

**LESÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO CÁDMIO INDUZIDAS – INTOXICAÇÃO  
POR INGESTÃO E pH DA ÁGUA PODERIAM INFLUENCIAR SUA GÊNESE? UM  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**FERNANDA FREIRE MARIN SOARES**

**LESÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO CÁDMIO INDUZIDAS – INTOXICAÇÃO  
POR INGESTÃO E pH DA ÁGUA PODERIAM INFLUENCIAR SUA GÊNESE? UM  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**FERNANDA FREIRE MARIN SOARES**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai

636.089 59 Soares, Fernanda Freire Marin.  
S676l Lesões do trato respiratório cádmio induzidas –  
intoxicação por ingestão e pH da água poderiam  
influenciar sua gênese? : um estudo experimental  
em ratos / Fernanda Freire Marin Soares. –  
Presidente Prudente, 2017.  
27 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,  
Presidente Prudente, SP, 2017.

Bibliografia.

Orientador: Gisele Alborghetti Nai.

1. Cádmio. 2. pH. 3. Trato respiratório. I. Título.

**FERNANDA FREIRE MARIN SOARES**

**LESÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO CÁDMIO INDUZIDAS – INTOXICAÇÃO  
POR INGESTÃO E pH DA ÁGUA PODERIAM INFLUENCIAR SUA GÊNESE?  
UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 20 de março de 2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Profa. Dra. Susimary Aparecida Trevizan Padulla  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP  
Presidente Prudente-SP

---

Profa. Dra. Cecília Braga Laposy  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

## DEDICATÓRIA

Dedico a realização deste trabalho ao meu marido José Pedro, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e cuidando do nosso filho João, com poucos dias de vida, sempre que precisei. Ao meu filho também que soube superar minhas ausências.

Dedico também a minha orientadora Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai que não deixou em desistir, também pelo empenho, paciência e dedicação pra me ensinar.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado saúde e esta oportunidade maravilhosa de crescimento.

As minhas amigas do mestrado Cristiane, Fernanda, foram ótimas companheiras para dividir tarefas e que me ensinaram também muitas coisas.

A minha orientadora e amiga Gisele Alborghetti Nai pela toda paciência, incentivo, dedicação e carinho.

À toda equipa de professores, funcionários e alunos da Unoeste;

À todos meus amigos que me apoiaram e incentivaram, em especial aos meus amigos Daniel Bonfim e Carolina Betônico;

Ao meu pai, que sempre me apoia, pelo amor e pela paciência

Aos meus queridas irmãs por todo amor, incentivo e carinho;

Aos meus sogros Maria Rosa e Sérgio, pelo apoio e carinho;

Aos professores do Mestrado em Ciência Animal por todos conhecimentos ministrados ao longo do curso;

Ao meu amor, José Pedro, por todo amor, ajuda com meu filho e paciência.

Ao meu filho amado João, por me dar alegria a cada dia e mais vontade de viver e superar tudo.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

**Augusto Cury**

## RESUMO

### LESÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO CÁDMIO INDUZIDAS – INTOXICAÇÃO POR INGESTÃO E pH DA ÁGUA PODERIAM INFLUENCIAR SUA GÊNESE? UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

O cádmio é um metal muito utilizado na indústria. A exposição ao cádmio pode desenvolver uma variedade de doenças pulmonares. Não há na literatura avaliação do dano traqueal ou mesmo se a ingestão de cádmio pode também provocar danos ao trato respiratório. O objetivo do estudo é investigar as alterações histopatológicas causadas por intoxicação por cádmio via ingestão no trato respiratório e os possíveis efeitos do pH da água na gênese destas alterações. Utilizaram-se 90 ratos Wistar, divididos em 6 grupos (n=15): A – solução de cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$  - 400mg/L) na água de beber com pH 7,0; B –  $\text{CdCl}_2$  (400mg/L) na água de beber com pH 5,0; C –  $\text{CdCl}_2$  (400mg/L) na água com pH 8,0. D – água com pH 5,0; E – água com pH 8,0; F – água com pH 7,0. Todos os animais foram eutanasiados após 6 meses após o início do experimento. Retiraram-se fragmentos do pulmão e traquéia. A análise histopatológica foi realizada para avaliar presença ou não dos seguintes parâmetros: 1. Traquéia: infiltrado inflamatório e tipo de célula inflamatória; congestão tecidual; hipertrofia da musculatura; lesões não neoplásicas da mucosa; lesões displásicas; lesões neoplásicas benignas e malignas; tipo de muco (ácido ou básico); e o número de células calciformes; 2. Pulmão: infiltrado inflamatório intersticial, tipo de célula inflamatória e localização; congestão tecidual; fibrose intersticial; enfisema; necrose do parênquima; lesões displásicas e presença de lesões neoplásicas benignas e malignas. Observou-se que os animais expostos ao cádmio apresentaram média de células calciformes na traquéia de 65,83 células/6 campos de grande aumento (CGA), enquanto que os animais não expostos apresentaram 85,16 células/6CGA ( $p=0,012$ ). Enfisema pulmonar ocorreu em 71,43 a 100% dos casos, enquanto os não expostos apresentaram enfisema em 6,66 a 15,38% dos casos ( $p<0,001$ ). Concluiu-se que o trato respiratório é alvo do cádmio também na intoxicação via ingestão, porém o pH da água não influenciou no desenvolvimento das lesões.

