja a concentración de cobre constante tanto en tiempo como en espacio.

Sin embargo, la concentración de iones metálicos en los tejidos que rodean a un biomaterial implantado no es constante [6] probablemente debido a limitaciones de los procesos de transporte que conducen a variaciones del nivel de iones tanto en el espacio como en el tiempo. Es interesante, entonces, evaluar el efecto de dicha variación sobre las líneas celulares con el objeto de simular la situación clínica.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar comparativamente el efecto de los iones cobre liberados por una muestra de cobre metálico sobre líneas celulares de dos tipos de células las UMR106 y las de ovario de hamster (CHOK1), analizando la influencia de la variación de los posibles gradientes de concentración con el tiempo de exposición.

### Materiales y Métodos

#### Muestras metálicas y liberación de iones

Se utilizaron discos de cobre puro de 0.314 cm<sup>2</sup> de área que fueron esterilizados en un autoclave antes de ser transferidos a la cápsula de cultivo. El total de medio de cultivo adicionado fue de 3 mL. La concentración de iones liberada se midió a través de espectrofotometría de absorción atómica (sensibilidad: 0.1 µg/mg para el cobre). Se realizaron experiencias en presencia y ausencia de células. Los extractos de la solución sobrenadante también fueron utilizados para evaluar la citotoxicidad en el cultivo a concentración constante, con fines comparativos.

#### Incubación de las células

Las células CHO fueron cultivadas en medio Ham's F10 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Natorcor, Córdoba, Argentina) 100 unidades/ml de penicilina (Gibco) y 10 ug/ml de estreptomina (Gibco) a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Las UMR106 derivadas de osteosarcomas de ratas se cultivaron en condiciones similares pero con DMEM (Gibco) como medio de cultivo.

#### Viabilidad Celular

La viabilidad de las células fue determinada utilizando la mezcla bromuro de etidio/naranja de acridina de acuerdo a lo reportado previamente [23]. Se empleó una alícuota de 5 µL de la mezcla 1:1 de bromuro de etidio (100 µg/mL, Sigma) y naranja de acridina (100 µg/mL, Sigma) que se mezclaba con 50 µL de la suspensión de células. Inmediatamente eran observadas en un

microscopio Olympus BX50 por epifluorescencia equipado con filtros apropiados. Las células viables aparecen como verdes fluorescentes mientras que las células muertas aparecen teñidas de naranja. La densidad de células se expresa como número de células por cm<sup>2</sup> de superficie.

### Resultados

La variación de la concentración de especies de cobre con el tiempo se muestra en la **figura 1**. La concentración fue medida en la solución sobrenadante en contacto con la muestra del cobre metálico. Cada valor corresponde a la acumulación de iones cobre durante el período seleccionado. Se encontró una variación lineal durante las primeras 48 h. Una relación similar con valores ligeramente menores se encuentran en presencia de las células.

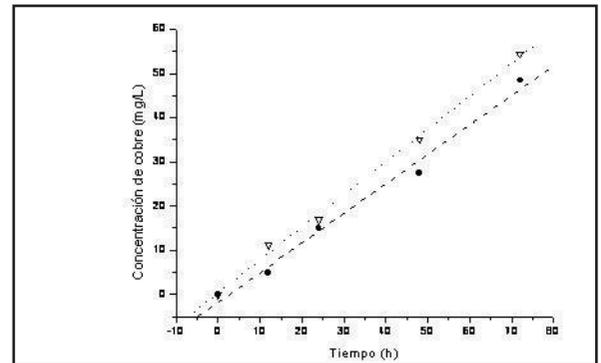


Figura 1: Concentración de iones cobre en el medio de cultivo estéril (▽) y en presencia de células (●)

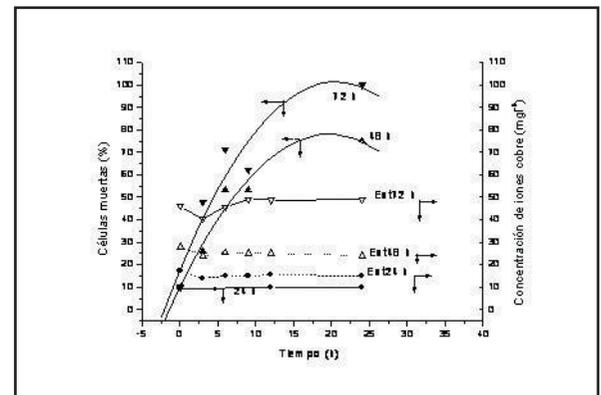
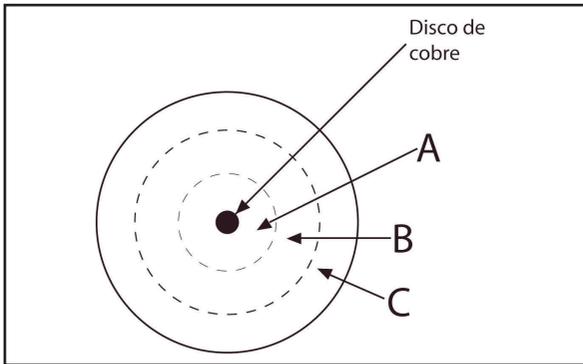


