



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia

**Ano 2012**

**Manuel Ricardo Dos  
Santos Ferreira**

**Suplementos Nutricionais: a polémica do  
trispicolinato de crómio(III)**



**Universidade de Aveiro**

Departamento de Biologia

**Ano 2012**

**Manuel Ricardo Dos  
Santos Ferreira**

**Suplementos Nutricionais: a polémica do  
trispicolinato de crómio(III)**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada Com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e Professora Doutora Teresa Margarida dos Santos, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais, namorada, irmã e sobrinha por  
todo o amor, carinho e apoio ao longo deste trabalho

## **o júri**

presidente

Professora Doutora Adelaide Almeida,  
Professora Auxiliar, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

arguente principal

Professora Doutora Virgília Sofia Almeida de Azevedo e  
Silva,  
Investigadora em Pós- Doutoramento, CESAM - Centros de Estudos do  
Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro

vogais

orientadora

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira  
Professora Associada com Agregação, Departamento de Biologia da  
Universidade de Aveiro

co-orientadora

Professora Doutora Teresa Margarida Santos  
Professora Auxiliar, Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**agradecimentos**

Agradeço a todas as pessoas que tornaram possível este trabalho.

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, minha orientadora, pela sua ajuda, amizade, pela transmissão de conhecimentos e por acreditar no meu trabalho.

Gostaria de agradecer de igual modo à Professora Doutora Teresa Margarida Santos, minha co-orientadora pela sua ajuda, amizade e colaboração.

Agradeço também a todas as pessoas que me incentivaram e apoiaram durante a realização deste trabalho.

Um especial agradecimento a todas as colegas do laboratório de histologia animal por toda a ajuda, apoio, amizade, cooperação em todos os momentos da realização deste trabalho.

Ao Sr. Rui Marques e Sr. Aldiro Pereira, agradeço todo o apoio prestado durante as experiências.

O meu sincero obrigado a todos.

**palavras-chave** tris-picolinato de crómio(III); suplementos alimentares; alterações histológicas.

**resumo** O suplemento nutricional tris-picolinato de crómio(III) tem estado, nos últimos anos, no centro de várias polémicas quanto aos seus efeitos na saúde pública. A suplementação com o tris-picolinato de crómio(III) tem sido ativamente promovida devido à sua presumível habilidade de reforçar o metabolismo da glicose e dos lípidos. Por conseguinte, a popularidade aumentou ainda mais uma vez que é visto como um recurso muito vantajoso para melhorar sintomas associados a doenças cardiovasculares, à obesidade e, principalmente, a Diabetes mellitus tipo II. Tendo em conta a ampla utilização de suplementos nutricionais de crómio onde a evidência científica a favor da eficácia e segurança é limitada e controversa, o presente trabalho teve como objetivo principal determinar os efeitos histopatológicos da suplementação de crómio em níveis crescentes sobre a forma de picolinato de crómio. Foram utilizados ratinhos machos, com 7 semanas de idade e com um peso corporal compreendido entre 30 e 40 g, tendo sido divididos em vários grupos. Em dois dos 4 grupos experimentais o suplemento de [Cr(pic)3] foi administrado por via subcutânea, na dose de 5mg/Kg e de 10mg/Kg diariamente durante 7 dias. Nos outros dois grupos experimentais o suplemento de [Cr(pic)3] foi administrado por via oral, na dose de 25mg/Kg e 50mg/Kg, respetivamente, num período de 14 dias. Após o sacrifício dos animais, foram removidos e pesados o fígado, rim, testículo, epidídimo, baço e timo, fixados em solução de Bouin e preparados para estudos histológicos. Não foram evidenciadas diferenças significativas no peso dos animais e respetivos órgãos. Histologicamente, os efeitos do tris-picolinato de crómio(II) foram mais evidentes nos grupos injetados com 10mg/Kg de [Cr(pic)3] e 50mg/Kg de [Cr(pic)3] por via oral. O suplemento de [Cr(pic)3] provocou alterações histológicas em todos os órgãos em estudo. Dada a evidência de lesões histopatológicas sugere-se o desenvolvimento de estudos futuros, visando o melhor conhecimento dos mecanismos de ação deste suplemento.

**keywords**

Chromium(III)- tris picolinate; nutritional supplements; histological changes

**abstract**

Nowadays the nutritional supplement chromium(III) picolinate on public health has been a matter under polemic focus. The use of supplements of chromium(III)picolinate is actively promoted due to their ability to reinforce the metabolism of glucose and lipids. Owing to the ability for alleviate symptoms related to several pathologies such as cardiovascular, obesity and mainly Diabetes Mellitus tipe II this compound has a relevant role. However scientific evidence of its efficacy is limited and controversial. Then, the main goal of the present study was to evaluate the histopathological effects of graded supplement of chromium(III) as chromium(III) picolinate. For this purpose, male mice (7 weeks old, weighing 30 and 40g) were used. Animals were divided in different groups: 2 groups were experimentally submitted to subcutaneous injection of 5 mg/Kg and 10 mg/Kg daily, respectively, during seven days. Other groups were given 25 mg/Kg and 50 mg/kg of the supplement orally for 14 days. After sacrifice, organs such as liver, kidney, testis, epididymes, spleen and thymus were removed, fixed in Bouin's solution and routinely prepared for histology. No significant differences were noted within animals and organs weights. Histopathological effects were evident in all groups and more pronounced changes were observed within groups administered with 10 mg/Kg of  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  and 50 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  . For this reason, further investigations should be carried out aiming to elucidate the mechanisms underlying this nutritional supplement.

# ÍNDICE GERAL

Índice Geral.....	8
Índice de Figuras.....	10
Índice de Tabelas .....	11
Abreviaturas.....	12
<b>1. Introdução .....</b>	<b>13</b>
1.1. Introdução Geral .....	13
1.2. Crómio: Cronologia Histórica e Posicionamento na Tabela Periódica .....	15
1.3. Crómio como Nutriente .....	16
1.4. Toxicidade do Crómio .....	17
1.5. Essencialidade e Funções Biológicas dos Compostos de Crómio(III) .....	18
1.6. Suplementos Nutricionais.....	19
1.7. A Polémica Relacionada com o <i>Tris</i> - Picolinato de Crómio (III) .....	20
1.8. Propriedades Químicas e Físicas do <i>Tris</i> - Picolinato de Crómio (III).....	21
1.9. Órgãos em Estudo.....	22
1.9.1.Fígado .....	22
1.9.2.Rim.....	23
1.9.3.Testículo.....	23
1.9.4.Epidídimo.....	24
1.9.5.Baço .....	24
1.9.6.Timo.....	25
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Material e Métodos .....</b>	<b>28</b>
3.1. Reagentes .....	28
3.2. Preparação de Soluções .....	28
3.3. Animais.....	28
3.4. Grupos Experimentais .....	29



3.5.	Tratamentos .....	29
3.6.	Estudos Histológicos .....	29
3.7.	Esfregaço Sanguíneo .....	30
3.8.	Análise Estatística dos resultados obtidos .....	30
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>31</b>
4.1.	Comportamento dos Animais ao longo da Experiência.....	31
4.2.	Efeito do peso corporal e do peso relativo dos órgãos.....	31
4.3.	Observação macroscópica dos órgãos .....	32
4.4.	Alterações Histológicas .....	33
4.5.	Alterações Histológicas no Fígado .....	33
4.6.	Alterações Histológicas no Rim .....	34
4.7.	Alterações Histológicas no Testículo .....	35
4.8.	Alterações Histológicas no Epidídimo .....	37
4.9.	Alterações Histológicas no Baço .....	38
4.10.	Alterações Histológicas no Timo.....	39
<b>5.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusões e Perspetivas de Trabalho Futuro .....</b>	<b>43</b>
<b>7.</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>44</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura Química do <i>Tris</i> -Picolinato de Crómio(III) .....	21
<b>Figura 2.</b> Cortes Histológicos do Fígado.....	33
<b>Figura 3.</b> Cortes Histológicos do Fígado.....	34
<b>Figura 4.</b> Cortes Histológicos do Rim.....	34
<b>Figura 5.</b> Cortes Histológicos do Rim.....	35
<b>Figura 6.</b> Cortes Histológicos do Testículo.....	36
<b>Figura 7.</b> Cortes Histológicos do Epidídimo .....	37
<b>Figura 8.</b> Cortes Histológicos do Baço .....	38
<b>Figura 9.</b> Cortes Histológicos do Timo .....	39

## **ÍNDICE DE TABELAS**

**Tabela 1 .** Peso corporal dos ratinhos ao longo da experiência.....31

**Tabela 2.** Peso relativo dos órgãos ao longo da experiência .....32

## **ABREVIATURAS**

**Cr** - Crómio

**Cr(III)** - Crómio(III)

**[Cr(pic)<sub>3</sub>]** - *Tris*-picolinato de crómio

**FTG** - Fator de tolerância à glicose

**IARC** - Agência Internacional para a Investigação do Cancro

**LMWCr** - *Low-molecular-weight chromium-binding substance*

**NTP** - *The National Toxicology Program*

**ROS** - Espécies reativas de oxigénio

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. INTRODUÇÃO GERAL

O crómio, tal como alguns outros metais de transição, apresenta um carácter "duplo" em termos de química bioinorgânica, pois pode atuar para o ser humano como elemento essencial, como também apresentar-se como agente tóxico. Há quem até o designe como “camaleão biológico” (Levina *et al.*, 2006).

A toxicidade do crómio está associada à sua forma hexavalente, presente na maioria dos compostos de crómio utilizados industrialmente (Barceloux, 1999). Deste modo, desde há muito tempo que se levantou uma crescente preocupação devido à exposição ocupacional a compostos deste tipo, visto que o Cr(VI) está estabelecido como espécie carcinogénica e mutagénica (Cood *et al.*, 2003). Os compostos de Cr(VI) foram classificados em 1987, e posteriormente em 1990, pela IARC, a Agência Internacional para a Investigação do Cancro da Organização Mundial de Saúde, como substâncias cancerígenas do Grupo I, isto é, do grupo de maior perigosidade para a saúde humana, enquanto que o crómio elementar e a sua forma trivalente foram considerados não classificáveis quanto ao seu potencial carcinogénico para os humanos – Grupo 3 (IARC, 2012). Contudo, o crómio continua a ser um dos metais mais utilizados na indústria e está constantemente presente na nossa vida diária. Parece, assim, impossível, num futuro próximo, eliminar completamente a exposição ambiental e ocupacional a este metal e aos seus compostos.

Para além da importante utilização industrial de crómio, no estado de oxidação + 6 na sua forma trivalente, que é o estado de oxidação mais estável, é utilizado em suplementos nutricionais, uma vez que é considerado um elemento essencial, embora em quantidades vestigiais usa-se sob a forma de compostos como por exemplo o cloreto de crómio(III) mas, sobretudo como *tris*-picolinato de Cr(III), considerando o suplemento nutricional com compostos de elementos metálicos mais vendido a seguir ao cálcio (Vicent, 2010; Althuis *et al.*, 2002).

O Cr(III) foi proposto, há mais de 50 anos, como elemento essencial sendo, por isso, considerado por muitos nutricionistas como um micronutriente essencial para os seres humanos (Vicent, 2010). O interesse na essencialidade do Cr(III) tornou-se mais evidente em pacientes que apresentavam intolerância à glicose e nos quais, após a

suplementação em Cr(III), se verificava uma melhoria no nível glicémico (Cefalu & Hu, 2004). Assim, o Cr(III) foi proposto como um nutriente essencial envolvido na regulação do metabolismo de hidratos de carbono e lípidos, com um papel importante no reforço da acção da insulina (Levina *et al.*, 2006; Pattar *et al.*, 2006), o que tornou muito popular o uso do *tris*-picolinato de crómio(III), sobretudo em termos de medicina alternativa e complementar, associado ao alívio de sintomas da *Diabetes Mellitus* tipo II e à doenças cardiovasculares (Kottwitz *et al.*, 2009; Levina *et al.*, 2006; Press *et al.*, 1990).

A *Diabetes Mellitus* tipo II é uma doença crónica caracterizada por um elevado nível glicémico, pela resistência à insulina e por uma elevada produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), que podem levar a complicações cardiovasculares, renais, oculares e na gravidez (Refaie *et al.*, 2009).

As doenças cardiovasculares, por sua vez, estão associadas essencialmente à hipercolesterolemia que resulta de vários fatores, tais como o consumo de alimentos ricos em colesterol ou à deficiência de certos nutrientes, nos quais pode estar incluído o crómio (Levina *et al.*, 2006; Pattar *et al.*, 2006; Press *et al.*, 1990). Desta forma, determinou-se que a deficiência em crómio, na forma de Cr(III), nos humanos e em outros mamíferos, pode resultar em sintomas associados a estas patologias (Refaie *et al.*, 2009; Levina *et al.*, 2006; Cefalu & Hu, 2004; Press *et al.*, 1990).