**Palavras-chave:** metais pesados, neoplasia, pulmão, traquéia, exposição crônica, ingestão.

## ABSTRACT

### RESPIRATORY TRACT CADMIUM-INDUCED INJURIES – POISONING VIA INTAKE AND WATER pH COULD INFLUENCE THEIR GENESIS? AN EXPERIMENTAL STUDY IN RATS

Cadmium is a metal that is widely used in industry. Cadmium exposure may result in a variety of pulmonary diseases. No studies have evaluated tracheal damage or even whether cadmium intake can damage the respiratory tract. The aim of this study was to investigate the histopathological changes caused by cadmium poisoning via intake into the respiratory tract and the possible effects of water pH in the genesis of these changes. Ninety male Wistar rats were used and were divided into six groups (n=15): Group A received 400 mg/l cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) in the drinking water at a pH of 7.0; group B received CdCl<sub>2</sub> (400 mg/l) in the drinking water at a pH of 5.0; group C received CdCl<sub>2</sub> (400 mg/l) in the drinking water at a pH of 8.0; group D received water at a pH of 5.0; group E received water at a pH of 8.0; and group F received water at a pH of 7.0. Animals were euthanized after 6 months. Samples of the lung and trachea were removed. The histopathological analysis was performed to evaluate the presence or not of the following parameters: 1. Trachea: inflammatory infiltrate and type of inflammatory cell; tissue congestion; muscle hypertrophy; non-neoplastic lesions of the mucosa; dysplastic lesions; benign and malignant neoplastic lesions; mucus type (acid or basic); and the number of goblet cells; 2. Lung: interstitial inflammatory infiltrate, inflammatory cell type and location; tissue congestion; interstitial fibrosis; emphysema; necrosis of the parenchyma; dysplastic lesions and the presence of benign and malignant neoplastic lesions. Animals exposed to cadmium had a mean of goblet cells in the trachea of 65.83 cells / 6 high-power fields (HPF), while the animals exposed to cadmium had 85.16 cells / 6 HPF (p = 0.012). Pulmonary emphysema occurred in 71.43 to 100% of the cases, while the non-exposed had emphysema in 6.66% to 15.38% of the cases (p <0.001). The respiratory tract is a target for cadmium-related deficits after intake; however, the pH of the water did not influence the development of these lesions.

**Keywords:** metals, heavy, neoplasm, lung, trachea, chronic exposure, intake.

## SUMÁRIO

1	ARTIGO.....	9
	ANEXO - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE).....	26

## 1 ARTIGO

### LESÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO CÁDMIO INDUZIDAS – INTOXICAÇÃO POR INGESTÃO E pH DA ÁGUA PODERIAM INFLUENCIAR SUA GÊNESE? UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

### RESPIRATORY TRACT CADMIUM-INDUCED INJURIES – POISONING VIA INTAKE AND WATER pH COULD INFLUENCE THEIR GENESIS? AN EXPERIMENTAL STUDY IN RATS

**Short title:** RESPIRATORY TRACT CADMIUM-INDUCED INJURIES

Fernanda Freire Marin Soares<sup>1</sup>, Lyara Meira Marinho Queiroz<sup>2</sup>, Mariani Paulino Soriano Estrella<sup>2</sup>, Gisele Alborghetti Nai<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Médica, discente de Mestrado, professora da Faculdade de Medicina (FAMEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Discente de graduação em Medicina, Faculdade de Medicina de Presidente Prudente (FAMEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Doutora, médica, professora do Departamento de Patologia e do Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

Correspondência: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil. Phone: +55-18-3229-1059. Fax: +55-18-3229-1194. E-mail: patologia@unoeste.br.

\*Artigo formatado segundo as normas da revista *Biological Trace Element Research*.

## RESUMO

**Introdução:** O cádmio é um metal muito utilizado na indústria. A exposição ao cádmio pode desenvolver uma variedade de doenças pulmonares. Não há na literatura avaliação do dano traqueal ou mesmo se a ingestão de cádmio pode também provocar danos ao trato respiratório. **Objetivo:** Investigar as alterações histopatológicas causadas por intoxicação por cádmio via ingestão no trato respiratório e os possíveis efeitos do pH da água na gênese destas alterações.

**Material e métodos:** Utilizou-se 90 ratos Wistar, divididos em 6 grupos (n=15): GA – solução de cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$  - 400mg/L) na água de beber com pH 7,0; GB –  $\text{CdCl}_2$  (400mg/L) na água de beber com pH 5,0; GC –  $\text{CdCl}_2$  (400mg/L) na água com pH 8,0. GD – água com pH 5,0; GE – água com pH 8,0; GF – água com pH 7,0. Todos os animais foram eutanasiados após 6 meses após o início do experimento. Retiraram-se fragmentos do pulmão e traquéia para análise histopatológica.

**Resultados:** Os animais expostos ao cádmio apresentaram média de células calciformes na traquéia de 65,83 células/6 campos de grande aumento (CGA), enquanto que os animais não expostos apresentaram 85,16 células/6CGA ( $p=0,012$ ). Enfisema pulmonar ocorreu em 71,43 a 100% dos casos, enquanto os não expostos apresentaram enfisema em 6,66 a 15,38% dos casos ( $p<0,001$ ).

**Conclusão:** O trato respiratório é alvo do cádmio também na intoxicação via ingestão, porém o pH da água não influenciou no desenvolvimento destas lesões.

**Palavras-chave:** metais pesados, neoplasia, pulmão, traquéia, exposição crônica, ingestão.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cadmium is a metal that is widely used in industry. Cadmium exposure may result in a variety of pulmonary diseases. No studies have evaluated tracheal damage or even whether cadmium intake can damage the respiratory tract.

**Objective:** Investigate the histopathological changes caused by cadmium poisoning via intake into the respiratory tract and the possible effects of water pH in the genesis of these changes.

**Material and methods:** Ninety male Wistar rats were used and were divided into six groups (n=15): Group A received 400 mg/l cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) in the drinking water at a pH of 7.0; group B received CdCl<sub>2</sub> (400 mg/l) in the drinking water at a pH of 5.0; group C received CdCl<sub>2</sub> (400 mg/l) in the drinking water at a pH of 8.0; group D received water at a pH of 5.0; group E received water at a pH of 8.0; and group F received water at a pH of 7.0. Animals were euthanized after 6 months. Samples of the lung and trachea were removed for histopathological analysis.