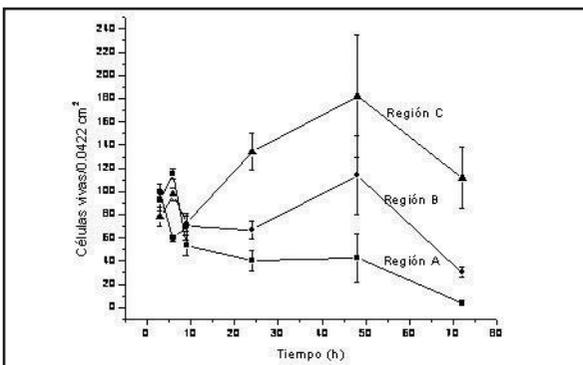
Figura 2: Número de células (UMR106) muertas después de 24, 48 y 72 h; y concentración de células en los extractos después de 24 h (Ext24h), 48 h (Ext48h) y 72 h (Ext72 h).

Si las experiencias se repiten en presencia de un disco de cobre metálico como fuente de iones cobre los resultados varían significativamente si se analiza la variación de la viabilidad en regiones concéntricas al disco de cobre, como indica la **figura 3**.



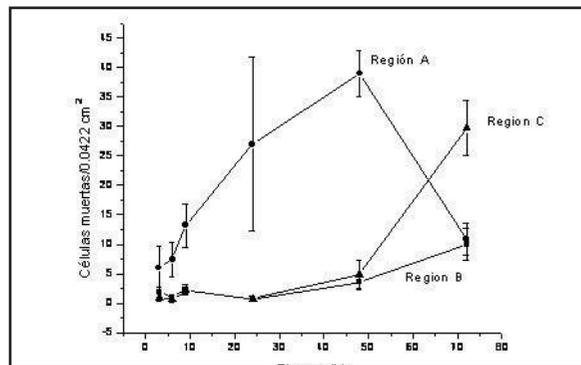
**Figura 3:** Ubicación del disco de cobre y de las regiones A, B y C en la cápsula de cultivo.

Las **figuras 4 y 5** muestran el resultado de la evaluación de células sobrevivientes y muertas para los cultivos de UMR106 en las experiencias realizadas de acuerdo a la distribución indicada en la **figura 3**. Allí se puede observar que los resultados varían de acuerdo a la región (A, B o C). El número de células vivas en las regiones B y C alcanza un máximo a las 48 h debido al crecimiento celular, para luego decrecer debido a la muerte y desprendimiento de células. En la región C el efecto de los iones cobre se observa a partir de las 48 h a través de una disminución del número de células vivas. El decrecimiento del máximo observado en las regiones B y C probablemente se deba a una disminución de la velocidad de crecimiento inducida por los iones cobre.



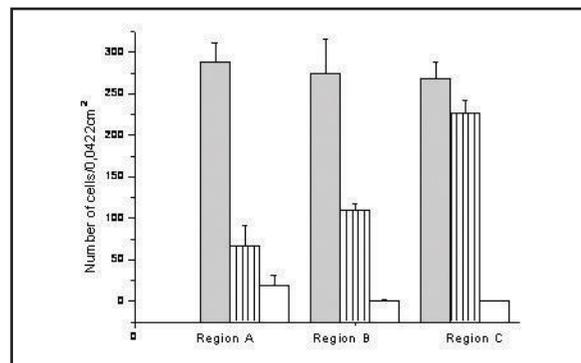
**Figura 4:** Número de células vivas en función del tiempo para las distintas regiones.

La **figura 5** muestra que la variación de células muertas con el tiempo en la región A alcanza un valor máximo para luego disminuir debido al desprendimiento de las células. En las regiones B y C el número de células muertas que permanecen adheridas no se incrementó significativamente durante las primeras 48 h debido a que parte de las células se desprende. A las 72 h se observa que el efecto de los iones cobre afecta significativamente a la región C mostrando un apreciable incremento en las células muertas adheridas, en concordancia con la disminución de células vivas observadas.



**Figura 5:** Variación del número de células muertas con el tiempo de acuerdo a la región.

En la **figura 6** se muestran experiencias similares realizadas con células de ovario para un período de exposición de 24 h en el cultivo con disco de cobre y en el control (barra gris) sin él. Puede observarse que el número de células supervivientes aumenta al incrementar la distancia a la muestra de cobre y el número de células muertas disminuye.