Entretanto, as evidências em torno da essencialidade do Cr(III) têm sido problemáticas (Santos, 1995; Stearns *et al.*, 1995). A essencialidade do Cr(III) nos pacientes recebendo nutrição parenteral total é atualmente ambígua e não foram detetadas manifestações clínicas da sua deficiência no público em geral (indivíduos saudáveis) que possam explicar totalmente a sua essencialidade (Vicent, 2010)

Além disso, o uso *tris*-picolinato de crómio(III) tem sido também muito questionado devido a incertezas em torno dos seus benefícios para pessoas saudáveis e para pacientes diabéticos tipo II, especialmente pela crescente preocupação de este composto poder atuar como agente tóxico para as células, causando, por exemplo, mutações (Press *et al.*, 1990), aberrações nos cromossomas e danos no ADN (IARC, 2012; Stearns *et al.*, 1995). Desta forma a utilização de *tris*-picolinato de crómio(III) como suplemento nutricional está em franco debate e é um foco de investigação pertinente e atual (Althuis *et al.*, 2002).

## 1.2. CRÓMIO: CRONOLOGIA HISTÓRICA E POSICIONAMENTO NA TABELA PERIÓDICA

A descoberta do crómio está associada às minas Beresof da Sibéria, de onde se extraía ouro, cobre, prata e chumbo desde 1752. Os mineiros estavam familiarizados com um mineral vermelho que, em pequenas quantidades, acompanhava o minério de chumbo. Johann Gottlob Lehmann investigou este mineral, conhecido como crocoíte e, em 1766, descobriu que originava uma solução verde-esmeralda quando dissolvido em ácido muriático (ácido clorídrico). Lehmann morreu no ano seguinte, quando um destilador contendo arsénio rebentou devido a sobre-aquecimento, mas em 1797 o químico francês Nicolas Louis Vauquelin observou a beleza, raridade e aspeto semelhante ao ouro deste mineral e, com base em várias análises químicas contraditórias, empenhou-se na determinação da composição correta da crocoíte (Santos, 1995). Aqueceu crocoíte pulverizada ( $\text{PbCrO}_4$ ) com duas partes de cinzas alcalinas obtendo-se uma solução amarela. Esta solução formava um precipitado vermelho com um sal de mercúrio e um precipitado amarelo com o chumbo e adicionando cloreto de estanho, aquela solução tornava-se verde. Em 1798 o mesmo químico precipitou chumbo com ácido clorídrico, secou o sólido verde e, depois, “cozinhou-o” durante meia hora num cadinho em brasa. Sob arrefecimento, formaram-se agulhas metálicas cinzentas, pesando um terço do peso original. Devido à grande variedade de cores dos seus compostos, deu a este novo elemento o nome de crómio, que provém da palavra grega “chroma” ( $\chi\rho\omicron\mu\alpha$ ) (Santos, 1995).

O crómio (Cr) é o 24º elemento da Tabela Periódica, localizando-se no Grupo 6 e no Período 4, isto é, na 1ª série dos metais de transição, com número atómico 24 e massa atómica de 51.996 g/mol. Este elemento forma inúmeros compostos de coordenação (complexos), facilmente isoláveis, devido, essencialmente, à sua cinética lenta de decomposição em solução. Conhecem-se milhares compostos deste tipo, com os mais variados ligandos, entre os quais ligandos “biológicos”, como os aminoácidos, os peptídeos e mesmo proteínas (Santos, 1995).

### 1.3. O CRÓMIO COMO NUTRIENTE

As fontes alimentares de Cr(III) incluem levedura de cerveja, vinhos, ostras, fígado e batata, seguindo-se produtos como cereais não refinados (produtos integrais), gérmen de trigo, gema de ovo, queijo, café, cenoura, espinafres, bróculos, nozes, feijão verde, carne e marisco (Insel *et al.*, 2007). Os lacticínios e a maior parte dos frutos e legumes possuem teores muito variáveis, embora baixos, de crómio. Esta é a característica de todas estas fontes de crómio: quantidades pequenas e muito variáveis do referido elemento. A quantidade de crómio nos alimentos varia também com a quantidade deste elemento presente nos solos (Afonso, 1998).

O Cr(III) está amplamente distribuído nos solos, ar, água e alimentos. Para suplementação existem diversas formulações na forma de complexos com diferentes ligandos. Nos alimentos, existem sais catiónicos de Cr(III), na levedura de cerveja, o Cr(III) apresenta-se ligado a aminoácidos. Se noutros alimentos isso também acontece, é desconhecido (Gallagher, 2008).

O Cr(III), além de existir em pequenas quantidades nos alimentos, é absorvido numa percentagem que varia de 0,5% a 2% para ingestões de 10 e 40 µg/dia, respetivamente. A quantidade não absorvida é excretada (Afonso, 1998).

O modo de absorção do Cr(III) não é ainda claro, mas assume-se que ocorre essencialmente no jejuno, por difusão simples ou transporte ativo. Os valores plasmáticos normais rondam 0,1-2,1 µg/ml. Aqui, o Cr(III) é transportado isoladamente, ligado á transferrina, ou através de outros transportadores. O seu transporte para as células é dependente da insulina, uma vez que esta interfere no metabolismo do crómio: aumento das concentrações desta tem como consequência a diminuição da quantidade de crómio plasmático e aumento do urinário. A transferrina tem capacidade para transportar crómio, uma vez que fica apenas com 30% da sua capacidade preenchida quando transporta o ferro. Havendo uma saturação desta metaloproteína, a albumina é também capaz de efetuar o transporte, assim como algumas  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas e lipoproteínas. Uma vez absorvido, o crómio distribui-se então pelo plasma, glóbulos vermelhos, rins, fígado, baço, medula óssea e pulmões. A sua excreção dá-se maioritariamente pela urina (95% da quantidade excretada) e em pequenas quantidades pelo cabelo, suor, bÍlis e leite materno (Gallagher, 2008).



Uma alimentação rica em alimentos refinados, além de pobre em crómio, potencia uma maior excreção urinária (entre 10 a 300% superior) e dificulta a absorção deste oligoelemento, tal como acontece com uma alimentação rica em gorduras (Afonso, 1998; Gallagher, 2008).

#### **1.4. TOXICIDADE DO CRÓMIO**

A toxicologia do crómio está associada principalmente às espécies de Cr(VI), classificadas como carcinogénicas (IARC, 2012; Barceloux, 1999). A incidência de cancro devida a estas espécies em diferentes órgãos, para além do pulmão, tem sido relatada em numerosos estudos epidemiológicos (Levina *et al.*, 2006), mas os resultados não têm sido muito conclusivos, sobretudo no que se refere aos teores de crómio tóxicos.

A primeira evidência da toxicidade do Cr(VI) foi um relatado no século XIX, em que foi detetado cancro nasal em trabalhadores expostos a compostos de Cr(VI) na produção de pigmentos para tintas (Barceloux, 1999). Os compostos de Cr(VI) para além de induzirem cancro pulmonar, podem também desencadear irritação na mucosa nasal, espirros, tosse e hemorragia nasal, resultante da inalação de altos teores de Cr(VI). Podem também causar dermatite, asma, perfurações do septo nasal e inflamação da laringe e do fígado. O risco de cancro associado à exposição de compostos de Cr(VI) continua a ser uma preocupação corrente, apesar da implementação de procedimentos para reduzir os riscos nos locais de trabalho (Vicent, 2010; Levina *et al.*, 2006; Medeiros, 2003; Santos, 1995; Medeiros, 2003).

Os compostos de crómio, tanto de Cr(VI) como de Cr(III), têm uma grande aplicação comercial e são amplamente utilizados em processos industriais, especialmente na indústria química e metalúrgica. como por exemplo, na indústria de curtumes, na produção de aço e de ligas metálicas, na cromagem, no fabrico de pigmentos e na preservação da madeira (Vicent, 2010; Medeiros, 2003 Santos, 1995).

O Cr(VI) atravessa facilmente a membrana celular usando os canais do fosfato e do sulfato, sendo depois reduzido a Cr(III) pelos redutores biológicos intracelulares (cisteína e glutatona, principalmente), produzindo danos no ADN e mutações e aberrações nos cromossomas (Barceloux, 1999; Vincent, 1999; Santos, 1995). Para além da contaminação industrial e ocupacional, a contaminação ambiental é também um problema adicional da exposição humana ao crómio, que advém de emissões industriais

e da sua acumulação em locais de acesso aos humanos (Santos, 1995; Levina *et al.*, 2006).

### **1.5. ESSENCIALIDADE E FUNÇÕES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS DE Cr(III)**

A essencialidade do crómio para os mamíferos está associada à forma trivalente, que tem (ou parece ter) um papel importante e fundamental no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas. Pressupõe-se que melhore a eficiência da insulina de modo a aumentar a tolerância à glicose e que a sua insuficiência esteja associada a fatores de risco de doenças cardiovasculares ou a diabetes tipo II (Vincent, 2010; Refaie *et al.*, 2009; Insel *et al.*, 2007; Levina *et al.*, 2006; Barceloux, 1999; Cefalu & Hu, 2004; Vincent, 1999).

O Cr(III) foi estabelecido como um micronutriente essencial nos anos 50, por Mertz e Schwarz, que encontraram na levedura da cerveja um composto de crómio com ligandos orgânicos, capaz de reduzir o nível de glicose sanguíneo (Levina *et al.*, 2006). Este composto foi designado por " fator de tolerância à glicose " (FTG) , pensando-se ser constituído pelo ião crómio(III), coordenado com ácido nicotínico e alguns aminoácidos (glicina, cisteína e ácido glutâmico), tendo efeitos na melhoria da tolerância à glicose e ajudando a potenciar a acção da insulina. Devido a incertezas em relação à sua natureza química e estrutural, o FTG acabou por ser descartado, pois foram encontradas amostras ativas que se provou nem sequer possuírem crómio (IARC, 2012; Santos, 1995).

Foi entretanto sugerida uma outra molécula como sendo a forma biologicamente ativa do crómio, um oligopeptídeo conhecido como LMWCr – *low-molecular-weight chromium-binding substance*, também designado de cromodulina, em analogia à proteína calmodulina que se liga a quatro iões de cálcio e que estimula a actividade das cinases e das fosfatases (Vincent, 1999; Porter *et al.*, 1999).

A cromodulina é isolada essencialmente no fígado de mamíferos e, em menor quantidade, nos rins, sendo também encontrada na urina, pois representa uma grande parte (quantidade) do crómio urinário (Kottwitz *et al.*, 2009). Também, foi proposto que o aumento da atividade da tirosina cinase nos recetores de insulina pela cromodulina aumentasse a fluidez da membrana plasmática, proporcionando uma maior sensibilidade à insulina e a regulação da circulação do transportador da glicose (GLUT4) (Vincent,

1999). Este, por sua vez, permitiria uma diminuição do nível glicémico através do transporte da glicose para o interior das células. Sugere-se também que o crómio influencie o metabolismo do colesterol e dos triglicérideos, mas o seu mecanismo de ação não se encontra ainda esclarecido (Pattar *et al.*, 2006; Vincent, 1999).

## **1.6. SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS**

Um regime alimentar adequado e variado deve fornecer todos os nutrientes necessários ao ser humano, nas quantidades estabelecidas e recomendadas por dados científicos, para o seu bom desenvolvimento e à sua manutenção num bom estado de saúde (DL 136/ 2003, 2003). Todavia, tem-se verificado que esta situação ideal não está a ser alcançada em relação a todos os nutrientes nem a todos os grupos populacionais, devido designadamente, ao estilo de vida atual. Os consumidores podem, portanto, optar por completar as quantidades ingeridas de alguns nutrientes através do consumo de suplementos nutricionais (Santos, 2008). Assim, tem-se verificado a existência de um número crescente de produtos comercializados como géneros alimentícios, que constituem uma fonte concentrada de substâncias nutrientes, as quais são apresentadas como complemento aos nutrientes ingeridos num regime alimentar normal. Estes suplementos nutricionais podem conter um leque bastante variado de nutrientes e outros ingredientes, designadamente vitaminas, minerais, aminoácidos, ácidos gordos essenciais, fibras e extratos de várias plantas e ervas (Santos, 2008).

Em Portugal os suplementos nutricionais encontram-se atualmente sob a tutela do Gabinete de Planeamento e Políticas do Ministério da Agricultura, organismo responsável pelas medidas de políticas relativas à quantidade e segurança alimentar.

## 1.7. A POLÊMICA RELACIONADA COM O *TRIS*-PICOLINATO DE CRÓMIO(III)

O *tris*-picolinato de crómio(III) é um suplemento nutricional de crómio que foi pela primeira vez relatado na literatura, em 1917. É um composto muito "popular", em especial nos Estados Unidos. Tem sido ativamente promovido desde os anos 80, pela sua "hipotética" relação direta com a perda de peso (obesidade) e com o ganho de massa muscular (Althuis *et al.*, 2002).