**Results:** Animals exposed to cadmium had a mean of goblet cells in the trachea of 65.83 cells / 6 high-power fields (HPF), while the animals exposed to cadmium had 85.16 cells / 6 HPF (p = 0.012). Pulmonary emphysema occurred in 71.43 to 100% of the cases, while the non-exposed had emphysema in 6.66% to 15.38% of the cases (p <0.001).

**Conclusion:** The respiratory tract is a target for cadmium-related deficits after intake; however, the pH of the water did not influence the development of these lesions.

**Key words:** metals, heavy, neoplasm, lung, trachea, chronic exposure, intake.

## INTRODUÇÃO

O cádmio é um metal que contamina diversos alimentos, tais como vegetais, cereais e crustáceos [7], e desta forma pode contaminar também os seres humanos, além da exposição ocupacional.

Este metal pesado foi incluído no grupo 1 dos agentes cancerígenos a partir de 1993, como causa de câncer pulmonar entre trabalhadores que o manipulam, havendo forte suspeita de estar relacionada com o tempo e a intensidade de exposição [1]. Altos níveis de cádmio foram encontrados em tecidos de pacientes com câncer de pulmão e em tabagistas [2].

A exposição ao cádmio pode acarretar numa variedade de doenças pulmonares, incluindo enfisema, fibrose intersticial, pneumonites e câncer [3-5]. Por isso a necessidade de se ter maneiras alternativas e simples de evitar a toxicidade provocada por este elemento.

A exposição ao cádmio por ingestão é a principal fonte de contaminação para população em geral que não é fumante. O aumento da industrialização e da produtividade na agricultura nas últimas décadas tem levado ao aumento do cádmio no meio ambiente. O solo pode conter normalmente cádmio, e o uso de fertilizantes fosfatados pode aumentar estas concentrações. O cádmio é facilmente absorvido pelas plantas e a acidificação do solo torna o cádmio mais propenso à absorção. O cádmio se acumula no organismo dos seres humanos [7]. Apesar disso, ainda há poucos estudos na literatura avaliando a toxicidade do cádmio via ingestão.

O pulmão é um órgão alvo para diversos metais quando inalados. Devido à baixa solubilidade dos metais nos alvéolos pulmonares, estes compostos ficam por muito tempo no parênquima pulmonar, possibilitando o aparecimento de lesões [2]. O cádmio pode se acumular no cabelo, nas unhas, na pele e nos pulmões [2]. À inalação, o trato respiratório é o primeiro a ter contato com o cádmio, porém há poucos estudos avaliando se o trato respiratório é alvo da toxicidade do cádmio independente da via de exposição ou se é alvo somente quando o cádmio é inalado.

Um dos principais fatores que afeta a disponibilidade dos metais pesados às plantas é o pH do solo, o qual apresenta, em geral, relação inversa com a disponibilidade desses elementos [8].

Não há estudos na literatura avaliando se o cádmio ingerido pode causar lesões no trato respiratório, nem se há influência do pH da água de beber na toxicidade ao trato respiratório pelo cádmio.

O objetivo deste estudo foi investigar as alterações histopatológicas causadas por intoxicação por cádmio via ingestão ao trato respiratório e os possíveis efeitos do pH da água na gênese destas alterações.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Aprovação ética**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (CEUA – UNOESTE) (Protocolo nº 2459).

### **Protocolo animal**

Para este estudo, foram utilizados 90 ratos Wistar albinos (*Ratus Norvegicus albinus*), adultos (90 dias de idade), machos, com peso entre 200 a 250g. Os ratos foram agrupados em número de três em caixas grandes retangulares, medindo 49x34x16cm. Os ratos foram mantidos em biotério climatizado em umidade ( $50\pm 15\%$ ) e temperatura ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) e com fotoperíodo normal (12 horas de claro e escuro) controlados.

A exposição ao cádmio foi feita com cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$  – Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), com as seguintes especificações: hidrato mínimo de 98%, conteúdo de água de aproximadamente 2,5 mole/mole. A solução de cloreto cádmio foi fornecida aos animais na água de beber, todos os dias durante 6 meses, dissolvido na concentração de 400mg/L (adaptado de Motta et al [9]). A água foi acidificada com ácido clorídrico e alcalinizada com hidróxido de sódio. A troca da água do bebedouro foi realizada três vezes por semana, para evitar alteração do pH. As soluções residuais de água com cádmio foram encaminhadas para central de resíduos da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) e neutralizadas para posterior descarte. A água residual nos bebedouros foi medida a cada troca de solução, para avaliar a ingestão média de cada animal. Além disso, o pH da água restante foi medido para assegurar sua estabilidade.

Os animais foram distribuídos em 6 grupos (n=15) conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1- Distribuição dos animais por grupo de estudo (n=90).

<b>Grupo</b>	<b>Exposição ao cádmio</b>	<b>pH da água</b>
<b>GA</b>	400 mg/L	pH 7,0
<b>GB</b>	400 mg/L	pH 5,0
<b>GC</b>	400 mg/L	pH 8,0
<b>GD</b>	0	pH 5,0
<b>GE</b>	0	pH 8,0
<b>GF</b>	0	pH 7,0

Todos os grupos receberam água e ração *ad libitum* e foram mortos com injeção de Pentobarbital sódico (Syntec, EUA), na dose de 100 mg/Kg administrado na cavidade peritoneal [10], seis meses após o início do experimento. A necropsia foi realizada com abertura mento-púbica dos animais e foram retirados fragmentos da traquéia (terço proximal, médio e distal) e de cada lobo pulmonar de cada animal para análise microscópica.

### **Análise histopatológica**

Os fragmentos retirados da traquéia e pulmão foram fixados em formol a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas e submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Cortes de 5 $\mu$  foram obtidos e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil). Os cortes da traquéia também foram corados pelo método PAS-Azul de Alcian (Merck, Germany) para identificação do tipo de muco presente (ácido ou básico) e quantificação das células caliciformes.

