



**Rita Maria  
Cerejeira Matos**

**Efeitos do Crómio-Cobre-Arsenato (CCA) em  
ratinhos: estudos morfológicos e analíticos.**



**Rita Maria  
Cerejeira Matos**

**Efeitos do Crómio-Cobre-Arsenato (CCA) em  
ratinhos: estudos morfológicos e analíticos.**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob a orientação científica da Prof<sup>a</sup> Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

*"We must be the change we wish to see in the world."*

Mahatma Gandhi

Aos meus Pais.

## **O júri**

Presidente

Professor Doutor Júlio Domingos Pedrosa da Luz de Jesus  
Professor Catedrático.  
Universidade de Aveiro.

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira  
Professora Associada com Agregação.  
Universidade de Aveiro.

Professora Doutora Simone Barreira Morais  
Professora Adjunta.  
Instituto Superior de Engenharia do Porto.

## agradecimentos

A realização deste trabalho foi conseguida devido à colaboração de várias pessoas e laboratórios, a quem agradeço.

Ao Professor Doutor Júlio Pedrosa por me ter dado a oportunidade de continuar no mundo da investigação e me ter dado a conhecer a UA.

Ao Departamento de Biologia, ao CICECO e ao Grupo de Reacção e Análises Químicas (GRAQ), pelo acolhimento e pelas facilidades de recursos que me disponibilizaram.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, por tudo: pela paciência, pela motivação, por acreditar nas minhas capacidades e potencialidades; por me ter deixado aprender, seguindo a curiosidade e libertando-me para a globalidade da Ciência; pelo exemplo do saber estar, pela ética, e pela humanidade.

À Professora Doutora Cristina Matos por ter permitido e facilitado a utilização dos laboratórios da GRAQ.

À Professora Doutora Simone Morais por tudo também. Pela energia positiva e alegria do estar no laboratório, pela vontade de conseguir atingir os objectivos propostos, pela determinação e pela força da sua pessoa; pelo enquadramento de um sorriso de um acreditar que se vai conseguir.

À Professora Doutora Teresa Margarida dos Santos pelas dicas ao trabalho.

Ao Senhor Aldiro e companhia. As palavras não chegam para descrever todo o carisma e humanidade.

À Professora Doutora Conceição Santos e à sua equipa, pela permissão e ajuda no uso do Citómetro de Fluxo e pelo espírito de grupo demonstrados.

Ao Professor Doutor Amadeu Soares e à sua equipa, pela permissão de usar o espectrofotómetro e o leitor de placas e pela união, simpatia e disponibilidade constantes que reina no laboratório.

Ao Professor Doutor Fernando Gonçalves e ao seu grupo, por terem mostrado sempre simpatia e disponibilidade.

Ao Professor Doutor Bruno Santos pela simpatia de ajudar a desvendar os segredos do stress oxidativo.

Ao Professor Doutor João Serôdio e ao seu grupo, sempre com um sorriso, pelo uso do espectrofotómetro.

À Professora Doutora Aurora pela ajuda preciosa que acrescentou ao trabalho.

À Helena Oliveira pela amizade, ajuda, profissionalismo e curiosidade em querer atingir mais, melhor e com qualidade...sempre!

Ao Ricardo das Neves por ter sido o impulsor de todo este trabalho, e por me ter ajudado muito no início do mesmo.

À Paula Paíga (Paulinha) pelo exemplo de força de vontade, de ética, de capacidade, de ajuda, de preocupação com os outros, e de amizade.

À Catarina Vieira pela capacidade de trabalho, boa disposição e prontidão na ajuda.

À Tânia Silva, à "Tina" Lopes, à Luisa Filipe, à Renata Tavares, ao Eleazar Rodriguez, ao António Coelho e à Mónica Ferreira pela simpatia e ajuda ao longo do trabalho.

À Márcia Bessa pela ajuda no arranque do stress oxidativo.

À Isabel Teixeira e à Filipa Teixeira pela ajuda e alegria que deram ao trabalho.

A todos os meus amigos.

Aos meus Pais porque merecem o mundo!

## palavras-chave

CCA, nefrotoxicidade, histologia, espectrometria de absorção atômica por atomização electrotérmica (GFAAS), citometria de fluxo (FCM), necrose tubular aguda (ATN).

## resumo

O Crómio-Cobre-Arsenato (CCA) é um protector da madeira, contendo crómio, cobre e arsénio. Apesar de em 2002, a agência de protecção ambiental (EPA) ter limitado a utilização da madeira tratada com CCA, a contaminação do ambiente e o perigo para a saúde pública permanece, devido à grande durabilidade desta madeira.

O principal objectivo deste trabalho foi analisar a toxicidade aguda do CCA em ratinhos. O desenvolvimento e optimização de uma metodologia de quantificação do arsénio e do crómio total nos rins de ratinhos foi também um outro objectivo. Realizaram-se experiências para caracterizar os efeitos causados pelo CCA e pelos compostos individuais (pentóxido de arsénio –  $As_2O_5$ ) e (trióxido de crómio –  $CrO_3$ ) em vários órgãos de ratinhos. Os animais foram divididos em dezasseis grupos, correspondendo a diferentes tempos de exposição. Os grupos de tratamento receberam uma injeção subcutânea (0,3 mL) de CCA,  $CrO_3$  e  $As_2O_5$ . Aos animais controlo foi administrado o veículo (soro fisiológico). Após 14h, 24h, 48h e 96h procedeu-se ao abate dos animais e à remoção dos rins, timo, fígado, baço, testículo e epidídimo. Realizaram-se análises histológicas e histoquímicas dos rins de animais provenientes de todos os grupos. Procedeu-se a estudos de citometria de fluxo (FCM) para a análise do ciclo celular. Efectuou-se ainda um estudo preliminar para determinação da actividade da catalase (CAT) e da glutathione – S – transferase (GST) em amostras de rim. Por fim, realizou-se uma análise quantitativa destes compostos por espectrometria de absorção atômica com atomização electrotérmica (GFAAS), após a digestão das amostras pela tecnologia de microondas.

O estudo histológico revelou necrose tubular aguda (ATN) nos animais expostos ao CCA e ao  $CrO_3$ . Contudo, não se observaram quaisquer lesões significativas nos outros órgãos. Por esta razão, o estudo foi direccionado para o rim. A análise por citometria de fluxo (FCM) evidenciou a existência de diferenças significativas no ciclo celular dos grupos expostos ao  $As_2O_5$  e ao CCA. Os ensaios bioquímicos revelaram uma tendência para a diminuição da actividade das enzimas CAT e GST, embora sem diferenças estatísticas significativas. A análise quantitativa demonstrou uma diminuição progressiva da acumulação de crómio e de arsénio nos rins. Por outro lado, observou-se que a distribuição de crómio e de arsénio era diferente para os diferentes grupos de tratamento.

Por fim, o presente trabalho permite concluir que a nefrotoxicidade provocada pelo CCA nos ratinhos é muito mais acentuada do que a induzida pelo  $As_2O_5$  e pelo  $CrO_3$ , e alerta para o potencial tóxico do CCA para a saúde pública.

**keywords**

CCA, nephrotoxicity, histology, graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), flow cytometry (FCM), acute tubular necrosis (ATN).

**abstract**

Chromated copper arsenate (CCA) is a chemical wood preservative protecting timber from natural deterioration, containing chromium, copper and arsenic. Although on 2002, Environmental Protection Agency (EPA) had limited the use of CCA-treated wood, the environment contamination and the hazard to the public health will pursue due to the durability of this wood for 60 years.

The main aim of the present work was the assessment of the acute toxicity of CCA, using mice as models. The development of a quantification methodology for chromium and arsenic in mice kidneys was another goal. In these studies, it was designed a set of experiments to investigate the effects caused by CCA, and the individual effects induced by arsenic pentoxide ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ) and chromium trioxide ( $\text{CrO}_3$ ) in thymus, liver, spleen, testis, epididymis and kidney. Sixteen groups of five animals each were considered in these studies, corresponding to different times of exposure. Treated groups received a single subcutaneous injection (0,3mL) of CCA,  $\text{CrO}_3$  and  $\text{As}_2\text{O}_5$ . In addition, control animals were administrated with the vehicle only. Following 14h, 24h, 48h and 96h animals were sacrificed, for organs removal. Afterwards, body and organs weights were also recorded. Subsequently, histology and histochemistry analysis was done. Furthermore, flow cytometry (FCM) approach was also considered for determination of cell cycle. Additionally, a set of preliminary enzyme assays was done to study the oxidative stress stimulated by these treatments. At last, the quantification of these compounds was also performed in kidney samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), after the digestion of the samples by microwave technology.

The histology results, as confirmed by histochemistry, revealed acute tubular necrosis (ATN) induced by CCA and  $\text{CrO}_3$ . Moreover, while FCM analysis revealed differences in cell cycle, enzyme assays showed a tendency to the decrease of the activities of CAT and GST. Finally, quantitative assays demonstrated a progressive decrease of the accumulation of CCA, arsenic and chromium during de exposure time, although no changes were observed within the other organs. For this reason, kidneys were carefully investigated.

These results indicated that CCA-induced nephrotoxicity was more prominent than those caused by  $\text{As}_2\text{O}_5$ , and  $\text{CrO}_3$ , which is an alert for its potential toxic effects on human health.

# Índice



## Índice

|  |               |
|--|---------------|
| <b>Capítulo I – Enquadramento do trabalho</b> -----  | <b>Pág. 1</b> |
| <b>I.1. Enquadramento do trabalho</b> -----  | <b>Pág. 1</b> |
| <b>I.2. Estrutura e apresentação da dissertação</b> -----  | <b>Pág. 2</b> |
| <b>Capítulo II – Introdução</b> -----  | <b>Pág. 3</b> |
| <b>II.1. Introdução</b> -----  | <b>Pág. 3</b> |
| <b>II.2. Considerações legislativas</b> -----  | <b>Pág. 4</b> |
| <b>II.3. Fontes de exposição, transporte e bio-monitorização</b> -----                               | <b>Pág. 5</b> |
| <b>II.4. Modelos para o estudo de toxicidade</b> -----   | <b>Pág. 7</b> |
| <b>II.5. Exposição humana</b> -----  | <b>Pág. 8</b> |
| <b>II.6. Objectivos e justificação do trabalho</b> -----   | <b>Pág. 9</b> |
| <b>Capítulo III – Materiais e Métodos</b> -----  | <b>Pág.11</b> |
| <b>III.1. Reagentes e Soluções</b> -----   | <b>Pág.11</b> |
| <b>III.1.1. Reagentes</b> -----  | <b>Pág.11</b> |
| <b>III.1.2. Soluções</b> -----   | <b>Pág.11</b> |
| <b>III.2. Animais</b> -----  | <b>Pág.12</b> |
| <b>III.3. Protocolo de administração de CCA, As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e CrO<sub>3</sub></b> ----- | <b>Pág.12</b> |
| <b>III.4. Análise da solução de CCA</b> -----  | <b>Pág.13</b> |
| <b>III.5. Estudos Histológicos e Histoquímicos no rim</b> -----                                      | <b>Pág.13</b> |
| <b>III.5.1. Identificação de polissacarídeos</b> -----   | <b>Pág.14</b> |
| <b>III.5.2. Identificação de proteínas</b> -----   | <b>Pág.14</b> |
| <b>III.6. Estudos de citometria de fluxo (FCM)</b> -----   | <b>Pág.14</b> |
| <b>III.7. Estudos Bioquímicos</b> -----  | <b>Pág.15</b> |
| <b>III.7.1. Amostragem</b> -----   | <b>Pág.15</b> |
| <b>III.7.2. Doseamento de proteínas</b> -----  | <b>Pág.16</b> |

---

|   |               |
|---|---------------|
| <b>III.7.2.1.</b> Recta de calibração-----  | <b>Pág.16</b> |
| <b>III.7.2.2.</b> Amostras-----   | <b>Pág.16</b> |
| <b>III.7.3.</b> Catalase (CAT) -----  | <b>Pág.17</b> |
| <b>III.7.4.</b> Glutathiona – S – transferase (GST) -----   | <b>Pág.17</b> |
| <b>II.8.</b> Estudos Quantitativos-----   | <b>Pág.17</b> |
| <b>III.8.1.</b> Digestão assistida por Microondas-----  | <b>Pág.17</b> |
| <b>II.8.2.</b> Espectrometria de absorção atómica com atomização<br>electrotérmica (GFAAS) -----              | <b>Pág.19</b> |
| <b>II.8.2.1.</b> Optimização do programa de temperaturas----  | <b>Pág.19</b> |
| <b>II.8.2.2.</b> Análise-----   | <b>Pág.20</b> |
| <b>II.9.</b> Análise Estatística-----   | <b>Pág.21</b> |
| <b>Capítulo IV – Resultados e Discussão</b> -----   | <b>Pág.23</b> |
| <b>IV.1.</b> Análise da solução de CCA-----   | <b>Pág.23</b> |
| <b>IV.2.</b> Estudos Histológicos e Histoquímicos no rim-----   | <b>Pág.24</b> |
| <b>IV.3.</b> Variação de peso-----  | <b>Pág.33</b> |
| <b>IV.4.</b> Estudos de citometria de fluxo (FCM) -----   | <b>Pág.34</b> |
| <b>IV.5.</b> Estudos Bioquímicos-----   | <b>Pág.38</b> |
| <b>IV.5.1.</b> Actividade da Catalase (CAT) -----   | <b>Pág.38</b> |
| <b>IV.5.2.</b> Actividade da Glutathiona – S – transferase (GST) -----  | <b>Pág.40</b> |
| <b>IV.5.3.</b> Mecanismo de formação de ROS envolvidos na alteração das<br>actividades da CAT e da GST? ----- | <b>Pág.42</b> |
| <b>IV.6.</b> Estudos Quantitativos-----   | <b>Pág.44</b> |
| <b>IV.6.1.</b> Material de referência certificado (MRC) -----   | <b>Pág.44</b> |
| <b>IV.6.2.</b> Optimização das condições para análise po GFAAS---   | <b>Pág.45</b> |
| <b>IV.6.2.1.</b> Método da recta de calibração-----   | <b>Pág.45</b> |
| <b>IV.6.2.2.</b> Método da adição padrão-----   | <b>Pág.46</b> |

|  |               |
|--|---------------|
| IV.6.2.3. Método da curva de calibração por da adição padrão-- | <b>Pág.47</b> |
| IV.6.3. Acumulação do crómio e arsénio no rim-----             | <b>Pág.49</b> |
| <b>Capítulo VI – Conclusões e Perspectivas Futuras-----</b>    | <b>Pág.55</b> |
| <b>Capítulo VII – Referências Bibliográficas-----</b>          | <b>Pág.59</b> |

# **Índice de Figuras**

## Índice de Figuras

**Figura 1** – Recta de Calibração obtida a partir das soluções padrão de Cr(VI). A expressão que relaciona a absorvância com a concentração é  $Abs = 0,565 C + 0,008$ .  $R^2 = 0,999$ . ----- **Pág.23**

**Figura 2** – Cortes histológicos e histoquímicos do rim. (a-b) H&E. (c-d) PAS. (e-f) IB6B. \* – Cilindro hialino. ► – Cilindro granular. ➡ – Descamação do epitélio em túbulos renais; G – Glomérulo de malpighi; T – Túbulos renais; ----- **Pág.25**

**Figura 3** – Alterações histológicas na região cortical do rim. Colorações PAS. (a) Controlo. (b) As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (c) CrO<sub>3</sub> (d) CCA. G – Glomérulo de malpighi. T – Túbulo renal. – ► bordadura em escova. \* – Cilindro hialino. ➡ – Descamação do epitélio.---- **Pág.26**

**Figura 4** – Alterações histológicas na região medular do rim. Colorações PAS. (1) Controlo. (2) As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (3) CrO<sub>3</sub> (4) CCA. T – Túbulo renal \* – Cilindro hialino. --- **Pág.27**

**Figura 5** – Alterações histológicas na região cortical (a) e medular (b) do rim. Colorações PAS. G – Glomérulo de malpighi. T – Túbulo renal. \* – Cilindro hialino. – ➡ Descamação do epitélio. ----- **Pág.27**

**Figura 6** – Percentagem de túbulos renais normais observada na região do córtex (a) e medula (b) nos grupos de tratamento. As barras correspondem aos valores médios de erro padrão, obtidos em cada um dos grupos ( $n=5$ ). \* corresponde às diferenças significativas observadas entre os grupos e os grupos controlo respectivos ( $p < 0,005$ ). -- ----- **Pág.28**

**Figura 7** – Percentagem de lesões observadas ao longo de todos os túbulos renais. (a,b) Percentagem de cilindros hialinos no córtex e na medula, respectivamente. (c,d) Percentagem de cilindros granulares no córtex e na medula, respectivamente. (e, f) Percentagem de descamação do epitélio no córtex e na medula, respectivamente. As barras correspondem aos valores médios do erro padrão, obtidos em cada um dos grupos ( $n=5$ ). \* corresponde às diferenças significativas observadas entre os grupos e os grupos controlo respectivos ( $p < 0,005$ ).----- **Pág.29**

**Figura 8** – Razão entre o peso corporal e o peso dos rins dos ratinhos de diferentes grupos de tratamento. As barras correspondem aos valores de erro padrão médio obtidos em cada um dos grupos ( $n=5$ ). \* Corresponde às diferenças significativas observadas entre esse grupo e o grupo controlo ( $p < 0,005$ ). ----- **Pág.33**

**Figura 9** – (a) Histograma. (b) Distribuição dos núcleos em termos de dispersão de luz----- **Pág.35**

**Figura 10** – Sequência de histogramas de DNA obtidos para os diferentes tratamentos nos períodos de exposição (a) 14h, (b) 24h, (c) 48h e (d) 96h. As barras representam a média dos erros padrão ( $n=5$ ). ----- **Pág.35**

**Figura 11** – Sequência da análise do ciclo celular para os diferentes tratamentos nos períodos de exposição (a) 14h, (b) 24h, (c) 48h e (d) 96h. ----- **Pág.36**

**Figura 12** – Tendência observada para a actividade da CAT nos diferentes grupos de tratamentos expostos durante o período de tempo de 14h. As barras correspondem aos desvios erros padrão observados ( $n=5$ ). ----- **Pág.39**

**Figura 13** – Tendência observada para a actividade da GST nos diferentes grupos de tratamentos expostos durante o período de tempo de 14h e 96h. As barras correspondem aos desvios erros padrão observados ( $n=5$ ). \* Diferenças significativas observadas no grupo. ----- **Pág.41**

**Figura 14** – Recta de calibração obtida com as soluções padrão de crómio, usada para a quantificação do crómio total nas amostras tratadas com CCA. A expressão que relaciona a absorvência com a concentração é  $Abs = 1,79 \times 10^{-2} \times C + 1,21 \times 10^{-2}$ .  $R^2 = 0,999$ . ----- **Pág.45**

**Figura 15** – Recta do Método de Adição Padrão de uma amostra para o doseamento de arsénio. A expressão que relaciona a absorvência com a concentração é  $Abs = 2,25 \times 10^{-3} \times C + 2,04 \times 10^{-2}$ .  $R^2 = 0,999$ . ----- **Pág.46**

**Figura 16** – Recta de calibração de Adição de soluções Padrão às amostras obtida com as soluções padrão de crómio, usada para a quantificação do crómio total nas amostras tratadas com  $CrO_3$ . A expressão que relaciona a absorvência com a concentração é  $Abs = 2,5 \times 10^{-3} \times C + 2,8 \times 10^{-2}$ .  $R^2 = 0,999$ . ----- **Pág.48**

**Figura 17** – Quantidade de crómio total acumulado nos rins de ratinhos após a administração das respectivas soluções. As barras verticais correspondem aos valores médios de erros padrão ( $n=15$ ). Os asteriscos correspondem às diferenças significativas entre os grupos de tratamento com os grupos controlo respectivos ( $p < 0,005$ ). -- **Pág.50**

**Figura 18** – Quantidade de arsénio total acumulado nos rins de ratinhos. As barras verticais correspondem aos valores médios de erro padrão ( $n=15$ ). ----- **Pág.51**

## **Índice de Tabelas**



## Índice de Tabelas

|   |                |
|---|----------------|
| <b>Tabela 1</b> – Valores de doses de toxicidade para as fórmulas de CCA-----   | <b>Pág. 6</b>  |
| <b>Tabela 2</b> – Procedimento experimental de administração subcutânea de CCA, As <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e CrO <sub>3</sub> ao longo do tempo. Inj.– Injecção subcutânea. × – Sacrifício. ----- | <b>Pág. 12</b> |
| <b>Tabela 3</b> – Programa de digestão onde se destacam os vários parâmetros otimizados   | <b>Pág. 19</b> |
| <b>Tabela 4</b> – Programa de Temperatura otimizado para a quantificação do crómio--  | <b>Pág. 20</b> |
| <b>Tabela 5</b> – Parâmetros de duas rectas obtidas pelo método de adição padrão para o doseamento de arsénio e de crómio no material de referência certificado (MRC) -----                           | <b>Pág. 44</b> |
| <b>Tabela 6</b> – Parâmetros de rectas obtidas pelo método da curva de calibração para o doseamento de arsénio e de crómio total nos rins-----  | <b>Pág. 46</b> |
| <b>Tabela 7</b> – Parâmetros importantes para o processo de validação da metodologia no doseamento de arsénio e de crómio nos rins-----   | <b>Pág. 47</b> |
| <b>Tabela 8</b> – Parâmetros importantes para o doseamento de arsénio nos rins-----   | <b>Pág. 48</b> |

## **Abreviaturas**

## **Abreviaturas**

**AAS** – Espectroscopia de Absorção Atômica.

**Abs** – Absorvância.

**ACGIH** – Instituição Governamental de Saúde e Higiene Americana

**ATN** – Necrose Tubular Aguda.

**As** – Arsénio.

**As<sub>2</sub>O<sub>5</sub>** – Pentóxido de arsénio.

**C** – Concentração do elemento analisado.

**CAT** – Catalase.

**Cu** – Cobre.

**CCA** – Crómio-Cobre-Arsenato.

**Cr** – Crómio.

**Cr(VI)** – Crómio hexavalente.

**Cr(III)** – Crómio trivalente.

**CrO<sub>3</sub>** – Óxido de crómio.

**CRBC** – Eritrócitos de galinha.

**CuO** – Óxido de cobre.

**DFG** – Deutsche Forschungsgemeinschaft.

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico.

**EPA** – Agência de protecção ambiental.

**FCM** – Citometria de fluxo.

**GST** – Glutathione-S-transferase.

**GFAAS** – Espectroscopia de absorção atômica com atomização eletrotérmica.

**GHAAS** – Espectroscopia de absorção atômica acoplada com gerador de hidretos.

**H&E** – Hematoxilina e eosina.

**ICP-MS** – Espectroscopia de massa por plasma indutivamente acoplado.

**ICP** – Espectroscopia em plasma induzida.

**IB6B** – Indocianina brilhante 6B.

**IP** – Iodeto de propídeo.

**MRC** – Material de referência certificado.

**PAS** – Ácido periódico – Schiff.

**R<sup>2</sup>** – Coeficiente de correlação.

**ROS** – Espécies reactivas ao oxigénio.

**USCPSC** – Comissão de segurança de produtos dos consumidores dos estados unidos.

# **Capítulo I – Enquadramento do trabalho**

## I.1. Enquadramento do trabalho

A compreensão dos mecanismos de acção de compostos tóxicos, nomeadamente metais pesados, na forma em que se encontram na natureza ou nos meios ocupacionais, torna-se fundamental nos dias de hoje. Embora os efeitos de cada um destes agentes isoladamente, e os respectivos mecanismos sejam bem conhecidos, e estejam bem documentados na literatura, o mesmo não acontece para as suas misturas. Uma das principais linhas de investigação do laboratório de histologia, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, compreende o estudo individual dos efeitos de vários metais e metalóides, no ratinho. Neste laboratório, uma das orientações dos trabalhos de investigação está relacionada com a acção da toxicidade do crómio e do arsénio, em diferentes órgãos de ratinhos.