O aumento das taxas de obesidade nos Estados Unidos da América (EUA) tem conduzido a uma maior procura deste tipo de suplementos alimentares e, consequentemente, também do *tris*-picolinato de crómio(III). Nos EUA este composto está facilmente disponível em farmácias, supermercados e lojas de alimentos naturais, sob diversas formas, incluindo comprimidos, bebidas desportivas, pastilhas elásticas e barras nutritivas, fornecendo cerca 200-600µg Cr/dia, o que excede em 10 a 20 vezes os valores aceites para a ingestão da quantidade adequada de crómio (Vincent, 2003). O maior consumo verifica-se nos atletas, com a finalidade de melhorar a composição física mas também no público em geral, uma vez que parece o meio mais fácil para a redução e regulação do peso (Lukaski *et al.*, 2007; Vincent, 2003).

A suplementação com o *tris*-picolinato de crómio(III) tem sido também ativamente promovida devido à sua presumível habilidade de reforçar os metabolismos da glicose e dos lípidos. Por conseguinte, a sua popularidade aumentou ainda mais, uma vez que é visto como um recurso muito vantajoso para melhorar sintomas associados a doenças cardiovasculares, à obesidade e, principalmente, à *Diabetes Mellitus tipo II* (Levina *et al.*, 2006; Cefalu & Hu, 2004). O *tris*-picolinato de crómio(III) tornou-se assim alvo das indústrias farmacêuticas nos EUA, onde a sua produção e venda se tornaram multimilionárias. Foi estimado que desde 1998 mais de 10 milhões de pessoas adquiriram o *tris*-picolinato de crómio(III), nomeadamente para redução de peso ou para o uso terapêutico do tratamento da *Diabetes Mellitus tipo II* (Althuis *et al.*, 2002).

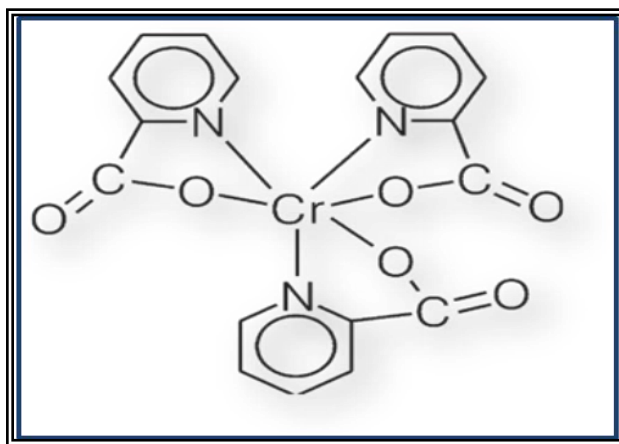
Entretanto, a maioria dos efeitos "benéficos" do *tris*-picolinato de crómio(III) tem sido muito questionada, principalmente depois do relato de evidências sobre os seus potenciais efeitos tóxicos. A primeira descrição de toxicidade foi demonstrada num estudo em 1995, por Stearns e colaboradores (1995), que verificaram danos em cromossomas de células do ovário de Hamster Chinês. Existe assim uma considerável preocupação em torno da segurança do uso do *tris*-picolinato de crómio(III), devido ao

seu amplo consumo principalmente em diabéticos, uma vez que estes ingerem doses elevadas deste composto (200-1000 µg de Cr/dia), excedendo cerca de 6-40 vezes os valores atualmente aceites (25-35 µg de Cr/dia) para uma adequada ingestão dietética de crômio (Stearns *et al.*, 1995).

O *tris*-picolinato de crômio(III) tem estado, assim, nos últimos anos, no centro de várias polémicas quanto aos seus efeitos em saúde pública, especialmente por três fatores: a venda deste suplemento alimentar gera avultadas receitas, estas substâncias são relativamente fáceis de obter para consumo humano e os estudos que têm sido realizados indicam incerteza quanto aos benefícios da ingestão do produto.

### 1.8. PROPRIEDADES QUÍMICAS E FÍSICAS DO *TRIS*-PICOLINATO DE CRÔMIO(III)

O *tris*-picolinato de crômio(III) resulta da coordenação do crômio trivalente ( $\text{Cr}^{3+}$ ) com três ligandos, bidentados, picolinato (base conjugada do ácido picolínico) (Pattar *et al.*, 2006) (Fig.1).



**Figura 1.** Estrutura química do *tris* - picolinato de crômio(III)  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ . Aboul-Enein *et al.*, 2005

O ácido picolínico deriva do metabolismo do aminoácido triptofano e forma complexos estáveis com metais de transição, como é o caso do *tris*-picolinato de crômio(III) (Kottwitz *et al.*, 2009). Este é complexo inerte e solúvel em solução aquosa neutra, ou seja, é um composto estável com “habilidade” de ser absorvido pelos tecidos (Stearns *et al.*, 1995). No entanto, propôs-se que seja hidrolisado perto do estômago depois de ser ingerido, permitindo a absorção do crômio(III) (Althuis *et al.*,

2002). Como descrito anteriormente, o *tris*-picolinato de crómio(III) é amplamente usado devido à sua presumível capacidade de reforçar o metabolismo da glicose. No entanto, há uma crescente evidência de sua genotoxicidade e, de modo a avaliar os seus efeitos tóxicos e o seu papel como agente terapêutico, é necessário compreender o seu metabolismo e o mecanismo pelo qual provoca toxicidade (Porter *et al.*, 1999). Alguns estudos elucidaram a reatividade do *tris*-picolinato de crómio(III) em condições biologicamente relevantes, com valores de pH próximos do pH fisiológico, que podem contribuir para a avaliação do seu possível efeito tóxico. Como nos diabéticos tipo II a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encontra normalmente aumentada devido a stress oxidativo crónico, o consumo prolongado e a ingestão de doses elevadas de [Cr(pic)<sub>3</sub>] suscita sérias preocupações quanto à sua toxicidade, uma vez que poderá ser produzido Cr(VI) em quantidades suficientes para gerar genotoxicidade. Deste modo, é provável que quer os seus efeitos benéficos (reforço do efeito da insulina) quer os tóxicos do surjam a partir dos mesmos mecanismos bioquímicos, dependendo da concentração relativa das espécies reativas (Porter *et al.*, 1999).

## **1.9. ÓRGÃOS EM ESTUDO**

### **1.9.1. FÍGADO**

O fígado desempenha inúmeras funções vitais no organismo. Esta glândula mista é responsável pelo metabolismo dos aminoácidos e dos hidratos de carbono, pela emulsificação dos lípidos e pelo armazenamento das vitaminas e do ferro. Exerce também um papel muito importante na síntese de proteínas plasmáticas, incluindo a albumina e os fatores de coagulação (com exceção do factor III), assim como na desintoxicação e na excreção de substâncias endógenas e de xenobióticos (Junqueira & Carneiro, 2008).

O fígado está localizado na porção anterior da cavidade abdominal, adjacente ao diafragma. A sua face diafragmática é convexa e lisa, enquanto que a sua face visceral é côncava, delimitando o ponto em que o fígado está em contacto com as vísceras. A veia porta e a artéria hepática penetram no fígado através do hilo hepático. Tanto a artéria como veia referidas são acompanhadas pelos ductos biliares e pelos vasos linfáticos.

Anatomicamente, o fígado apresenta dois lobos principais o direito (6 vezes maior) e o esquerdo, e dois lobos menores. Os tipos celulares presentes no fígado

normal são os hepatócitos, as células endoteliais, as células de Küpffer, as células estreladas e as células dos canais biliares (Burkitt *et al.*, 1994).

### **1.9.2. RIM**

O principal órgão do sistema urinário é o rim, cujas funções principais incluem a regulação do volume, composição, pH e pressão do sangue e que contribui para a regulação do metabolismo através da síntese de hormonas (Junqueira & Carneiro, 2008).

O rim é constituído por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, uma zona cortical e uma zona medular. A medular é constituída por 10 a 18 estruturas piramidais-pirâmides medulares, cujas bases e lados entram em contacto com a zona cortical. Esta é contínua e ocupa o espaço compreendido entre as bases das pirâmides e a cápsula renal (Junqueira & Carneiro, 2008).

As unidades funcionais do rim são os nefrónios. Cada nefrónio é constituído pelo corpúsculo renal, túbulo contornado proximal, ança de Henle, túbulo contornado distal e tubo colector. Cada rim apresenta cerca de um a quatro milhões de nefrónios que realizam a osmorregulação e excreção de vários resíduos metabólicos tóxicos através dos seguintes processos: filtração, reabsorção seletiva e secreção (Burkitt *et al.*, 1994). A filtração ocorre ao nível do corpúsculo renal, onde as substâncias presentes no sangue e de baixo peso molecular atravessam a parede dos capilares do glomérulo de Malpighi para o túbulo renal. À medida que o fluido se desloca ao longo do túbulo renal muitas substâncias úteis são reabsorvidas para a corrente sanguínea, enquanto que outras (substâncias tóxicas e em excesso no organismo) são segregadas das células dos túbulos e do sangue para o filtrado (Junqueira & Carneiro, 2008).

### **1.9.3. TESTÍCULO**

Os testículos são órgãos secretores e excretores onde ocorre a espermatogénese. Apresentam forma ovóide e ficam suspensos no escroto por meio dos funículos espermáticos. Situam-se nas bolsas escrotais abaixo do pénis, entre as coxas, na parte anterior do períneo. O testículo esquerdo situa-se ligeiramente mais abaixo do que o do lado direito. Podem considerar-se duas faces (face externa e interna), dois bordos (ântero-inferior e pósterio-superior) e duas extremidades (superior e inferior) (Esperança, 2004).

A estrutura do testículo compreende uma túnica fibrosa que reveste o órgão, a túnica albugínea e os túbulos seminíferos. Os túbulos seminíferos organizam-se em lóbulos espermáticos, em número variável de 220 a 230, que se encontram separados por septos fibrosos de albugínea (Moore & Dalley, 1999).

#### **1.9.4. EPIDÍDIMO**

O epidídimo nos mamíferos adultos é um ducto longo e enovelado revestido por epitélio pseudo-estratificado colunar com estereocílios, rodeado por fibras musculares lisas, cujas contracções peristálticas permitem o movimento dos espermatozóides ao longo do ducto (Junqueira & Carneiro, 2008).

No epidídimo do ratinho há três zonas principais, a cabeça, o corpo e a cauda. Cada uma destas regiões, por sua vez, divide-se em segmentos que consistem em lóbulos de ducto enrolado, rodeado por septos de tecido conjuntivo. O número de segmentos do epidídimo varia de acordo com a espécie. No ratinho, o epidídimo apresenta 10 segmentos (Johnston *et al.*, 2005).

A espessura do epitélio e o diâmetro dos ductos varia consoante a zona do epidídimo. A zona da cabeça apresenta uma maior espessura de epitélio e um menor lúmen, contrariamente à zona da cauda, que apresenta uma menor espessura de epitélio, embora um maior lúmen. Do mesmo modo, o número de espermatozóides presentes no lúmen também aumenta do corpo para a cauda. A barreira hemato-epidídimal, constituída pelas junções de oclusão entre as células do epitélio do epidídimo proporciona aos espermatozóides um ambiente privilegiado, no qual estes gâmetas permanecem isolados (Turner, 2008).

#### **1.9.5. BAÇO**

O baço apresenta-se como o maior órgão linfóide secundário, onde ocorre a maior concentração de tecido linfóide, produzindo linfócitos B e T na circulação sanguínea (Fry & McGavin, 2007). A sua estrutura histológica permite um contacto íntimo entre o sangue e as células imunologicamente ativas, representando assim um importante órgão de defesa contra agentes veiculados no sangue circulante. Desempenha um importante papel na formação de anticorpos (Junqueira & Carneiro, 2008). Possuindo um compartimento linfocitário organizado, o baço constitui o mais importante órgão para resposta imunitária antibacteriana e antifúngica.



O baço assume-se ainda como o principal órgão onde ocorre a destruição de eritrócitos envelhecidos, permitindo a conservação do ferro para a sua reutilização na síntese de hemoglobina. O baço é também considerado um órgão hematopoiético, participando na formação do sangue, em especial na eritropoiese, granulocitopoiese e trombocitopoiese. Desempenha uma importante função de reservatório de eritrócitos e plaquetas (para situações em que o aumento da concentração destes elementos seja necessária) tendo ainda um papel no metabolismo lipídico (Otero *et al.*, 2004).

A polpa vermelha é responsável pela remoção dos agentes estranhos e dos eritrócitos envelhecidos ou alterados (por parasitas, imunocomplexos ou por processos oxidativos). É ainda responsável pelo armazenamento de eritrócitos nos espaços vasculares, assumindo ainda uma função hematopoiética em determinadas circunstâncias. Quanto à função da polpa branca, ela é descrita como sendo responsável pelo desenvolvimento da resposta imunitária, com a produção de linfócitos B e de plasmócitos, cujo objetivo é a produção de anticorpos e de células memória (Fry & McGavin, 2007).

#### **1.9.6. TIMO**

Órgão linfo-epitelial primário, o timo situa-se no mediastino, atrás do esterno e na altura dos grandes vasos do coração. Possui dois lobos, envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso. Esta emite septos que dividem o parênquima em lóbulos. Cada lóbulo é formado por uma zona externa, densamente rica em linfócitos – zona cortical, que envolve uma zona mais clara, a zona medular. Na medula encontram-se os corpúsculos de Hassall, constituídos por células reticulares epiteliais achatadas, dispostas concêntricamente. Estes corpúsculos sofrem alterações sequenciais quer por estimulação antigénica, quer por irradiação, caracterizadas por um aumento no tamanho e número, ausência e regeneração. As zonas cortical e medular possuem os mesmos tipos celulares, porém em proporções diferentes. No entanto, a zona medular pode apresentar linfócitos B, quer agregados como folículos linfóides, quer isolados (Suster & Rosai, 1997).

