

ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DE ELEMENTOS DE LIGAS METÁLICAS UTILIZADAS COMO BIOMATERIAIS

Sizue Ota Rogero¹; Mitiko Saiki¹; Áurea Silveira Cruz²; Rezolina Pereira Santos²;
José Roberto Rogero¹; Isolda Costa¹

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – 05508-000 – São Paulo, SP, Brasil

sorogero@ipen.br

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP

²Instituto Adolfo Lutz – Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 - São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

A citotoxicidade dos íons de Co, Cr, Cu e Ni foi avaliada pela técnica de incorporação do vermelho neutro utilizando soluções padrão destes elementos em meio de cultura celular em diferentes tempos de incubação, em soluções mono ou multielementares. Os resultados obtidos indicaram que soluções recém preparadas em meio de cultura, não apresentaram toxicidade. Dentre as soluções contendo um único metal, somente a que continha íons de Cu apresentou toxicidade quando incubada a 37°C durante 9 dias. As soluções multielementares preparadas com a combinação de 2 a 4 metais apresentaram toxicidade, com exceção das soluções mistas de Co/Cr e Co/Ni, sendo que a maior toxicidade foi observada na solução mista de Cr/Ni com índice de citotoxicidade $IC_{(50\%)} < 1$. Os resultados obtidos mostraram que a citotoxicidade de metais depende não só do tempo de incubação, mas também da combinação dos diferentes elementos lixiviados pelo processo de corrosão.

Palavras chave: Biomateriais metálicos, Citotoxicidade, Biocompatibilidade.

INTRODUÇÃO

A biocompatibilidade é um dos principais requisitos dos biomateriais. O termo biocompatibilidade envolve dois fenômenos associados na mesma situação: o implante do material não pode ser afetado pelo meio fisiológico e os tecidos na proximidade do implante ou distantes não podem sofrer danos pela presença do material. Efeitos adversos nos materiais de implante são, por exemplo, corrosão de implantes metálicos e cerâmicos ou degradação de polímeros pelos fluídos do corpo. Efeitos locais desfavoráveis são caracterizados por necrose ou reabsorção dos tecidos, reações celulares e ação de bactérias que podem resultar em infecções. As possíveis reações sistêmicas são: hipersensibilidade, toxicidade e carcinogenicidade ⁽¹⁾.

Segundo a *International Organization for Standardization* (ISO) ⁽¹⁾, a seleção e avaliação de qualquer material ou dispositivo com pretensão de uso em humanos requer um programa estruturado de avaliação. A ISO 10993 tem como função oferecer estrutura para planejamento de uma avaliação biológica. Esta avaliação deve ser planejada e realizada por peritos com conhecimento e experiência suficientes para poder tomar decisões sobre as vantagens e desvantagens dos vários materiais e procedimentos de testes disponíveis. Para a seleção apropriada dos testes iniciais de avaliação para cada dispositivo e/ou material e seu tempo de contato, a ISO contém um guia de testes.

Os ensaios *in vitro* são normalmente efetuados como um teste de triagem inicial na primeira fase da avaliação da biocompatibilidade. A avaliação *in vitro* pode fornecer dados rápidos e financeiramente acessíveis sobre interações biológicas. Os testes *in vitro* minimizam o uso de animais em pesquisa, por exemplo, materiais que causam coagulação e que são incompatíveis com células, geralmente não merecem uma avaliação *in vivo*.

Citotoxicidade significa causar efeito tóxico no nível celular. O efeito tóxico pode ser morte celular, alterações na permeabilidade da membrana, inibição enzimática, etc. É uma técnica que utiliza cultura celular e que pode ser medida quantitativamente pela lise das células (morte celular), inibição de crescimento

celular, e outros efeitos causados nas células pelos dispositivos, materiais e/ou seus extratos. As células usadas para cultura são adquiridas de linhagem estabelecidas e fornecidas por revendedores biológicos ou bancos celulares ou de tecidos, como a *American Type Tissue Culture Collection* (ATCC), devido a apresentarem boa reprodutibilidade, eficiência e disponibilidade ⁽²⁾.