O trabalho que se apresenta nesta dissertação surgiu na sequência desses estudos, e da necessidade de se compreender o mecanismo de acção de misturas destes dois elementos. Assim, o estudo centrou-se na análise do composto de Crómio-Cobre-Arsenato (CCA), um protector químico utilizado para o tratamento de madeira. Este protector contém uma mistura de sais, ou óxidos, dos elementos crómio, cobre e arsénio, que protegem a madeira de danos causados por insectos, pelo sol e pela água. Esta madeira tratada com CCA é utilizada com diversos fins, nomeadamente na construção de parques de recreio infantil, docas, cercas, estaleiros, convés de navios, aquacultura, e viticultura. Ao longo do tempo, e em condições de humidade específicas, os compostos químicos da mistura de CCA são lixiviados, podendo ser potencialmente perigosos para o ambiente e para a saúde pública. Contudo, pouco se conhece sobre os perigos ambientais e a toxicidade para os seres vivos desta mistura.

Em Portugal, o CCA foi usado até 2003, ano em que foi proibida a sua utilização, com a aprovação do decreto-lei 208/2003 que interditou a utilização de compostos contendo arsénio. No entanto, está bem documentado que o CCA poderá apresentar efeitos residuais e/ou retardados, podendo manter-se no meio ambiente e ocupacional até  $\approx 60$  anos (Cocker *et al.*, 2006; Jacobi *et al.*, 2007). Por esta razão, e pela escassa informação existente na literatura sobre os efeitos desta mistura de compostos nos organismos vivos, desenvolveu-se este trabalho. Pelos factos referidos, pareceu pertinente com esta dissertação contribuir para uma melhor compreensão da acção de crómio hexavalente

(CrO<sub>3</sub>), de arsénio pentavalente (As<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e da sua mistura no CCA, nos diferentes órgãos de ratinhos.

## **I.2. Estrutura e apresentação da dissertação**

Esta dissertação está dividida em seis capítulos.

No primeiro apresenta-se o enquadramento e justificação do presente trabalho.

O segundo aborda os conceitos teóricos sobre o CCA e as metodologias analíticas mais relevantes do trabalho, conferindo uma visão geral de diferentes dados descritos na literatura.

No terceiro descreve-se a metodologia desenvolvida, e está dividido em nove secções. Na primeira, apresentam-se os reagentes e as soluções. Da segunda à quinta secção, descreve-se o tratamento efectuado com os animais, o protocolo de administração das soluções a estudar, as metodologias realizadas para a análise quantitativa da solução de CCA injectada aos ratinhos e os procedimentos relativos à análise histológica e histoquímica do rim, ao longo dos diferentes períodos de exposição a que foram expostos os animais. Na sexta e sétima secção, descreve-se a técnica de citometria de fluxo (FCM) para avaliação do ciclo celular e do conteúdo de ácido desoxidoribonucleico (DNA) no rim dos animais intoxicados, e, delineiam-se os procedimentos preliminares do estudo bioquímico, nomeadamente para o doseamento de proteínas, para a determinação da actividade das enzimas catalase (CAT) e glutathione – S – transferase (GST). Na última secção, apresenta-se o método realizado para o doseamento dos teores de crómio total e de arsénio total, por espectrometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (GFAAS), e a metodologia efectuada para o tratamento estatístico dos resultados obtidos.

O quarto, quinto e sexto capítulos apresentam os resultados e a discussão de acordo com a sequência descrita no capítulo da metodologia, as conclusões gerais/perspectivas futuras e as referências bibliográficas (respectivamente).

## **Capítulo II – Introdução**



## II.1. Introdução

A durabilidade dos produtos de madeira sem tratamento é limitada a alguns anos. No entanto, quando se adicionam alguns tipos de protectores químicos o tempo de vida dos produtos de madeira pode ser estendido de 10 a 60 anos, dependendo da quantidade e do tipo de produto químico adicionado (Shibata et al, 2007).

O Crómio-Cobre-Arsenato (CCA) é um protector químico da madeira. A madeira tratada com este protector é muitas vezes referida como madeira tratada à pressão por ser impermeável à água, e pela introdução do CCA nos poros da madeira ocorrer a elevadas pressões (Kim *et al.*, 2007). Este produto é fornecido sob a forma de pasta ou concentrados aquosos que são diluídos entre 1 a 10% (m/m) do total de sais (Cocker *et al.*, 2006). Como já foi referido, o CCA é constituído por uma mistura de compostos contendo arsénio pentavalente ( $As_2O_5$ ), crómio hexavalente ( $CrO_3$ ) e óxido de cobre ( $CuO$ ) (Read, 2003). O cobre é usado para o controlo de alguns fungos (Townsend *et al.*, 2004). O arsénio é usado para o controlo de insectos e alguns fungos resistentes ao cobre. A função do crómio é actuar como um agente fixador que liga os metais de cobre e de arsénio à madeira. Existem três fórmulas químicas patenteadas do CCA, sendo a mais usada o CCA tipo C, constituída por 47,5 % de  $CrO_3$ , 18,5 % de  $CuO$  e 34% de  $As_2O_5$  (AWPA, 2005). Um dos problemas da utilização deste protector prende-se com a libertação de alguns dos seus componentes, dado que são substâncias tóxicas, potencialmente perigosas para o meio ambiente, e para a saúde pública (Nygren *et al.*, 1992). De facto, o potencial carcinogénio do arsénio e do crómio está demonstrado em inúmeros trabalhos, nomeadamente nos artigos de revisão de Chen e Shin (2002) e de Kitchin (2001). Este problema adquiriu relevância após estudos realizados em parques infantis, entre os quais se destacam os desenvolvidos por Solo-Gabriele e Hemond (2005) e por Barraij e colaboradores (2007). Nestes trabalhos, os autores pretendiam relacionar a probabilidade da libertação de arsénio com o desenvolvimento de várias processos patológicos, nomeadamente neoplasias.

Tanto na indústria de tratamento de madeira como em estudos laboratoriais, utilizam-se diversas técnicas para a determinação da perda dos componentes deste protector. Para a avaliação da toxicidade do CCA são utilizadas diversas metodologias. Uma dessas metodologias consiste na avaliação feita a partir do lixiviamento da madeira. Um dos

objectivos de alguns métodos é a medição da quantidade e da velocidade de lixiviamento dos componentes destes protectores quando a madeira é exposta à água, permitindo assim a requerida avaliação em termos de impactos ambientais e de saúde humana (Jambeck *et al.*, 2006; Townsend *et al.*, 2004). Demonstrou-se que a quantidade de lixiviamento de arsénio, crómio e cobre depende de vários factores, entre os quais se destacam o tipo de madeira, o método de conservação, o pH da solução, a força iónica, a dimensão da peça e o tempo de contacto com a mesma (Hingston *et al.*, 2001). Pouco se sabe sobre a acção dos compostos resultantes do lixiviamento do CCA em modelos animais. A literatura descreve a acção isolada de cada um dos seus componentes, mas não do seu conjunto e, portanto, das suas prováveis interacções, nomeadamente um possível efeito potencializador ou neutralizador dos diversos compostos, quando em actuação conjunta (Fowler, 1992; Madden, 2000).

A escassa informação existente sobre os efeitos desta mistura de compostos nos organismos vivos, e o facto das madeiras tratadas com estes produtos apresentarem uma grande durabilidade ( $\simeq$  60 anos), tornando previsível que a exposição ao CCA se mantenha activa (Jacobi *et al.*, 2007; Zartarian *et al.*, 2006), justificam os estudos que conduziram a elaboração da presente dissertação.

## **II.2. Considerações legislativas**

A falta de estudos concludentes sobre os efeitos tóxicos do CCA originou polémica nos EUA, entre as associações de produtores de madeira e as agências encarregues de controlar a toxicidade desta substância. Finalmente, foi definitivamente consignada na lei a proibição do uso de compostos de arsénio em 2004, e portanto do CCA. Na legislação portuguesa esta proibição está consignada no decreto-lei 208/ 2003. A partir desta data, em Portugal, deixou legalmente de se poder utilizar a substância. Como já foi referido, devido à grande durabilidade dos produtos de madeira e à variabilidade na quantidade CCA adicionado à madeira, é importante continuar a analisar o efeito desta mistura de compostos no ambiente e na saúde pública.

## **II.3. Fontes de exposição, transporte e bio-monitorização**

A exposição ao CCA pode ocorrer durante o manuseamento da madeira tratada com este protector e pode estar associada ao equipamento contaminado com este produto (Cocker *et al.*, 2006). A absorção cutânea e a ingestão são as principais vias de intoxicação.

Por outro lado, um dos perigos da utilização da madeira tratada com o CCA encontra-se na sua utilização doméstica, nomeadamente quando usada como lenha para lareira. A combustão desta madeira leva à libertação de arsénio que pode atingir os níveis tóxicos, podendo mesmo ser letal para quem o inspira (Cocker *et al.*, 2006).

Vários estudos, em crianças, analisaram a libertação do arsénio para a pele e o risco de intoxicação por ingestão, nomeadamente através da saliva (Hamula *et al.*, 2004; Shalat *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 2007; Solo-Gabriele, 2005;).

A exposição indirecta ao CCA presente na madeira por eliminação para o meio ambiente foi igualmente estudada, dado que os seus componentes, nomeadamente o arsénio, podem ser lixividados por contacto directo da madeira com águas das chuvas, o que pode ter impacto no solo e nas águas subterrâneas (Shibata *et al.*, 2007).

A exposição à madeira tratada com CCA pode ocorrer em aterros, se esta não estiver bem identificada, se não tiver sido removida para reciclagem ou para locais de tratamento de resíduos perigosos, como está regulamentado pela EPA. Nestas situações, pode constituir uma fonte de contaminação, tanto para o meio ambiente como para pessoas e animais (Jacobi *et al.*, 2007). Existem também outras formas de despejo desta madeira, nomeadamente a sua incineração que requer equipamento próprio para impedir ou limitar a poluição da atmosfera (Moghaddam and Mulligan, 2007).

Em termos de saúde ocupacional, estão publicados trabalhos que visam a monitorização biológica do CCA (Cocker *et al.*, 2006). Este tipo de estudo pode ser usado para analisar a exposição dos seres humanos por diversas vias (pele, inalação ou ingestão).

Em 2004, na conferência organizada pela Instituição Governamental de Saúde e Higiene Americana (ACGIH) e pela Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) estabeleceu-se que a bio-monitorização do arsénio, deveria ser baseada na sua forma inorgânica e nos seus metabolitos metilados presentes na urina, sendo analisados por Espectrometria de absorção atómica acoplada com gerador de hidretos (GHAAS) (Cocker *et al.*, 2006).

O entendimento do lixiviamento do CCA é importante, na medida em que permite perceber em que valência é que os elementos de arsénio e de crómio se encontram disponíveis no ambiente ou afectando a saúde pública. Não é claro se os metais são lixiviados como elementos individuais, como o crómio ou arsenatos de crómio, ou como complexos inorgânicos ou ainda complexos organometálicos ligados a extractos de madeira solúveis em água (Hingston *et al.*, 2001). Vários estudos, mostraram que o crómio em espécies diferentes de madeira tratada com CCA se encontrava no estado trivalente e no estado hexavalente, e o arsénio se encontrava todo no seu estado pentavalente (para revisão ver Katz e Salem, 2005).

Estudos efectuados envolvendo elevadas doses de CCA indicaram interacções entre o cobre, o crómio e o arsénio, tais como variações em termos de toxicidade e de toxicinética (USCPSC, 2003). A Tabela 1 indica a toxicidade aguda, oral e cutânea, efectuados em modelos animais (Read, 2003).

**Tabela 1** – Valores das doses de toxicidade para as fórmulas de CCA.

| Tipo                             | Valor (mg kg <sup>-1</sup> ) | Modelo    |
|----------------------------------|------------------------------|-----------|
| LD <sub>50</sub> orais agudos    | <150-<400                    | Animais   |
| LD <sub>50</sub> cutâneos agudos | 200-1188                     |           |
| LD <sub>50</sub>                 | 1-2                          | Humanos*  |
| LD <sub>50</sub> orais agudos    | 0,4-130                      | Animais** |
| LD <sub>50</sub> cutâneos agudos |                              |           |

\* São classificados como corrosivos, baseando-se no seu pH <2, e sensíveis à pele.

\*\* Sem evidência de danos para a saúde. Ensaios de curta duração.

A exposição à madeira tratada com CCA é uma combinação da exposição ao crómio, ao cobre e ao arsénio. Os seus efeitos podem diferir do comportamento de cada um dos componentes isolados (Read, 2003).

## II.4. Modelos para o estudo da toxicidade

Mason e Edwards (1989) estudaram a toxicidade aguda de Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> e CuSO<sub>4</sub> em ratos. Deste trabalho, concluíram que a co-administração de um ou dois compostos provocava um aumento significativo na toxicidade aguda, podendo o CCA ser um agente perigoso e actuar com uma toxicidade superior à dos seus constituintes individuais.

Existem vários estudos *in vivo* efectuados por Weis e colaboradores, destacando-se os a seguir enumerados: 1) Estudos de toxicidade dos lixiviados de madeira tratada com CCA em organismos estuarinos (Weis *et al.*, 1991); 2.) Estudos de toxicidade de materiais de construção em ambiente marinho (Weis *et al.*, 1992); 3.) Histopatologia e bioacumulação em ostras vivendo em madeira preservada com CCA (Weis *et al.*, 1993); 4.) Efeitos da madeira tratada com CCA num ambiente marinho (Weis *et al.*, 1995).

Gordon e colaboradores (2002) realizaram um estudo *in vitro* sobre a bio-disponibilidade dos metais pesados em pó de madeira tratada com CCA. Estes autores estudaram a bio-disponibilidade do crómio, cobre e arsénio *in vitro* através da análise da citotoxicidade em células incubadas com pó de madeira tratado com CCA. O estudo demonstrou que o pó de madeira tratado com CCA quando comparado com o pó de madeira controlo, era mais citotóxico. Sob as condições experimentais destes autores, os metais ligados às fibras de madeira tornavam-se bio-disponíveis. Esta bio-disponibilidade ocorria independentemente do processo de fixação dos metais à madeira ser completo. Uma outra conclusão que sugeriram foi que o pó de madeira tratada com CCA presente no local de trabalho, poderia representar um maior perigo do que o pó de madeira usado num período de tempo mais longo.

Outros trabalhos referidos no artigo de revisão de Katz e Salem (2005) descreveram a ocorrência de neoplasias do aparelho respiratório, em animais expostos à combinação de cromato e pó de madeira. Esta observação sugeriu que o cromato podia ser uma causa importante do aparecimento de neoplasias da cavidade nasal, observadas em operários que trabalham na indústria da madeira.

### ***II.5. Exposição Humana***

A hipótese da madeira tratada com o CCA ter efeitos tóxicos no Homem foi levantada após diversas observações que Carolyn Cox sumariou no seu artigo de revisão em 1991. De seguida, são referidos alguns dos factos assinalados por esta autora. Em 1968, uma Indústria que produzia CCA, registou o aparecimento de operários doentes depois de trabalharem no tratamento de madeira (Cox, 1991). Em 1987, um empregado do Departamento de Agronomia, nos Estados Unidos, adoeceu, apresentando hemorragias internas e vómitos, após ter trabalhado na construção de mesas de picnic, numa loja mal ventilada. Em 1990, nos EUA um empregado de uma empresa reconhecida na indústria madeireira, apresentou sintomas de lesões do sistema nervoso, após ter participado em

trabalhos de construção e instalação de pontes, efectuados usando madeira tratada com CCA (Cox, 1991). Na Suíça, um estudo da exposição ocupacional ao crómio, cobre e arsénio analisou a exposição a que estavam sujeitos trabalhadores em contacto com o pó de madeira. O grau de exposição foi avaliado pela detecção de Cr(VI) nos sujeitos expostos. Neste estudo, também verificaram que a concentração média de arsénio à volta das várias máquinas era bastante elevado, não tendo detectado crómio nesta localização. Constataram, além disso, que não se apurava qualquer aumento da concentração de arsénio na urina dos operários. Consideraram também que era importante a pesquisa, e doseamento deste elemento, no ambiente dos locais de trabalho para a avaliação da saúde dos mesmos (Cox, 1991).

Um outro estudo, realizado no Havai, demonstrou que os operários que trabalhavam com madeira tratada com CCA apresentavam níveis de arsénio na urina 1,4 vezes superiores aos dos detectados nos operários trabalhando com madeira controlo (Cox, 1991). Na Nigéria, um outro estudo demonstrou que os operários que trabalhavam com madeira tratada com CCA tinham níveis de arsénio no cabelo 1,6 vezes superiores aos detectados em indivíduos controlo. Por fim, um estudo não ocupacional relata um caso de uma família que começou a apresentar problemas de saúde após utilizar, para aquecimento da casa, lenha de madeira tratada com CCA (Cox, 1991).

## **II.6. Objectivos e justificação do trabalho**

Estudos preliminares sobre a toxicidade do CCA em diversos órgãos do ratinho, nomeadamente no timo, fígado, baço, testículo e baço não revelaram lesões. Contudo o rim evidenciou alterações patológicas, após a intoxicação experimental com o mesmo. Dos resultados anteriores, concluiu-se que seria oportuno realizar este trabalho.

O objectivo deste trabalho consistiu em estudar a toxicidade aguda do CCA no rim de ratinhos machos ICR (CD1), e a sua comparação com a nefrotoxicidade provocada pelas mesmas quantidades dos seus compostos individuais:  $As_2O_5$  e  $CrO_3$ . A avaliação dos efeitos tóxicos envolveu vários estudos: 1.) Estudos histológicos e histoquímicos com o objectivo de perceber a interacção destes compostos ao nível celular. 2.) Estudos por citometria de fluxo (FCM) com o intuito de entender a relação destes elementos com o ciclo celular. 3.) Estudos bioquímicos – catalase (CAT) e a glutatona – S – transferase (GST) – para a percepção da relação entre o arsénio e o crómio com o

desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam, ou reparem os danos por elas causados.

O desenvolvimento e optimização de uma metodologia de quantificação do arsénio e do crómio total nos rins de ratinhos foram também um outro objectivo. Esta metodologia envolveu a digestão assistida por microondas e a análise por Espectrometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (GFAAS). Esta metodologia teve por objectivo determinar a acumulação e a distribuição do crómio e do arsénio no rim.

## **Capítulo III – Materiais e Métodos**



## III.1. Reagentes e Soluções

### III.1.1. Reagentes

Os reagentes dicromato potássico ( $K_2Cr_2O_7$ ) e pentóxido de arsénio ( $As_2O_5$ ), ácido tricloroacético, peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), ácido nítrico supra puro ( $HNO_3$ ) 65%, nitrato de magnésio hexahidratado ( $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ) e nitrato de paládio em  $HNO_3$  15% ( $Pd(NO_3)_2$ ) foram adquiridos à Merck. O iodeto de propídio (PI), pepsina, Rnase, albumina sérica bovina (BSA), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), triton X-100, hidrogenofosfato de potássio ( $K_2HPO_4$ ), dihidrogenofosfato de potássio ( $KH_2PO_4$ ), forma reduzida da glutathiona (GSH) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) foram adquiridos à Sigma. O reagente de Bradford biorad® concentrado, foi obtido na Biorad. Os reagentes hidrogenofosfato de sódio desidratado ( $NaH_2PO_4$ ), hidrogenofosfato de sódio dodecahidratado ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ), trióxido de crómio ( $CrO_3$ ) e pentóxido de arsénio ( $As_2O_5$ ) (1000mg/L), foram adquiridos à Riedel-da Haen.

O material de referência certificado (MRC) correspondeu ao bife de fígado, com a referência NCSZC 71001, aprovado pelo Centro Nacional de Análise para o Ferro e para o Aço (Beijing, China) e adquirido a LGC Standards (Barcelona).

Para as análises quantitativas das amostras de rins de ratinhos utilizou-se água de qualidade ultra-pura (resistividade de 18,2 M $\Omega$ ), produzida por purificação de água desionizada, num sistema da marca Milipore.

### III.1.2. Soluções

#### **Preparação da solução de Crómio-Cobre-Arsenato (CCA), pentóxido de arsénio ( $As_2O_5$ ) e trióxido de crómio ( $CrO_3$ )**

Na preparação da solução de CCA a injectar aos animais, usou-se uma amostra (obtida numa fábrica local) igual à que era utilizada na indústria madeireira, antes da proibição. Designou-se esta amostra por solução de CCA mãe. Esta solução mãe correspondeu ao CCA do tipo C, constituída por 47,5 % de  $CrO_3$ , 18,5 % de  $CuO$  e 34% de  $As_2O_5$ . Diluiu-se duzentas vezes esta solução mãe, e ajustou-se o pH até 7. Procedeu-se à centrifugação da suspensão a 6000 rpm, durante 5 minutos. Por fim, considerou-se o

sobrenadante como a solução de CCA a injectar nos animais. De seguida, prepararam-se separadamente duas soluções, uma de  $As_2O_5$ , e outra de  $CrO_3$ , contendo as mesmas quantidades de As(V) e Cr(VI) existentes nesta solução de CCA.

### III.2. Animais

Usaram-se ratinhos machos ICR (CD1), com cerca de 2 meses de idade, pesando entre 27 e 40 g. Os animais foram divididos em dezasseis grupos de 5, e mantidos durante 3 semanas, em gaiolas apropriadas, à temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C), humidade relativa de 40-60% e um período de luz de 12 horas. A todos foram fornecidas água e ração apropriada *ad libitum*. A legislação nacional para a protecção dos animais foi garantida em todos os procedimentos experimentais (regra 1006/92-23/10/92, baseada em 86/609/EC-24/11/92).

### III. 3. Protocolo de administração do CCA, $As_2O_5$ e $CrO_3$

Todos os animais foram injectados por via subcutânea. Os animais controlo foram injectados com soro fisiológico. Os intoxicados com CCA,  $As_2O_5$  e  $CrO_3$  foram abatidos após 14, 24, 48 e 96 horas, como se indica na **Tabela 2**. Os grupos 1 – 4 foram injectados com soro fisiológico, os grupos 5 – 8 com  $As_2O_5$  (7,21 mg/kg de arsénio), os grupos 9 – 12 com  $CrO_3$  (10,42 mg/kg de crómio) e os grupos 13 – 16 com CCA (7,21mg/kg de arsénio e 10,42 mg/kg de crómio), durante o período de tempo indicados na mesma tabela.

Após o período experimental, todos os animais foram abatidos por estiramento com secção da medula cervical.

**Tabela 2** – Procedimento experimental da administração subcutânea de CCA,  $As_2O_5$  e  $CrO_3$  ao longo do tempo. Inj. – Injecção subcutânea. × – Sacrificio.

| Tempo         | 0h   | 14h | 24h | 48h | 96h |
|---------------|------|-----|-----|-----|-----|
| Grupo         |      |     |     |     |     |
| 1, 5, 9 e 13  | Inj. | ×   |     |     |     |
| 2, 6, 10 e 14 | Inj. |     | ×   |     |     |
| 3, 7, 11 e 15 | Inj. |     |     | ×   |     |
| 4, 8, 12 e 16 | Inj. |     |     |     | ×   |
|               |      |     |     |     |     |

De cada animal foram colhidos e pesados os timos, fígados, baços, testículos, epidídimos e rins para a realização das técnicas de histologia e histoquímica, citometria de fluxo (FCM), bioquímica e análises quantitativas.