As células mais abundantes no timo são os linfócitos T, em diversos estágios de maturação e as células reticulares epiteliais. Na zona cortical verifica-se a presença de macrófagos (Junqueira & Carneiro, 2008).

As fases de desenvolvimento, diferenciação e expansão clonal dos linfócitos T no timo envolvem interações entre os timócitos e as células do estroma tímico e requerem um microambiente único, o qual é produzido e controlado pelas células epiteliais e não epiteliais do estroma (Asan, 2002).

## **2. OBJETIVOS**

Tendo em conta a ampla utilização de suplementos nutricionais de crómio onde a evidência científica a favor da sua eficácia e segurança é limitada e controversa, o presente trabalho teve como objetivo principal determinar os efeitos histopatológicos da suplementação de crómio(III) em níveis crescentes, sob a forma de trispicolinato de crómio(III) em estudos com ratinhos. Foram selecionados órgãos com funções metabólicas e de excreção (fígado, rim), com funções imunitárias (baço e timo) e com função reprodutora (testículo e epidídimo).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. REAGENTES

O *tris*-picolinato de crómio(III) foi sintetizado no Laboratório de Inorgânica do Departamento de Química, por T.M.Santos e caracterizado por comparação com dados da literatura (Nicole *et al.*, 1999). A verificação da sua composição como complexo mononuclear foi testada por espectrometria de massa (ESI) e por difração de raios X de pó, seguido de estudos de simulação teórica para determinar a estrutura cristalina correspondente.

#### 3.2. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

Para a realização de estudos *in vivo*, prepararam-se soluções aquosas de crómio [Cr(pic)<sub>3</sub>] em NaCl 0,9%, nas seguintes concentrações: 5 mg/Kg; 10 mg/Kg; 25 mg/Kg e 50 mg/Kg.

#### 3.3. ANIMAIS

Foram utilizados ratinhos machos CD1, da estirpe ICR, com cerca de 7 semanas, com peso corporal entre 30 e 40g, fornecidos pela Harlan (Espanha). Os ratinhos foram mantidos em gaiolas de policarbonato transparente, numa câmara climatizada (22° ± 2°C com fotoperíodo luz/escurecimento de 12/12 horas e humidade relativa de 40-60%). Os animais tiveram acesso a água e ração apropriada *ad libitum*. Após um período de aclimatização de uma semana nestas condições os animais foram pesados e divididos em grupos.

Em todos os procedimentos foram consideradas as Normas Éticas de Experimentação Animal.

### **3.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Os animais foram pesados e divididos em 2 grupos controlo e 4 grupos experimentais, com 4 ratinhos cada. Os grupos experimentais foram os seguintes:

- Grupo I - Controlo negativo
- Grupo II - Tratamento com  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  na dose de 5 mg/Kg
- Grupo III - Tratamento com  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  na dose de 10 mg/Kg
- Grupo IV - Controlo negativo
- Grupo V - Tratamento com  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  na dose de 25 mg/Kg
- Grupo VI - Tratamento com  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  na dose de 50 mg/Kg

### **3.5. TRATAMENTOS**

O suplemento de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  foi injetado por via subcutânea nos grupos II e III diariamente, num período de 7 dias. Nos grupos V e VI foi administrado oralmente o mesmo suplemento num período de 14 dias. O veículo utilizado na administração foi NaCl 0.9%.

Os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, 24 horas após o último tratamento. Após a dissecação dos animais, foram recolhidos e pesados os órgãos em estudo (fígado, rim, baço, timo, testículo e epidídimo).

Todos os órgãos foram lavados com solução de NaCl 0.9% e imediatamente preparados para os estudos histológicos. Procedeu-se ainda à recolha de amostras de sangue em cada caso

### **3.6. ESTUDOS HISTOLÓGICOS**

As amostras dos órgãos em estudo foram fixadas em Bouin, por um período de 24 horas, e desidratadas com concentrações crescentes de etanol. De seguida, as amostras foram mergulhadas em benzol. Após este procedimento, efetuou-se a impregnação e a inclusão das amostras em 2 tipos de parafina (ponto de fusão 42-44°C e 52-58 °C).

Efetuarão-se cortes de 5-7  $\mu\text{m}$  de espessura, num micrótomo Leitz, modelo 1512. Estes cortes foram montados em água albuminada, sobre lâminas de vidro, e levados à estufa a 40°C para secagem, durante dois dias.

De seguida, procedeu-se à desparafinação, re-hidratação e coloração com hematoxilina e eosina (H&E). Após montagem em meio Eukitt, as preparações foram mantidas na estufa a 40° C, durante 2 dias.

Por último, foram observadas num microscópio ótico Olympus BX41TF com sistema fotográfico acoplado.

### **3.7. ESFREGAÇO SANGUÍNEO**

Efetuaram-se esfregaços sanguíneos corados, pelo método de Wright que foram observados ao microscópio ótico. este procedimento foi repetido para todos os grupos experimentais.

### **3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS**

Os valores do peso dos animais e do peso relativo dos órgãos estudados são apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão, nas Tabelas 1 e 2.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS AO LONGO DA EXPERIÊNCIA

Durante o decurso das experiências a taxa de sobrevivência dos animais foi de 100%. Após a administração do suplemento de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  quer por via injetável, quer oralmente, os animais apresentaram um comportamento e aspeto normal, quando comparados com o grupo controlo. Não se notaram quaisquer alterações no consumo de alimento e de água.

### 4.2. EFEITO NO PESO CORPORAL E PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados do peso corporal e do peso relativo dos órgãos dos animais.

Assim no presente estudo observou-se que a administração do suplemento de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  nas diferentes doses não induziu diminuição no peso corporal dos ratinhos, visto que este aumentou em todos os grupos ao longo dos tratamentos efetuados, excepto nos ratinhos do grupo VI, em que o seu peso se manteve constante ao longo do tratamento.

**Tabela 1 :** Peso Corporal dos ratinhos ao longo da experiência

GRUPOS	PESO INICIAL	PESO FINAL
<b>I</b> (Controlo)	$36,25 \pm 1,06$	$38,40 \pm 1,98$
<b>II</b> (5 mg/Kg de $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ )	$36,55 \pm 6,82$	$37,47 \pm 3,35$
<b>III</b> (10 mg/Kg de $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ )	$35,67 \pm 4,38$	$36,43 \pm 2,31$
<b>IV</b> (Controlo)	$30,61 \pm 1,50$	$33,90 \pm 1,00$
<b>V</b> (25 mg/Kg de $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ )	$30,77 \pm 0,70$	$32,49 \pm 0,57$
<b>VI</b> (50 mg/Kg de $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ )	$30,07 \pm 3,23$	$30,74 \pm 1,62$

**Tabela 2 :** Peso relativo dos órgãos ao longo da experiência

GRUPOS	PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS EM ESTUDO					
	FÍGADO	RIM	TESTÍCULO	EPIDÍDIMO	BAÇO	TIMO
<b>I</b> <sup>(Controlo)</sup>	4,66 ± 0,30	0,86 ± 0,05	0,34 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,26 ± 0,03	0,15 ± 0,07
<b>II</b> <sup>(5 mg/Kg de [Cr(pic)<sub>3</sub>])</sup>	4,34 ± 0,21	0,76 ± 0,09	0,32 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,25 ± 0,04	0,17 ± 0,08
<b>III</b> <sup>(10 mg/Kg de [Cr(pic)<sub>3</sub>])</sup>	4,16 ± 0,18	0,75 ± 0,05	0,30 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,25 ± 0,08	0,12 ± 0,06
<b>IV</b> <sup>(Controlo)</sup>	4,85 ± 0,37	0,84 ± 0,14	0,36 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,06
<b>V</b> <sup>(25 mg/Kg de [Cr(pic)<sub>3</sub>])</sup>	4,41 ± 0,47	0,74 ± 0,04	0,36 ± 0,04	0,16 ± 0,009	0,23 ± 0,04	0,19 ± 0,12
<b>VI</b> <sup>(50 mg/Kg de [Cr(pic)<sub>3</sub>])</sup>	4,47 ± 0,33	0,70 ± 0,09	0,36 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,06	0,20 ± 0,05

Relativamente ao peso relativo dos órgãos em estudo não se verificam diferenças no peso dos órgãos entre os animais dos diferentes grupos. (Tabela 2).

### 4.3. OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS

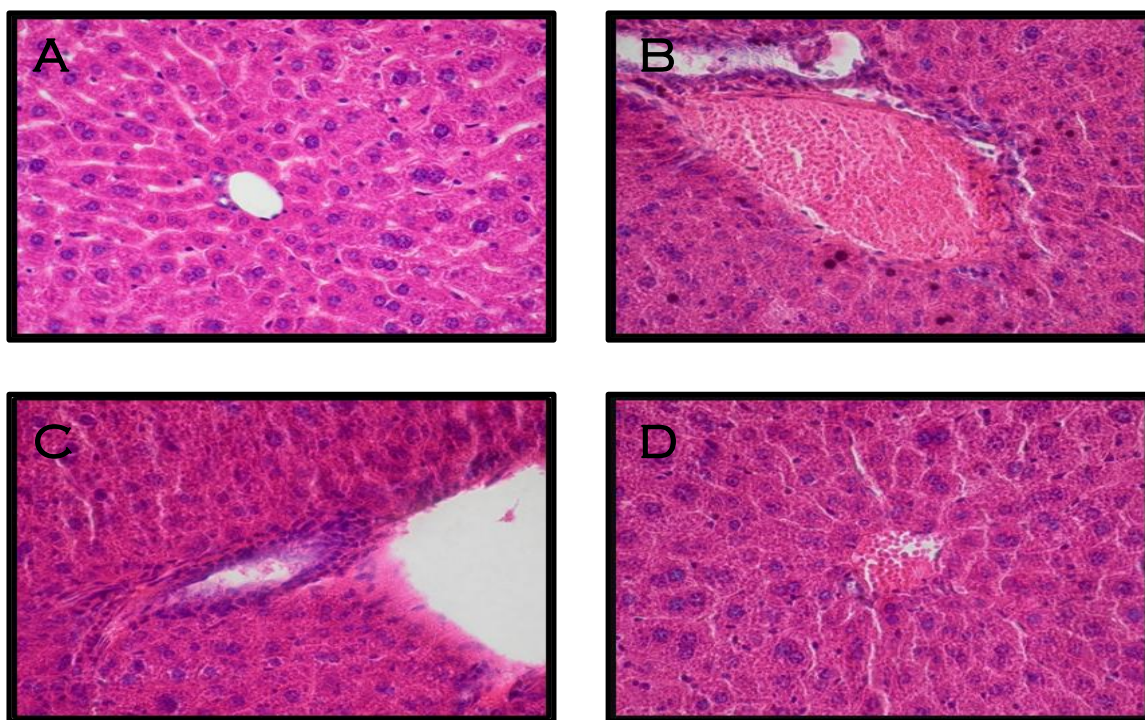
A observação macroscópica dos órgãos dos animais em estudo não revelou alterações significativas, quando comparados com os dos grupos controlo. Os órgãos apresentaram características morfológicas normais, assim como cor normal.



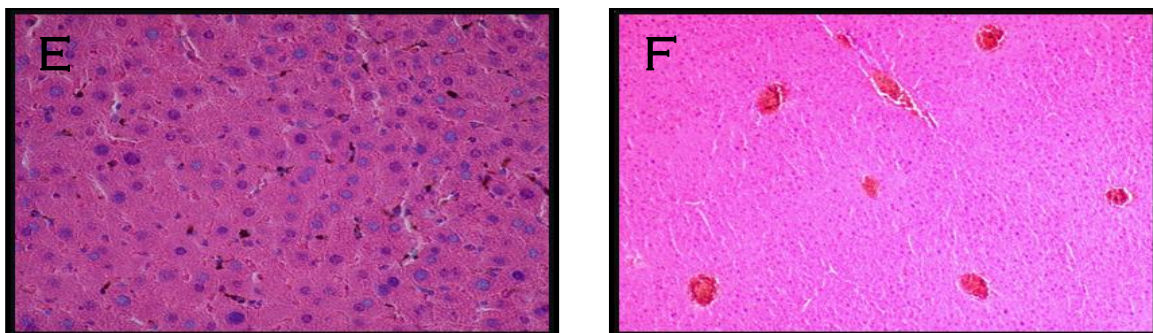
## 4.4. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

### 4.4.1. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO FÍGADO

Os cortes histológicos do fígado dos animais do grupo controle apresentaram morfologia normal (Fig. 2A). Na dose de 5 mg/kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  observaram-se algumas hemorragias e infiltração de algumas células de resposta inflamatória em torno da veia central, com maior evidência na dose de 10 mg/kg  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ . Na dose de 25 mg/kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  observaram-se hemorragias e acumulação de ferro. Contudo no grupo exposto a 50 mg/kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  notaram-se múltiplas hemorragias. As alterações descritas anteriormente estão ilustradas na Fig. 3.