A avaliação da toxicidade de íons metálicos é de grande interesse para o desenvolvimento de novos materiais metálicos com superior biocompatibilidade. Em estudos anteriores, produtos de corrosão de ligas metálicas em meio de cultura celular, com potencialidade para uso como biomateriais, foram analisados pela técnica de ativação com nêutrons e quanto a toxicidade pelo ensaio de citotoxicidade, visando a identificação dos elementos metálicos responsáveis pela toxicidade ⁽³⁻⁸⁾. Os elementos identificados que poderiam estar associados com citotoxicidade foram o Co, Cr, Cu e Ni, sem, entretanto, estabelecer-se quais destes seriam responsáveis pela citotoxicidade observada.

Neste trabalho foi estudada a citotoxicidade de íons metálicos de Co, Cr, Cu e Ni em solução que simula meio fisiológico, os quais haviam sido identificados nos produtos de corrosão de ligas metálicas. A citotoxicidade foi avaliada pelo método de incorporação do vermelho neutro utilizando soluções padrão destes elementos em meio de cultura celular em diferentes concentrações, tempos de incubação, bem como em soluções mono ou mutielementares.

O objetivo deste trabalho foi investigar quais os elementos ou a associação deles, assim como as suas concentrações, que estariam ocasionando citotoxicidade.

METODOLOGIA

O estudo de biocompatibilidade de materiais para uso como biomateriais se inicia com o teste de citotoxicidade que consiste de um ensaio *in vitro* utilizando-se cultura de células de mamíferos, de acordo com normas internacionais ^(1,2).

A metodologia utilizada é a da incorporação do vermelho neutro, onde o extrato do material a ser analisado sofre diluição seriada e é colocado em contato com uma cultura de células da linhagem NCTC L929 da ATCC, e o resultado é

avaliado pela viabilidade celular que é medida pela incorporação do corante vital vermelho neutro pelas células vivas e não lesadas ⁽⁹⁾.

Baseado em resultados de trabalhos anteriores ^(3,5,7,8,10) o ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando-se soluções de íons metálicos em meio de cultura celular (MEM-uso), preparadas utilizando soluções padrão dos elementos Co, Cr, Cu e Ni adquiridas da Spex Certiprep, USA. As concentrações dos elementos nos produtos de corrosão, determinadas de extratos de ligas metálicas pela análise por ativação neutrônica (AAN), estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações de elementos nos produtos de corrosão das ligas metálicas analisadas por AAN, e apresentadas em trabalhos anteriores ⁽³⁻⁸⁾.

Tipos de Material		Aço 444	Aço 17-4PH	Aço 17-4PH PIM	Aço 316L	Aço 316L PIM	Brinco Studex	Brinco Perfur	Brinco de Ti
Concentração dos metais ng.mL ⁻¹ (10dias de extração)	Cr	47	50	143	174	156	0,01	0,01	0,03
	Ni	nd	nd	~ 0	~ 0	~ 0	0,66	0,96	nd
	Co	11	19,1	6,3	6,6	8,8	86,9	49,5	41,7

nd = não detectado

Os aços 316L e 316L PIM e os materiais usados na fabricação dos brincos perfurantes Studex e Perfur mostraram citotoxicidade. Portanto, os resultados indicaram que os elementos responsáveis por este efeito foram provavelmente Co, Cr e Ni, encontrados nos extratos analisados pela análise por ativação neutrônica.

Como o substrato do brinco Perfur era constituído de liga de Zn/Cu e este tipo de brinco apresentou forte toxicidade, o Cu foi analisado por absorção atômica no extrato, sendo encontrado nível < 5µg/mL. Devido a este fato, o efeito do Cu foi investigado neste estudo.

Partindo de soluções estoques foram preparadas soluções dos íons metálicos em concentrações mais altas que aquelas obtidas nos extratos das ligas estudadas. Na Tabela 2 estão apresentados dados das soluções padrão estoque dos elementos Co, Cr, Cu e Ni utilizadas bem como as concentrações das

soluções diluídas preparadas para uso no ensaio de citotoxicidade. As diluições foram realizadas com meio de cultura celular (MEM uso), simulando o extrato 100%.