### **III.4. Análise da solução de CCA**

O procedimento experimental relativo à determinação da quantidade de crómio total e de arsénio total na solução de CCA foi efectuado por espectrometria de plasma (ICP), e confirmado por espectrometria de absorção atómica (AAS), e por espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

A determinação da especiação do crómio na solução de CCA foi efectuada de acordo com o método de referência (AWWA, 1992). Resumidamente, o princípio deste método baseia-se na determinação da quantidade de Cr(VI) presente numa solução. A reacção colorimétrica entre a quantidade de Cr(VI) com a difenilcarbazida produzirá uma solução de cor vinosa, sendo monitorizada no espectrofotómetro UV-Visível (Jenway; 6100 Spectrophotometer) a 540 nm.

No presente trabalho, relacionou-se a concentração de Cr(VI) existente na amostra de solução de CCA com os valores das absorvâncias obtidos para cinco soluções padrão de crómio hexavalente de concentrações 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 e 1 mg/L. A quantificação do Cr(VI) na solução de CCA foi efectuada por interpolação a partir da equação da recta de calibração.

### **III.5 Estudos Histológicos e Histoquímicos do rim**

Para o estudo histológico e histoquímico colheram-se os timos, os fígados, os baços, os testículos, os epidídimos e os rins de cada animal. Estes órgãos foram fixados em Bouin durante 24 horas, desidratados e incluídos em parafina. Efectuaram-se cortes no micrótomo (Leitz 1512). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e observados num microscópio Nikon AFX-Dx com sistema fotográfico FD-35DX. As preparações foram fotografadas para uma análise semi-quantitativa. Em 80 preparações foram analisadas duzentas secções de túbulos renais, para a determinação da percentagem de túbulos normais e dos vários tipos de lesões observadas.

#### **III.5.1. Identificação de polissacarídeos**

Para a identificação histoquímica dos polissacarídeos, o processamento dos rins e dos restantes órgãos, fez-se como no caso da coloração com H&E. No entanto, realizou-se o método do Ácido Periódico – Schiff (PAS), tal como é descrito por Kiernan (1990). Após a montagem e secagem das lâminas, procedeu-se à sua observação ao microscópio. Identificaram-se e comprovaram-se as lesões obtidas nas 80 lâminas, com o auxílio do microscópio óptico acima mencionado. Tiraram-se as fotografias relevantes para o trabalho.

### **III.5.2. Identificação de Proteínas**

Neste trabalho a identificação da alteração do conteúdo de proteínas no rim e nos restantes órgãos, foi determinada seguindo o método de indocianina brilhante 6B (IB6B) descrito por Kiernan (1990). A montagem, observação e análise semi-quantitativa das lesões foi efectuada, de acordo com a metodologia já descrita anteriormente.

### **III.6. Estudos de Citometria de fluxo (FCM)**

Neste trabalho avaliou-se o conteúdo de DNA e os níveis de ploidia de amostras de rins parafinadas, de acordo com a metodologia desenvolvida por Oliveira e colaboradores (2006). Resumidamente, realizou-se a fixação em formol dos rins e inclusão em parafina. Posteriormente, efectuaram-se cortes de 40 µm de espessura, no micrótomo, utilizando-se lâminas metálicas descartáveis. Após a desparafinação e re-hidratação, seguiu-se a incubação das amostras com pepsina em PBS, à temperatura de 37°C, durante 1 hora. Seguidamente, procedeu-se à centrifugação (16000 G) das amostras durante 10 minutos. Após a rejeição do sobrenadante, efectuaram-se duas lavagens com 1 mL de PBS. As amostras foram filtradas (em filtro nylon de 50 µm de poro) e retirou-se um volume de 500 µL ao qual se adicionou 50 µL de Rnase e deixou-se incubar a 37°C, durante 10 minutos. Após este período, adicionaram-se 25 µL de iodeto de propídeo (IP) e incubaram-se a 4°C, durante 10 minutos. Em simultâneo, preparou-se uma solução padrão de eritrócitos de galinha (CRBC). Depois adicionaram-se 50 µL de Rnase e deixaram-se a incubar a 37°C durante 10 minutos. Após este período, adicionaram-se 25 µL de iodeto de propídeo (IP) e incubaram-se a 4°C, durante 10 minutos.

Antes de se efectuar a análise, verificou-se a linearidade da fluorescência do padrão (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) e ajustou-se a amplificação, de maneira a que o pico correspondente ao pico diploide se encontrasse posicionado no canal 200, tendo-se mantido constante este ajuste. Por fim, analisou-se a intensidade relativa de fluorescência dos núcleos corados com o IP no citómetro de fluxo (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA). O citómetro de fluxo usado continha um laser de árgon arrefecido com ar, com 15 mW e opera a 488 nm. Este mesmo equipamento apresentava, para além de sensores de dispersão frontal e lateral, quatro sensores de fluorescência.

Os resultados foram obtidos sob a forma de dois gráficos: intensidade linear da luz fluorescente, e dispersão da luz frontal versus dispersão da luz lateral.

### **III.7. Estudos Bioquímicos**

Neste trabalho, determinou-se a actividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutationa – S – transferase (GST) nos rins de todos os grupos de animais expostos. Os outros órgãos mantiveram-se preservados a -80°C, para análises posteriores. A recolha dos rins e dos restantes órgãos, foi realizada à temperatura de 4°C. Os períodos de tempo analisados foram os animais expostos durante 14h e 96h.

#### **III.7.1. Amostragem**

Procedeu-se à recolha dos rins e sua homogeneização num homogeneizador (Yellow line DI 18 basic) num volume de 5 mL de tampão fosfato (50 mM, pH=7,0), com Triton X-100 0,1% [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 65mM com 250 µL de Triton X-100; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM com 500 µL de Triton X-100; proporção aproximada de 1:1,5 (v/v), pH=7,0]. De seguida, retiraram-se alíquotas de 600 µL para o doseamento de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Numa centrifuga (Hettich Zentrifugen; Miko22R) previamente refrigerada a -4°C, centrifugaram-se os homogeneizados a 13000 r.p.m., durante 10 minutos. Seguidamente, pipetaram-se os sobrenadantes para crio-tubos de 3 mL. Do mesmo sobrenadante, retiraram-se alíquotas de 20 µL para novos *eppendorffs*, e diluíram-se com um volume de 1980 µL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0. Deste passo, obtiveram-se homogeneizados diluídos (com um factor de diluição 1 para 100 vezes), e conservaram-se a -80°C para posterior análise da actividade da catalase (CAT). Por fim, e ainda do mesmo sobrenadante, retiraram-se alíquotas de 200 µL para novos *eppendorffs*, e diluíram-se com um volume de 1800 µL de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH

6,5. Obtiveram-se homogeneizados diluídos com um factor de diluição de 1 para 10 vezes, e conservaram-se a -80°C para posterior análise da actividade da glutathione S-transferase (GST). O sobrenadante restante foi conservado a -80°C.

## **III.7.2. Doseamento de Proteínas:**

### **III.7.2.1. Recta de Calibração**

Recorreu-se ao método de Bradford para a quantificação da proteína. Este método baseia-se no facto da Absorvância máxima de uma solução ácida de Coomassie Blue G-250 (Reagente de Bradford) passar de 465 nm para 595 nm após a sua ligação à proteína total, originando um complexo corado e estável (Bradford, 1976). A relação entre as concentrações do Reagente de Bradford com as absorvâncias adquiridas, foi obtida através de um gráfico contendo a informação do valor de absorvância *versus* concentração.

Preparou-se uma solução de trabalho da proteína BSA, na concentração de 1 mg/mL. De seguida, numa microplaca (96 well WIA/RIA plate, 3590), prepararam-se soluções padrão da proteína BSA (0,2; 0,5; 0,8 mg/mL), tendo-se efectuado quatro réplicas. Por fim, procedeu-se ao preenchimento da micro-placa.

A ordem de adição foi a seguinte: proteína e reagente de Bradford, tendo sido usado para este último uma micropipeta multicanais da marca High Tech (MT300).

Após agitação durante 15 minutos, efectuou-se a leitura das absorvâncias a 595 nm, num leitor de micro-placas (Labsystems; Multiskan Ex).

Os resultados da quantidade de proteínas foram obtidos por interpolação da recta de calibração, tendo sido expressos em mg/mL.

### **III.7. 2. 2. Amostras**

Após a descongelação das amostras efectuou-se um estudo de determinação do factor de diluição óptimo para a determinação do teor proteico.

O preenchimento da micro-placa foi efectuado de igual modo para todas as amostras: Primeiro pipetou-se um volume de 10  $\mu\text{L}$  da respectiva amostra (quatro réplicas). No final, adicionou-se com a micropipeta multicanais 250  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford.

Os restantes procedimentos foram efectuados tal como acima descrito.

### III.7.3. Catalase (CAT)

A catalase (CAT) tem as funções de decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de oxidação de dadores de hidrogénio, com consumo de peróxido. Neste trabalho, a actividade da catalase (CAT) foi determinada analisando a decomposição do peróxido de hidrogénio a 240 nm, seguindo o método descrito por Aebi (1984).

Programou-se o espectrofotómetro (Jenway; 6505 UV/Vis. Spectrophotometer) na função cinética, para a absorção no comprimento de onda de 240 nm, com leituras de 5 em 5 segundos, durante 30 segundos. Após o descongelamento das amostras, previamente homogeneizadas e diluídas, realizou-se a análise cinética, adicionando o peróxido de hidrogénio 30 mM para iniciar a reacção. O procedimento foi efectuado numa *cuvette* de quartzo (volume 1,5 mL). Após a mistura reaccional, registou-se a diminuição da absorvância a 240 nm, durante 30 segundos.

Os resultados foram calculados recorrendo ao valor do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ), no comprimento de onda a 240 de  $0,00394 \pm 0,0002$  litros  $\text{mmol}^{-1}\text{mm}^{-1}$ , tendo sido apresentados em unidades (U) por mg de proteína.

### III.7.4. Glutathione S-transferase (GST)

Neste trabalho, a actividade desta enzima foi determinada de acordo o método descrito por Habig e colaboradores (1974).

A glutathione S-transferase (GST) catalisa a reacção de conjugação da glutathione reduzida (GSH) *via* grupos do tipo sulfidril, com os centros electrofilicos de vários substratos, nomeadamente do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Esta actividade é importante na destoxificação de compostos endógenos (ex. lípidos peroxidados) e no metabolismo de xenobióticos.

Neste trabalho monitorizou-se, o aumento da absorvância resultante da formação do conjugado, o tioéter dinitrofenilo, no comprimento de onda de 340 nm.

Resumidamente, programou-se o leitor de placas (Labsystems; Multiskan Ex) na função cinética, para a absorção no comprimento de onda de 340 nm e com leituras de 10 em 10 segundos durante 5 minutos, a 30°C. De seguida, e após o descongelamento das amostras homogeneizadas e previamente diluídas, efectuou-se o preenchimento da micro-placa (96 well WIA/RIA plate, 3590). Preencheram-se quatro micro-placas correspondendo aos tratamentos de controlo, CrO<sub>3</sub>, As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e CCA nos diferentes tempos de exposição (14 e 96 horas) a que cada grupo de ratinhos foi submetido. Efectuaram-se quatro réplicas por amostra.

Deve notar-se que a solução reacção foi a última a ser adicionada com o auxílio de uma micropipeta multicanais, tendo-se iniciado a contagem do tempo a partir dessa altura.

Por fim, registou-se o aumento da Absorvância a 340 nm, procedendo-se a repetidas leituras de 10 em 10 segundos, até perfazer 5 minutos (leitura contínua).

Os resultados foram apresentados em nmole de conjugado/minuto/miligrama de proteína (coeficiente de extinção molar usado: 9,6 mmol<sup>-1</sup>L<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

## **III.8. Estudos Quantitativos**

### **III.8.1. Digestão Assistida por Microondas**

Durante o tempo de descongelamento das amostras de rim de ratinho, efectuou-se a pesagem dos vasos de digestão. Após o descongelamento, massau-se cada rim e colocou-se dentro de um vaso.

De seguida, desligaram-se as sondas do Microondas (Marx-X “1500 W Accelerated Reaction System”, CEM, Mathews, NC, USA) e, efectuou-se a secagem dos rins a 25, 30% e 35% de potência durante 10 minutos. No final do programa de secagem, pesaram-se os vasos contendo as amostras, e repetiu-se este passo até se obter uma diferença de massa inferior a 0,01 g, considerando-se a amostra seca.

Após a secagem das amostras, seleccionou-se o vaso controlo, contendo a amostra de rim com maior massa.



De seguida, adicionaram-se 10,0 mL de ácido nítrico a cada um dos vasos, e fecharam-se os mesmos cuidadosamente. No vaso controlo, conectaram-se as sondas de temperatura e de pressão. Colocaram-se os vasos no carrossel do microondas. De seguida, no microondas, ligaram-se as sondas e estabeleceu-se o programa de digestão, de acordo com a **Tabela 3** e optimizado a partir da referência proveniente do protocolo de amostras de rim de rato (Morais e Pereira., 2000; Pereira *et al.*, 1999).

**Tabela 3** – Programa de digestão, onde se destacam os vários parâmetros optimizados.

| Estágio | Potência |    | Tempo de Rampa (minutos) | Vaso Controlo |                  | Tempo (minutos) |
|---------|----------|----|--------------------------|---------------|------------------|-----------------|
|         | Máxima   | %  |                          | Pressão (Psi) | Temperatura (°C) |                 |
| 1       | 600      | 50 | 5                        | 150           | 50               | 10              |
| 2       | 600      | 70 | 10                       | 200           | 100              | 10              |
| 3       | 600      | 90 | 10                       | 200           | 175              | 15              |

No final do programa de digestão, esperou-se que a temperatura do microondas atingisse 35°C para se retirarem e abrirem os vasos. Por fim, as soluções foram transferidas para frascos de 15 mL (novos e previamente lavados com ácido nítrico), devidamente identificados e conservados no congelador a -80°C até à sua análise por espectrometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (GFAAS).

### **III.8.2. Análise por espectrometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (GFAAS)**

#### **III.8.2.1.Optimização do Programa de temperatura**

Neste trabalho optimizou-se o programa de temperatura, tanto para a análise do crómio como para a do arsénio no rim, bem como na matriz do material de referência certificado (MRC) (Pereira *et al.*, 1997).

As temperaturas para a secagem, pirólise e atomização desta matriz, sugeridas pela documentação do aparelho foram: 100 e 120°C (secagem), 1500°C e 1100°C (pirólise), 2450°C e 2400°C (atomização) para o crómio e para o arsénio, respectivamente. A selecção da temperatura de pirólise e de atomização óptima teve como parâmetros de avaliação o máximo de absorvância observado para o elemento que se pretendeu analisar, e os menores valores obtidos em relação ao ruído de fundo.

Assim, pipetaram-se 15 µL da amostra conjuntamente com 5 µL da solução de modificador  $Mg(NO_3)_2$  para a câmara de grafite. As temperaturas de pirólise testadas foram as seguintes: 950°C, 1000°C, 1050°C, 1100°C para o crómio, e 1100°C, 1250°C, 1300°C, 1400°C para o arsénio.

Após a optimização da temperatura de pirólise, efectuou-se a optimização da temperatura de atomização. As temperaturas testadas foram 2450°C, 2350°C, 2400°C para o crómio e 2300°C, 2400°C, 2500°C para o arsénio. Os programas aplicados para a determinação de crómio e do arsénio acumulados nos rins de ratinhos, são apresentados seguidamente (**Tabela 4**).

**Tabela 4** – Programa de temperatura optimizado para a quantificação do crómio e do arsénio.

| Estágio | Temperatura (°C) |         | Rampa (s) | Tempo (s) |         |
|---------|------------------|---------|-----------|-----------|---------|
|         | Crómio           | Arsénio |           | Crómio    | Arsénio |
| 1       | 90               | 90      | 5         | 32,8      | 34      |
| 2       | 105              | 105     | 3         | 25        | 25      |
| 3       | 110              | 110     | 2         | 12,5      | 17,5    |
| 4       | 1000             | 1300    | 250       | 13,6      | 14,8    |
| 5       | 2450             | 2400    | 1200      | 6,2       | 4,9     |

### III.8.2.2. Análise

Para a quantificação do crómio nas amostras de rim dos animais submetidos ao tratamento de CCA e de  $CrO_3$ , recorreu-se ao Método de Calibração, utilizando seis soluções padrão. Pipetaram-se 20 µL da amostra biológica de concentração de crómio desconhecida (ou da solução padrão Mãe, 50 µg/L), conjuntamente com 5 µL da solução de modificador  $Mg(NO_3)_2$ .

Para a determinação de crómio nas amostras controlo, recorreu-se ao Método de Adição Padrão pela Curva de Calibração com cinco adições de solução padrão. Pipetaram-se 15 µL da amostra biológica de concentração de crómio desconhecida (ou da solução padrão Mãe, 20 µg/L) conjuntamente com 10 µL da solução de modificador  $Mg(NO_3)_2$  directamente para a câmara de grafite.

Para a quantificação do arsénio nas amostras de tratamento com CCA e  $As_2O_5$  recorreu-se ao Método de Calibração, utilizando seis soluções padrão. Pipetaram-se 20 µL da amostra biológica de concentração de arsénio desconhecida (ou da solução padrão Mãe, 100 µg/L) conjuntamente com 5 µL da solução de modificador  $Pd(NO_3)_2$  para a câmara de grafite.

Para a determinação de arsénio nas amostras controlo, recorreu-se ao Método de Adição Padrão pela Curva de Calibração com seis adições de solução padrão. Pipetaram-se 20  $\mu\text{L}$  da amostra biológica de concentração de arsénio desconhecida (ou da solução padrão Mãe, 25  $\mu\text{g/L}$ ), conjuntamente com 10  $\mu\text{L}$  da solução de modificador  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  para a câmara de grafite.

A determinação de crómio e de arsénio nas amostras de material de referência certificado (MRC) foi efectuada pelo Método de Adição Padrão, com três adições de soluções padrão. O valor da solução padrão mãe utilizada para o crómio foi de 20  $\mu\text{g/L}$ , e para o arsénio foi de 25  $\mu\text{g/L}$ . Todas as medições foram efectuadas em triplicado.

A área do pico de absorvância foi registada para cada amostra ou solução padrão analisada, e foi a partir desta que foram obtidos os valores da média da absorvância e do desvio padrão.

A concentração de crómio ou de arsénio por massa de rim, foi calculada a partir da concentração de crómio ou de arsénio presente em cada amostra, em função da amostra seca obtida durante o procedimento da digestão assistida por Microondas, sendo expressa em  $\mu\text{g/kg}$ .

### **III.9. Análise Estatística**

Os resultados apresentam-se sob a forma de médias  $\pm$  erros padrão, para o número de animais que será referido para cada determinação. A análise estatística foi realizada através de ANOVA (SigmaStat for Windows Version 3.1., SPSS Inc., USA) e estabeleceu-se como nível de significado estatístico  $p < 0,05$ .



## **Capítulo IV – Resultados e Discussão**

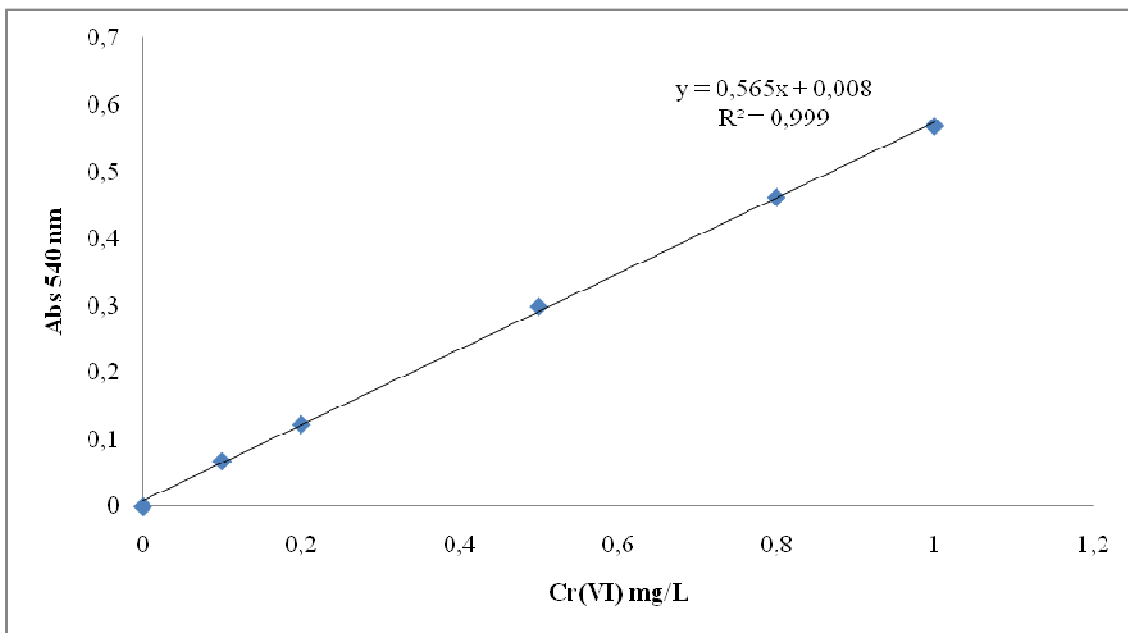
## IV. Resultados e Discussão

### IV.1. Análise da solução de CCA

No presente trabalho, efectuaram-se experiências preliminares com diferentes doses de CCA, durante os tempos de exposição de 14h a 96h. Optou-se pela dose de CCA diluída de 1 para 200 vezes, por esta corresponder à menor quantidade em que se observou uma taxa de sobrevivência de 100% em todos os grupos estudados.

A análise da solução de CCA (diluída 200 vezes) com o intuito do doseamento de crómio total e de arsénio total realizada por ICP-MS, ICP e AAS revelou os seguintes valores: 1034 mg/L de crómio, 721 mg/L de arsénio e 3 mg/L  $\mu\text{M}$  de cobre (Matos *et al.*, 2005).

A recta de calibração obtida para a análise da especiação do crómio por espectrofotometria UV – Visível encontra-se na **Figura 1**.



**Figura 1** – Recta de Calibração obtida a partir das soluções padrão de Cr(VI). A expressão que relaciona a absorvância com a concentração é  $\text{Abs} = 0,565 C + 0,008$ .  $R^2 = 0,999$ .

Obtiveram-se 850 mg/L Cr(VI) e 190 mg/L Cr(III), garantindo que o crómio presente nesta solução de CCA se encontrava maioritariamente na forma hexavalente.

Os estudos acima referidos permitiram concluir que seria pertinente estudar a acção de crómio hexavalente (10 mg/kg) e de arsénio pentavalente (7 mg/kg) *per si*, e comparar a sua acção com a mistura de CCA.

Os resultados obtidos apenas revelaram toxicidade destes compostos para os túbulos renais, não tendo sido perceptíveis quaisquer lesões para os restantes órgãos.

Kim e Na (1991) indicaram que o dicromato de sódio (20 mg/kg) produzia lesões nos túbulos renais. Por sua vez, Gumbleton e Nicholls (1988) sugeriram nefrotoxicidade a partir de 10 mg/kg de dicromato de potássio. Outros estudos demonstraram nefrotoxicidade após a administração de crómio hexavalente em roedores, para valores compreendidos entre 7 mg/kg a 30 mg/kg (Barrera *et al.*, 2003; Na *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2006;).