A análise histopatológica foi cega e realizada por um único observador experiente, utilizando um microscópio óptico convencional (NIKON Labophot, Japão).

Tabela 2 - Parâmetros avaliados e escores dos seguimentos da traquéia (terço proximal, médio e distal) e fragmentos pulmonares.

Parâmetro avaliado		Traquéia	Pulmão
	Ausente	x	x
<b>Infiltrado inflamatório</b>	Leve	x	x
	Moderado	x	x
	Intenso	x	x
<b>Tipo de célula inflamatória</b>	Polimorfonuclear	x	x
	Mononuclear	x	x
<b>Localização da inflamação</b>	Intraalveolar		x
	Intersticial		x
	Peribrônquica		x
<b>Hipertrofia da musculatura</b>	Ausente	x	
	Presente	x	
	Ausente	x	x
<b>Congestão tecidual</b>	Leve	x	x
	Moderada	x	x
	Intensa	x	x
<b>Lesões não neoplásicas da mucosa*</b>	Ausente	x	
	Presente	x	
	Ausente	x	x
<b>Lesões displásicas</b>	Displasia leve	x	x
	Displasia moderada	x	x
	Displasia severa	x	x
<b>Lesões neoplásicas</b>	Ausente	x	x
	Presente	x	x
	Benignas	x	x
<b>Tipo de muco</b>	Malignas	x	x
	Ácido	x	
<b>Número de células caliciformes<sup>#</sup></b>	Básico	x	
		x	
<b>Fibrose intersticial</b>	Ausente		x
	Presente	Focal	x
		Difusa	x
<b>Necrose do parênquima</b>	Ausente		x
	Presente		x
<b>Enfisema pulmonar</b>	Ausente		x
	Presente		x

\*atrofia, hiperplasia, metaplasia. <sup>#</sup> Contadas pelo método de fotogrametria em 6 campos de grande aumento (CGA), 2CGA em cada seguimento traqueal amostrado.

### Mortalidade

Cinco animais morreram ao longo do estudo (um do grupo A, um do grupo C, um do grupo D e dois do grupo E). A causa de morte dos animais do grupo A e C foi

edema agudo pulmonar, complicação esta associada à exposição ao cádmio [11]. Nos animais dos grupos D e E, não foi possível se estabelecer a causa *mortis* após a necrópsia.

### **Análise estatística**

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para a avaliação da normalidade da amostra e o Teste de Levene para avaliação da homogeneidade das variâncias. A verificação das alterações histopatológicas em relação a ingestão de cádmio foi realizada pelo teste de ANOVA *one way* e o Teste de Tukey para comparação entre os grupos. Todos os testes estatísticos foram realizados com o software SSPS 5.1 e ao nível de significância de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

A ingestão média de água por animal por dia no Grupo A foi de 55ml (aproximadamente 22 mg de cádmio), no Grupo B de 57ml (aproximadamente 22,8 mg de cádmio), no Grupo C de 52ml (aproximadamente 20,8 mg de cádmio), no Grupo D de 60ml, no grupo E de 70ml e no Grupo F de 73ml. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à ingestão de cádmio nem a de água ( $p > 0,05$ ).

### **Análise histopatológica da traquéia**

Não foram observadas congestão tecidual, alterações não neoplásicas na mucosa (atrofia, necrose, hiperplasia) nem lesões displásicas nem neoplásicas (benignas ou malignas) nos seguimentos traqueais avaliados em nenhum dos grupos de estudo.

Não houve diferença entre os grupos com relação à presença de inflamação ( $p = 0,654$ ) e de metaplasia epitelial ( $p = 0,105$ ) (Figura 1, Tabela 3).

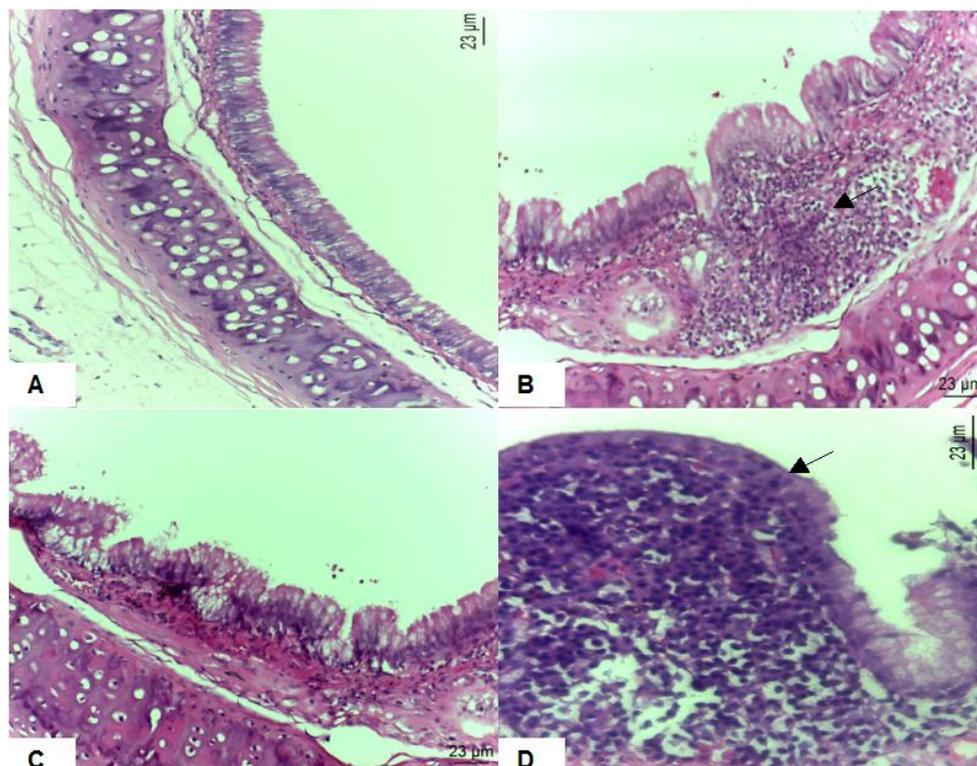


Figura 1 – Fotomicroscopia com demais achados histopatológicos da traquéia. Animais do grupo A. A – Epitélio traqueal sem alterações. B – Inflamação moderada na submucosa (seta). C – Grande número de células caliciformes. D – Metaplasia escamosa do epitélio (seta). Hematoxilina-eosina, aumento de 200x.