Tabela 2. Soluções padrão dos metais utilizados e concentrações preparadas.

Elementos	Soluções Padrão Estoque de Elementos	Concentração da Solução (extrato 100%)
Co	1001±3 mg.L ⁻¹ – 2% HNO ₃ lote 8-11 CO PLCO ₂ – 2X/2Y/2T	1µg.mL ⁻¹
Cr	1002±3 mg.L ⁻¹ lote 8-15 CR	2 µg.mL ⁻¹
Cu	10011,5±30 mg.L ⁻¹ lote 07-49 Cu X/Y	50 µg.mL ⁻¹
Ni	9980,5±30 mg.L ⁻¹ lote 07-61 Ni	99,8 ng.mL ⁻¹

No ensaio de citotoxicidade com as soluções de elementos recém preparadas nas concentrações descritas na Tabela 2, não apresentaram toxicidade, tanto isoladamente como em diferentes associações.

Foram então realizados ensaios de citotoxicidade usando soluções recém preparadas em concentrações mais elevadas destes elementos, isto é, cerca de 100 vezes mais concentradas que aquelas encontradas nos produtos de corrosão dos biomateriais testados e, estas novas soluções, seja as com elementos individuais ou em diferentes associações, também não mostraram citotoxicidade (10).

Estes resultados sugeriram que o efeito do tempo de contato poderia ser um fator importante no ensaio de citotoxicidade, considerando que nos trabalhos anteriores com ligas metálicas, o ensaio de corrosão teve duração de 10 dias, e durante este período os íons metálicos liberados ficaram em contato com os aminoácidos e os vários complexos existentes no meio de cultura, à temperatura de 37°C. Neste período pode ter havido fixação ou ligação dos íons metálicos com componentes do meio de cultura MEM uso (meio mínimo de Eagle com adição de aminoácidos não essenciais e soro fetal bovino), e os complexos assim formados

poderiam facilitar a entrada dos íons metálicos nas células, provocando alteração e, conseqüentemente, citotoxicidade.

Provavelmente devido à preparação das soluções metálicas um pouco antes do uso na realização do teste, ou seja, baixo tempo de contato, pode não ter ocorrido ligação da maioria dos íons metálicos com os complexos do meio de cultura, dificultando assim sua penetração nas células e, portanto, não causando toxicidade no ensaio.

Diante dos resultados anteriormente obtidos resolveu-se preparar as soluções dos íons metálicos considerando as mesmas condições de tempo de extração de 10 dias e temperatura de 37°C.

Foram preparadas soluções individuais e com associações de Co (8µg mL⁻¹), Cr (8µg mL⁻¹), Cu (40µg mL⁻¹) e Ni (5µg mL⁻¹) em MEM uso, cujas composições são dadas na Tabela 3.

Tabela 3. Concentrações de elementos nas soluções utilizadas no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

Extrato n°	Concentrações de Elementos (µg mL ⁻¹)			
	Co	Cr	Cu	Ni
1	8	-	-	-
2	-	8	-	-
3	-	-	40	-
4	-	-	-	5
5	8	8	-	-
6	8	-	40	-
7	8	-	-	5
8	-	8	40	-
9	-	8	-	5
10	-	-	40	5
11	8	8	40	-
12	8	8	-	5
13	8	-	40	5
14	-	8	40	5
15	8	8	40	5

As soluções (extratos) preparadas como descritas na Tabela 3 foram incubadas a 37°C durante 10 dias. Estas condições foram as mesmas utilizadas no ensaio de citotoxicidade para materiais metálicos ⁽⁹⁾.

Paralelamente foi preparada microplaca contendo células partindo do cultivo celular em garrafa de cultura. Após a obtenção de uma monocamada celular foi feito o destaque das células com uma solução de tripsina e preparada uma suspensão celular contendo $2,5 \times 10^5$ células mL⁻¹. Foram distribuídos 200µL desta suspensão em cada poço da microplaca de 96 poços. A microplaca foi colocada em incubadora úmida com 5% CO₂, na temperatura de 37°C por 24h.