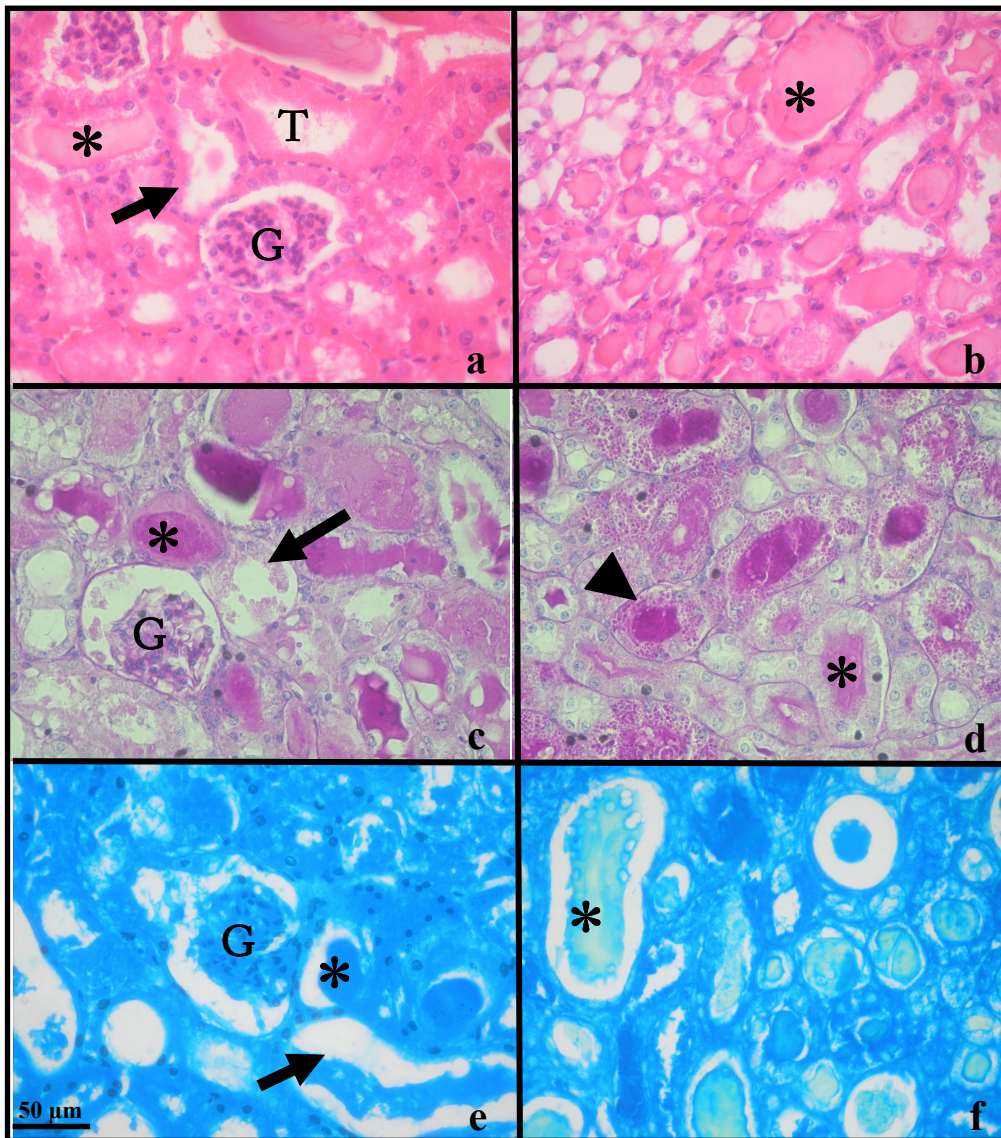
Tsukamoto e colaboradores (1983) descreveram nefrotoxicidade para as quantidades de 7,33 e 15 mg/kg de arsenato de sódio, em cães. Mittal e Flora (2006) observaram nefrotoxicidade para a quantidade de 100 mg/L, administrada oralmente. Das Neves (2003) descreveu nefrotoxicidade para 10 mg/kg arsenito de sódio, em ratos.

Mason e Edwards (1989) observaram nefrotoxicidade mais acentuada para a mistura de dicromato de sódio (5 e 35 mg/kg) e arsenato de sódio (25 e 90 mg/kg) quando comparada com a acção dos mesmos compostos *per si*.

## **IV.2. Estudos Histológicos e Histoquímicos no rim**

Durante as experiências a taxa de sobrevivência dos animais foi de 100%. Após a administração de CCA (períodos de exposição de 14h e 96h), e a administração de CrO<sub>3</sub> (exposição de 96h), observou-se uma progressiva inactividade dos animais, quando comparados com os dos respectivos grupos controlos. Os animais dos restantes grupos manifestaram um comportamento normal.

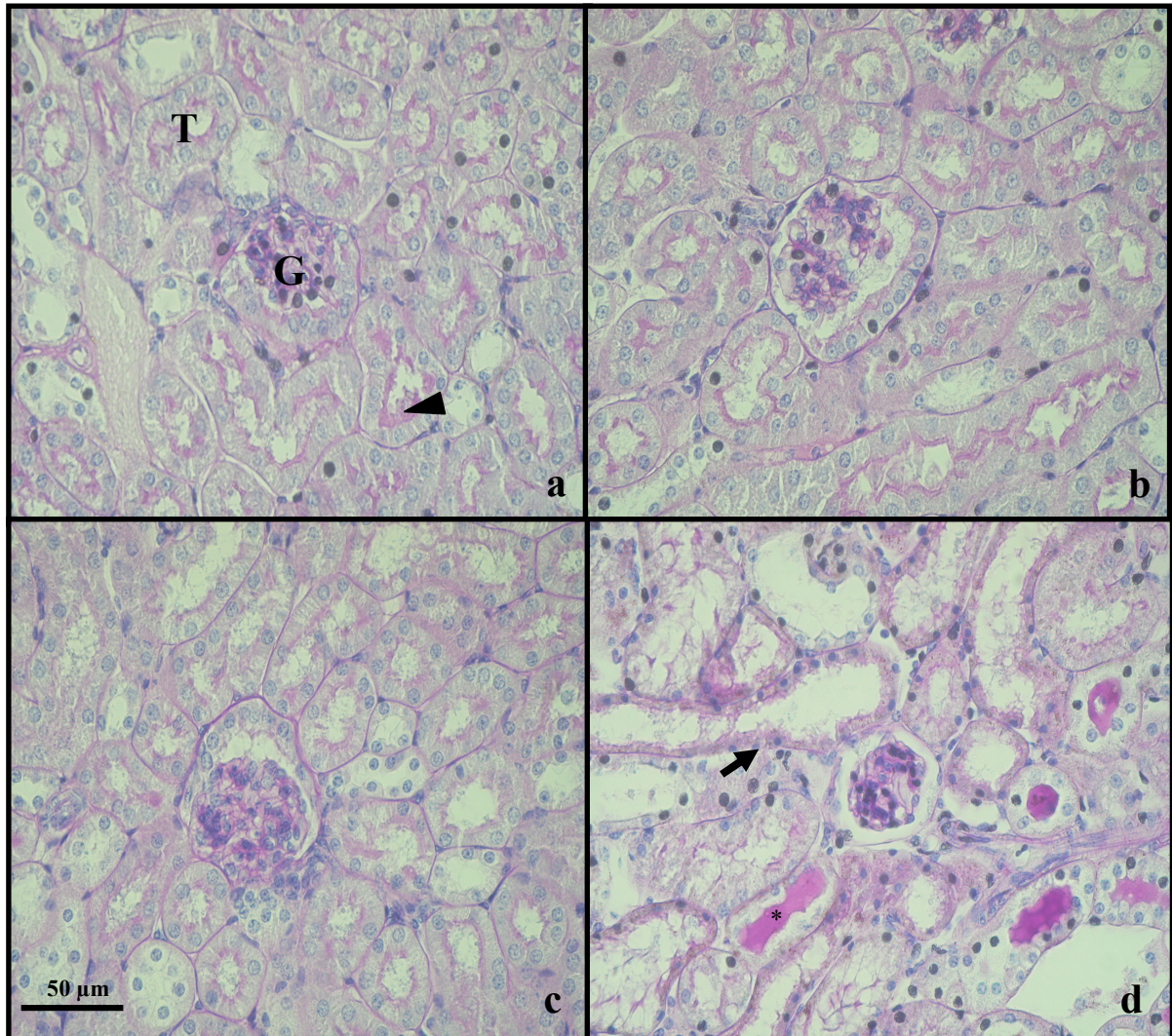
Os resultados do presente trabalho demonstraram que o crómio hexavalente e o arsénio pentavalente (administrados sob as formas de CrO<sub>3</sub>, As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e de CCA) induziram lesões nos túbulos renais. Estas lesões foram caracterizadas pela presença de cilindros hialinos e granulares, e a degenerescência das células epiteliais ao longo de toda a extensão dos túbulos renais, como se observa pela **Figura 2**.



**Figura 2** – Cortes histológicos e histoquímicos do rim. (a-b) H&E. (c-d) PAS. (e-f) IB6B. \* – Cilindro hialino. ➡ Cilindro granular. ▶ – Descamação do epitélio em túbulos renais; G – Glomérulo de malpighi; T – Túbulos renais;

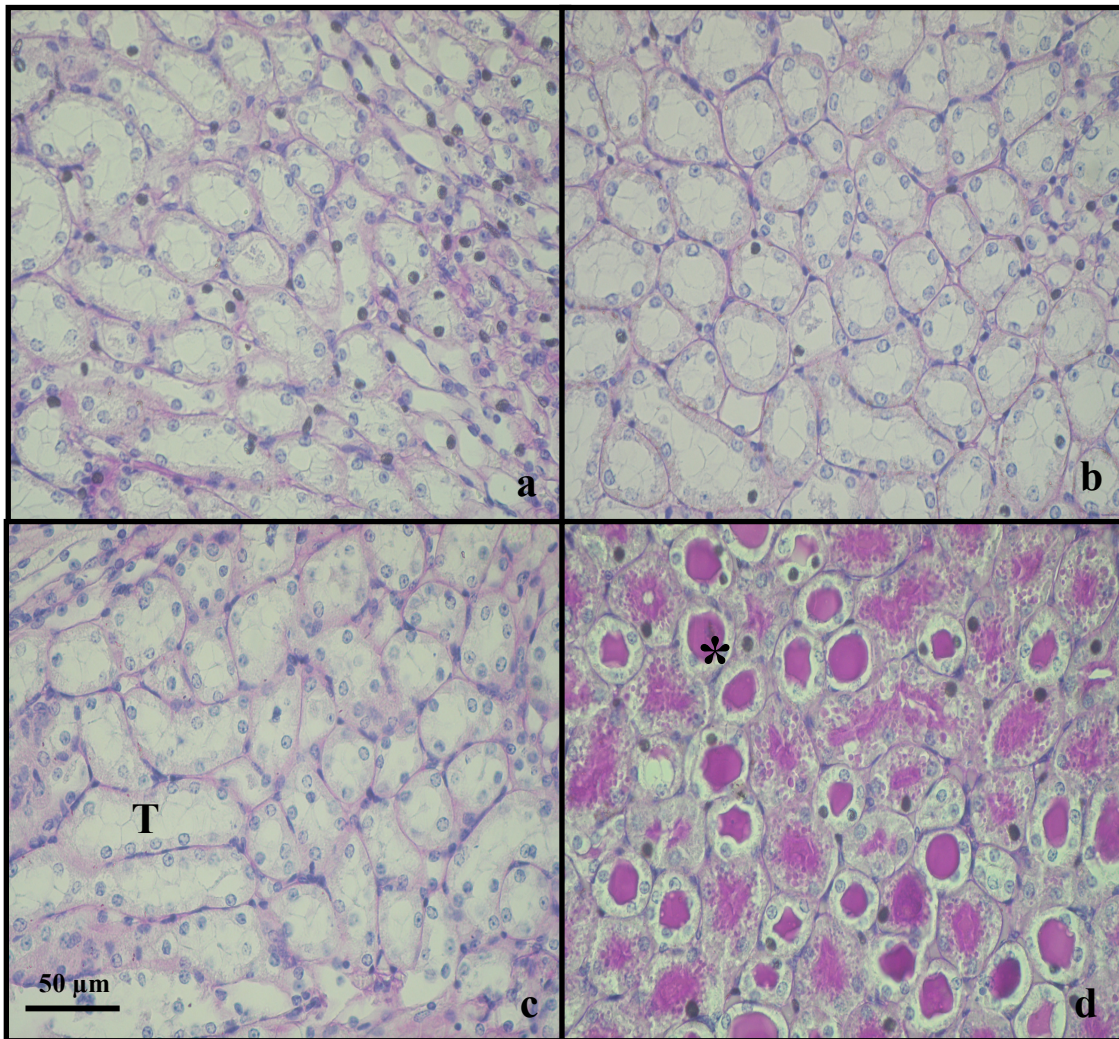


Nas **Figuras 3 e 4** podem observar-se a estrutura da zona cortical e da zona medular (respectivamente), correspondente aos grupos expostos e ao controlo, após 14h de exposição. A Figura 5 demonstra a gravidade das lesões observadas ao longo do tempo de exposição aos compostos.

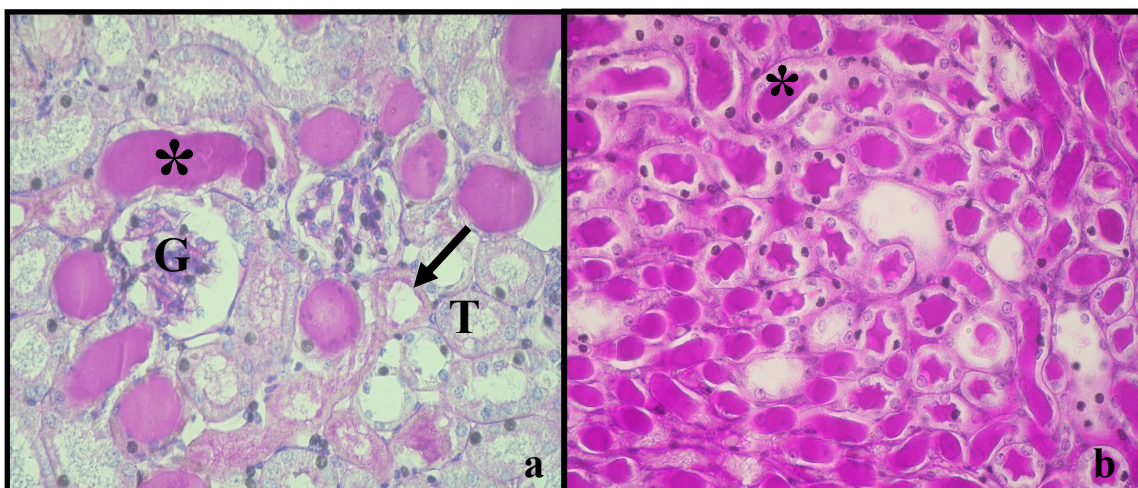


**Figura 3** – Alterações histológicas na região cortical do rim. Colorações PAS. **(a)** Controlo. **(b)**  $As_2O_5$  **(c)**  $CrO_3$  **(d)** CCA. G – Glomérulo de malpighi. T – Túbulo renal.  $\blacktriangle$  – bordadura em escova. \* – Cilindro hialino.  $\rightarrow$  – Descamação do epitélio.



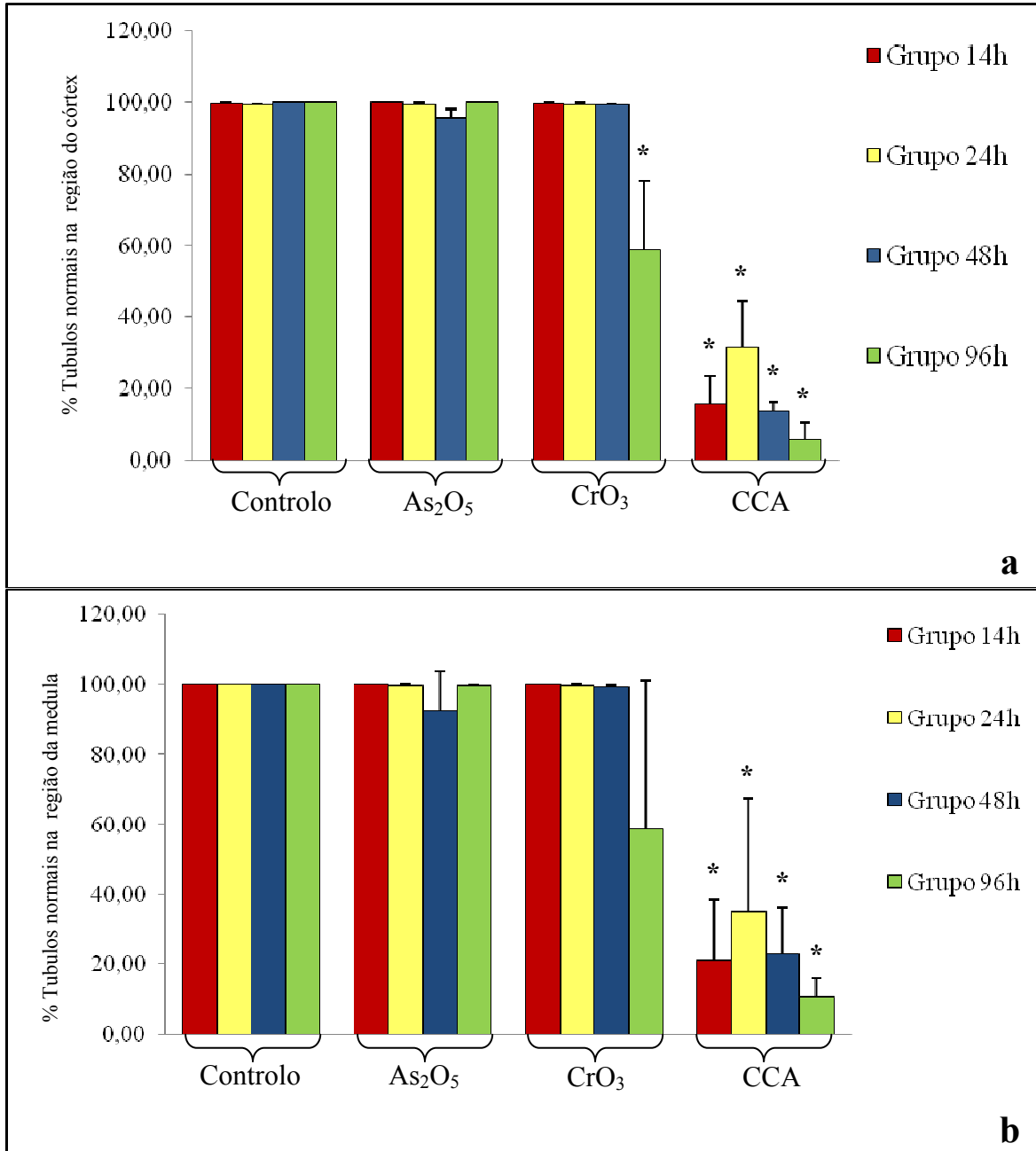


**Figura 4** – Alterações histológicas na região medular do rim. Colorações PAS. (a) Controle. (b)  $As_2O_5$  (c)  $CrO_3$  (d) CCA. T – Túbulo renal \* – Cilindro hialino.

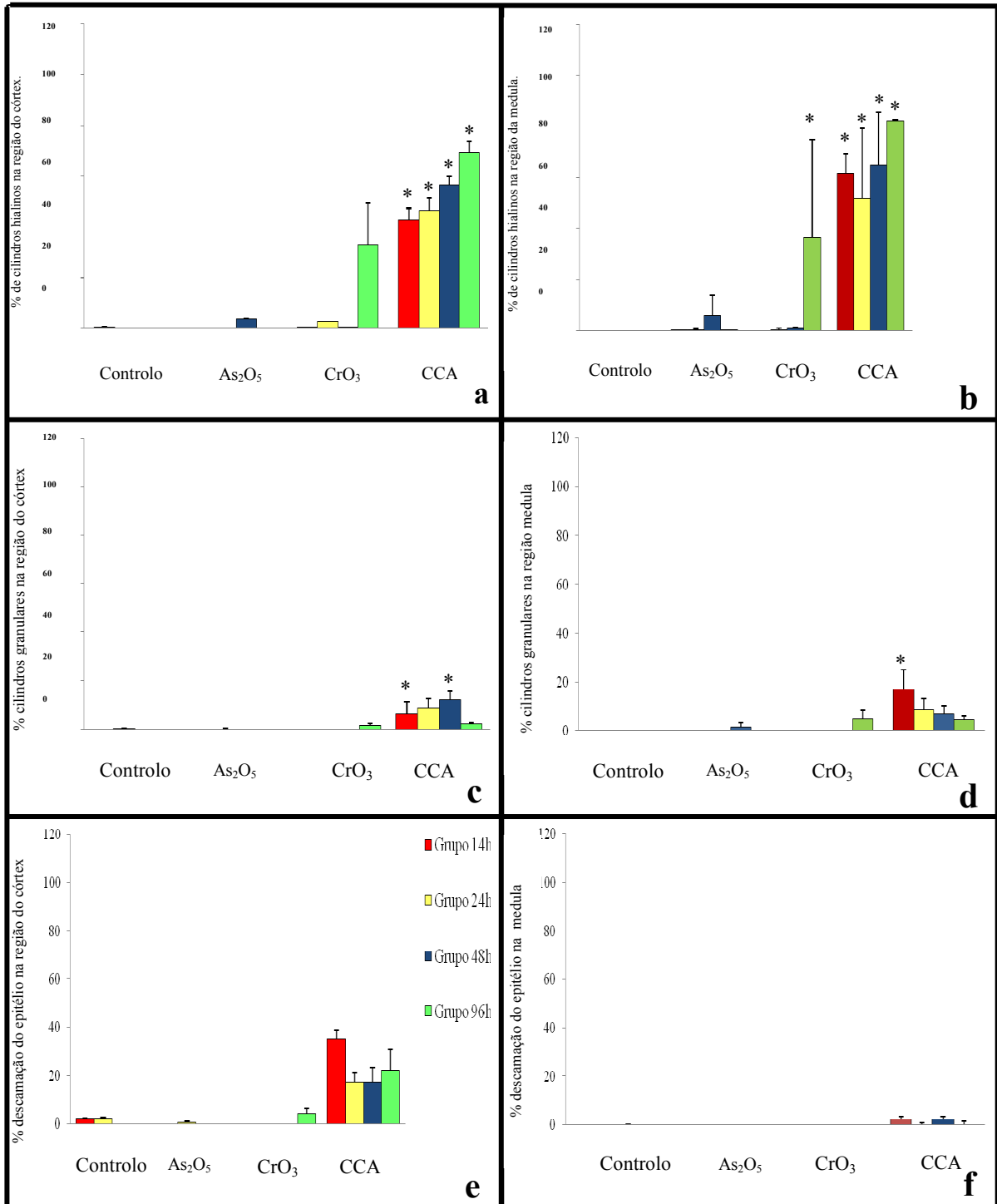


**Figura 5** – Alterações histológicas na região cortical (a) e medular (b) do rim. Colorações PAS. G – Glomérulo de malpighi. T – Túbulo renal. \* – Cilindro hialino. ➔ – Descamação do epitélio.

Efectuou-se uma análise semi-quantitativa das lesões observadas. Nas **Figuras 6 – 7** estão representadas as percentagens de túbulos normais, de cilindros hialinos, de cilindros granulares e de descamação do epitélio observadas para cada grupo de tratamento e para cada tempo de exposição, nas regiões do córtex e medula.



**Figura 6** – Percentagem de túbulos renais normais observada na região do córtex (a) e medula (b) para os grupos de tratamento. As barras correspondem aos erros padrão médios obtidos em cada um dos grupos ( $n=5$ ). Os asteriscos corresponde às diferenças significativas observadas entre os grupos e os grupos controlo respectivos ( $p < 0,005$ ).