**Figura 6:** Densidad superficial de células supervivientes en el control (sin cobre) (gris) y en el cultivo con cobre (rayado) y células muertas en el cultivo (blanco) luego de una exposición de 24 horas.

## Discusión

Al analizar los resultados obtenidos con los extractos (**figura 2**) debe tenerse en cuenta que en dichas experiencias la concentración de iones cobre no varía ni con el espacio ni con el tiempo. Allí se observa un incremento del número de células muertas con el tiempo de exposición y para un mismo tiempo de exposición un mayor índice de células muertas a mayor concentración de cobre. Estas experiencias difieren notablemente de las realizadas en presencia del cobre metálico donde se observa que el número de células vivas y muertas varía con el tiempo y con la distancia al cobre. En la región A, cercana al cobre, hay muy bajo número de células vivas y el número de células muertas se incrementa con el tiempo, en coincidencia con resultados previos obtenidos en sistemas de distinta geometría <sup>12a</sup>.

La velocidad de crecimiento en las células CHO (**figura 5**) es mayor que en las UMR106 (**figura 4**) alcanzando en el mismo período un mayor número de células (30 % mayor). El número de células muertas (barra blanca) después de 24 h de exposición es menos elevado que en el caso de las células osteoblásticas. El número de células CHO supervivientes crece en el sentido A<B<C (barra rayada) y el de las muertas adheridas decrece: A>B>C (barra blanca). Salvo en la región C, la suma de células vivas y muertas es menor que el número de células del control. Existen dos posibilidades que se hayan desprendidos luego de su lisis o que haya menor reproducción celular. Frente al bajo número de células muertas, es más probable que exista una importante inhibición en la velocidad de crecimiento debido a la presencia del cobre que se manifiesta en un menor número de células vivas adheridas en el cultivo conteniendo cobre que en el control en todas las regiones (especialmente en la A y en la B). En forma similar al caso de los osteoblastos la curva número de células vivas vs. tiempo también pasa por un máximo luego de 48 h de exposición al medio conteniendo cobre.

Las exposiciones por períodos menores de 3 h no causan la muerte de células osteoblásticas aún a concentraciones altas (c.a. 50 mg/L). Además concentraciones de 16 mg/L no reducen el número de células vivas aún después de exposiciones de 24 h. Consecuentemente hay valores de tiem-

po y concentración que son umbrales, debajo de los cuales el efecto de los iones cobre no puede detectarse a través de la enumeración de células. Sin embargo, sí se observan cambios en la velocidad de reproducción celular.

Los resultados reportados sobre corrosión de cobre en medios electrolíticos que simulan la composición de los fluidos uterinos <sup>115-118</sup> muestran la cinética de la liberación del cobre e informan la liberación del mismo en  $\mu\text{g}/\text{día}$ , es decir la masa de iones acumulada durante 24 h de exposición. Sin embargo, las condiciones experimentales descritas son diferentes a las correspondientes a los casos clínicos.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Sr. Raúl Pérez por los análisis por espectroscopia de absorción atómica, al CONICET (PIP 02359), a la ANPCyT (06-12508) a la UNLP (11-1095) y a la CICBA (Res.694/04) por los subsidios recibidos y al Sr. Daniel Cartrogiovanni por la compaginación del artículo.

## Referencias

- 1 Kaga M, Seale NS, Hanawa T, Ferracane JL, Wite DE, Okabe T. Cytotoxicity of amalgams alloys and their elements and phases. *Dent. Mater* 1991; 7: 68-72.
- 2 Yap AU, Ng BL, Blackwood DJ. Corrosion behaviour of high copper dental amalgams. *J Oral Rehabil* 2004; 31:595-99.