Quando se avalia a média de células caliciformes nos grupos expostos ao cádmio (GA, GB e GC), esta foi de 65,83 células/6CGA, enquanto nos grupos não expostos (GD, GE e GF) foi de 85,16 células/6CGA ( $p = 0,012$ ). A média de células caliciformes em cada grupo está descrita na Tabela 1. Houve diferença entre os grupos A e F ( $p=0,018$ ), C e F ( $p=0,026$ ) e D e F ( $p=0,040$ ). Todas células caliciformes dos animais de todos os grupos continham muco neutro (Figura 2).

Tabela 3 - Incidência de inflamação e metaplasia e média de células caliciformes no epitélio traqueal dos grupos estudados (n=85).

Grupos*	Inflamação presente	Metaplasia presente	Média de células caliciformes (±DP)
<b>GA</b>	14/14 (100%) <sup>a</sup>	5/14 (35,71%) <sup>a</sup>	61,30 (±38,07) <sup>a</sup>
<b>GB</b>	14/15 (93,33%) <sup>a</sup>	2/15 (13,33%) <sup>a</sup>	72,28 (±44,29) <sup>a,b</sup>
<b>GC</b>	13/14 (92,85%) <sup>a</sup>	1/14 (7,14%) <sup>a</sup>	73 (±17,04) <sup>a</sup>
<b>GD</b>	14/14 (100%) <sup>a</sup>	2/14 (14,28%) <sup>a</sup>	67,14 (±30,49) <sup>a</sup>
<b>GE</b>	11/13 (84,61%) <sup>a</sup>	1/13 (7,69%) <sup>a</sup>	84,38 (±29,17) <sup>a,b</sup>
<b>GF</b>	13/15 (86,66%) <sup>a</sup>	6/15 (40,0%) <sup>a</sup>	102,66 (±27,57) <sup>b</sup>

\*Grupo A: cádmio em água com pH 7,0; Grupo B: cádmio em água com pH 5,0; Grupo C: cádmio em água com pH 8,0; Grupo D: somente água com pH 5,0; Grupo E: somente água com pH 8,0; Grupo F: somente água com pH 7,0. DP: desvio padrão. Letras minúsculas comparam grupos no mesmo momento e na mesma coluna. Letras minúsculas diferentes:  $p < 0,05$ .

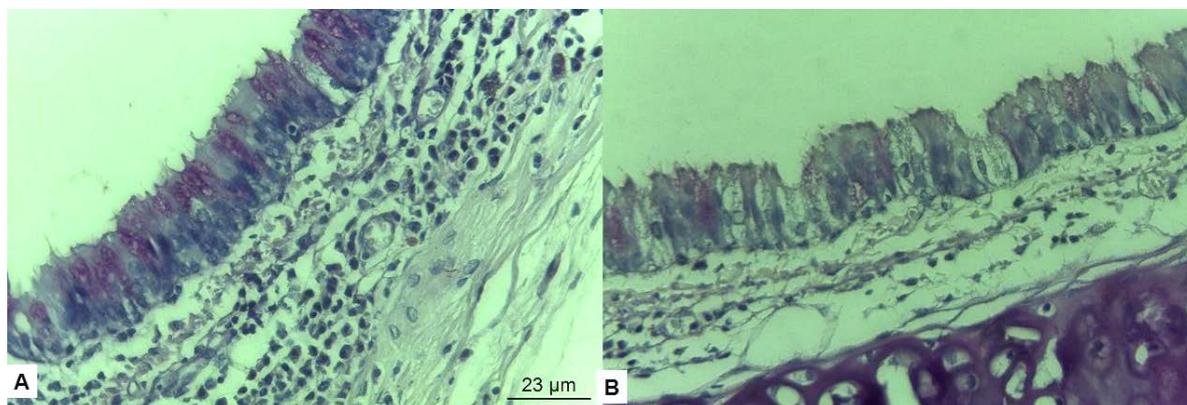


Figura 2 - Fotomicroscopia da traquéia. Notar células caliciformes com citoplasma corado de magenta. A – Número normal de células caliciformes (Animal do grupo A). B – Diminuição do número de células caliciformes (Animal do grupo B). Coloração de PAS/Azul de Alcian, aumento de 400x.

### Análise histopatológica do pulmão

Não foram observadas alterações não neoplásicas na mucosa (atrofia, necrose, fibrose) nem lesões displásicas, nem neoplásicas (benignas ou malignas) nos pulmões dos grupos avaliados.

Todos animais, de todos os grupos, apresentaram congestão leve ou moderada nos pulmões ( $p > 0,05$ ). Assim como, os animais de todos os grupos avaliados apresentaram inflamação no parênquima pulmonar, sem diferença estatística com relação ao grau (leve, moderada ou severa) ( $p = 0,135$ ) (Figura 3).