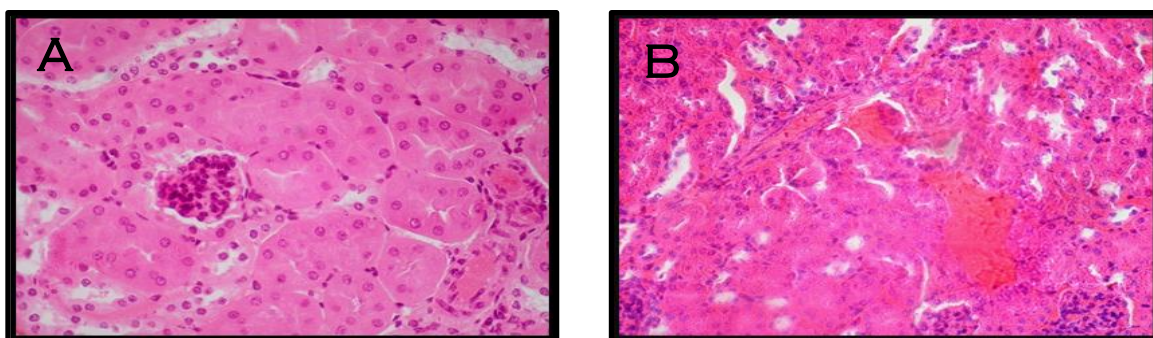
**Figura 2 :** Cortes histológicos do fígado **A)** Controle; **B)** 5 mg/ kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; **C)** 10 mg/kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; **D)** 25 mg/Kg  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  (HE x 400; x 100).



**Figura 3 :** Cortes histológicos do fígado **E)** 25 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  e **F)** 50 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; (HE x 400; x 100).

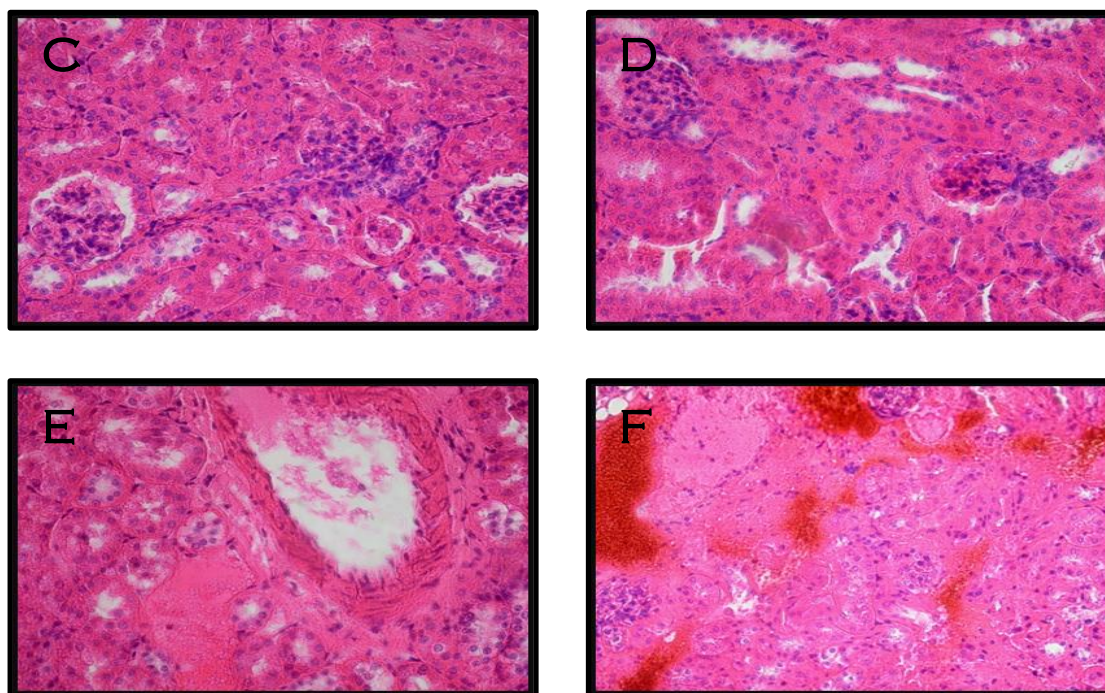
#### 4.4.2. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO RIM

Os cortes histológicos do rim do grupo controlo evidenciaram uma morfologia normal com clara distinção entre a zona cortical e medular (Fig. 4A). Contudo, nos grupos de animais sujeitos a exposição com o suplemento de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ , quer por via injetável quer por via oral observaram-se várias lesões (Fig.4). Embora para a dose de 5 mg/kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  não se tenham observado alterações significativas, no outro grupo (10 mg/kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ), constatou-se a presença de infiltrados de células inflamatórias próximo dos glomérulos de Malpighi. Nos animais tratados por via oral observou-se destruição da cápsula de Bowman, com consequente libertação dos capilares para a zona distal na dose de 25 mg/kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ . Contudo na dose de 50 mg/kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  observaram-se hemorragias mais extensas.



**Figura 4:** Cortes histológicos de rim **A)** Controlo; **B)** 10 mg/ kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  ( HE x 400; x 100).

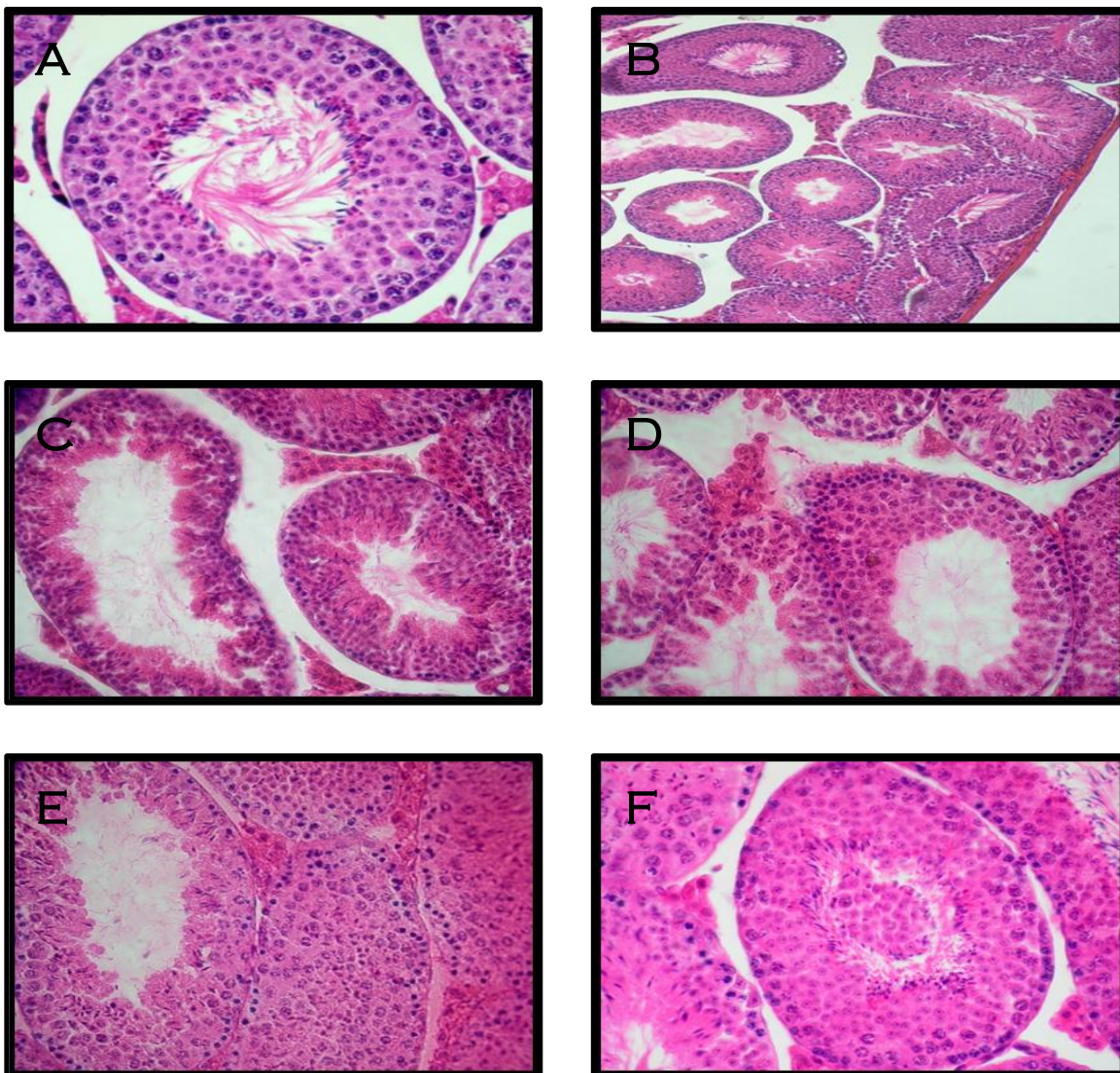




**Figura 5:** Cortes histológicos de rim **C)** e **D)** 25 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; **E)** e **F)** 50 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  (HE x 400; x 100).

#### 4.4.3. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO TESTÍCULO

Os cortes histológicos do testículo do grupo de controle mostraram uma morfologia normal e característica, com destaque para os tubos seminíferos com morfologia aparentemente regular (Fig. 6A). Nos animais sujeitos a exposição por via injetável, observou-se degenerescência dos tubos seminíferos na dose de 5 mg/ Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ . Na dose de 10 mg/ Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  observou-se um maior número de alterações: o lúmen dos tubos seminíferos estava desprovido de espermatozoides e desorganização celular, levando a uma degenerescência acentuada com diminuição das etapas de alongamento e desenvolvimento dos espermatídios, o que resultou na ausência de orientação radial adequada. Nos animais sujeitos a exposição por via oral observou-se disrupção da membrana basal do tubo seminífero e formação de edema intersticial. Constatou-se ainda a redução das células germinativas e dos espermatozóides no lúmen dos tubos seminíferos na dose de 25 mg/ Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ . No grupo de animais sujeitos à dose de 50 mg/ Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  observou-se desorganização radial, rutura da membrana e células imaturas no lúmen. Estas alterações histológicas estão representadas na figura 6.

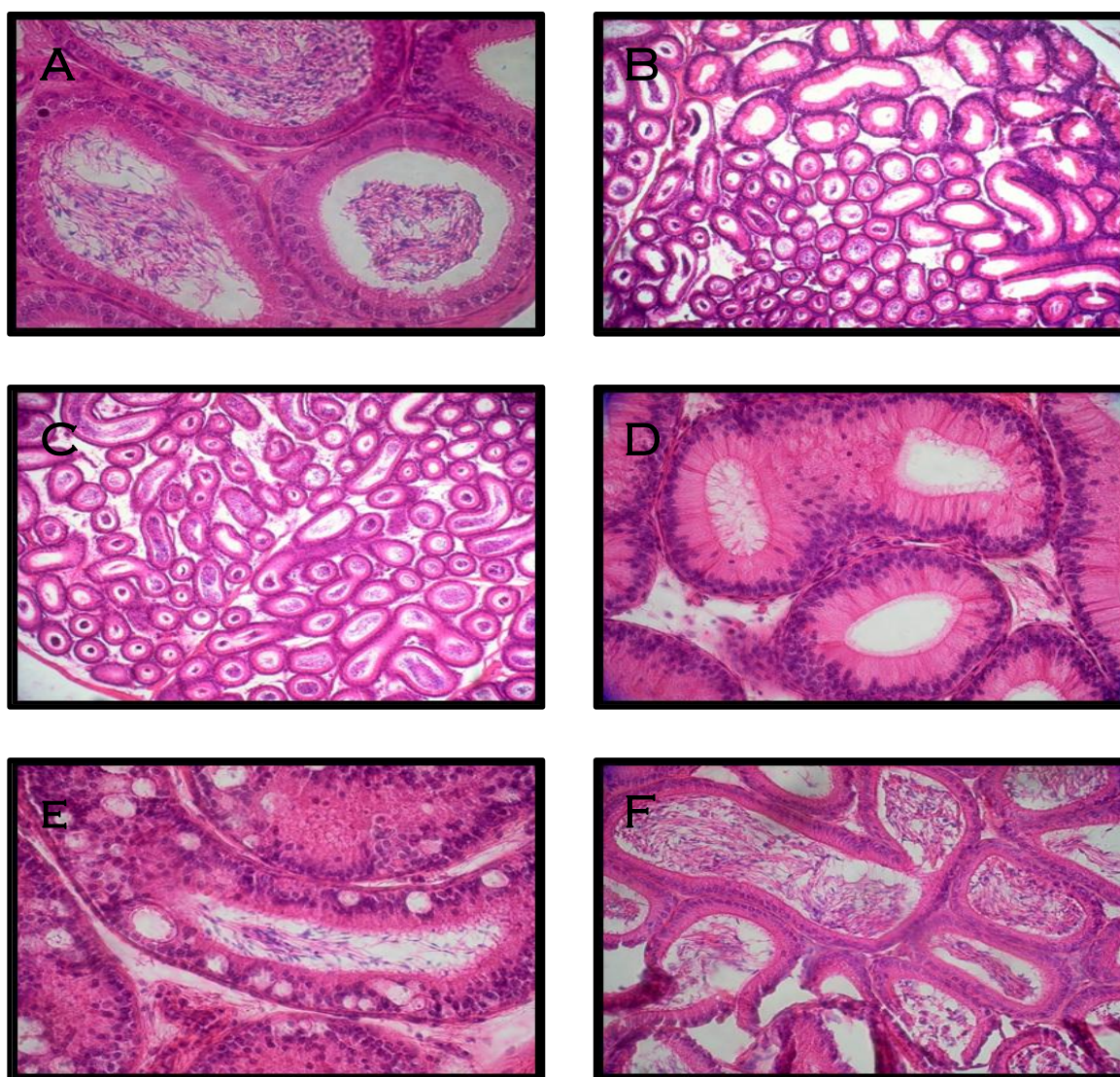


**Figura 6:** Cortes histológicos de testículo **A)** Controlo; **B)** 5 mg/ kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; **C)** 10 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; **D)** 25 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; **E)** e **F)** 50 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  ( HE x 400; x 100).