**Figura 7** – Percentagem de lesões observadas ao longo de todos os túbulos renais. **(a,b)** Percentagem de cilindros hialinos no córtex e na medula, respectivamente. **(c,d)** Percentagem de cilindros granulares no córtex e na medula, respectivamente. **(e, f)** Percentagem de descamação do epitélio no córtex e na medula, respectivamente. As barras correspondem aos erros padrão médios obtidos em cada um dos grupos ( $n=5$ ). O asterisco corresponde às diferenças significativas observadas entre os grupos e os grupos controlo respectivos ( $p < 0,005$ ).

Como é possível observar pelas Figuras 6 e 7, a percentagem de túbulos normais decresceu, apresentando diferenças significativas para todos os períodos de exposição de CCA e para o CrO<sub>3</sub>. Esta diminuição correspondeu ao aumento significativo da percentagem de cilindros hialinos e granulares, e da descamação do epitélio para os mesmos grupos. Os restantes apresentaram maioritariamente túbulos renais normais (Matos *et al.*, 2007).

O rim, pelo seu papel na bio-transformação e eliminação de múltiplos compostos, constitui um órgão alvo de uma grande variedade de metais e metalóides (Ruegg, 1997; Madden *et al.*, 2000).

Os dados da literatura apontam para o nefrónio como alvo da sua acção, em particular os túbulos próximos (Ruegg, 1997). Estes representam o primeiro segmento do rim que recebe e processa o filtrado glomerular. O tecido epitelial que reveste os túbulos próximos apresenta a bordadura em escova, responsável pela elevada actividade de reabsorção (Madden *et al.*, 2000). Esta capacidade deve-se a vários processos de transporte activos, muitas vezes acoplados com o gradiente de sódio (Ruegg, 1997). No caso dos metais, além da reabsorção, pode haver acumulação nesta porção do nefrónio. (Oliveira *et al.*, 2006).

Os resultados histopatológicos do presente trabalho, concordam com o acima descrito, pois demonstraram que o crómio hexavalente e o arsénio pentavalente (administrados sob as formas de CrO<sub>3</sub>, As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e de CCA) produziam lesões no tubo contornado proximal.

Outros trabalhos referem igualmente lesões renais após a exposição ao crómio hexavalente, estando em concordância com o presente estudo, pois indicam que a exposição ao crómio hexavalente causa vários efeitos na função renal na espécie humana e em animais (Hayes, 1982). Entre os efeitos descritos destacam-se, no rato, grandes alterações (das células tubulares ou do organismo em geral) metabólicas após o período de tratamento (Kim e Na, 1991), surgindo as alterações histológicas mais tarde, sendo específicas do tubo proximal (Na *et al.*, 1992).

Por outro lado, Modi e colaboradores (2005) descrevem que após a ingestão do arsénio, as suas formas solúveis são absorvidas pelo aparelho digestivo. De seguida passam para a circulação que o distribui por diversos órgãos e tecidos. Após a metabolização do

arsénio, este é eliminado pela urina (Hughes *et al.*, 2003). Existem evidências da toxicidade renal do arsénio em modelos animais, usando doses elevadas (Liu *et al.*, 2000). Bisnas e colaboradores (1998) consideram os rins como alvos principais para as manifestações toxico-patológicas do arsénio, como indicam os registos de alterações bioquímicas.

Os resultados histopatológicos evidenciam necrose tubular aguda (ATN,) para todos os grupos administrados com CCA, e para o grupo de animais administrado com CrO<sub>3</sub>, no período de exposição de 96h confirmando os resultados de Mason e colaboradores (1989).

A ATN é uma lesão renal resultante da acção de múltiplos agentes tóxicos sobre o nefrónio (Thadhani *et al.*, 1996). Esta lesão caracteriza-se pela diminuição repentina da velocidade de filtração glomerular (GFR), pela acumulação de resíduos azotados e pela incapacidade do rim em manter o sódio, os electrólitos, os ácidos e outros componentes essenciais para a sua homeostasia (Esson and Schrier, 2002).

Nos túbulos renais, a ATN manifesta-se por diversas lesões e tem como consequência a obstrução tubular (Schrier *et al.*, 2004). De acordo com Schrier e colaboradores (2004), na obstrução tubular, as principais lesões são perda da bordadura em escova, em células tubulares proximais não viáveis e viáveis, e diminuição da reabsorção de sódio no túbulo proximal. Numa primeira fase, a bordadura em escova e os detritos celulares podem, no seu conjunto, obstruir o lúmen dos túbulos proximais do nefrónio. Numa fase posterior formam-se cilindros, granulares e hialinos, nos túbulos distais, e ductos colectores (Schrier *et al.*, 2004). Os cilindros granulares são constituídos por detritos celulares e conteúdo proteico (Oliveira *et al.*, 2006). Os hialinos são formados por proteínas, lípidos e detritos celulares (Oliveira *et al.*, 2006). Uribe-Uribe e Herrera (2006) reconheceram que a formação de cilindros hialinos nos túbulos distais e nos ductos colectores, se devia à acidificação e ao aumento da concentração osmótica que ocorria na ansa de henle, conduzindo a uma elevada concentração e acidez da urina neste segmento do nefrónio.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão em concordância com o acima descrito, tendo-se comprovado a natureza glicoproteica dos cilindros granulares e hialinos, através das técnicas histoquímicas.

Os efeitos nefrotóxicos por nós observados, no caso do crómio hexavalente, são idênticos aos descritos na literatura nomeadamente o de Fatima e colaboradores (2005) e o realizado no nosso laboratório por Oliveira e colaboradores (2006). Oliveira e colaboradores (2006) demonstraram degenerescência de células epiteliais tubulares e a formação de cilindros, em rins de ratinhos submetidos ao tratamento subcutâneo com  $K_2CrO_4$ . Pedraza-Chaverri e colaboradores (2006) demonstraram que o cromato afecta selectivamente a secção contornada dos túbulos proximais e induz ATN nos túbulos renais. Barrera e colaboradores (2003) referem, na espécie humana, que existem bastantes registos indicando que a exposição aguda ao crómio hexavalente promove a ATN nos túbulos renais e a lipoperoxidação. A ocorrência de ATN após administração de Cr(VI) em animais, foi descrita por Wedeen e Qian (1991) e por Gumbleton e Nicholls (1988).

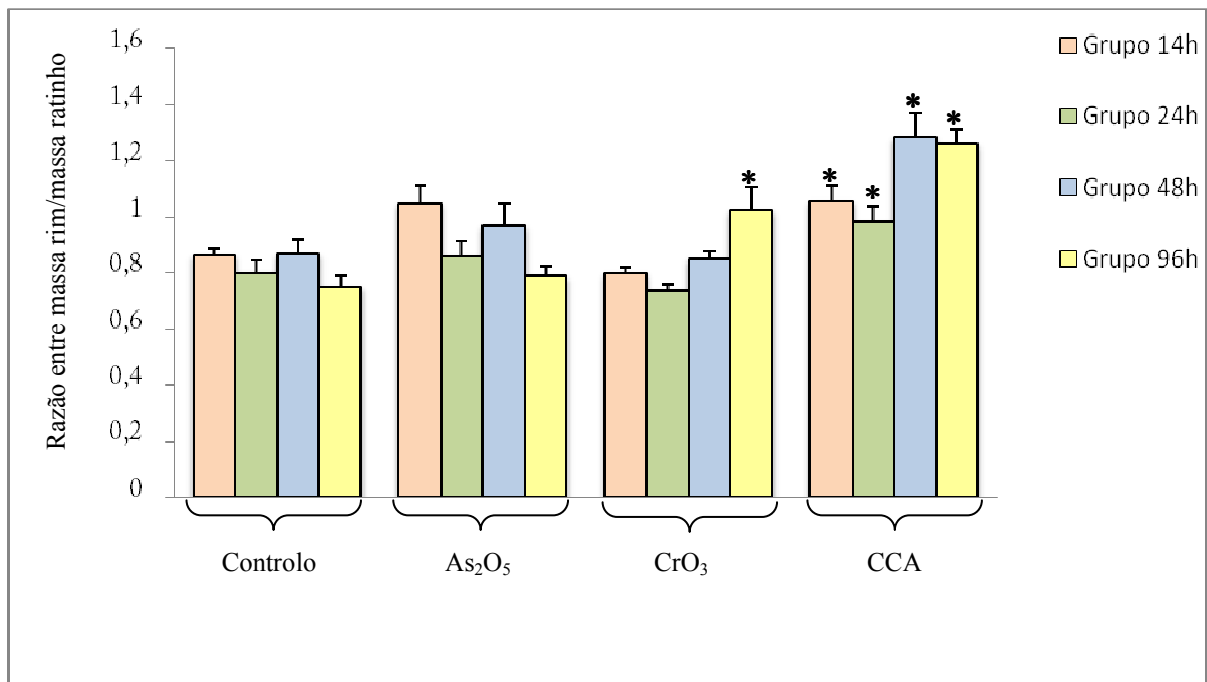
Os resultados obtidos no presente trabalho, para o arsénio pentavalente, estão de acordo com os referidos por outros autores. De facto, existem dados na literatura associando o ATN com os efeitos provocados pelo arsénio. Liu e colaboradores (2000) demonstraram o desenvolvimento de ATN e de outras lesões, após a exposição de hamsters ao As(III) e As(V). Tsukamoto e colaboradores (1983), no cão, observaram ATN após a administração de arsenato de sódio (7,33 mg/kg e 15 mg/kg).

### IV.3. Variação de Massa

A observação macroscópica do rim revelou uma coloração mais pálida nos grupos de animais expostos ao CCA e ao  $CrO_3$ .

A **Figura 8** mostra que todos os grupos de animais a que foi administrado CCA apresentaram um aumento da massa do rim e, conseqüentemente um aumento da razão entre a massa do rim e a massa corporal dos animais, quando comparados com os respectivos grupos controlo. O grupo a que foi administrado  $CrO_3$ , durante o período de exposição de 96h, também exibiu este aumento de massa comparativamente ao respectivo controlo. Os restantes grupos não exibiram diferenças significativas neste parâmetro, embora no grupo a que foi administrado  $As_2O_5$  também se tenha observado um ligeiro aumento da razão massa corporal e massa do rim nas primeiras 14h, tendo sido semelhante nos restantes períodos de exposição.





**Figura 8** – Razão entre a massa corporal e a massa dos rins dos ratinhos de diferentes grupos de tratamento. As barras correspondem aos valores de erro padrão médio obtidos em cada um dos grupos ( $n=5$ ). \* Corresponde às diferenças significativas observadas entre esse grupo e o grupo controlo ( $p < 0,005$ ).

As diferenças significativas observadas no aumento da massa do rim e, consequentemente da razão entre a massa do rim/ massa corporal, dos grupos de ratinhos sujeitos à administração de CCA e de CrO<sub>3</sub> (período de exposição 96h), pode revelar que a causa deste aumento pode ser a acumulação do crómio nos túbulos renais, bem como a presença de cilindros hialinos, granulares e dos detritos celulares nos mesmos, tal como descrito por Oliveira e colaboradores (2006), em ratinhos expostos a dicromato de potássio. No entanto, a observação do aumento desta razão nos grupos tratados com As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para os períodos de exposição de 14h e 48h pode indicar uma acção do arsénio na mistura de CCA para os mesmos períodos de exposição, uma vez que nos grupos de animais a que foi administrado CrO<sub>3</sub> não se observou este aumento. Para o período de 14h, pode ter-se observado uma acumulação inicial do arsénio no rim, devido ao primeiro impacto gerado com a sua presença, o qual pode ter contribuído para o desequilíbrio da homeostasia do rim. Em consequência, o processo de biotransformação e desintoxicação podem não terem tido capacidade de resposta



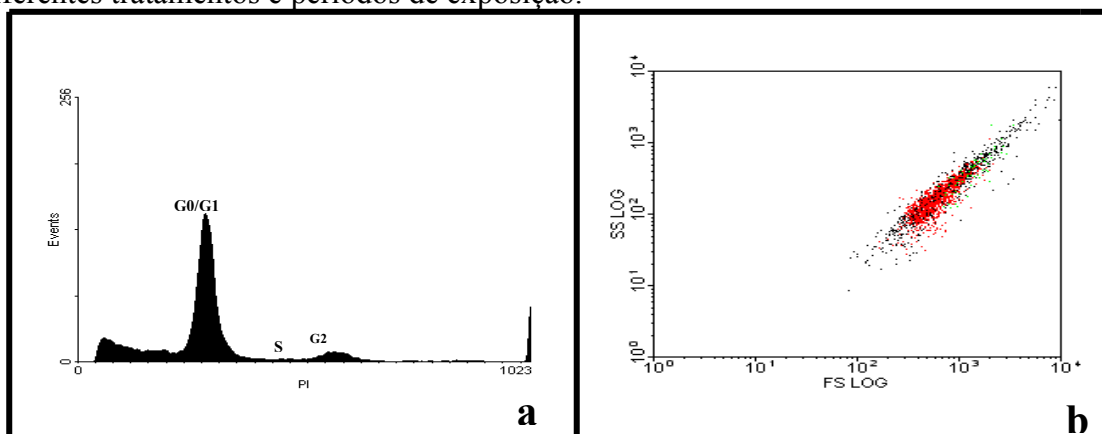
durante o período de tempo em questão. Por outro lado, sabe-se que o arsénio inorgânico é destoxificado e excretado pela urina em 48h (Hindmarch, 2000). Este facto pode explicar o ligeiro aumento da razão massa corporal e massa do rim observado ao fim de 48h nos grupos de animais a que foi administrado  $As_2O_5$ . No entanto, as evidências da presença de cilindros e de detritos celulares no interior do lúmen dos túbulos renais, nos grupos de animais tratados com CCA, são factos suficientemente plausíveis para a justificação deste aumento significativo.

Os nossos resultados são compatíveis com os resultados apresentados por Mason e Edwards (1989) onde o CCA apresentou efeitos nefrotóxicos mais acentuados do que os compostos *in situ* testados, uma vez que em todos os grupos de exposição ao CCA se observam diferenças significativas no massa do rim. Por outro lado, os nossos resultados indiciam que os efeitos tóxicos do CCA podem assemelhar-se mais aos efeitos observados para os grupos tratados com  $CrO_3$  do que para os grupos expostos ao  $As_2O_5$  devido às lesões observadas. Esta semelhança também é sustentada pela cor pálida observada para os rins de animais expostos ao CCA e com  $CrO_3$ , no período de exposição de 96h, contrastando com a dos rins de animais controlo e dos restantes grupos de tratamento.

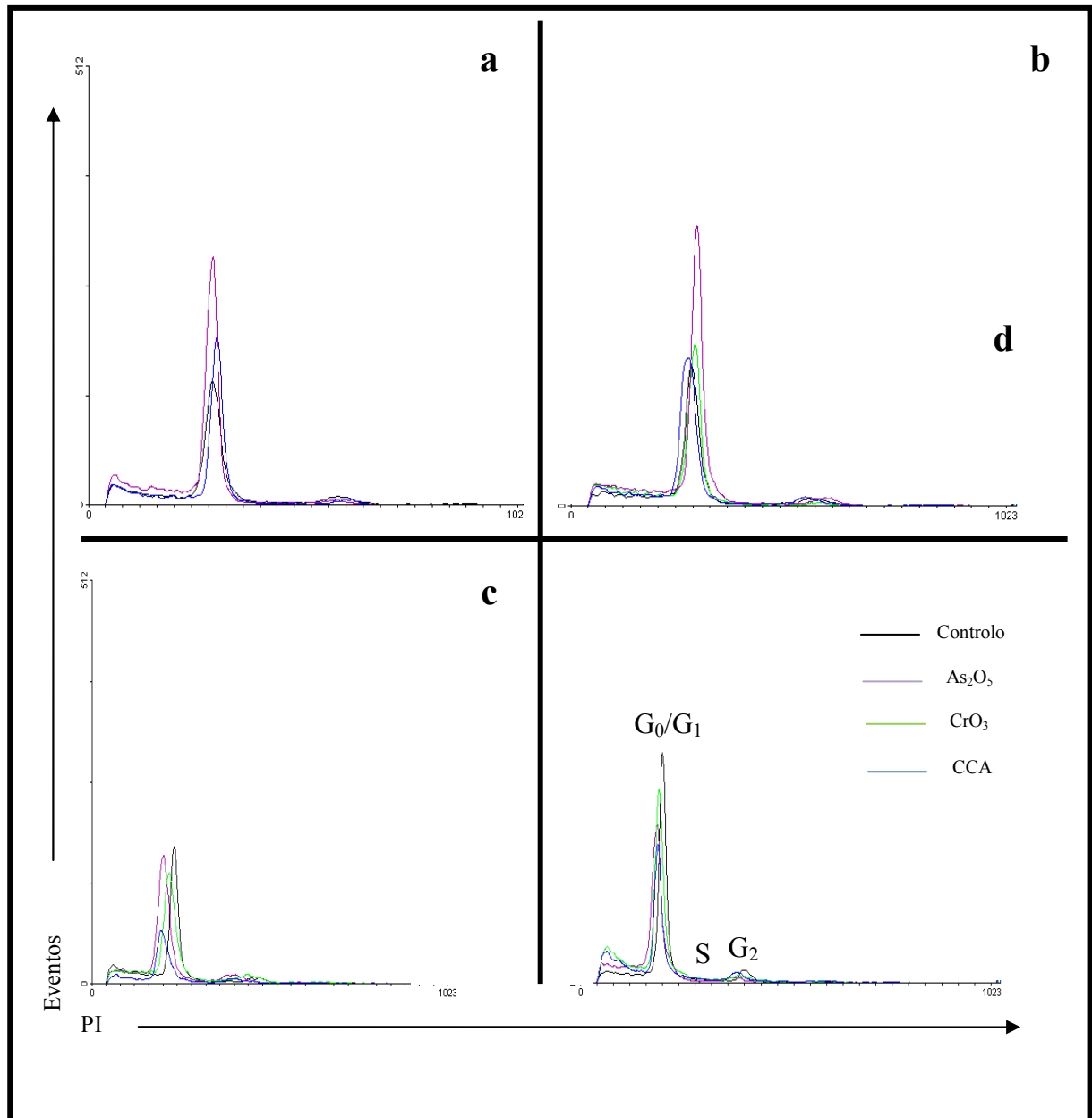
#### IV.4. Estudos de citometria de fluxo (FCM)

O efeito específico do CCA,  $CrO_3$  e  $As_2O_5$  no ciclo celular durante os períodos de exposição de 14h, 24h, 48h e 96h, foi registado em histogramas de dispersão de luz e de intensidade de fluorescência representados nas **Figuras 9 e 10**. Como esperado, os histogramas obtidos revelaram três áreas de distribuição de frequência, correspondendo às três subfases da interfase do ciclo celular,  $G_0/G_1$ , Fase S e Fase  $G_2$ (**Figura 9**).

A **Figura 9.b.** representa a intensidade de fluorescência do ADN corado com iodeto de propídeo. A **Figura 10** mostra a sequência de histogramas de ADN obtidos para os diferentes tratamentos e períodos de exposição.

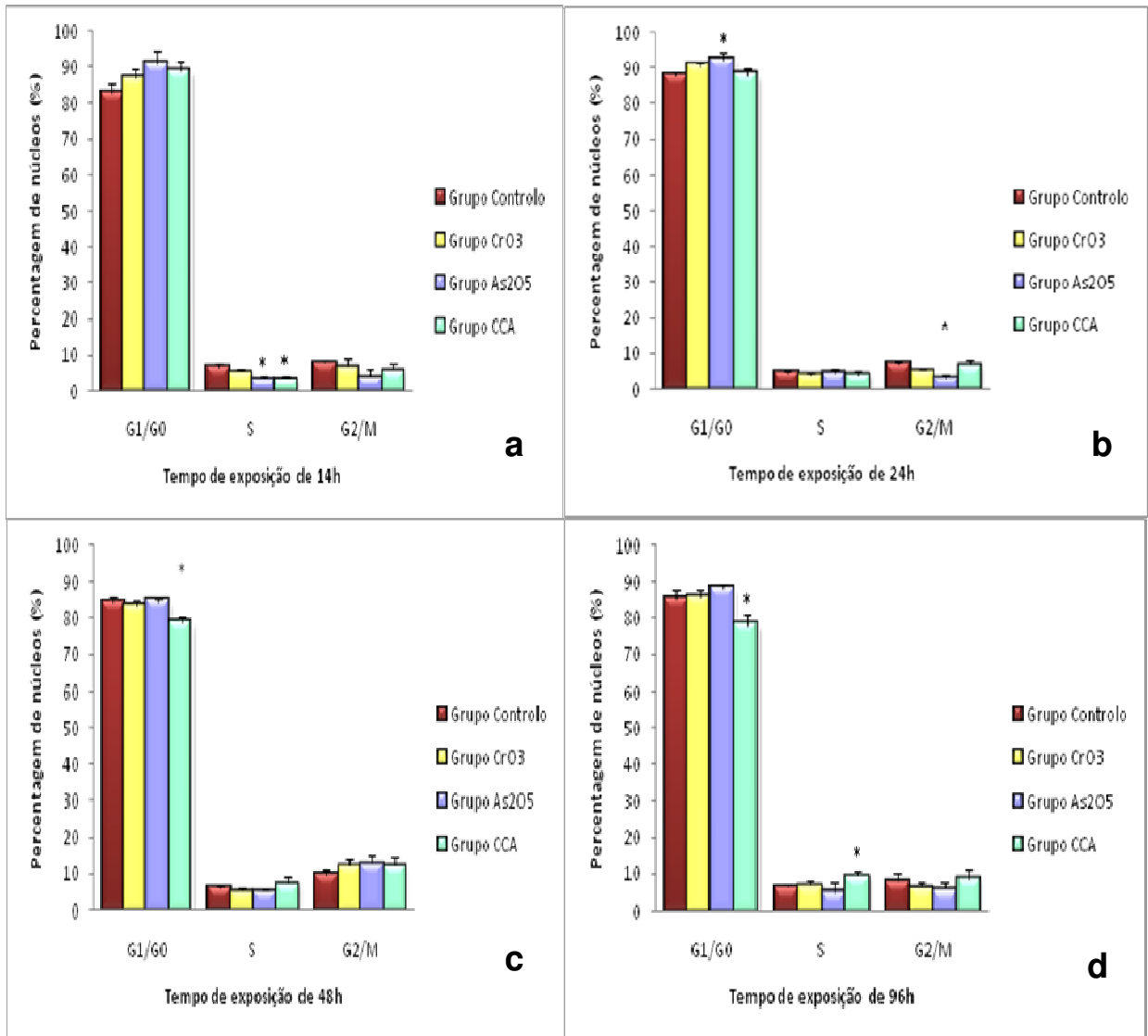


**Figura 9** – (a) Histograma de DNA mostrando a variação da intensidade de fluorescência (PI) e o número de eventos observados. (b) Distribuição dos núcleos em termos de dispersão de luz.



**Figura 10** – Sequência de histogramas de DNA obtidos para os diferentes tratamentos nos períodos de exposição (a) 14h, (b) 24h, (c) 48h e (d) 96h.

Na **Figura 11** está representada a variação (em percentagem) do número de de núcleos de células de rins, para as fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>.



**Figura 11** – Sequência da análise do ciclo celular para os diferentes tratamentos nos períodos de exposição (a) 14h, (b) 24h, (c) 48h e (d) 96h.