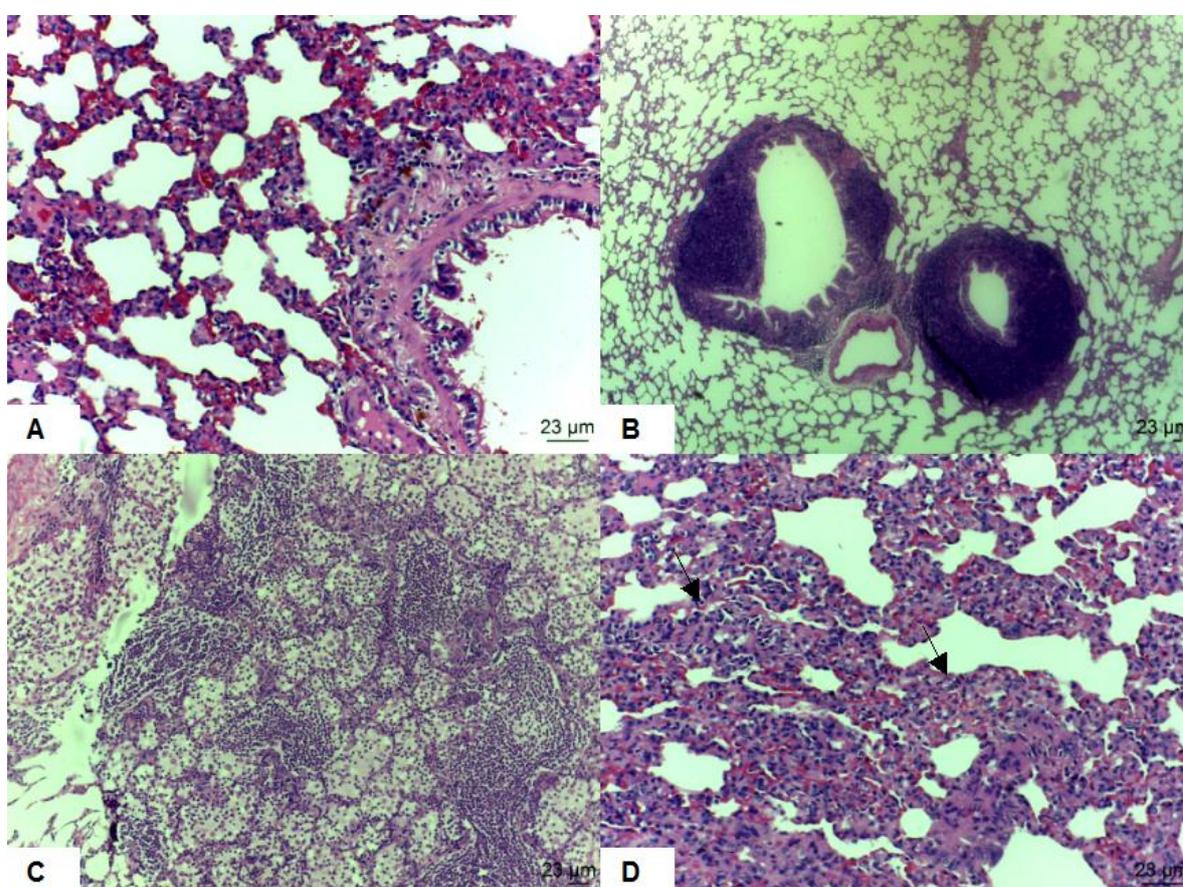


Figura 3 – Fotomicroscopia do pulmão. A – Parênquima pulmonar normal com discreta congestão (animal do grupo D, Hematoxilina-eosina, aumento de 200x). B – Inflamação peribrônquica intensa (setas) (animal do grupo A, Hematoxilina-eosina, aumento de 40x). C – Área de broncopneumonia (animal do grupo B, Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). D – Inflamação intersticial discreta (setas) (animal do grupo F, Hematoxilina-eosina, aumento de 200x).

Houve diferença estatisticamente significativa quando comparado os grupos expostos ao cádmio e os não expostos. Com relação à presença de enfisema pulmonar (Figura 4) e quanto a ser focal ou difuso ( $p < 0,001$ ). Houve predomínio de casos de enfisema pulmonar nos animais expostos ao cádmio, porém os animais do grupo E, composto por animais expostos somente a água com pH básico (pH = 8,0) não diferiram dos animais dos grupos A, B e C ( $p > 0,05$ ). Também, ocorreu um predomínio de enfisema do tipo difuso nos animais expostos ao cádmio ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4).

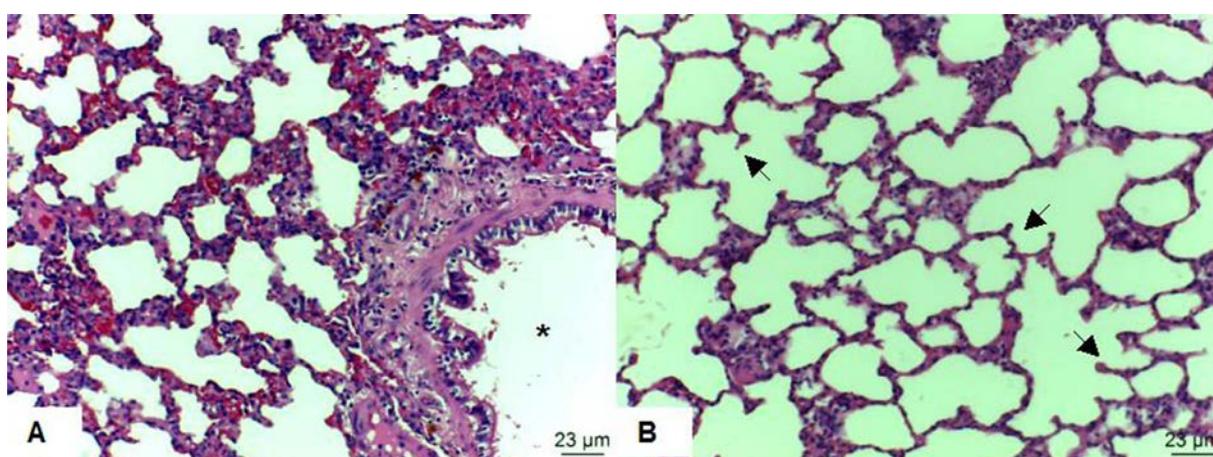


Figura 4 – Fotomicroscopia do pulmão. A – Parênquima pulmonar normal com discreta congestão e área brônquica normal (\*) (Animal do grupo D). B – Enfisema pulmonar. Notar a dilatação dos alvéolos e a retração dos septos formando pequenas bolas na ponta destes (setas) (Animal do grupo A). Hematoxilina-eosina, aumento de 200x.