#### 4.4.4. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO EPIDÍDIMO

Os cortes histológicos do epidídimo do grupo de controlo demonstraram uma morfologia normal. Na dose de 5 mg/Kg  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  observou-se um padrão diferente na distribuição de espermatozóides nos túbulos. Contudo, na dose de 10 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  observaram-se lesões menos acentuadas que na dose anterior, verificando-se ainda, agregação de espermatozóides no lúmen. Na dose de 25 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  não foram observadas lesões significativas. Contudo na dose de 50 mg/ Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  foi observada condensação de espermatozóides no lúmen, disrupção da membrana e ausência de espermatozoides em alguns túbulos. A figura 7 ilustra estas alterações histológicas.

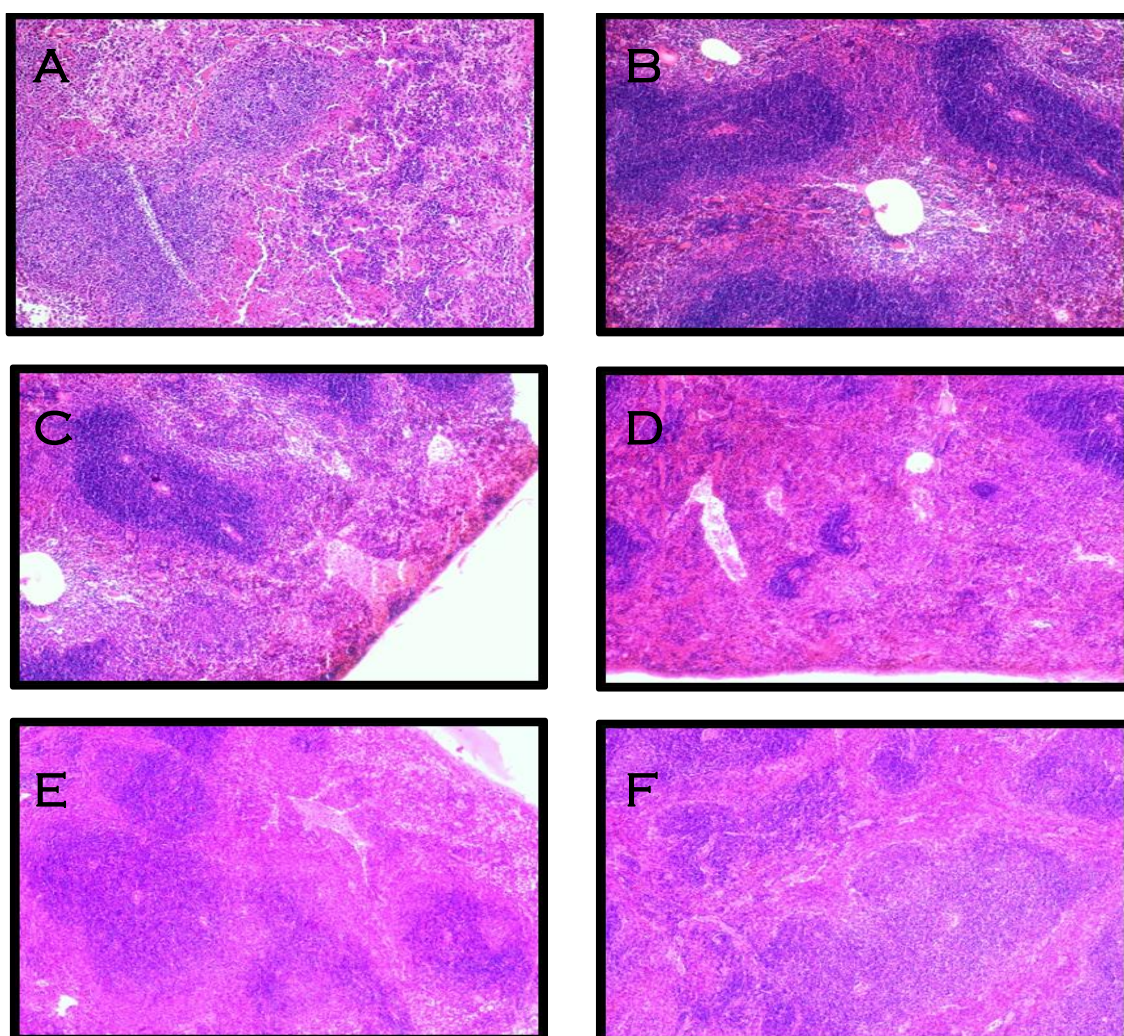


**Figura 7 :** Cortes histológicos de epidídimo A) Controlo; B) 5 mg/ kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; C) e D) 10 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; E) e F) 50 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  ( HE x 400; x 100).



#### 4.4.5. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO BAÇO

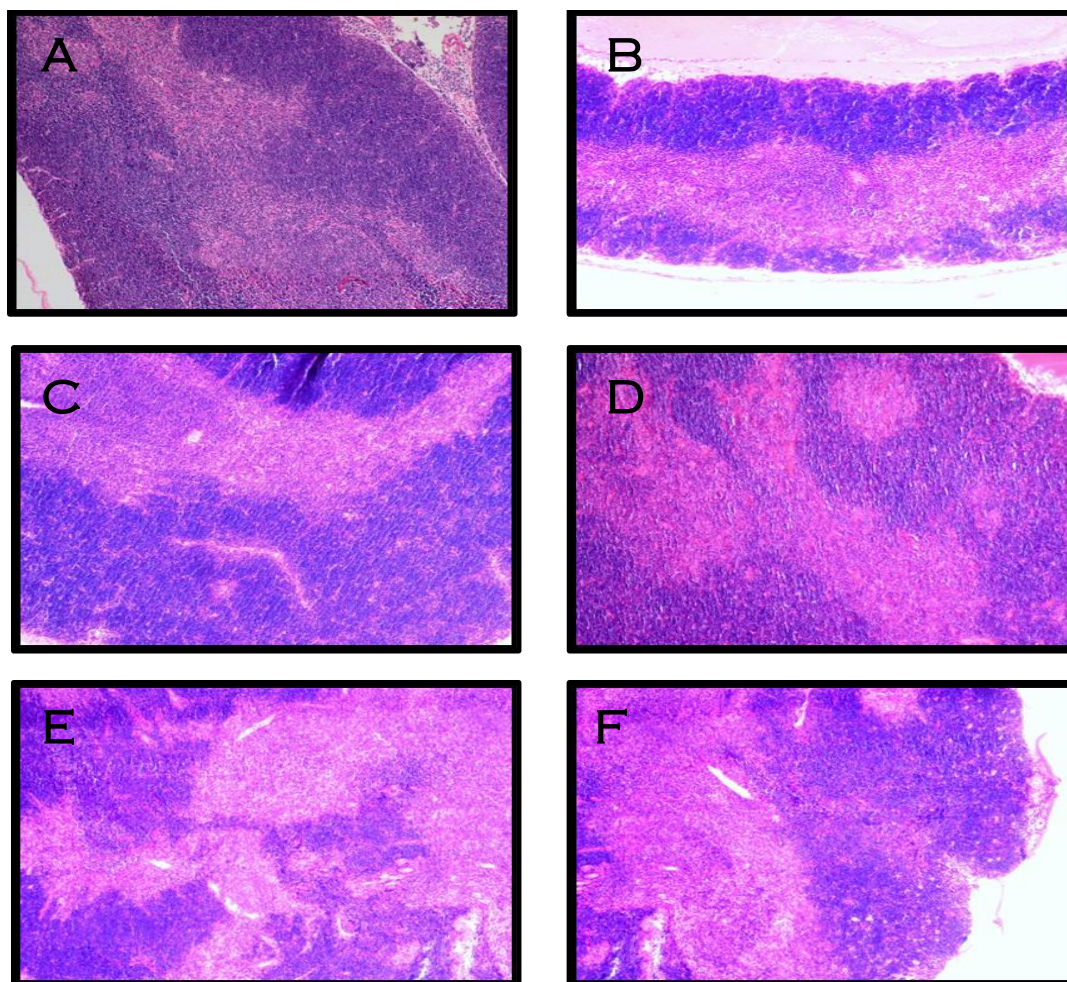
Os cortes histológicos do baço do grupo de controlo mostraram uma morfologia normal, e também uma distribuição normal da polpa branca e da polpa vermelha. Na dose de 5 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  observou-se desorganização da polpa branca e espessamento da cápsula. No grupo de animais exposto à dose de 10 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  observou-se a presença de células gigantes e algumas zonas com depleção celular. Na dose de 25 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  observou-se desorganização das polpas vermelha e branca e na de 50 mg/Kg também se observou desorganização das polpas e zonas de depleção celular. Na Figura 8 estão ilustradas estas as alterações histológicas.



**Figura 8:** Cortes histológicos de baço A) Controlo; B) e C) 5 mg/ kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; D) 10 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; E) 25 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  e F) 50 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  ( HE x 400; x 100).

#### 4.4.6. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO TIMO

Os cortes histológicos do timo do grupo controlo apresentaram uma histologia normal, com corpúsculos de Hassal e lóbulos distintos, envolvidos pela cápsula de tecido conjuntivo e também com as zonas cortical e medular bem distintas. Nos restantes grupos observaram-se alterações histológicas ilustradas na Figura 9. Assim nos animais sujeitos a tratamento por via injetável não se observaram alterações significativas, na dose de 5 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ , mas para a dose de 10 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  observou-se pouca diferenciação entre a zona cortical e medular. Nos animais sujeitos a tratamento por via oral observou-se depleção celular e desorganização da estrutura na dose de 25 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ . Assim como na dose de 50 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  para a qual se observou igualmente desorganização na estrutura do timo.



**Figura 9 :** Cortes histológicos de timo **A)** Controlo; **B)** 5 mg/ kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; **C)** 10 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; **D)** 25 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ ; **E)** e **F)** 50 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  ( HE x 400; x 100).



## 5. DISCUSSÃO

Os suplementos alimentares surgem como uma opção apetecível para diversos fins, nomeadamente para a perda de peso. No entanto, além de não ser ainda conhecida qual a segurança destes suplementos a longo prazo, bem como todas as interações possíveis com outros medicamentos, atualmente a maioria dos suplementos utilizados ainda não possuem evidência científica consistente que justifique a sua utilização. Estes suplementos, isolados ou combinados, são facilmente acessíveis à população, sendo habitualmente mais fáceis de adquirir do que recorrer ao aconselhamento por parte de um profissional de saúde. Embora a legislação existente seja escassa, e muitas vezes estes produtos se possam tornar perigosos, são vistos pelos seus utilizadores como soluções naturais que não comportam riscos para a sua saúde.

No caso particular dos suplementos alimentares, um inquérito realizado acerca do seu consumo em Portugal, revelou que 81% dos entrevistados consome, ou já consumiu, algum suplemento alimentar, sendo que 72% tinham consumido este tipo de produtos no ano anterior (Fernandes, 2009; Felício, 2006).

A utilização do suplemento de *tris*-picolinato de crómio(III) tem vindo a tornar-se um assunto polémico, visto que os seus efeitos benéficos têm sido questionados quando usados na redução e regulação do peso corporal e no metabolismo da glicose. Os seus efeitos toxicológicos têm sido alvo de constante debate, aumentando a controvérsia em torno da segurança de utilização deste composto.

No presente estudo, pretendeu-se verificar se se observavam efeitos histopatológicos após suplementação de Crómio em níveis crescentes sobre a forma de *tris*-picolinato de crómio(III) em estudos *in vivo* com ratinhos.