Os resultados deste ensaio sugeriram que os diferentes tratamentos (CCA,  $As_2O_5$  e  $CrO_3$ ) promoveram desfasamentos na transição entre as várias etapas da interfase,  $G_1$ , S e  $G_2$  do ciclo celular. Estes resultados estão de acordo com os indicados por Chen e Shin (2002), para a acção de metais e metalóides, descrita num seu artigo de revisão em que sustentam que muitos metais e metalóides podem afectar a expressão e a função de proteínas reguladoras do ciclo celular, nomeadamente as proteínas relevantes para os

pontos de controle do ciclo celular. Estas proteínas são as responsáveis pela manutenção, estabilidade e integridade das células em resposta a um stress ambiental ou ocupacional.

Nos dados obtidos por FCM (figura 11. a - b), observou-se uma tendência de todos os grupos de tratamento da acumulação dos núcleos na fase G<sub>1</sub>, nos períodos de exposição de 14h e 24h. O desfasamento dos núcleos, face ao controlo, apenas foi significativo para o grupo de tratamento de As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> exposto durante 24h. Estes resultados estão em concordância com os estudos efectuados em fibroblastos, normais e transformados, que revelaram uma grande toxicidade do NaAsO<sub>2</sub> para a concentração de 10 mM e onde ocorreram alterações no ciclo celular (fase G<sub>1</sub>) (Waalkes *et al.*, 2000). Estes autores sugeriram que o efeito tóxico do arsénio se deveu à inactivação do gene supressor tumoral, p53, que é um regulador chave do ciclo celular. Esta proteína p53 modula uma outra proteína (p21) que é reguladora da transição da fase G<sub>1</sub> para a S no ciclo celular.

Por outro lado, Chen e Shin (2002) verificaram que o arsénio trivalente é um inibidor das fosfatases. Estas enzimas são necessárias para a progressão do ciclo da fase G<sub>1</sub> para a fase S, e da fase G<sub>2</sub> (Chen e Shin, 2002). Assim, a inibição da actividade de fosfatases pode retardar a transição do ciclo celular nesta fase G<sub>1</sub> (Chen e Shin, 2002).

O aumento do número de núcleos na fase G<sub>1</sub> observado para os grupos de tratamento do trabalho desta dissertação, está em concordância com as descrições acima referidas. No entanto, seria necessário efectuar novas experiências, de modo a compreender de que forma é que arsénio, crómio ou CCA promovem alterações na activação de proteínas intervenientes no ciclo celular (e.g. proteína supressora de tumor, p53).

Por outro lado, observou-se ainda que os grupos de tratamentos de As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e CCA mostraram uma diminuição do número de núcleos com diferenças significativas, após a exposição de 14 horas, na fase S (figura 11. a). No entanto, as percentagens de núcleos atingiram os valores das do controlo, após 24h (figura 11. b). Estes resultados estão em concordância com a acumulação dos núcleos na fase G<sub>1</sub>, que uma vez retidos fazem com que a percentagem de núcleos em fase S diminua significativamente.

O facto dos valores das percentagens de núcleos terem retomado os valores das percentagens do grupo controlo pode ser compatível a nível celular tendo atingido valores próximos do controlo. No entanto, apesar do ciclo celular aparentar ter

regressado ao normal, seria necessário realizar outras experiências que apresentassem resultados relativos aos dados ao nível celular.

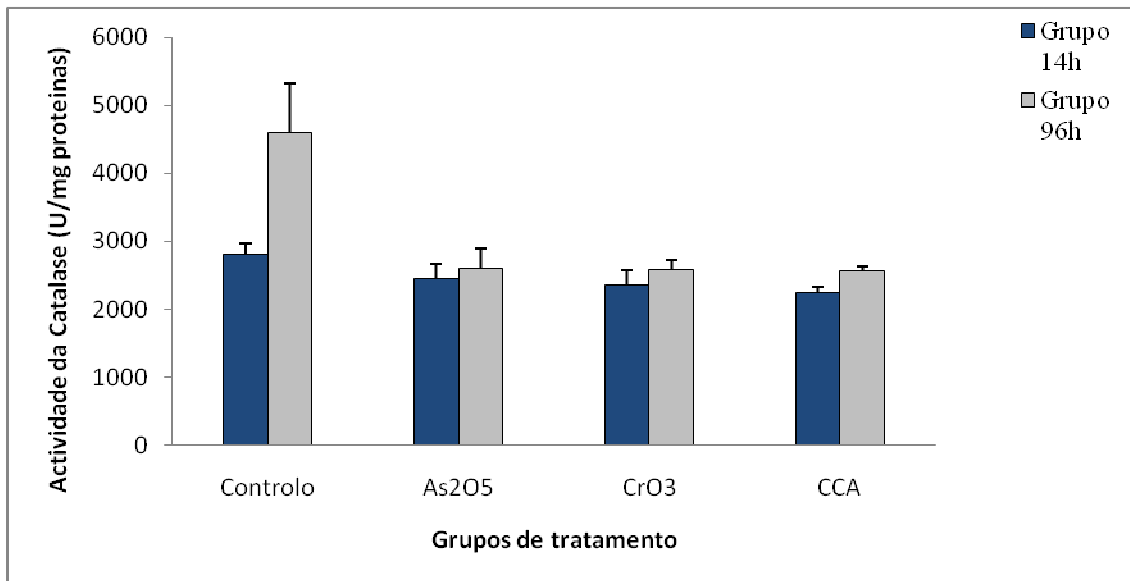
Após 48h e 96h (figuras 11. c – d), observou-se uma tendência de diminuição da percentagem dos núcleos de todos os grupos de tratamento, na fase G<sub>1</sub>, com particular atenção para o grupo submetido ao CCA. Em relação a este grupo ocorreu ainda acumulação dos núcleos nas fases S e G<sub>2</sub>. Estes resultados assemelham-se aos estudos realizados noutras linhas celulares, nomeadamente células de mieloma (Park *et al.*, 2000), fibroblastos (Yih *et al.*, 1997) e linfócitos (Ramirez *et al.*, 1997). Nestes trabalhos demonstra-se que o arsénio trivalente induziu alterações na transição das células (acumulação G<sub>2</sub>). Waalkes e colaboradores (2000) descreveram alterações no curso normal do ciclo celular após tratamento com arsénio. Por sua vez, Yih e colaboradores (1997) demonstraram que o fuso mitótico se desorganizava em fibroblastos normais após o tratamento com arsenito de sódio. Este facto estava associado ao atraso na passagem das células da fase G<sub>2</sub> para a M. Outros estudos realizados por Chen e Shi (2002) confirmam a acumulação das células na fase G<sub>2</sub>, em linhas de células epiteliais de brônquios provocado pelo arsénio trivalente. Estes autores demonstraram que o arsénio trivalente promovia um aumento da percentagem retida na fase G<sub>2</sub> e uma diminuição de núcleos na fase G<sub>1</sub>. Este aumento revelou-se dependente da dose. Este estudo revelou ainda, que os efeitos de concentrações elevadas de crómio hexavalente traduziram-se na acumulação das células na fase S, o mesmo não se verificando para as doses baixas.

Em suma, os resultados apresentados indicam que o efeito do CCA no ciclo celular se traduz numa acção diferente da acção observada para o As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e o CrO<sub>3</sub>.

## **IV.5. Estudos Bioquímicos**

### **IV.5.1. Actividade da Catalase**

A actividade enzimática da catalase (CAT) apresentou uma tendência para diminuir após a exposição ao CCA, ao CrO<sub>3</sub> e ao As<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Pela **Figura 12** observou-se esta propensão (embora não significativa), tendo-se observado também uma diferença muito grande na actividade desta enzima para os grupos a que foi administrada a solução salina nos diferentes períodos de tempo.



**Figura 12** – Tendência observada para a actividade da catalase (CAT) nos diferentes grupos de tratamentos expostos durante o período de tempo de 14h. As barras correspondem aos erros padrão observados (n=5).

A catalase é uma hemoproteína cuja maior função é destoxificar o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio quando ocorre stress oxidativo (Ashan *et al.*, 2003). Esta enzima é capaz de metabolizar os agentes oxidantes.

Neste trabalho, o resultado relativo à actividade da catalase estudada nos rins dos grupos controlo apresentou uma diferença inesperada. Esta pode ser explicada por algum factor que tenha provocado stress aos animais, e por esta razão promoveu um aumento da biossíntese e, conseqüentemente da actividade desta enzima. No entanto, existe a possibilidade de que na aplicação da metodologia para a medição da enzima, tenha havido algum pormenor técnico que possa ter interferido com a actividade da mesma. Assim, a análise dos resultados fica condicionada, sendo realizada em consideração de que os valores obtidos para os animais controlo no período de tempo de 14h seriam os esperados, uma vez que o tratamento das amostras foi efectuado logo após a recolha dos rins. Por outro lado, como a actividade da catalase estudada nos rins de diferentes grupos experimentais revelou uma tendência para diminuir nos grupos expostos quando comparados com os controlo, em ambos os períodos de exposição, consideramos que seria interessante analisá-los.

Os resultados obtidos para o grupo de tratamento de  $As_2O_5$  estão em concordância com das Neves e colaboradores (2003). Estes autores administraram subcutaneamente a quantidade de arsenito de sódio de 10 mg/kg de massa de ratinho e observaram que, após 2 horas, a actividade desta enzima no fígado, se mantinha semelhante à actividade do mesmo enzima nos animais controlo. Por outro lado, Lee e Ho (1995) demonstraram uma diminuição da actividade da catalase após o tratamento com arsenito de sódio, em culturas de células de fibroblastos humanos. O estudo realizado por Maiti e Chatter-jee (2000) corrobora com esta diminuição de actividade da catalase em fígado de ratos, após a exposição ao longo de 1 hora, a arsenito de sódio (15 mg/Kg). Um outro trabalho efectuado por Ramos e colaboradores (1995) confirma estes resultados em fígado, rim e coração de ratos, após a exposição a arsenito de sódio (15mg/Kg e 18 mg/Kg), durante o período de tempo de 1 hora.

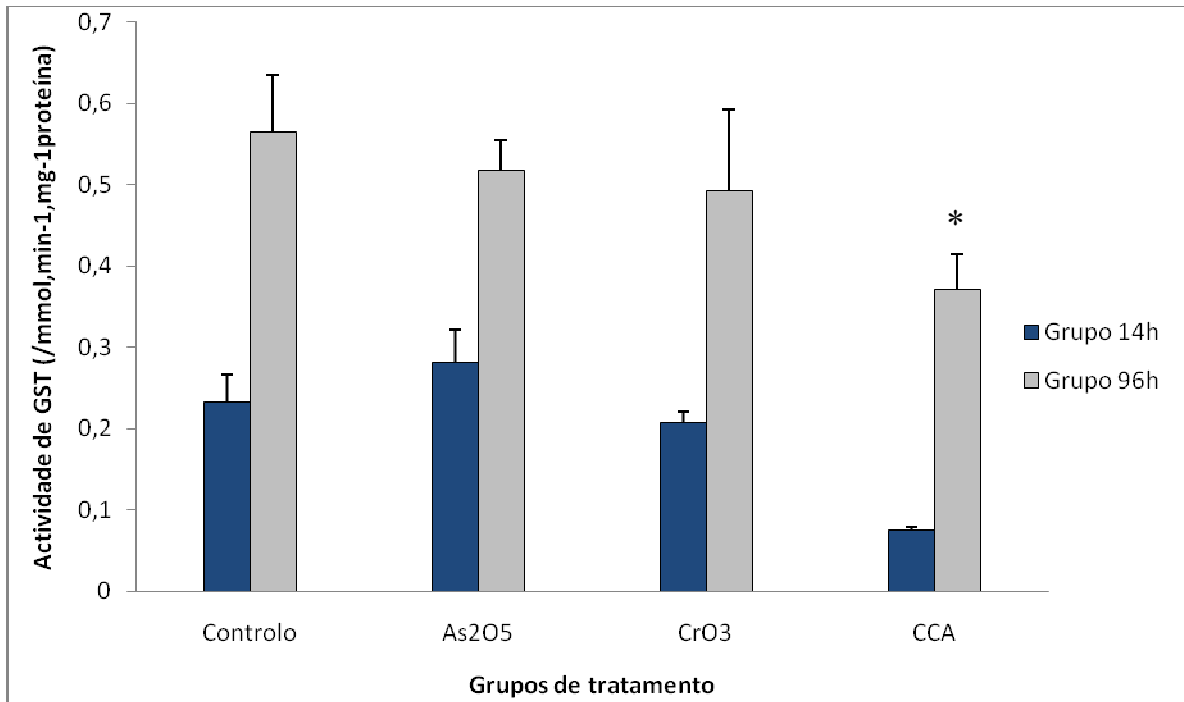
Os resultados obtidos para o grupo de tratamento de  $CrO_3$  estão em concordância com Pedraza-Chaverri e colaboradores (2006). Estes autores administraram subcutâneamente dicromato de potássio na quantidade de 15 mg/kg a ratos, e observaram uma diminuição das actividades de vários enzimas, nomeadamente da catalase. Outros estudos, realizados por Wang e colaboradores (2006), demonstraram que a administração oral de crómio hexavalente nas quantidades de 9, 17 e 35 mg/kg de massa corporal de ratos não promovia qualquer alteração na actividade da catalase no rim. Estes autores compararam os seus resultados com resultados de outros estudos efectuados com as mesmas doses mas com administração subcutânea, e concluíram que o facto de não observarem os mesmos resultados se devia ao facto de que a maioria do crómio hexavalente se reduzia à sua forma trivalente até este atingir o rim. Sabe-se que a nefrotoxicidade do crómio hexavalente está dependente da forma química do crómio que atinge o rim.

Os resultados do presente estudo indicam que o CCA apresenta um comportamento distinto na acção da actividade desta enzima.

#### **IV.5.2. Actividade da GST**

Para todos os grupos verificou-se uma tendência para a diminuição da actividade da enzima GST após 14h e 96h. No entanto, só o grupo tratado com CCA no período de exposição de 96h exibiu diferenças significativas. Por outro lado, mais uma vez na actividade desta enzima, observou-se uma grande diferença dos valores de actividades

desta enzima entre os períodos de 14h e 96h, em todos os grupos de tratamento, tendo sido novamente relevante os valores obtidos para os grupos a que foi administrado soro fisiológico. Na **Figura 13** estão representadas as actividades da GST para os diferentes grupos de tratamento.



Em condições normais a glutathiona existe na sua forma reduzida (GSH). No entanto, após um desequilíbrio resultante da exposição a agentes oxidantes gerados durante o fluxo da cadeia respiratória, das reacções de transporte de electrões pelos citocromos P450, do metabolismo de xenobióticos (ex. crómio e arsénio), da interacção ligando/receptor, da exposição a oxidantes ambientais observa-se uma variação da razão da presença de glutathiona oxidada e reduzida, o que resulta no stress oxidativo (Packer, 2002). A glutathiona apresenta várias funções nomeadamente no metabolismo do peróxido de hidrogénio, na desactivação de ROS, e no de xenobióticos como cofactor de glutathiona – S – transferase. A GST tem uma importante função na destoxicação de xenobióticos uma vez que cataliza a formação de complexos entre a glutathiona e espécies electrofílicas.

Neste trabalho, o resultado relativo à actividade da GST, estudada nos rins dos grupos controlo e dos restantes grupos de tratamento apresentou uma grande e inesperada, diferença entre os dois períodos de exposição. Novamente as explicações sugeridas em



cima (no caso da catalase) são as que nos parecem mais plausíveis. Mais uma vez, a análise dos resultados fica condicionada. No entanto, como se observou que a actividade da GST estudada nos diferentes grupos experimentais exibiu uma tendência para diminuir nos grupos tratados com  $As_2O_5$ ,  $CrO_3$  e CCA (embora apenas com diferenças significativas para o grupo do CCA), optou-se por discutir esta propensão em ambos os períodos de exposição.

Os resultados obtidos para o grupo de tratamento de  $As_2O_5$  estão em concordância com os estudos *in vitro* (GST isolada de cavalos) realizados com arsénio trivalente e arsénio pentavalente por Chouchane e Snow (2001). Por outro lado, Maiti e Chatterjee (2001) provaram que a administração de As(III) a ratos conduziu a uma redução significativa na actividade desta enzima em fígado de ratos, após 1 hora de exposição.

No presente trabalho, os resultados obtidos para o grupo exposto ao  $CrO_3$  estão em concordância com a diminuição dos níveis de actividade de glutathiona descritos para hepatócitos isolados (Ueno *et al.*, 1989). Debetto e colaboradores (1988) estudaram a função da glutathiona na redução citoplasmática do crómio hexavalente em timócitos, e sugeriram que a glutathiona pode estar envolvida na redução do crómio hexavalente a crómio trivalente em timócitos de ratos. Standeven e Wetterhan (1991) sugeriram que a glutathiona desempenhava uma função protectora na nefrotoxicidade do crómio hexavalente, porque a sua depleção (por um agente específico) não afectava a captação do crómio hexavalente em ratos tratados com este metal, mas resultava no aumento da massa relativo do rim e no aumento do azoto na ureia sanguínea.

Estes resultados indicam, mais uma vez, que o CCA apresenta um comportamento distinto na acção da actividade da GST, quando comparado com a acção isolada do arsénio pentavalente e do crómio hexavalente.

### **IV.5.3. Mecanismo de formação de espécies reactivas ao oxigénio envolvidos na alteração das actividades da Catalase (CAT) e da Glutathiona-S-transferase (GST)?**

Uma das razões para a indução destes efeitos tóxicos nas actividades da catalase e da glutathiona-s-transferase pelo arsénio e pelo crómio está relacionada com o stress oxidativo.

A formação de ROS, mediada por metais e metalóides, causa várias modificações ao nível do ADN, da peroxidação lipídica, da homeostasia do cálcio e dos grupos sulfidrilo (Valko *et al.*, 2005). Por outro lado, as diferenças observadas na toxicidade dos metais devem-se a vários factores (solubilidade, absorção, transporte e reactividade química) (Soths *et al.*, 1995).

O crómio está sujeito a reacções redox, onde ocorrem mecanismos envolvendo a geração dos radicais superóxido e hidroxilo, os quais estão associados à mitocôndria, aos microssomas e aos peroxissomas (Valko *et al.*, 2005; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2005). Por outro lado, Barrera e colaboradores (2003) indicam que os estados de oxidação intermédios envolvidos na redução do crómio [Cr(V), Cr(IV) e Cr(III)] podem ser mais tóxicos uma vez que estão relacionados com a produção de ROS, gerados em condições fisiológicas.

O arsénio é um exemplo de um metaloide mediando a formação de ROS, através da sua ligação directa aos grupos do tiólicos. Está envolvido na formação de peróxido de hidrogénio, superóxido, hidroxilo, e dos radicais dietil arsénico e dimetil arsénico, (Kitchin and Ahmad, 2003; Valko *et al.*, 2005). Foram já descritos vários mecanismos de formação de ROS pelo arsénio, nomeadamente nas mitocôndrias, a formação de espécies de arsénio intermediárias e a formação de espécies de arsénio metiladas (Shi *et al.*, 2004).

Em suma, os resultados obtidos indicaram que o CCA reduziu a actividade destas enzimas (CAT e GST), sendo mais potente do que os outros compostos estudados, sugerindo que talvez a mistura de CCA contenha algum componente que potencie a sua toxicidade ou que talvez a mistura do CCA seja mais tóxica do que os componentes individuais tal como Mason e Edwards (1989) concluíram.

No entanto, são necessárias novas experiências para se confirmarem as explicações sugeridas relativas aos resultados descritos nesta dissertação.

## **IV.6. Estudos Quantitativos**

### **IV.6.1. Material de Referência Certificado (MRC)**

A digestão das amostras de rim e do MRC produziram uma solução de cor amarelada (Matos *et al.*, 2006; Morais e Pereira, 2000; Pereira *et al.*, 1999). Para a análise do

arsénio e do crómio recorreu-se ao Método de Adição Padrão, por GFAAS. No Método de Adição Padrão, efectua-se adições de soluções padrão (com uma quantidade de analito conhecida) à amostra. Os valores de absorvância das amostras tratadas com alíquotas destas soluções, e sem as alíquotas, são medidos e comparados com a concentração do elemento adicionado. Este cálculo efectua-se através da construção da recta de calibração, obtida pela adição dos padrões à amostra, efectuando-se a extrapolação para o valor da absorvância zero, sendo desta forma determinado o valor da concentração do elemento que se pretendia quantificar na amostra (Beauty, 1988).

A análise foi efectuada através da construção de rectas de calibração contendo as amostras com adições dos respectivos elementos a analisar. No caso do arsénio, recorreram-se às concentrações de 2,5; 5, e 7,5 µg/L; para o crómio usaram-se concentrações 1,33; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 e 20,0 µg/L. Os parâmetros de duas rectas obtidas para a quantificação do crómio e do arsénio no MRC, estão representados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Parâmetros de duas das rectas obtidas pelo método de adição padrão para o doseamento de arsénio e crómio total no material de referência certificado (MRC).

| Amostra | Elemento | Nº de Padrões | Gama de Calibração (µg/L) | Equação  | R <sup>2</sup> |
|---------|----------|---------------|---------------------------|--|----------------|
| MRC     | As       | 3             | 2,5 a 7,5                 | Abs = $1,5 \times 10^{-3} + 6,5 \times 10^{-3} \times C$ | 0,9855         |
|         | Cr       | 6             | 1,33 a 20,0               | Abs = $1,3 \times 10^{-3} + 7,6 \times 10^{-3} \times C$ | 0,9997         |

A quantidade total de crómio e de arsénio total obtida pelo Método de Calibração das amostras encontrou-se no intervalo dos valores certificados:  $0,109 \pm 0,013$  mg/kg e  $0,59 \pm 0,11$  mg/kg, respectivamente.

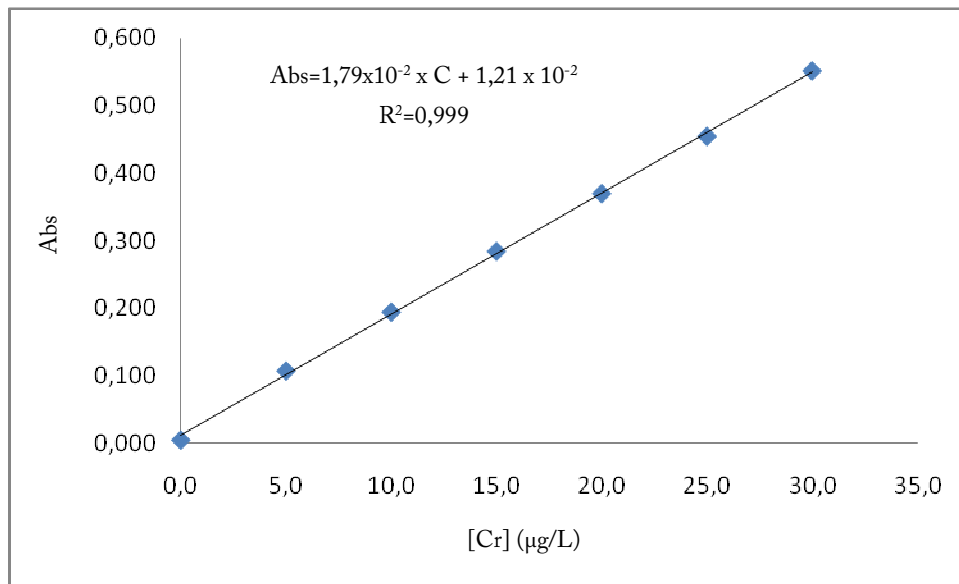
## IV. 6.2. Optimização das condições para a análise por GFAAS

### IV. 6.2. 1. Método da Recta de Calibração

As amostras que apresentaram uma gama de diluição entre 1 para 40 vezes, e a 1 para 100 vezes, foram analisadas pelo Método de Recta de Calibração (Pereira *et al.*, 1997). No Método de Calibração, representa-se graficamente o sinal analítico (resposta instrumental) em função da concentração (às vezes, da massa), a recta de calibração. Esta é obtida através da preparação de um conjunto de soluções padrão contendo uma concentração conhecida do elemento que se pretende analisar. Estas soluções padrão são

preparadas sob as mesmas condições que a amostra que contém o elemento em quantidades desconhecidas. É a partir da interpolação desta recta de calibração que se determina a linearidade da resposta instrumental, bem como a concentração do elemento que se pretende analisar nas amostras (Beauty, 1988).