- 3 Hujanen ES, Seppa ST, Virtanen K. Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis induced by zinc, copper and nickel in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1245: 145-52.
- 4 Grill V, Syrucci MA, Basa N, Di Lenarda R, Dorigo E, Narducci P, Martelli AM, Delbello G, Bareggi R. The influence of dental metal alloys on cell proliferation and fibronectin arrangement in human fibroblast cultures. *Arch Oral. Biol* 1997; 42: 641-47.
- 5 Kapanen A, Kinnunen A, Ryhänen J, Tuukkanen J. TGF- $\beta$ 1 secretion of ROS-17/2.8 cultures on NiTi implant material. *Biomaterials* 2002; 23: 3341-46.
- 6 Stea S, Visentin NM, Granchi D, Cenni E, Ciapetti G, Sudanese A, Toni A. Apoptosis in peri-implant tissue. *Biomaterials* 2000; 21: 1393-98.
- 7 Huk OL, Catelas IC, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ, Petit A. Induction of apoptosis and necrosis by metal ions in vitro. *The Journal of Arthroplasty* 2004; 19: 84-87.
- 8 Manzl C, Ebner H, Köch G, Dallinger R, Krumschnabel G. Copper, but not cadmium, is acutely toxic for trout hepatocytes: short-term effects on energetics and ion homeostasis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003; 191: 235-44.
- 9 van Kooten TG, Klein CL, Kirkpatrick CJ. Cell-cycle control in cell-biomaterial interactions: expression of p53 and Ki67 in human umbilical vein endothelial cells in direct contact and extract testing of biomaterials. *J Biomed Mater Res* 2000; 52: 199-209.
- 10 Suska F, Gretzer C, Esposito M, Emanuelsson L, Wennerberg A, Tengvall P, Thomsem P. In vivo cytokine secretion and NF- $\kappa$ B activation around titanium and copper implants. *Biomaterials* 2005; 26: 519-27.
- 11 Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 37: 1921-42.
- 12 Cortizo MC, Fernández Lorenzo de Mele M, Cortizo AM. Biocompatibility of osteoblast-like cells: Correlation with metal ions release. *Biol Trace Elem Res* 2004; 100: 151-68.
- 13 Bastidas JM, Mora N, Cano E, Pólo JL. Characterization of copper corrosion products originated in simulated uterine fluids on package intrauterine devices. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12: 391-97.
- 14 Cortizo MC, Fernández Lorenzo de Mele M. Cytotoxicity of copper ions released from the metal. Variation with exposure period and concentration gradients. *Biological Trace Elements Research* 2004; 102: 129-43.
- 15 Zhang C, Xu N, Yang B. The corrosion behaviour of copper in simulated uterine fluid. *Corrosion Science* 1995; 38: 635-41.
- 16 Mora N, Cano E, Mora EM, Bastidas JM. Influence of pH and oxygen on copper corrosion in simulated uterine fluid. *Biomaterials* 2002; 23: 667-71.
- 17 Xu T, Lei H, Cai SZ, Xia XP, Xie CS. The release of cupric ion in simulated uterine: New material nano-Cu/low-density polyethylene used for intrauterine devices. *Contraception* 2004; 70: 153-57.
- 18 Cai S, Xia X, Xie C. Corrosion behavior of copper/LDPE nanocomposites in simulated uterine solution. *Biomaterials* 2005; 26: 2671 – 76.
- 19 Locci P, Marinucci L, Lilli C, Belcastro S, Staffolani N, Bellocchio S, Damiani F, Becchetti E. Biocompatibility of alloys used in orthodontics evaluated by cell culture tests. *J Biomed Mater Res* 2000; 51: 561-68.
- 20 Craig RG, Hanks CT. Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *J Dent Res* 1990; 69: 1539-42.
- 21 Granchi DG, Ciapetti G, Savarino L, Cavedagna D, Donati ME, Pizzoferrato A. Assessments of metal extract toxicity on human lymphocytes cultured in vitro. *J Biomed Mater Res* 1996; 31: 183-91.
- 22 Bumgardner JD, Lucas CL. Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys. *J Dent Res* 1995; 74: 1521-27.
- 23 González M, Sloloneski S, Reigosa MA, Larramendy ML. Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro IV. DNA damage and repair kinetics assessed by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Research* 2003; 534: 145-54.
- 24 Stewart PS. A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotech and Bioeng* 1998; 59: 261-72.

## Comparison of copper cytotoxic effect on ovarian and osteoblastic cells.

Reigosa M, Labarta V, Gómez de Saravia SG, Fernández Lorenzo de Mele M.  
*Rev Fac Cien Med (Quito) 2008; 33: 78-83.*

### Summary

**Background:** Copper may be used either pure or in alloys employed for dental biomaterial and contraceptive intrauterine devices (IUD).

**Objective:** The present study analyses copper cytotoxic effect on osteoblastic UMR 106 and ovarian cell from Chinese hamsters (CHO K1).

**Methods:** Cells were cultured in capsules containing a central pure-copper disk. A simultaneous analysis was performed in control without copper. After different exposure times from 3 h to 72 h, the number of live and dead cells and under similar laboratory conditions was measured after several immersion times.

**Results:** We observed that in the presence of copper, the number of dead cells decreased as copper-cell distance was longer, and increased as exposure time was extended. No effect was observed below some threshold exposure times and concentrations. Cell reproduction speed was lower when metallic ions were present, showing higher cytotoxic effect for bone cell lines.

**Key words:** Cytotoxic, copper, osteoblasts, intrauterine device, IUD.

**Conclusion:** The copper exposition do not reduce the number of life cells, however, it produces changes in the velocity of reproduction of both, ovarian and osteoblastic cells.