Na generalidade dos grupos que foram estudados, verificou-se que o suplemento não interferiu na redução de peso dos ratinhos nem no seu normal crescimento. Perante estes resultados constatou-se que o nosso estudo foi ao encontro de trabalhos de investigação anteriormente desenvolvidas pelo *The National Toxicology Program* (NTP) no qual se testou também o efeito do  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ , utilizando doses subcrónicas de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  num grupo de ratos durante 13 semanas (Rhodes *et al.*, 2005). A dose mais elevada usada no estudo atrás referido foi de  $(4243\mu\text{g Cr}(\text{pic})_3/\text{Kg}/\text{dia})$  testada era  $10 \times 10^3$  vezes superior à da ingestão média diária de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  em seres humanos (Andersson *et al.*, 2007; Rhodes *et al.*, 2005) e, mesmo nessas doses os resultados demonstraram que o  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  não tinha efeito no o peso corporal.



Quanto à análise histológica foram notórias as lesões provocadas pelo *tris*-picolinato de crómio(III) nos órgãos em estudo (fígado, rim, testículos, epidídimo, baço e timo). A nível hepático as lesões observadas foram hemorragias, infiltração de algumas células de resposta inflamatória e acumulação de ferro, lesões estas que foram mais evidentes nas doses de 10 mg/Kg e 50 mg/Kg de [Cr(pic)<sub>3</sub>]. Num estudo realizado por Mahmoud e seus colaboradores (2009) em ratos administrados com diferentes doses de *tris*-picolinato de crómio(III) por via oral, foi descrito alterações na morfologia do fígado, nomeadamente alterações degenerativas nos hepatócitos.

A nível renal observou-se alterações significativas, nomeadamente a presença de infiltrados de células inflamatórias próximos dos glomérulos de Malpighi, destruição da cápsula de Bowman, com consequente libertação dos capilares para a zona distal e hemorragias extensas. Pode-se constatar que estas alterações ocorreram nas doses mais elevadas do tratamento. Elevada acumulação de *tris*-picolinato de crómio(III) no rim e fígado foi verificada num estudo realizado por Vincent e seus colaboradores (2001), após estes terem administrado por via injectável, *tris*-picolinato de crómio(III) em ratos normais. Num outro estudo Mahmood e seus colaboradores (2009) demonstraram resultados distintos em diferentes grupos de ratos, ou seja uns apresentavam morfologia normal enquanto outros apresentavam alterações renal.

O *tris*-picolinato de crómio(III) também induziu alterações na histologia do testículo e do epidídimo. No testículo observou-se degenerescência dos tubos seminíferos, ausência de espermatozoides, desorganização celular, disrupção da membrana basal, redução das células germinativas e células imaturas no lúmen. No epidídimo observou-se distribuição distinta de espermatozoides nos túbulos, agregação e condensação de espermatozoides no lúmen e disrupção da membrana. Nomeadamente, McAdory e seus colaboradores (2011) demonstraram que o índice de fertilidade nos ratinhos tratados por administração oral, é mais baixo do que nos ratos controlo.

No baço observou-se desorganização das polpas vermelha e branca, presença de células gigantes e zonas de depleção celular. No timo observou-se pouca diferenciação entre a zona cortical e medular, desorganização da estrutura e depleção celular em relação a esta temática a literatura é escassa.

Segundo Levina e seus colaboradores (2008) os resultados negativos de alguns estudos podem ser devido ao curto tempo de tratamento. Pela revisão de estudos efetuados, constatou-se que existe uma discrepância de resultados que, segundo Cefalu e seus colaboradores (2004), advém provavelmente de metodologias diferentes entre os diferentes estudos nomeadamente na concentração das doses de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  ingeridas e na formulação de tratamento.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO FUTURO

Face à análise de estudos recentes sobre a temática do suplemento nutricional *tris*-picolinato de crómio(III) constatou-se que os resultados obtidos até a data têm evidenciado uma considerável controvérsia a nível do seu uso e da sua segurança, mostrando que as evidências dos seus possíveis efeitos tanto benéficos como tóxicos, não se encontram bem esclarecidas e não são conclusivas. Existem portanto, várias perspetivas acerca do papel do *tris*-picolinato de crómio(III) na saúde humana, o que tem resultado numa área de debate atual e num notável caso polémico.

No presente estudo através da análise histológica conclui-se que as doses administradas de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  provocaram lesões nos órgãos estudados; órgãos com funções metabólicas e de excreção (fígado, rim) outros com funções imunitárias (baço e timo) e reprodutores (testículo e epidídimo), sendo as doses de 10 e 50 mg/Kg de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  as mais lesivas. Perante esta situação, torna-se assim pertinente a realização de estudos futuros, de modo a clarificar esta situação polémica, com metodologias diferentes, nomeadamente nas doses administradas de  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ , nos tempos de tratamento e protocolos variados .

Como se pode constatar, apesar do esforço desenvolvido ao longo dos últimos anos na realização de estudos com o *tris*-picolinato de crómio(III) existe ainda uma discrepância de resultados relativos aos seus efeitos, que tornam difícil estabelecer a sua segurança. Tal como já referido, torna-se imperativo o desenvolvimento de estudos futuros para o esclarecimento do mecanismo de ação deste suplemento.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso AB. A importância do crômio na alimentação humana [Monografia]. Instituto Superior de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto; 1998.

Althuis, D. M., Jordan, N. E., Ludington, E. A., & Wittes, J. T. (2002). Glucose and insulin responses to dietary chromium supplements: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 148-155.

Andersson, M. A., Grawé, K. P., Karlsson, O. M., Abramsson-Zetterberg, L. G., & Hellman, B. E. (2007). Evaluation of the potential genotoxicity of chromium picolinate in mammalian cells *in vivo* and *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1097-1106.

Asan, E. (2002). Progress in focus: recent advances in histochemistry and cell biology. *Histochemical and Cell Biology*, 118: 507-525.

Barceloux, D. G., & Barcelaux D. (1999). Chromium. *Clinical Toxicology*, 37, 173–194.

Cefalu, W. T., & Hu, F. B. (2004). Role of Chromium in Human Health and in Diabetes. *Diabetes Care*, 27, 2741-2751.

Cood, R., Irwin, J. A., & Lay, P. A. (2003). Sialoglycoprotein and carbohydrate complexes in chromium toxicity. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 213-219.

McAdory, D. & Nicholas R. Rhodes & Felicia Briggs & Melissa M. Bailey & Kristin R. Di Bona & Craig Goodwin & John B. Vincent & Jane F. Rasco (2011) - Potential of Chromium(III) Picolinate for Reproductive or Developmental Toxicity Following Exposure of Male CD-1 Mice Prior to Mating. *Biology Trace Element Research* 143:1666–1672.

Eastmond DA, Macgregor JT, Slesinski RS. (2008), Trivalent chromium: assessing the genotoxic risk of an essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Critical Review in Toxicology*,; 38:173-90(3):173-190.

Esperança, Pina JA. Anatomia Humana dos Órgãos. Lisboa (Portugal). Lidel; 2004.

Felício, J.A. 2006. Estudo de mercado: Consumo de Suplementos alimentares em Portugal. *Centro de Estudos de Gestão do ISEG*.

Fernandes, P. 2009. Comportamentos do consumidor face aos suplementos alimentares. *Segurança e Qualidade Alimentar*. Lisboa: Editdeias.

Fry M.M. & McGavin M.D. (2007). Bone marrow, blood cells, and lymphatic system. In: McGavin, M.D. & Zachary, J.F. (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease*, (4th ed.). (pp. 751-755). St. Louis Missouri: Mosby Elsevier.

Gallagher ML. Micronutrientes: Minerals - Chromium. In: Mahan LK, Escott-Stump S, editores. *Krause's Food & Nutrition Therapy*. 12nd ed.: Saunders Elsevier; 2008. p. 132-33.

IARC, <http://www.iarc.fr> (consultado em Junho de 2012).

Insel P, Turner RE, Ross D. Trace minerals - Chromium. In: *Nutrition*. 3rd ed.: Jones and Barlett Publishers, Inc; 2007. American Dietetic Association, p. 524-26.

Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS, et al. (2005). The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biology of Reproduction*; **73**:404-413.

Junqueira, L. C., and Carneiro, J. (2008) *Basic Histology, text and atlas* (11th edition). McGraw-Hill editora. Cap. 14, 16 e 19.

Kottwitz, K., Laschinsky, N., Ficher, R., & Nielsen, P. (2009). Absorption, excretion and retention of <sup>51</sup>Cr from labeled Cr-(III)-picolinate in rats. *Biometals*, 22, 289-295.

Levina, A., & Lay, P.,A. (2008). Chemical Properties and Toxicity of Chromium(III) Nutritional Supplements. *Chemical Research Toxicology*, 21, 563-571.

Levina, A., Codd, R., Dillon, C. T., & Lay, P.A. (2006). Chromium in Biology: Toxicology and Nutritional Aspects. *Progress in Inorganic Chemistry*, 51, 145–250.

Lukaski, H. C., Siders, A. W., & Penland, G. J. (2007) Chromium picolinate supplementation in women: effects on body weight, composition, and iron status. *Nutrition*, 23, 187-195.

Mahmoud, A., Ghanem, H., & Darwish, N., (2009). Effect of Chromium-Picolinate on Biochemical and Histopatological alterations in Rats. *The Egyptian Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, 27, 163-176.

Mahmood S Mozaffari; Rafik AbdelSayed; Jun Yao Liu<sup>1</sup>; Hereward Wimborne; Azza El-Remessy and Ahmed El-Marakby (2009) Effects of chromium picolinate on glycemic control and kidney of the obese Zucker rat . *Department of Oral Biology, School of Dentistry, Medical College of Georgia Augusta, Georgia 30912, USA*

Medeiros, M.G., (2003), Genotoxicidade de Compostos de Crómio, Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (Tese de Doutoramento).

Moore KL, Dalley AF. (1999.)Anatomia Orientada para a Clínica. Rio de Janeiro (RJ). Guanabara Koogan SA.

Nicole E. Chakoy, Rachel A. Collins, John B. Vincent (1999). A re-investigation the electronic spectra of chromium(III) picolinate complexes and high yield synthesis and characterization of Cr (m- 2 OH) (pic) 5H O (Hpic5picolinic acid), *Department of Chemistry and Coalition for Biomolecular Products, The University of Alabama, Tuscaloosa, AL 35487-0336, USA*

Otero, L.C., Pérez, M.J.B., Villamandos, J.C.G., Martinez, F.J.P., Campilho, J.S. & Alvarez, J.S. (2004). Sistema inmunológico y linfoide. In: Ortiz, A.G. & Rodríguez, A.B. (Eds.), *Tratado de Histologia Veterinária*. (1ª ed.). (pp. 230-238). Barcelona: Masson.

Pattar. G., Tackett, L., Liu, P., & Elmendorf, J. (2006) Chromium picolinate positively influences the glucose transporter system via affecting cholesterol homeostasis in adipocytes cultured under hyperglycemic diabetic conditions. *Mutation Research*, 610, 93-100.

Porter, DJ, Raymond, LW, & Anastasio, G. D (1999).Chromium: Friend or Foe?. *Archives of Family Medicine*, 8, 386-390.

Press, R. I., Geller, J., & Evans, G. W. (1990). The Effect of Chromium Picolinate on Serum Cholesterol and Apolipoprotein Fractions in Human Subjects. *The Western Journal of Medicine*, 152, 41-45

- Refaie, F. M., Esmat, A. Y., Mohamed, A. F. & Nour, W. H. A. (2009). Effect of Chromium supplementation on the diabetes induced-oxidative stress in liver and brain of adult rats. *Biometals*, 22, 1075-1087.
- Rhodes, M. C., Hébert, C. D., Herbert, R. A., Morinello, E. J., Roycroft, J. H., Travlos, G. S., & Abdo, K. M. (2005). Absence of toxic effects in F344/N rats and B6C3F1 mice following subchronic administration of chromium picolinate monohydrate. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 21–29.
- Santos, A.E.A. (2008). Recolha de dados de consumo de medicamentos e/ou suplementos à base de plantas medicinais numa amostra de população de Lisboa e Vale do Tejo. *Revista Lusófona de Ciência e Tecnologias da Saúde*.
- Santos, T.M., (1995), Química de coordenação de crómio relacionada com os efeitos biológicos de compostos de Cr(III) e de Cr(VI), Aveiro: Departamento de Química da Universidade de Aveiro, (Tese de Doutoramento).
- Sharp, E.P., LaRegine, M.C. (1998). The laboratory rat. London. CRC Press LCC. pp: 1-249.
- Burkitt H. G., Young B. and Heath, J. W. (1994) *Wheater - Histologia Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. pp. 214-303.
- Stearns, D. M., Sr Wise, J. P., Patierno, S. R., & Wetterhahn, K. E. (1995). Chromium(III) picolinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. *The FASEB Journal*, 9, 1643-1649.
- Suster, S., Rosai, J. (1997) Thymus, (Cap. 30), In: Histology for Pathologists. Eds. Sternberg, S.S., Lippincott-Raven Publishers Philadelphia, 687-706.
- Turner TT(2008). De Graaf's thread: the human epididymis. *Journal of Andrology*;29:237-250.
- Vicent B. Jonh; Hepburn D. DionD (2001). In vivo distribution of chromium from chromium picolinate in rats and implications for the safety of the dietary supplement.??
- Vincent, J. B. (2010) Chromium: celebrating 50 years as an essential element?. *Dalton transactions*, 39, 3787–3794.