Para a quantificação do crómio nos rins tratados com CCA, e a partir das soluções padrão de concentrações 5,00, 10,00, 15,00, 20,00, 25,00 e 30,00 µg/L, obteve-se a recta de calibração representada na **Figura 14**.



**Figura 14** – Recta de calibração obtida com as soluções padrão de Crómio, usada para a quantificação do Crómio total nas amostras tratadas com CCA. A expressão que relaciona a absorvância com a concentração é  $Abs=1,79 \times 10^{-2} \times C + 1,21 \times 10^{-2}$ .  $R^2=0,999$ .

Para a quantificação do crómio e do arsénio nos rins tratados com CCA recorreu-se ao mesmo Método de Calibração, utilizando soluções padrão de concentrações 5,00; 10,00; 15,00; 20,00; 25,00 e 30,00 µg/L e 0,71; 1,429; 2,857; 17,143 e 34,28, respectivamente. Na **Tabela 6** estão resumidos os dados relevantes para a determinação da quantidade total destes elementos nos rins dos ratinhos.

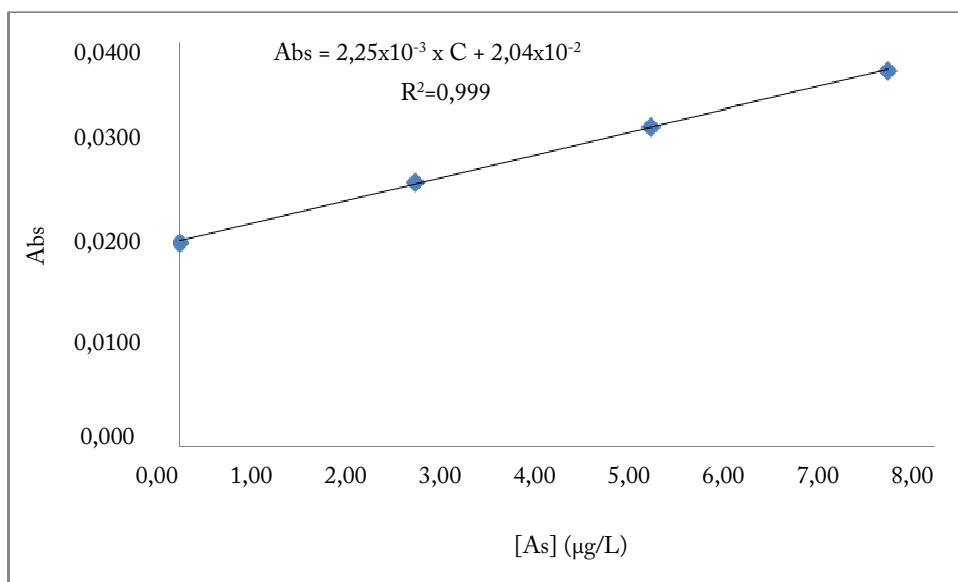
**Tabela 6** – Parâmetros das rectas obtidas pelo método da curva de calibração para o doseamento de arsénio e crómio total nos rins.

| Amostra                        | Elemento | Nº de Padrões | Gama de Calibração (µg/L) | Equação  | R <sup>2</sup> |
|--------------------------------|----------|---------------|---------------------------|--|----------------|
| CrO <sub>3</sub>               | Cr       | 6             | 5 a 30                    | $Abs=2,2 \times 10^{-2} \times C + 2,4 \times 10^{-2}$ | 0,999          |
| As <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | As       | 6             | 0,714 a 34,28             | $Abs=5,1 \times 10^{-3} \times C + 8,6 \times 10^{-3}$ | 0,999          |

**IV. 6.2. 2. Método da Adição Padrão**

Numa primeira fase, as amostras que apresentaram uma gama de diluição entre 10× a 20×, ou sem diluição, foram analisadas pelo Método de Adição Padrão.

A análise foi efectuada através da construção de uma recta de calibração (**Figura 15**) para cada amostra.



**Figura 15** – Recta do Método de Adição Padrão de uma amostra para o doseamento de Arsénio. A expressão que relaciona a absorvância com a concentração é  $Abs = 2,25 \times 10^{-3} \times C + 2,04 \times 10^{-2}$ .  $R^2 = 0,999$ .

Na **Tabela 7** estão resumidos os dados relevantes para o processo de validação da metodologia do doseamento do arsénio.

**Tabela 7** – Parâmetros importantes no doseamento de arsénio total nos rins.

| Amostra                        | Elemento | Nº de Padrões | Gama de Calibração (µg/L) | Equação  | R <sup>2</sup> |
|--------------------------------|----------|---------------|---------------------------|--|----------------|
| As <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | As       | 3             | 2,5 a 7,5                 | $Abs = 1,9 \times 10^{-2} + 2,5 \times 10^{-3} \times C$ | 0,998          |
|                                |          | 3             | 2,5 a 7,5                 | $Abs = 1,5 \times 10^{-2} + 2,0 \times 10^{-3} \times C$ | 0,990          |
|                                |          | 3             | 2,5 a 7,5                 | $Abs = 1,2 \times 10^{-2} + 2,2 \times 10^{-3} \times C$ | 0,996          |
|                                |          | 3             | 2,5 a 7,5                 | $Abs = 1,9 \times 10^{-2} + 2,2 \times 10^{-3} \times C$ | 0,999          |

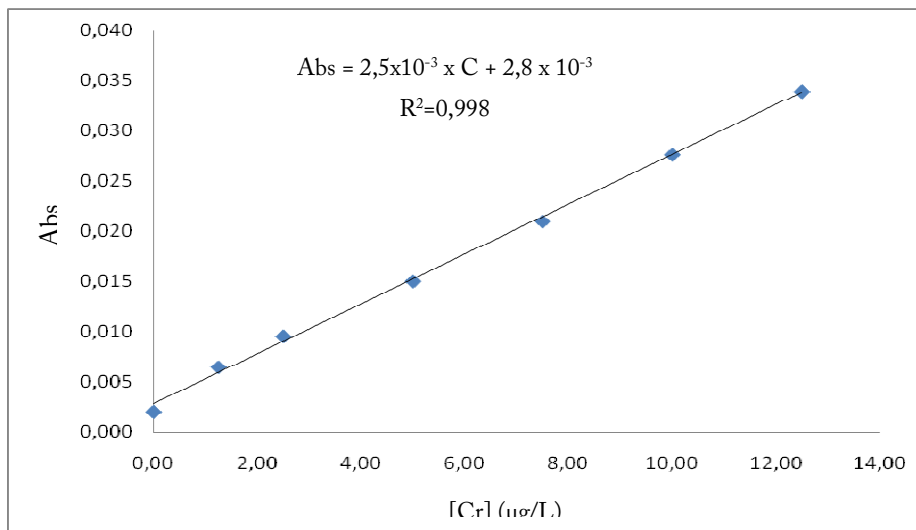
Nestas quatro amostras diferentes, observou-se que o declive das rectas de calibração era constante, indicando que o efeito de matriz era o mesmo nas várias amostras. Esta influência no sinal analítico, podia resultar dos teores elevados de ácido nítrico no digerido e/ou de restos de material orgânico ainda presentes no digerido. Para avaliar

qual dos dois factores era o predominante, recorreu-se ao Método de curva de Calibração por Adição Padrão usando uma matriz de ácido nítrico puro.

#### IV. 6.2. 3. Método da Curva de Calibração pela Adição Padrão

Numa segunda fase, as amostras que apresentaram uma gama de diluição entre 1 para 10 vezes, e de 1 para 20 vezes, ou sem diluição, foram também analisadas pelo Método da Curva de Calibração pela Adição Padrão. No Método de Calibração por Adição Padrão, o princípio é o mesmo do Método de Adição Padrão, com a diferença que se efectua a simulação de matriz. Assim, em vez de se usar a amostra contendo os padrões de concentração conhecida, utiliza-se apenas uma solução de HNO<sub>3</sub> contendo os padrões de concentração conhecida.

A análise foi efectuada através da construção de rectas de calibração, sendo o branco realizado com o ácido nítrico supra puro. Para a quantificação do crómio nos rins controlo, e a partir das soluções padrão de concentrações 1,33; 4,00; 8,00; 12,00; 16,00 e 20,00 µg/L, obteve-se a recta de calibração representada na **Figura 16**.



**Figura 16** – Recta de calibração de Adição de soluções Padrão às amostras obtida com as soluções padrão de crómio, usada para a quantificação do crómio total nas amostras tratadas com CrO<sub>3</sub>. A expressão que relaciona a absorvância com a concentração é  $Abs = 2,5 \times 10^{-3} \times C + 2,8 \times 10^{-2}$ .  $R^2 = 0,999$ .

Para a quantificação do arsénio, nos rins tratados com As<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, recorreu-se ao mesmo Método de Calibração por Adição Padrão, utilizando soluções padrão de concentrações 1,25; 2,5; 5; 7,5; 10 e 12,5 µg/L. Para a quantificação do arsénio, nos rins controlo, recorreu-se ao mesmo Método de Calibração por Adição Padrão, utilizando soluções padrão de concentrações 0,71; 1,429; 2,857; 17,143 e 34,28. Na **Tabela 8** estão

resumidos os dados relevantes para a determinação da quantidade total destes elementos nos rins dos ratinhos.

**Tabela 8** – Parâmetros importantes no doseamento de arsénio total nos rins.

| Amostra                        | Elemento | Nº de Padrões | Gama de Calibração (µg/L) | Equação   | R <sup>2</sup> |
|--------------------------------|----------|---------------|---------------------------|---|----------------|
| Controlo                       | As       | 6             | 0,71 – 34,3               | Abs= $1,9 \times 10^{-2} + 2,5 \times 10^{-3} \times C$ | 0,998          |
| As <sub>2</sub> O <sub>5</sub> |          | 6             | 0,71 – 34,3               | Abs= $1,5 \times 10^{-2} + 2,0 \times 10^{-3} \times C$ | 0,990          |

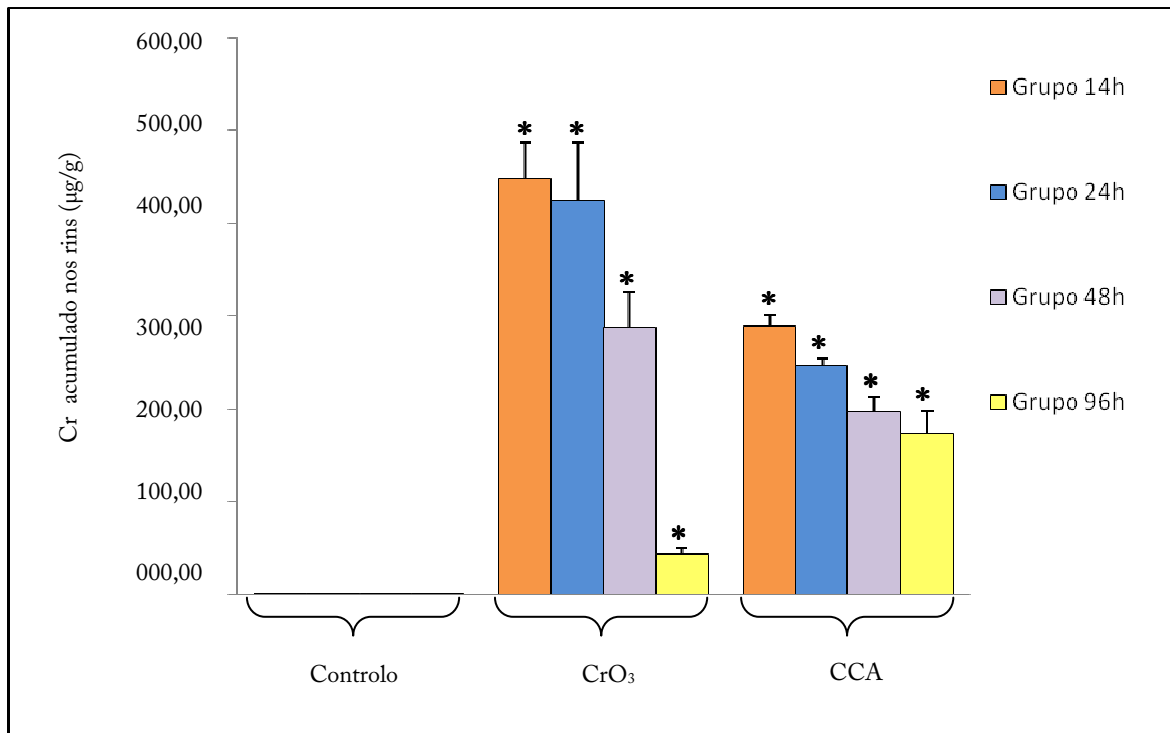
Pela equação das rectas apresentadas, quer na **Figura 15** quer na **Tabela 8**, observou-se que o declive se manteve constante, e semelhante ao declive obtido nas rectas obtidas para o Método de Adição Padrão. Concluiu-se assim, que o efeito de matriz era devido aos teores elevados de ácido nítrico no digerido, e que o Método da Curva de Calibração pela Adição Padrão usando padrões preparados em ácido nítrico era aplicável para a determinação de baixas concentrações de arsénio nos rins. Simultaneamente, verificou-se que a metodologia de digestão aplicada aos rins, era apropriada pois não havia nenhuma influência de possíveis restos de material orgânico mal digerido.

#### IV. 6.3. Acumulação do crómio e de arsénio no rim

O doseamento do crómio total nos digeridos de rim está sintetizado na **Figura 17**. Os valores estão expressos em µg g<sup>-1</sup> de massa seca. Pela **Figura 17** observou-se que todos os grupos de animais sujeitos aos diferentes tratamentos (e aos diferentes tempos de exposição), apresentaram valores de concentração de crómio por massa de massa seca, significativamente diferentes dos valores exibidos pelo grupo controlo.

Constatou-se também que as concentrações de crómio mais elevadas se observaram durante os períodos de tempo de 14h e 24h, tanto para os grupos tratados com CCA como para os grupos tratados com Cr(VI), sendo as quantidades deste elemento inferiores para a exposição de 96h de ambos os grupos. Desta forma, verificou-se que em ambos os grupos de animais (CrO<sub>3</sub> e CCA) existiu uma tendência do decréscimo da acumulação do crómio no rim, ao longo destes quatro períodos de tempo testados. Percebeu-se também que os valores da concentração de crómio nos animais controlo se mantiveram baixos e constantes. Por outro lado, comparando os valores das concentrações de crómio acumulado nos rins dos grupos tratados com CrO<sub>3</sub> com os grupos tratados com CCA, constatou-se que os valores de crómio acumulados nos

grupos de  $\text{CrO}_3$  são muito superiores aos valores de crómio obtidos para os rins dos grupos tratados com CCA.

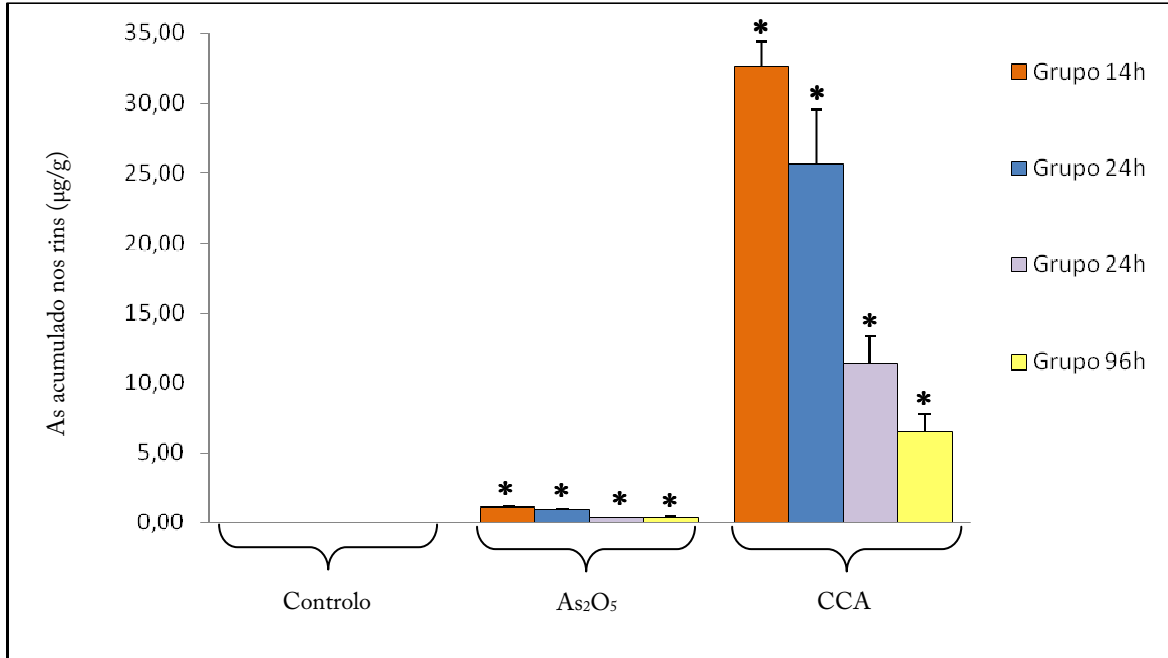


**Figura 17** – Quantidade de crómio total acumulado nos rins de ratinhos após a administração das respectivas soluções. As barras verticais correspondem aos valores médios de erros padrão ( $n=15$ ). Os asteriscos correspondem às diferenças significativas entre os grupos de tratamento com os grupos controlo respectivos ( $p < 0,005$ ).

O doseamento do arsénio total nos rins está sintetizado na **Figura 18**. Os valores estão expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca. Pela **Figura 18** observou-se que nos animais dos grupos controlo a concentração de arsénio apresentava valores muito pequenos, não tendo sido detectada. Todos os outros grupos de animais sujeitos aos diferentes tratamentos, apresentaram valores de concentração de arsénio por massa de massa seco elevados. Constatou-se também, que as concentrações de arsénio, tal como aconteceu no crómio, se apresentaram mais elevadas durante os períodos de tempo de 14h e 24h, tanto para os grupos tratados com CCA como para os grupos tratados com arsénio pentavalente, sendo as quantidades de arsénio inferiores para a exposição de 48h e 96h de ambos os grupos. Desta forma, verificou-se que em ambos os grupos de animais ( $\text{As}_2\text{O}_5$  e CCA) existiu uma tendência do decréscimo da acumulação do arsénio no rim, ao longo destes quatro períodos de tempo testados. Percebeu-se também que os valores da concentração de arsénio nos animais controlo se mantiveram baixos e constantes. Por



outro lado, comparando os valores das concentrações de arsénio acumulado nos rins dos grupos tratados com  $As_2O_5$  com os grupos tratados com CCA, constatou-se que os valores de arsénio acumulados nos grupos de CCA são muito superiores aos valores de arsénio obtidos para os rins dos grupos tratados com  $As_2O_5$ .



**Figura 18** – Quantidade de arsénio total acumulado nos rins de ratinhos. As barras verticais correspondem aos valores médios de erros padrão ( $n=15$ ).

Os dados relativos à acumulação do crómio são consistentes com os revelados por Pedraza-Chaverrí e colaboradores (2005) onde, através de dados fármaco-cinéticos, estes autores demonstram que o crómio é rapidamente distribuído pelos diferentes órgãos, inclusive no rim. Por outro lado, o retardamento da excreção do crómio pode estar relacionado com o facto deste se encontrar localizado em vacúolos das células dos túbulos proximais (Berry *et al.*, 1978).

Os dados obtidos no presente trabalho relativos à acumulação do arsénio, são consistentes com a biotransformação e a tóxico-cinética deste elemento (Klassen e Watkins, 2001). O tempo de meia vida biológico do arsénio inorgânico num organismo é aproximadamente de 10h e cerca de 80% de compostos arsenicais são excretados ao fim de 72h (Klassen e Watkins, 2001).

Um outro resultado relevante destas análises quantitativas é revelado na distribuição do arsénio e do crómio. Estes resultados quantitativos indiciam que as distribuições do

CCA no rim são diferentes da distribuição dos compostos isolados de arsénio pentavalente e do crómio hexavalente. Este facto sugere que as alterações observadas na histologia, na citometria e na bioquímica estão em concordância com estes dados analíticos.

As lesões morfológicas induzidas pelo CCA no rim e a acumulação dos respectivos elementos estão relacionadas com os mecanismos celulares de transporte do crómio e do arsénio.

Na nefrotoxicidade do arsénio o seu estado de oxidação e a sua forma química são características fundamentais para a compreensão dos mecanismos de lesão celular. Devido às semelhanças tanto ao nível das características estruturais como das suas propriedades físico-químicas, há dados que provam a partilha do mesmo sistema de transporte entre o arsénio pentavalente e o fosfato inorgânico (Kenney e Kaplan, 1988; Delnomdedieu *et al.*, 1994). Huang e Lee (1996) observaram que este facto tinha efeitos drásticos na toxicidade do arsénio. Estes autores provaram que a toxicidade do As(III) era cerca de 40 vezes maior do que o As(V) em células de carcinoma. No entanto, demonstraram efeitos semelhantes quando o crescimento das células ocorria em meio desprovido de fosfato. Huang e Lee (1996) concluíram que a toxicidade do arsenato se devia à captação do arsénio, e da sua regulação pelas bombas de fosfato. No entanto o trabalho destes investigadores não refere a redução do As(V) a As(III) no interior da célula. Por esta razão, apenas se pôde concluir, que a relação dose-resposta e os efeitos biológicos induzidos pela forma pentavalente do arsénio está dependente da concentração extra-celular de fosfato devido à sua semelhança estrutural (Carter, 2003).

A nefrotoxicidade induzida pelo crómio hexavalente também está relacionada com a sua captação para o interior das células. Na célula, o crómio hexavalente existe sob a forma de oxianião de cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ). O cromato entra na célula através de um transportador não específico (sistema permease) que transporta outros aniões de configuração tetraédrica, nomeadamente o anião sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) e o anião fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ), e é reabsorvido no túbulo próximo do rim onde a sua bio-transformação ocorre (Arslan *et al.*, 1987; Debetto *et al.*, 1988; De Flora *et al.*, 1989). Devido ao seu forte poder oxidante, após a sua entrada na célula, o crómio hexavalente sofre redução pela interacção com os componentes citoplasmáticos, dando origem a complexos de coordenação com diferentes moléculas biológicas (podendo encontrar-se com diferentes

valências) e interferindo assim com as suas funções (Debetto *et al.*, 1988). Este facto pode explicar a acumulação do cromato nos túbulos próximos, bem como o desencadeamento de todo o processo que conduziu ao aparecimento de ATN.

Alguns dados da literatura indicam que a combinação de metais pode alterar o efeito patológico de cada um deles, quando administrados isoladamente, embora se desconheça qual o mecanismo das células renais que está envolvido neste fenómeno (Madden and Fowler, 2000). Por exemplo, a exposição da mistura chumbo (Pb) + cádmio (Cd) + arsénio (As) em roedores mostrou padrões de toxicidade característicos, e diferentes de qualquer um destes metais isoladamente (Fowler, 1992). Outros trabalhos demonstraram, igualmente, que a exposição de misturas de metais conduzem a efeitos bioquímicos e morfológicos diferentes ao dos metais actuando individualmente (Madden and Fowler 2000).