No ensaio, as soluções que foram incubadas por 10 dias a 37°C foram diluídas (100; 50; 25; 10 e 1%) e colocadas em contato com as células nos poços da microplaca, em triplicata. Os extratos dos materiais utilizados como controle negativo (que não causa toxicidade) e controle positivo (que causa toxicidade) foram diluídos da mesma forma e, também, colocados em contato com as células na microplaca. Nos poços utilizados como controle de células foi colocado meio MEM uso fresco, e estes poços corresponderam a 100% de viabilidade das células.

Após 24h de contato, os extratos foram substituídos por solução de vermelho neutro em MEM, deixado por 3h em estufa a 37°C, para incorporação deste corante pelas células vivas. Decorrido este tempo, a microplaca foi lavada por duas vezes com solução tampão fosfato-salina (pH 7,4) e uma vez com solução de lavagem (CaCl₂ 1% em formol 0,5%). A leitura do teste foi feita após a ruptura das células com a solução de leitura, álcool/ácido acético (1/1), em espectrofotômetro leitor de ELISA, Sunrise da Tecan, em 540nm.

Os cálculos de viabilidade celular foram realizados com as leituras de densidade óptica (DO) e estes dados representados em gráfico em função da concentração do extrato foram traçadas as curvas de viabilidade celular e obtido o índice de citotoxicidade IC_{50%}. O IC_{50%} significa a concentração do extrato que lesa ou provoca a morte de 50% da população celular no ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de viabilidade celular obtidos para diferentes concentrações de extrato foram colocados em gráfico para obtenção dos índices de citotoxicidade.

O material testado é considerado não tóxico quando sua curva de viabilidade celular fica acima da linha correspondente a 50% para todas as concentrações, no gráfico obtido no ensaio. Quando a curva de viabilidade celular cruza a linha de 50%, o índice de citotoxicidade do material testado é obtido do eixo da concentração do extrato, no ponto do cruzamento.

Na Fig. 1 estão apresentadas as curvas de viabilidade celular dos íons metálicos Co, Cr, Cu e Ni, testados individualmente. Nesta Figura pode ser observado que somente o Cu apresentou toxicidade, semelhante ao controle positivo, com $IC_{50\%}$ de 43% e 40%, respectivamente. Os metais Co, Cr e Ni individualmente não apresentaram toxicidade, mesmo em concentrações cerca de 100 vezes maior que as encontradas nos produtos de corrosão das ligas metálicas que apresentaram citotoxicidade ⁽¹⁰⁾.

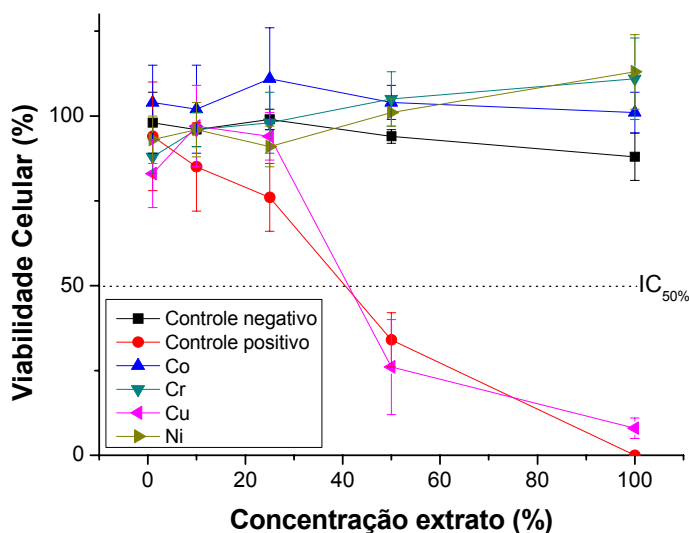


Figura 1. Curvas de viabilidade celular das soluções dos metais individuais obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

Na Fig. 2 estão apresentadas as curvas de viabilidade celular das soluções onde foram associados dois a dois os vários tipos de íons metálicos testados. Pode-se verificar que todas as soluções que continham Cu associado com outros metais apresentaram toxicidade. Quando este elemento foi associado com Co, Cr e Ni, o índice de citotoxicidade, $IC_{50\%}$ foi de 57%, 43% e 39%, respectivamente. Vale ressaltar que o Cu sozinho na solução já mostrou toxicidade (Fig.1). A associação do Cr com o Ni resultou em forte toxicidade, mesmo na menor diluição testada, de 1%, onde provocou a morte de praticamente 100% da população celular no ensaio. O Co associado ao Cr ou ao Ni não apresentou toxicidade, mas na associação destes três metais foi observado que o Co atenua o nível de toxicidade do Cr/Ni, observado na Fig.3, onde o $IC_{50\%}$ foi de 80, muito menos tóxico que o $IC_{50\%}$ do Cr/Ni, < 1.