Vincent, J. B. (1999). Mechanisms of Chromium Action: Low- Molecular- Weight Chromium-Binding Substance. *Journal of the American College of Nutrition*, 18, 6-12.

Vincent, J. B. (2003). The potential value and toxicity of chromium picolinate as a nutritional supplement, weight loss agent and muscle development agent. *Sports Medicine*, 33, 213-230.

Young, B., Heath, J.W. (2000). Wheater. Histologia Funcional. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. pp: 274-282.



# ANEXOS

## ANEXO I - TABELA DE ESTUDOS

Dose de [Cr(pic)3]	Animal	Modo de administração	Duração	Resultados	Referência
200 mg/kg Cr/ dia	Ratinhos	Oral	4 Semanas	Índice de fertilidade nos ratos tratados mais baixo do que nos ratos de controlo.  Não se observaram efeitos na má formação/ variação esquelética.	DeAna McAdor; Nicholas R. Rhodes; Felicia Briggs; Melissa M. Bailey; Kristin R. Di Bona; Craig Goodwin; John B. Vincent; Jane F. Rasco (2011) Potential of Chromium (III) Picolinate for Reproductive or Developmental Toxicity Following Exposure of Male CD-1 Mice Prior to Matins
5 µg/ Kg /dia	Ratos	Injectável	15 Dias	Elevada acumulação de crómio no fígado e nos rins.  Baixo risco de dano no DNA.	DionD. D.Hepburn and Jonh B.Vincent(2001) In vivo distribution of chromium from chromium picolinate in rats and implications for the safety of the dietary supplement.
1 mg Cr/ Kg dia	Ratos	Oral	10 Semanas	Não se verificaram diferenças visíveis entre os diferentes grupos.	Randall Bennett, Bobbi Adams, Amanda French, Yasmin Neggers and John B. Vincent.
5 mg Cr/Kg dia	Ratos	Oral	10 Semanas	A massa do coração, fígado e rim não foi afectadas pelo tratamento e todos os tecidos aparentavam estar normais.	High- Dose Chromium(III) Supplementation has no effects on body mass and composition while altering plasma hormone and triglycerides concentrations.
10mg/ Cr /Kg dia	Ratos	Oral	10 Semanas		
8 µg/ml água	Ratos diabéticos	Oral	6 semanas	Tolerância á glicose e aumento da da sensibilidade á insulina. Melhora as funções renais e hepáticas .	Shinde,U and Goyal R.(2003). Effect of chromium picolinate on histopatological alterations in stz and neonatal diabetic rats.
3mg/kg	Ratos	Injecção intraperitoneal	42h	Sem efeito genotóxico nos eritrócitos.	Andersson, M., Grawé, K., Karlsson, O., Abramsson-Zetterberg,L. and Hellman,B.,(2007)
3mg/kg	Ratos	Injecção intraperitoneal	16h	Nenhum dano no DNA dos linfócitos e hepatócitos	Evaluation of the potential genotoxicity of chromium picolinate in mammalian cells in vivo and in vitro, <i>Food and Chemical Toxicology</i> , 45:1097-1106

4243 µg/kg/dia	Ratos e Ratinhos	Oral	13 Semanas	-Sem evidência de toxicidade.	Rhodes MC, Hébert, CD, Herbert RA, Morinello, EJ, Roycroft JH, Travlos GS(2005). Absence of toxic effects in F344/N rats and B6C3F1 mice following subchronic administration of chromium picolinate.
0,44mg/ml	Ratos	<i>In vitro</i>	48h	Apoptose nas células de CHO. Danos mitocôndriais	Manygoats, K., Yazzie, M. and Stearns, D.,(2002) Ultrastructural damage in chromium picolinate-treated cells: a TEM study. Transmission electron microscopy, <i>Journal of Biological Inorganic Chemistry</i> <b>7</b> :791-8
0,8mg/100Kg	Ratos	Oral	8 semanas	Diminuição significativa nos níveis de GSH e GPx no fígado e no sangue. Aumento no nível de MDA nos tecidos hepáticos e no sangue. Aumento significativo nos níveis de sFas e de 8-oxo-dG. Alterações degenerativas na forma dos hepatócitos	
1,5mg/100Kg	Ratos	Oral	8 semanas	Diminuição significativa nos níveis de GSH e GPx no fígado e no sangue. Aumento no nível de MDA nos tecidos hepáticos e no sangue. Aumento significativo nos níveis de sFas e de 8-oxo-dG. Alterações degenerativas nos hepatócitos	Mahmoud, A., Ghanem, H., Darwish, N., (2009) Effect of Chromium-Picolinate on Biochemical and Histopathological alterations in Rats, <i>The Egyptian Journal of Biochemistry &amp; Molecular Biology</i> , <b>27</b> :163-176
0,8mg/100Kg (+ vitamina C)	Ratos	Oral	8 semanas	Nenhuma alteração significativa nos níveis de GSH e GPx no fígado e no sangue. Nenhuma alteração significativa nos hepatócitos	
1,5mg/100Kg (+ vitamina C)	Ratos	Oral	8 semanas	Nenhuma alteração significativa nos níveis de GSH e GPx no fígado e no sangue. Diminuição significativa nos níveis de sFas e de 8-oxo-dG. Nenhuma alteração significativa nos hepatócitos	
33,250mg/Kg	Ratos (machos e fêmeas)	Oral (entubados)	18h 42h	Nenhum dano nos cromossomos das células da medula óssea	Komorowski, J., Greenberg, D., Juturu, V., (2008) Chromium picolinate does not produce chromosome damage, <i>Toxicology in vitro</i> , <b>22</b> :819-826
2000mg/Kg	Ratos (machos e fêmeas)	Oral (entubados)	18h 42h		

"Journal Microscopy and Microanalyses 2012, *in press* "

**Light microscopy studies on mice testis after the nutritional supplement chromium(III)-tris(picolinate)**

M. Ferreira<sup>1</sup>, T. M. Santos<sup>2</sup>, M. L. Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology & CICECO, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

<sup>2</sup> Department of Chemistry & CICECO, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

e-mail: mrferreira@ua.pt

Cr(III)-tris(picolinate), [Cr(pic)<sub>3</sub>], is a very common dietary supplement, recommended for humans, cattle and swine. Chromium is considered an essential trace element, when in oxidation state +3, with some of its compounds seeming to have a beneficial effect on blood sugar regulation mechanisms. However, the safety of the use of a particularly popular Cr(III) compound, *ie* [Cr(pic)<sub>3</sub>], remains debatable. Clastogenic, and mutagenic features have been reported by Stearns and coworkers <sup>[1]</sup>, although surrounded by a controversial and contradictory multitude of publications on this subject <sup>[2,3]</sup>. The present work aims to study the effects of [Cr(pic)<sub>3</sub>] on mice spermatogenesis.

Cr(III)-tris(picolinate) was synthesized and characterized according to the literature <sup>[1]</sup>. Its composition as a mononuclear complex was tested by ESI-MS and by X-ray powder diffraction followed by single-crystal simulation calculations.

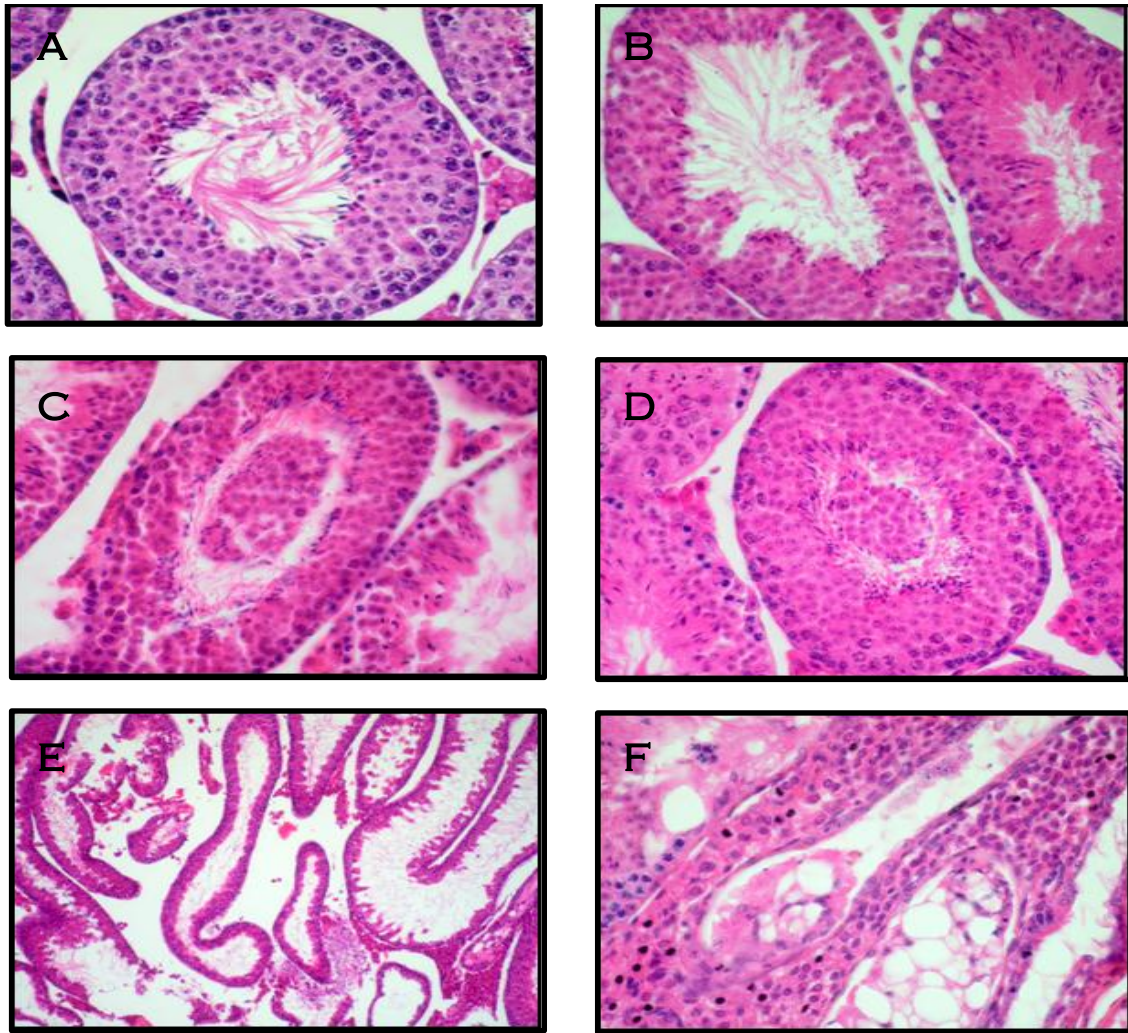
Male adult CDI mice from Harlan (Spain) were divided in groups and orally given 25 mg/kg and 50 mg/kg/body weigh/daily of [Cr(pic)<sub>3</sub>] for two weeks. Controls were also done. Behaviour and body weight were monitored throughout the experiments. After sacrifice, testis were collected, weighed, and fixed in Bouin's solution. Organs were then prepared for histology using routine techniques.

Animal experiments were conducted according to ethics procedures. Histological sections of control group evidenced normal regular features (Fig. 1a). However considerable damage was observed in both experimental groups in a dose dependent manner. In fact, seminiferous tubules showed degenerative changes within epithelium, namely vacuolation and sloughing of immature germ cells into the lumen in the group given the lowest dose (Fig.1 b,c). The high dosed group displayed more conspicuous injury within testis, namely strongly atrophic seminiferous tubules devoid of germs cells and strong vacuolation (Figs.1d-f).

The results of this study have shown an increased risk of adverse events in mice receiving 50 mg/kg/body weight of [Cr(pic)<sub>3</sub>]. However, little potential for adverse reproductive and developmental effects namely on progeny was recently described for male mice fed a diet containing 200 mg/kg/day [Cr(pic)<sub>3</sub>] <sup>[4-6]</sup>. In conclusion, concerns about using dietary supplements based on [Cr(pic)<sub>3</sub>] remain to be elucidated in future work.

1. Stearns, D. *et al* (2002). *Mutat. Res.*, 513, 135-142.
2. Kim, B. *et al* (2010), *Biol Trace Elem Res.*, 133, 171–180;
3. Yazaki, Y. *et al* (2010), *J. Altern. & Complem. Med.*,16(3), 291–299.
4. McAdory, D. *et al* (2011). *Biol Trace Elem Res.*, 143, 1666–1672;
5. Vincent, J. (2010) *Dalton Trans.*, 39, 3787-3794;
6. Anderson, M. A. *et al* (2007) *Food Chem. Toxicol.*, 45, 1097-1106.

This work was financed by CICECO, Aveiro University, Portugal.



**Fig 1.** Representative sections of testis from control group (A); 25 mg/kg/body weight exposed group (B, C); 50 mg/kg body weight  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ -administered mice (D-F). Substantial deleterious effects were noted within seminiferous epithelium; Haematoxylin- Eosin stain; original magnification 400x.