O presente trabalho, veio confirmar dados existentes na bibliografia e introduzir alguns novos elementos para a compreensão da acção tóxica do CCA sobre o rim. São, no entanto, necessários mais estudos para um melhor conhecimento do mecanismo de toxicidade do CCA, não só a nível renal, como também de outros órgãos para uma compreensão mais completa do efeito tóxico desta substância e dos seus constituintes.

## **Capítulo V – Conclusões e Perspectivas Futuras**

## V.1. Conclusões

Como anteriormente já foi escrito, o presente trabalho, veio confirmar dados existentes na bibliografia e introduzir alguns novos elementos para a compreensão da acção tóxica do CCA sobre o rim.

Os resultados desta dissertação, obtidos através das análises biológicas e analíticas, permitiram concluir que os compostos  $As_2O_5$ ,  $CrO_3$  e CCA são nefrotóxicos, sendo o CCA o agente mais tóxico, apontando para um possível efeito sinérgico dos compostos individuais na mistura, tal como Mason e Edwards (1989) também sugeriram.

A nível histopatológico detectaram-se diferenças significativas entre os efeitos provocados pelo CCA e os causados pelo  $CrO_3$ , quando comparados com os efeitos provocados pelo  $As_2O_5$  e com os animais do grupo controlo. Por outro lado, ao nível subcelular, concluiu-se que o efeito do CCA no ciclo celular se assemelhava ao provocado pelo  $As_2O_5$ . Ambos afectaram significativamente o ciclo celular, tendo condicionado a progressão do mesmo em diferentes fases e ao fim de diferentes períodos de tempo. Relativamente aos ensaios bioquímicos, demonstrou-se uma redução da actividade da CAT e da GST para todos os grupos estudados. O CCA revelou uma maior diminuição da actividade destas enzimas. No entanto, estes ensaios bioquímicos terão de ser repetidos devido aos valores discrepantes obtidos para as actividades das enzimas nos diferentes períodos de tempos, nos animais controlo.

Os resultados obtidos através da análise biológica acima referidos foram concordantes com a análise quantitativa efectuada por GFAAS. A análise quantitativa revelou uma distribuição e acumulação do crómio e do arsénio total no rim, diferente para os grupos de CCA,  $As_2O_5$  e do  $CrO_3$ . A razão para esta diferença de distribuição não ficou clarificada, levantando outras questões conduzindo a uma nova abertura para uma série de outras experiências.

Desta forma o comportamento ao nível da histologia, ciclo celular e bioquímica do  $As_2O_5$  e do  $CrO_3$  revelou características diferentes da mistura CCA. A metodologia utilizada foi eficaz para o esclarecimento do mecanismo de acção do CCA.

No entanto, muitas outras questões ficaram ainda por responder: Que espécies químicas de arsénio pentavalente e de crómio hexavalente existem na solução de CCA a que os

animais foram expostos? Será que a composição do CCA diluído contém outros elementos para além do Cr(VI) e As(V)? Qual a razão da acção tóxica do CCA ser tão diferente ao nível celular e subcelular quando comparada com a acção de  $As_2O_5$  e  $CrO_3$  *per se*? Desta forma, o presente trabalho representa apenas um início no processo de compreensão da acção tóxica desta mistura utilizada para a protecção da madeira, o CCA.

## V.2. Perspectivas Futuras

Apesar da proibição da utilização do CCA, este composto continua a ser um perigo para o ambiente e para a saúde pública, como consequência da sua durabilidade. Por esta razão, e apesar dos estudos desenvolvidos, ainda muito trabalho há para fazer, nomeadamente estudos ocupacionais e ambientais, para o completo esclarecimento do mecanismo tóxico deste produto. Por esta razão, justifica-se uma continuação dos estudos agora realizados.

Futuramente, será imprescindível conhecer os efeitos destes compostos a nível celular e sub-celular em outros órgãos, nomeadamente no fígado, o principal órgão interveniente nos processos de desintoxicação. O desenvolvimento do estudo de parâmetros do ciclo celular (apoptose, proteínas P53, P21 e ciclinas dependentes de quinases) será também outro dos pontos a explorar, para a melhor percepção do mecanismo de acção destes compostos.

Um outro estudo interessante será a investigação da existência, ou não, de um processo de regeneração do rim, após a intoxicação com estes agentes.

Uma outra possibilidade de continuação do trabalho consiste no estudo de todo o processo bioquímico inerente ao stress oxidativo. Seria interessante efectuar um conjunto de análises das actividades enzimáticas e da peroxidação lipídica observadas, não só ao nível do rim, mas também hepáticas.

Um outro caminho interessante consiste no esclarecimento dos mecanismos tóxicos do CCA, através de estudos do genoma, com o intuito de perceber de que forma é que esta mistura interfere com o DNA e na activação da expressão de determinados genes responsáveis pela indução da formação de proteínas, nomeadamente enzimas, importantes para a sua biotransformação.

## **Capítulo VI – Bibliografía**

- Aebi, H. (1984). *In: Oxygen Radicals in Biological Systems: Methods in enzymology*. Ed. Packer L. New York. Academic Press, pp. 121 – 126.
- Ahsan, H., Chen, Y., Kibriya, M.G., Isham, M.N., Slavkovich, V.N., Graziano, J.H., Santella, R.M. (2003). Susceptibility to arsenic-induced hyperkeratosis and oxidative stress genes myeloperoxidase and catalase. *Cancer Letters*. **201**: 57 – 65.
- Arlslan, P., Beltrame, M., Tomasi, A. (1987). Intracellular chromium reduction. *Biochimica et Biophysica Acta*. **931**: 10 – 15.
- AWPA. Selma, AL (2005). American Wood Preservers' Association. Book of Standards.
- AWWA, APHA , WEF. (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18<sup>th</sup> ed. Washington DC
- Barraj, L.M., Tsuji, J.S. and Scrafford, C.G (2007). The SHEDS-Wood Model: Incorporation of Observational Data to Estimate Exposure to Arsenic for Children Playing on CCA-Treated Wood Structures. *Environmental Health Perspectives*, **115**: 781 – 786.
- Barrera, D., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Hernández-Pando, R., Ibarra-Rubio, M.E., Pedraza-Chaverri, J. (2003). HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. *Free Radical Biology & Medicine*. **34**: 1390–1398.
- Berry, J.P., Houdry, J., Galle, P., Lagrue, G. (1978). Chromium concentration by proximal renal tubule cells: an ultrastructural microanalytical and cytochemical study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **26**: 651 – 657.
- Beauty, R. D. (1988). Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry. Perkin-Helmer Corporation. 1<sup>st</sup> edition. USA.
- Bisnas, U., Sarkar, S., Bhowmik, M.K., Roy, S. (1998). Clinicopathological profile of induced chronic arsenic toxicity in goats. *Indian Journal of Animal Sciences*. **68**: 320 – 323.



- Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248 – 251.
- Carter DE, Aposhian HV, Gandolfi AJ. The metabolism of inorganic arsenic oxides, gallium arsenide, and arsine: a toxicochemical review. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **193** :309 – 34.
- Chen, F., Shin, X. (2002). Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. *Critical Reviews in Oncology Hematology*. **42**: 105 – 121.
- Chouchane, S., Snow, E.T. (2001). In vitro effect of arsenical compounds on glutathione-related enzymes. *Chemical Research in Toxicology*. **14**: 517 – 522.
- Cocker, J., Morton, J., Warren, N., Wheller and Garrod, A.N. (2006). Biomonitoring for chromium and arsenic treatment plant workers exposed to CCA wood preservatives. *Annals of Occupational Hygiene*, **50**: 517 – 525.
- Commission Directive 1003/2/EC. (2003). Relating to restrictions on the marketing and use of arsenic (tenth adaptation to technical progress to Council Directive 76/769/EEC). *Official Journal of the European Communities*. pp. 4 – 9.
- Cox, C. (1991). Chromated Copper Arsenate. *Journal of Pesticide Reform*. **11**.
- Das Neves, R. (2003). Avaliação in vivo dos efeitos moduladores de antioxidantes na expressão da toxicidade do arsenito de sódio. *Tese de Mestrado*. Departamento de Biologia. Universidade de Aveiro.
- Debetto, P., Arslan, P., Antolini, M., Luciani, S. (1988). Uptake of chromate by rat thymocytes and role of glutathione in its cytoplasmic reduction. *Xenobiotica*. **18**: 657 – 664.
- De Flora, S., Wettelhahn, K.E. (1989). Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chemistry Reports*. **7**: 169 – 244.
- Delnomdedieu, M., Basti, M. M., Styblo, M., Otvos, J. O., Thomas, D. J. (1994). Complexation of arsenic species in rabbit erythrocytes. *Chemical Research in Toxicology*. **7**: 621 – 627.

- Esson, M.L, and Schrier, R.W. (2002). Diagnosis and treatment of acute tubular necrosis. *Annals of Internal Medicine*. **137**: 744 – 753.
- Fatima S, Arivarasu NA, Banday AA, Yusufi AN, Mahmood R. (2005). Effect of potassium dichromate on renal brush border membrane enzymes and phosphate *Human Experimental Toxicology*. **24**: 631 – 638.
- Fowler, B.A. (1993). Mechanisms of kidney cell injury from metals. *Environmental Health Perspectives*, **100**: 57 – 63.
- Gordon, T., Spanier, J., Butala, J. H., Li, P. and Rossman T. G. (2002). *In vitro* Bioavailability of heavy metals in pressure-treated wood dust. *Toxicological Sciences*, **67**: 32 – 37.
- Gumbleton, M., Nichols, P. J. (1998). Dose-response and time-response biochemical and histological study of potassium dichromate-induced nephrotoxicity in the rat. *Food and Chemical Toxicology*. **26**: 37 – 44.
- Ha, L., Ceryak, S., Patierno, S.R. (2004). Generation of S-phase dependent DNA double-strand breaks by Cr(VI) exposure: involvement in Cr(VI) induction of H2AX. *Carcinogenesis*. **25**: 2265 – 2274.
- Habig, W.H, Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S- transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, **249**: 7130 – 7139.
- Hamula C, Wang Z, Zhang H, Kwon E, Li XF, Gabos S, Le XC (2006). Chromium on the hands of children after playing in playgrounds built from chromated copper arsenate (CCA)-treated wood. *Environmental Health Perspectives*, **114**: 460 – 465.
- Hayes, R.B. (1982). Carcinogenic effects of chromium. In: Langard, S., Ed. Biological and Environmental Aspects of Chromium. *Elsevier Biomedical Press*, Amsterdam, pp. 221-247.
- Hindmarsh, J. T. (2000). Arsenic, its clinical and environmental significance. *The journal of trace elements in experimental medicine*. **13**: 165 – 172.

- Hingston, J.A., Collins, C.D., Murphy, R.J. and Lester, J.N (2001). Leaching of chromated wood preservatives: a review. *Environmental Pollution*. **111**: 53 – 66.
- Huang, R. N., Lee, T. C. (1996). Cellular uptake of trivalent arsenite and pentavalent arsenate in KB cells cultures in phosphate-free medium. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **136**: 243 – 249.
- Hughes, M.F., Kenyon, E.M., Edwards, B.C., Mitchell, C.T., Razo, L.M.D., Thomas, D.J. (2003). Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **191**: 202 – 210.
- Jacobi, G., Solo-Gabriele, H., Dubey, B., Townsend, T. and Shibata, T (2007). Evaluation of commercial landscaping mulch for possible contamination from CCA. *Waste Management*. **27**: 1765 – 1773.
- Jambeck JR, Townsend T, Solo-Gabriele H (2006). Leaching of chromated copper arsenate (CCA)-treated wood in a simulated monofill and its potential impacts to landfill leachate. *Journal of Hazardous Materials*. **135**:21 – 31.
- Lee, T.C., HO, I.C. (1995). Modulation of cellular antioxidant defense activities by sodium-arsenate in human fibroblasts. *Archives in Toxicology*. **69**: 498 – 504.
- Liu, J., Liu, Y., Habeebu, S.M., Waalkes, M.P., Klaassen, C.D. (2000). Chronic combined exposure to cadmium and arsenic exacerbates nephrotoxicity, particularly in metallothionein.I/II null mice. *Toxicology*. **147**: 157 – 166.
- Madden EF, Fowler B.A (2000). Mechanisms of nephrotoxicity from metal combinations: a review. *Drug and Chemical Toxicology*. **23**:1 –12.
- Maiti, S., Chatterjee, A.K. (2001). Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency. *Archives of Toxicology*. **75**: 531 – 537.
- Mason RW, Edwards IR. (1989). Acute toxicity of combinations of sodium dichromate, sodium arsenate and copper sulfate in the rat. *Comparative Biochemistry Physiology*. **93C**: 121 – 125.

Matos, R. C., Morais, S., Santos, T. M., Pereira, M. L., Pedrosa de Jesus, J. (2007). Estudo histológico e histoquímico do CCA (Arsenato de Cobre e Crómio) no rim de ratinhos. *XIII Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal*. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa.

Matos, R. C., Teixeira, I., Morais, S., Pereira, M. L., Pedrosa de Jesus, J. (2006. a). Application of Microwave Acid Digestion couples with UV/Vis spectrophotometry for determination of Chromated Copper Arsenate toxicity *in vivo*. *XX Encontro Nacional de Química*. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

Matos, R. C., Teixeira, I., Morais, S., Pereira, M. L., Pedrosa de Jesus, J. (2005). Chromated Copper Arsenate toxicity in mice models: preliminary studies. *Jornadas CICECO*. Departamento de Química. Universidade de Aveiro.

Mittal, M., Flora, S.J.S. (2006). Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chemico-Biological Interactions*. **162**: 128 – 139.

Modi, M., Kaul, R.K., Kannan, G.M., Flora, S.J.S. (2005). Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **20**: 197 – 204.

Moghaddam, A.H, Mulligan, C.N. (2007). Leaching of heavy metals from chromated copper arsenate (CCA) treated wood after disposal. *Waste Management*. **28**: 628 – 637.

Morais, S., Pereira, M. C. (2000). Application of stripping voltammetry and microelectrodes *in vitro* biocompatibility and *in vivo* toxicity tests of AISI 316 L corrosion products. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **14**: 48 – 54.

Na, K.J., Jeong, S.Y., Lim, C.H. (1992). The role of glutathione in the acute nephrotoxicity of sodium dichromate. *Archives of Toxicology*. **66**: 646 – 651.

Nygren O, Nilsson CA, Lindahl R (1992). Occupational exposure to chromium, copper and arsenic during work with impregnated wood in joinery shops. *Annals of Occupational Hygiene*. **36**: 509 –517.

- Katz, S. A., Salem H (2005). Chemistry and toxicology of building timbers pressure-treated with chromated copper arsenate: a review. *Journal of Applied Toxicology*. **25**: 1 – 7.
- Kenney, L.J., Kaplan, J.H.(1988). Arsenate substitutes for phosphate in the human red cell sodium pump and anion exchanger. *Journal of Biology and Chemistry*. **263**: 7954 – 7960.
- Kiernan, J.A. (1990). *Histological & Histochemical methods*. 2ª edition. Capítulos 10 e 11. Pergamon Press. England. pp. 142 – 198.
- Kim, E., Na, K.J. (1991). Nephrotoxicity of sodium dichromate depending on the route of administration. *Archives of Toxicology*. **65**: 537 – 541.
- Kitchin, K.T. (2001). Review: Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **172**: 249 – 261.
- Kitchin, K.T., Ahmad, S. (2003). Oxidative stress as possible mode of action for arsenic carcinogenic. *Toxicology Letters*. **137**: 3 – 13.
- Klaassen, C.D., Watkins, J.B. (2001). *Toxicologia: A ciência básica dos tóxicos de Casaret & Douls*. MacGraw-Hill de Portugal. 5ª edição. Lisboa. Pág. 584.
- Oliveira H, Loureiro J, Filipe L, Santos C, Ramalho-Santos J, Sousa M, Pereira Mde L. (2006). Flow cytometry evaluation of lead and cadmium effects on mouse spermatogenesis. *Reproductive Toxicology* **22**: 529 – 535.
- Oliveira, H., Santos,T.M., Ramalho-Santos, J., de Lourdes Pereira, M. (2006) Histopathological effects of hexavalent chromium in mouse kidney. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **76**: 977 – 983.
- Packer, L. (2002). Highlight: Oxidative stress. *Biology Chemistry*. **383**: 345.
- Park, W.H., Seol, J.G., Kim, E.S. (2000). Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis. *Cancer Research*. **60**: 3065 – 3071.

- Pedraza-Chaverrí, J., Barrera, D., Medina-Campos, O. N., Carvajal, R. C., Hernández-Pando, R., Macías-Ruvalcaba, N. A., Maldonado, P. D., Salcedo, M.I., Tapia, E., Saldívar, L., Castilla, M. E., Ibarra-Rubio, M. E. (2006). Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-induced nephrotoxicity. *BioMed Central Nephrology*. **6**: 1 – 12.
- Pereira, M. C., Pereira, M. L., Sousa, J. P. (1999). Individual study of chromium in the stainless steel implants degradation: An experimental study in mice. *Journal of Biomedical Materials Research*. **40**: 40 – 47.
- Pereira, M. C., Pereira, M. L., Sousa, J. P. (1997). Evaluation of nickel toxicity on liver, spleen and kidney of mice after administration of high-dose metal ion. *Biometals*. **12**: 275 – 280.
- Ramos, O., Carrizales, L., Yáñez, L., Mejía, J., Batres, L., Ortíz, D., Díaz-Barriga, F. (1995). Arsenic increased lipid peroxidation in rat tissues by mechanism independent of glutathione levels. *Environmental Health Perspectives*. **103**: 85 – 88.
- Ramirez, P., Eastmond, D.A., Laclette, J.P., Ostky-Wegman, P. (1997). Disruption on microtubule assembly and spindle formation as mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research*. **386**: 291 – 298.
- Read, D (2003). Report on copper, chromium and arsenic (CCA) treated timber. *Environmental Risk Management Authority*. ISBN 0-478-21521 – 5.
- Ruegg, C.E. (1997). The Renal Proximal Tubule: Factors Influencing Toxicity and Ischemic Injury. In: Goldstein, R.C. (ed) *Comprehensive toxicology*. Vol. 7. Renal Toxicology. Pergamon. New York. pp.245 – 257
- Shalat, S.L., Solo-Gabriele, H.M., Fleming, L.E., Buckley, B.T., Black, K., Jimenez, M., Shibata, T., Durbin, M., Graygo, J., Stephan, W., Van De Bogart, G. (2006). A pilot study of children's exposure to CCA-treated wood from playground equipment. *Science of the Total Ambient*. **367**: 80 – 88.
- Shi, H., Shi, X., Liu, K.J. (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **255**: 67 – 78.

- Shibata, T., Solo-Gabriele H.M., Fleming, L.E., Cai, Y., Townsend, T.G. (2007). A mass balance approach for evaluating leachable arsenic and chromium from an in-service CCA-treated wood structure. *Science of the Total Environment*. **372**: 624 – 635.
- Schrier, R.W., Wang, W., Pole, B. and Mitra, A. (2004). Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *The Journal of Clinical Investigations*. **114**: 5 – 14.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. **82**: 291 – 295.
- Solo-Gabriele, H.M. and Hemond, H.F (2005). Children's exposure to arsenic from CCA-treated wooden decks and playground structures. *Risk Analysis*. **25**: 1 – 5.
- Soths, S.H., Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*. **18**: 321 – 336.
- Standeven, A.M., Wetterhan, K.E. (1991). Possible role of glutathione in chromium(VI) metabolism and toxicity in rats. *Pharmacology Toxicology*. **68**: 469 – 476.
- Thadhani, R., Pascual, M., Bonventre, J. (1996). Acute Renal Failure: Review article. *The New England Journal of Medicine*. **334**: 1448 – 1459.
- Tsukamoto, H., Parker, H.R., Gribble, D.H., Mariassy, A., Peoples, S.A. (1983). Nephrotoxicity of sodium arsenate in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. **44**: 2324 – 2330.
- Townsend, T., Tolaymat, T., Solo-Gabriele, H., Dubey, B., Stook, K. and Wadanambi, L (2004). Leaching of CCA-treated wood: implications for waste disposal. *Journal of Hazardous Materials*. **B114**: 75 – 91.
- Ueno, S., Susa, N., Furukawa, Y., Akikawa, K., Itagaki, I. (1989). Cellular injury and lipid peroxidation induced by hexavalent chromium in isolated rat hepatocytes. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **51**: 137 – 145.
- USCPSC, United States Consumer Product Safety Commission (2003) *Consumer Product Safety Review: Neiss estimates*. Washington DC: National Injury Information Clearinghouse.

- Uribe-Uribe, N.O. and Herrera, G.A. (2006). Ultrastructure of Tubular Casts. *Ultrastructural Pathology*. **30**: 159 – 166.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. **12**: 1161 – 1208.
- Waalkes, M.P., Fox, D.A., States, C., Patierno, S.R., McCabe, M.J. (2000). Metals and disorders of cell accumulation: modulation of apoptosis and cell proliferation. *Toxicological Sciences*. **56**: 255 – 261.
- Wang, X.F., Xing, M.L, Shen, Y., Xu, L.H. (2006). Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in mice. *Toxicology*. **228**: 16 – 23.
- Wedeen, R.P., Qian, L.F. (1991). Chromium-induced kidney disease. *Environmental Health Perspectives*. **92**: 71 – 74.
- Weis P., Weis, J.S. and Couch, J (1993). Histopathology and bioaccumulation in oysters *crassostrea virginica* living on wood preserved with chromated copper arsenate. *Diseases of Aquatic Organisms*. **17**: 41 – 46.
- Weis, P. and Weis, J.S. (1995). Effects of chromated copper arsenate (CCA) pressure-treated wood in the aquatic environment. *Ambio - A Journal of the Human Environment*. **24**: 269 – 274.
- Weis, P., Weis, J.S., Greenberg, A., Nosker, T.J. (1992). Toxicity of construction materials in the marine environment: a comparison of chromated-copper-arsenate-treated wood and recycled plastic. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **22**: 99 – 106.
- Weis, P., Weis, J.S., Coohill, L.M. (1991). Toxicity to estuarine organisms of leachates from chromated copper arsenate treated wood. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **20**: 118 – 124.
- Weinert, T.. DNA damage checkpoints update: getting molecular. (1998). *Current Opinion in Genetics & Development*. **8**: 185 – 193.



Wiegand, H.J., Ottenwälder, H., Bolt, H.M. (1984). The reduction of chromium (VI) to chromium(III) by glutathione: an intracellular redox pathway in the metabolism of the carcinogenic chromate. *Toxicology*. **33**: 341 – 348.

Xu, J., Bubley, G.J., Detrick, B., Blankenship, L.J., Patierno, S.R. (1996). Chromium(VI) treatment of normal human lung cells results in guanine-specific DNA polymerase arrest, DNA-DNA cross-links and S – phase blockade of cell cycle. *Carcinogenesis*. **17**: 1511 – 1517.

Yih, L.H, HO, I.C., Lee, T.C. (1997). Sodium arsenite disturbs mitosis and induces chromosome loss in human fibroblasts. *Cancer research*. **57**: 5051 – 5059.

Zartarian, V.G., Xue, J., Ozkaynak, H., Dang, W., Glen, G., Smith, L., Stallings, C. (2007). A probabilistic arsenic exposure assessment for children who contact CCA-treated playsets and decks, Part 1: Model methodology, variability results, and model evaluation. *Risk Analysis*. **27**: 1 – 3.

Zhang, Z., Leonard, S.S., Wang, S., Vallyathan, V., Castranova, V., Shi, X. (2001). Cr(VI) induces cell growth arrest through hydrogen peroxide-mediated reactions. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **222**: 77 – 83.