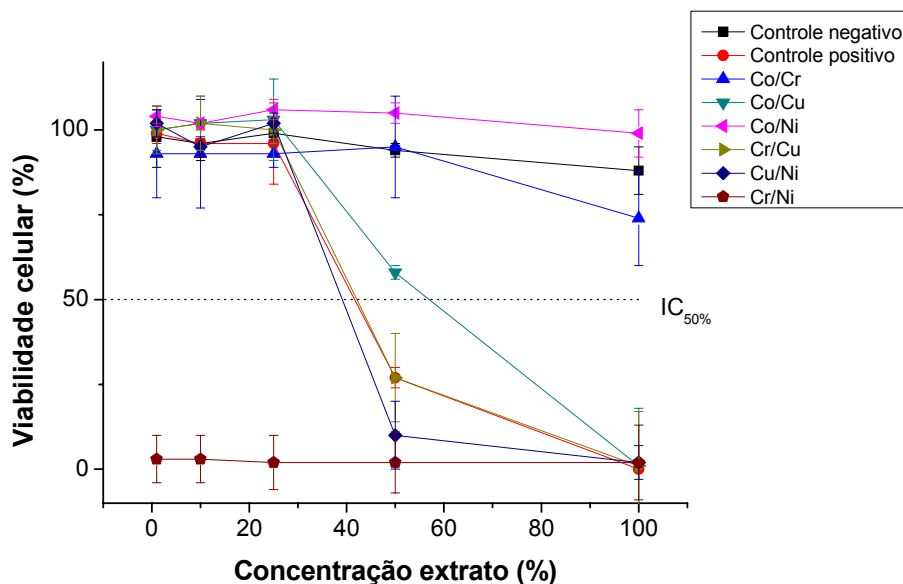


Figura 2. Curvas de viabilidade celular das soluções contendo íons metálicos associados dois a dois, obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

Na associação dos elementos três a três todas as soluções mostraram comportamento semelhante ao controle positivo, com índices de citotoxicidade de 42% (controle positivo), 60% (Co, Cr e Cu), 54% (Co, Cu e Ni), 40% (Cr, Cu e Ni),

80% (Co, Cr e Ni) e 40% (Co, Cr, Cu e Ni), novamente observando-se toxicidade em todas as soluções onde o cobre esteve presente.

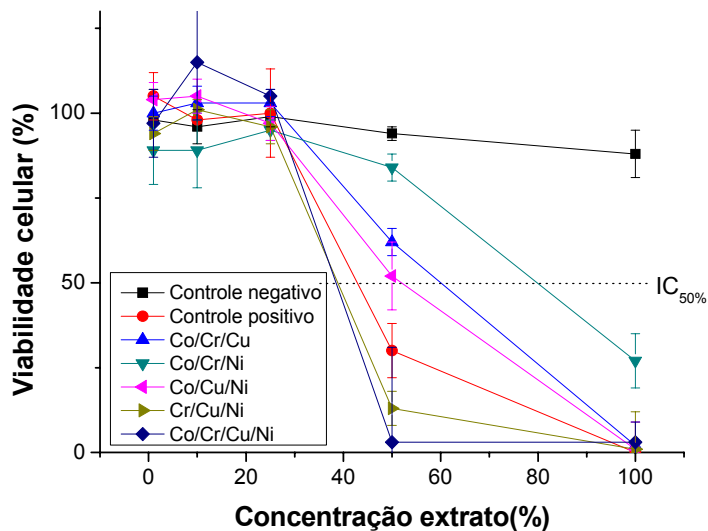


Figura 3. Curvas de viabilidade celular de soluções contendo associação de 3 e 4 elementos, obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

CONCLUSÕES

A citotoxicidade de ligas metálicas depende não só do tempo de incubação, mas também da combinação dos diferentes elementos lixiviados pelo processo de corrosão.