Tabela 4 – Incidência de enfisema pulmonar nos grupos estudados (n=85).

Grupos*	Presença de enfisema
GA	13/14 (92,85%) <sup>a</sup>
GB	15/15 (100%) <sup>a</sup>
GC	14/14 (100%) <sup>a</sup>
GD	5/14 (35,71%) <sup>b</sup>
GE	8/13 (61,53%) <sup>a,b</sup>
GF	3/15 (20%) <sup>b</sup>

\*Grupo A: cádmio em água com pH 7,0; Grupo B: cádmio em água com pH 5,0; Grupo C: cádmio em água com pH 8,0; Grupo D: somente água com pH 5,0; Grupo E: somente água com pH 8,0; Grupo F:

somente água com pH 7,0. Letras minúsculas comparam grupos no mesmo momento e na mesma coluna. Letras minúsculas diferentes:  $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que o trato respiratório foi alvo da toxicidade do cádmio, mesmo quando este foi ingerido, mostrando que o trato respiratório é alvo do cádmio independente da via de exposição.

O epitélio das vias aéreas serve como uma barreira biológica que protege contra a entrada de substâncias exógenas [6]. Estudos que avaliaram o epitélio brônquico mostraram diminuição do número de células bronquiais não ciliadas e um aumento do número de clones de células em divisão após oito semanas de inalação do cádmio [4]. Além disso, a exposição ao cloreto de cádmio resulta no rompimento da função de barreira do epitélio respiratório em concentrações sub-citotóxicas [6]. Porém, os estudos encontrados na literatura se restringem a avaliação do epitélio brônquico, e nenhum deles avaliou o epitélio traqueal.

O presente estudo mostrou diminuição do número de células calciformes nos grupos que foram expostos ao cádmio via ingestão de água, embora não se tenha demonstrado alterações dependentes do pH da água. Estudos anteriores mostraram alteração do epitélio brônquico frente à exposição inalatória ao cádmio [4,12], mas esta foi a única área das vias respiratórias avaliada na literatura.

Lesões do epitélio traqueal podem favorecer traqueobronquite e até mesmo um quadro pneumônico, por isso a importância da avaliação também do epitélio traqueal. Estudo anterior mostrou que o cádmio tem efeito citotóxico sobre as células do epitélio brônquico [12], este mesmo efeito pode ter ocorrido sobre o epitélio traqueal, justificando a diminuição das células calciformes neste. A diminuição do número de células calciformes pode levar a uma diminuição de produção de muco, um fator importante para proteção do epitélio respiratório frente a agressões [6].

Neste estudo, observou-se formação de enfisema nos grupos que foram expostos ao cádmio via ingestão de água, embora não se tenha demonstrado alterações dependentes do pH da água.

Já foi determinado que a inalação de cádmio pode resultar em enfisema [5]. A exposição de fibroblastos de pulmão de rato ao cádmio aumenta os níveis de tióis eliminadores de metal, por exemplo, da metalotioneína (MT) e glutathione, e da cadeia pesada de  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase, uma enzima chave para a biossíntese

de glutathiona, com concomitante regulação negativa de lisil-oxidase, uma enzima dependente de cobre para a ligação cruzada do colágeno e elastina na matriz extracelular. A diminuição da regulação da lisil-oxidase em células tratadas com cádmio foi acompanhada de perto pela supressão da síntese de colágeno, um componente principal para a estrutura da matriz extracelular pulmonar. Com quatro a seis semanas de instilação de cloreto de cádmio, em um modelo animal, houve diminuição de lisil-oxidase e da expressão do colágeno, e aumento de MT e glutathiona. Após seis semanas houve formação de enfisema [5].

Em outro estudo, a exposição inalatória ao cádmio por 20 semanas contínuas mostrou um aumento significativo de secreção de metaloproteinase (MMP) -2 (3,5 vezes mais que no tecido normal) e aumento da expressão da MT, principalmente as isoformas MT, MT-1A e MT-2A, que são características de células cancerígenas [13], mas que também podem contribuir para formação de enfisema. Os dados do presente estudo sugerem que as alterações enzimáticas e de expressão protéica que ocorrem na exposição ao cádmio via inalatória, também podem ocorrer na exposição via ingestão, o que acarreta na formação de enfisema pulmonar.

Neste estudo, não foi observado desenvolvimento de lesões displásicas nem de neoplasia pulmonar, embora tenha sido realizada exposição crônica a esse metal pesado e em alta concentração, apesar de estudos anteriores que também avaliaram a exposição crônica do cádmio por ingestão terem mostrado desenvolvimento de lesões displásicas no estômago [14] e na próstata [15] na exposição crônica por ingestão ao cádmio.

Desde de 1950, há descrição de cânceres de pulmão, bexiga urinária, rim, fígado, vesícula biliar e mama devido à exposição crônica ao cádmio, além de alterações não neoplásicas que também podem ocorrer nestes órgãos [16]. Recentemente, um estudo mostrou que os níveis de cádmio no sangue estão associados ao estadio do câncer de pulmão, ou seja, quanto maior foi o estadio do câncer, maior foi o nível de cádmio sanguíneo [2]. A ausência de formação de neoplasia no presente estudo pode ter ocorrido talvez porque apenas cerca de 5% da dosagem de cádmio é absorvida pelo trato gastrointestinal, enquanto que a absorção pulmonar é, cerca de 90% da dose inalada [17] e para o desenvolvimento de neoplasia pulmonar seja necessária uma carga maior deste metal pesado.