Todos os elementos quando presentes juntamente com o Cu mostraram toxicidade, nas concentrações utilizadas neste trabalho.

Os resultados mostraram que a associação entre os elementos Cr e Ni em solução fisiológica provoca alta toxicidade porém quando se adiciona Co há uma atenuação desta toxicidade.

Os elementos Co, Cr e Ni isoladamente não apresentaram citotoxicidade, assim como as soluções contendo Co associado ao Cr ou ao Ni.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio às pesquisas e bolsas de estudos.

REFERÊNCIAS

1. ISO document 10993-1, 1992 Biological evaluation of medical devices, Part 1, Guidance on selection of tests.
2. ISO document 10993-5, 1992 Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.
3. ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. ***Toxicology in Vitro*** 14(6): 497-504, 2000.
4. SAIKI, M.; ROGERO, S.O.; COSTA, I.; CORREA, O.V.; HIGA, O.Z. Characterization of ear piercing studs and their corrosion products by NAA. ***J.Radioanal.Nucl.Chem.***, v.248, n.1, p. 133-136, 2001.
5. ROGERO, S.O.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; ROGERO, J.R.; COSTA, I. Estudo da corrosão de aços inoxidáveis utilizados como biomateriais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, XV, 2002, Natal. ***Anais do XV CBECIMAT***, 2002. 1 CD-ROM
6. ASSIS, S.L.; ROGERO, S.O.; PADILHA, A.F.; COSTA, I. In vitro corrosion resistance of a superferritic stainless steel in Hank's solution. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA MECÂNICA, 2003, São Paulo. ***Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Mecânica***. 2003.
7. COSTA, I.; ROGERO, S.O.; CORREA, O.V.; KUNIOSHI, C.T.; SAIKI, M. Corrosion and cytotoxicity evaluation of AISI 316L stainless steel produced by powder injection molding (PIM) technology. In: FOURTH INTERNATIONAL LATIN-AMERICAN CONFERENCE ON POWDER TECHNOLOGY, 2003, Guarujá. ***Proceedings of Fourth International Latin-American Conference on Powder Technology***, 2003.
8. COSTA, I.; CORREA, O.V.; ROGERO, S.O.; SAIKI, M. Estudo comparativo da resistência à corrosão e citotoxicidade do aço 17-4PH obtido por metalurgia convencional e por moldagem de pós por injeção. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 28/11 – 02/12 2004, Porto Alegre. ***Anais do XVI Cbecimat***, 2004, 1 CD-ROM
9. ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. ***Mater. Res.*** v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
10. ROGERO, S.O.; SAIKI, M.; COSTA, I. Citotoxicidade de ligas metálicas utilizadas como biomateriais. CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CORROSÃO – LATINCORR2006, 21-26/05 2006, Fortaleza. ***Anais do Latincorr2006***, CD-ROM

CYTOTOXICITY STUDY OF ELEMENTS LIBERATED FROM METALLIC ALLOYS USED AS BIOMATERIALS

ABSTRACT

Cytotoxicity of Co, Cr, Cu and Ni ions was evaluated by neutral red uptake technique utilizing standard solutions of these elements in cell culture medium for different incubation times and in single and multielemental solutions. Results obtained in these experiments showed that newly prepared solutions using culture medium do not present toxicity. Among the solutions containing a single element just one with Cu showed toxicity after 9 days of incubation at 37°C. Multielemental solutions prepared by the combination of 2 to 4 elements showed cytotoxicity with exception of those mixed solutions of Co/Cr and of Co/Ni. The highest toxicity was observed in Cr/Ni mixed solution with cytotoxicity index $IC_{(50\%)} < 1$. These results indicated that the cytotoxicity of metals does not depend only on the incubation time but also on the combination of different elements leached by the corrosion process of metallic alloys.

Key-words: Metallic biomaterials, Cytotoxicity, Biocompatibility