O pH da água não influenciou no aparecimento de alterações histopatológicas na traquéia nem no pulmão neste estudo, embora estudos anteriores tenham

demonstrado a influencia do pH na gênese de lesões displásicas na próstata [15] e aterosclerose [18]. Estes achados mostram que a influencia do pH da água de beber na intoxicação por cádmio é órgão dependente.

Há necessidade de mais estudos com exposição por tempo mais prolongado e por outras vias de contaminação, como a inalatória, para que se tenha uma melhor avaliação das lesões provocadas pela exposição ao cádmio sobre o epitélio traqueal. Assim como, são necessários mais estudos para avaliação da possível influência do pH da água sobre a toxicidade do cádmio sobre o epitélio traqueal e do parênquima pulmonar.

## **CONCLUSÃO**

A exposição crônica por via oral ao cádmio, independente do pH da água, leva uma diminuição no número de células calciformes da traquéia e pode causar enfisema pulmonar.

## **AGRADECIMENTOS**

A Edvaldo Mamede dos Santos, pelo preparo das soluções. Lyara Meira Marinho Queiroz foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq).

## **REFERÊNCIAS**

1. Terra Filho M, Kitamura S: Occupational lung cancer. J Bras Pneumol 32 (Supl 1): S60-S68, 2006.
2. Demir N, Enon S, Turksoy VA, Kayaalti Z, Kaya S, Cangir AK, Soylemezoglu T, Savas I: Association of cadmium but not arsenic levels in lung cancer tumor tissue with smoking, histopathological type and stage. Asian Pac J Cancer Prev 15(7): 2965-2970, 2014.
3. WHO. World Health Organization: Environmental Health Criteria, Cadmium. 1<sup>st</sup> ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, vol. 134, 1992.
4. Fortoul TI, Saldivar LO, Espejel-Maya G, Bazarro PN, Mussaligalante P, Avila-Casado MC, Colin-Barenque L, Avila-Costa MR: Inhalation of cadmium, lead or its mixture. Effects on the bronchiolar structure and its relation with metal tissue concentrations. Environ Toxicol Pharmacol 19: 329-334, 2005.

5. Zhao Y, Chen L, Gao S, Toselli P, Stone P, Li W: The critical role of the cellular thiol homeostasis in cadmium perturbation of the lung extracellular matrix. *Toxicology* 267(1-3): 60, 2010.
6. Forti E, Bulgheroni A, Cetin Y, Hartung T, Jennings P, Pfaller W, Prieto P: Characterisation of cadmium chloride induced molecular and functional alterations in airway epithelial cells. *Cell Physiol Biochem* 25(1): 159-168, 2010. doi: 10.1159/000272060.
7. Olsson IM, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S, Oskarsso NA: Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects. *Environ Health Perspect* 110: 1185-1190, 2002.
8. Cunha, K.P.V, Nascimento, C.W.A, Pimentel, R.M.M, Accioly, A.M.A., Silva, A.J., 2008. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. *R. Bras. Ci. Solo* 32, 1319-1328
9. Motta ACF, Migliari DA, Gioso MA, Komesu MC, Sala MA, Lopes RA: The carcinogenic potential of cadmium in the palatal and gingival epithelium of rats. A morphologic and morphometric analysis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 41:183-188, 2004.
10. Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS: Course handling of laboratory animals. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. 2005. [cited 2014 Nov 10]. Available from: [http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha\\_manipulacao.pdf](http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf).
11. Järup L, Akesson A: Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238: 201-208, 2009. doi:10.1016/j.taap.2009.04.020.
12. Chen DJ, Xu YM, Du JY, Huang DY, Lau AT: Cadmium induces cytotoxicity in human bronchial epithelial cells through upregulation of eIF5A1 and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun.* 445(1):95-99, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.146.
13. Person RJ, Tokar EJ, Xu Y, Orihuela R, Ngalame NN, Waalkes MP: Chronic cadmium exposure in vitro induces cancer cell characteristics in human lung cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 273(2): 281-288, 2013.
14. Nai GA, Gonçalves Filho MA, Estrella MPS, Teixeira LDS: Study of the influence of the ph of water in the initiation of digestive tract injury in cadmium poisoning in rats. *Toxicology Reports* 2: 1033-1038, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.07.012>
15. Nai GA, Golghetto GM, Estrella MPS, Teixeira LDS, Moura FC, Bremer Neto H, Parizi JLS: Influence of pH of water in the genesis of cancer in cadmium poisoning: an experimental study in rats. *Histology and Histopathology* 30: 61-67, 2015.
16. Waalkes MP: Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 533:107-120, 2003.

17. Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA: The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol.* 1: 22, 2006. doi: 10.1186/1745-6673-1-22
18. Nai GA, Golghetto JJ, Estrella MPS, Alves JA, Garcia LA. pH Dependence of Cadmium-Contaminated Drinking Water on the Development of Cardiovascular Injury in Wistar Rats. *Biol Trace Elem Res* 2015; May;165(1):81-85. doi: 10.1007/s12011-014-0216-0

**ANEXO**

**APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)**



Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq)  
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

### PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado “**LESÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO CÁDMIO INDUZIDAS, HÁ INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA NA SUA GÊNESE? UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**”, cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) e na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número nº 2459 tendo como pesquisador responsável o (a) Profº (a) GISELE ALBORGHETTI NAI e as discentes FERNANDA FREIRE MARIN, LYARA MEIRA MARINHO QUEIROZ, MARIANI PAULINO SORIANO ESTRELLA, foi avaliado e **APROVADO** nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente/SP, 17 de Abril de 2015.

  
Profº Drº Jair Rodrigues Garcia Jr.  
Coordenador Científico da CCPq

  
Prof. Ms. Adriana Palco de Brito  
Coordenadora da CEUA-UNOESTE