



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DO CÂNCER POR INTOXICAÇÃO  
POR CÁDMIO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**GISELE MARIA SORIA GOLGHETTO**

**INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DO CÂNCER POR INTOXICAÇÃO  
POR CÁDMIO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**GISELE MARIA SORIA GOLGHETTO**

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: Prof. Dra. Gisele Alborghetti Nai

636.086 59 Golghetto, Gisele Maria Soria.  
G625i Influência do ph da água na gênese do câncer  
por intoxicação por Cádmió: um estudo  
experimental em ratos / Gisele Maria Soria  
Golghetto. – Presidente Prudente, 2013.  
55 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,  
Presidente Prudente, SP, 2013.

Bibliografia.

Orientador:Gisele Alborghetti Nai.

1. Intoxicação por Cádmió. 2. Intoxicação por  
água. 3. Neoplasias. 4. Acidificação. 5. Próstata. 6.  
Pâncreas. I. Título.

**GISELE MARIA SORIA GOLGHETTO**

**INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DO CÂNCER POR INTOXICAÇÃO  
POR CÁDMIO: 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, 17 de dezembro de 2013.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

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

---

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho  
Faculdade de Ciência e Tecnologia – FCT/UNESP  
Presidente Prudente-SP

---

Prof. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico à realização da presente dissertação primeiramente à Deus, força maior que nos conduz ao caminho do sucesso.*

*Á toda minha família em especial ao esposo Jair e aos meus filhos Felipe e Lucas por entenderem as minhas ausências e por sempre me apoiarem em todas as minhas conquistas profissionais.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Esta Dissertação de Mestrado só foi possível ser realizada graças à amabilidade e disponibilidade de várias pessoas, as quais manifesto os meus sinceros e reconhecidos agradecimentos.*

*Meus agradecimentos especiais à Professora Doutora Gisele Alborghetti Nai, a quem devo a orientação da mesma, por sempre me atender prontamente, com profissionalismo e paciência, esclarecendo todas as dúvidas surgidas durante à sua realização, sempre se colocando à minha inteira disposição.*

*Esteja certa que o seu saber e profissionalismo foram imprescindíveis para que conseguisse finalizar essa dissertação e com certeza espelharão todo o meu desempenho profissional e pessoal.*

*O meu muito obrigada por poder desfrutar dos seus conhecimentos.*

*"O êxito na vida não se mede pelo caminho que  
você conquistou, mas sim pelas dificuldades  
que superou no caminho"*

**Abraham Lincoln**

## RESUMO

### INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DO CÂNCER POR INTOXICAÇÃO POR CÁDMIO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

**Introdução:** O cádmio é um metal pesado, muito utilizado na indústria. Ele poder originar o aparecimento de tumores em múltiplos órgãos. **Objetivo:** Avaliar o efeito do pH da água ingerida na gênese do câncer provocado por cádmio. **Material e métodos:** Utilizou-se 98 ratos Wistar, divididos em 7 grupos: A – 15 ratos que receberam solução de cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$  - 400mg/L) na água de beber com pH neutro (pH 7,0); B – 15 ratos que receberam  $\text{CdCl}_2$  (400mg/L) na água de beber com pH ácido (pH 5,0); C – 15 ratos, que receberam  $\text{CdCl}_2$  (400mg/L) na água de beber com pH básico (pH 8,0). D – 15 ratos que receberam água com pH ácido (pH 5,0); E – 15 ratos que receberam água com pH básico (pH 8,0); F – 15 ratos, que receberam água com pH neutro (pH 7,0); G – 8 ratos que receberam ciclofosfamida em dose única (50mg/kg) no primeiro dia do experimento (controle positivo do teste do micronúcleo). Ratos dos grupos A-F foram eutanasiados após 6 meses e os do grupo G, 24 horas após o início do experimento. Retirou-se fígado, rim, pâncreas, próstata, vesícula seminal, testículos e medula óssea. **Resultados:** Não foram observadas lesões pré-neoplásicas nem neoplásicas no fígado, rim, pâncreas, vesícula seminal e testículos em todos os grupos. Somente animais expostos ao cádmio apresentaram neoplasia intraepitelial prostática de grau um, sendo mais prevalente no grupo B ( $p < 0,05$ ), porém não houve aumento de micronúcleos ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** O pH ácido contribuiu para formação de lesões pré-neoplásicas na próstata dos animais expostos ao cádmio.

**Palavras-chave:** Cádmio. Acidificação. Neoplasias. Próstata. Pâncreas.

## ABSTRACT

### INFLUENCE OF pH OF WATER IN THE GENESIS OF CANCER IN CADMIUM POISONING: AN EXPERIMENTAL STUDY IN RATS

**Introduction:** Cadmium is a heavy metal, widely used in industry. It may give rise to the appearance of tumors in multiple organs. **Objective:** To evaluate the effect of the pH of the water in the genesis of cancer caused by cadmium. **Material and methods:** We used 98 Wistar rats were divided into seven groups: A - 15 rats that received solution of cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$  - 400mg / L) in drinking water with a neutral pH (pH 7.0), B - 15 rats that received  $\text{CdCl}_2$  (400 mg / L) in the drinking water at acidic pH (pH 5.0), C - 15 rats that received  $\text{CdCl}_2$  (400 mg / L) in drinking water with basic pH (pH 8.0), D - 15 rats that received water at acidic pH (pH 5.0), E - 15 rats that received water with basic pH (pH 8.0), F - 15 rats that received water at neutral pH (pH 7.0 ); G - 8 rats that received cyclophosphamide as a single dose (50mg/kg) on the first day of the experiment (positive control for micronucleus test). Rats of groups A-F were euthanized after 6 months and the group G, 24 hours after the start of the experiment. We removed liver, kidney, pancreas, prostate, seminal vesicles, testes, and bone marrow. **Results:** There were no pre-neoplastic or neoplastic in liver, kidney, pancreas, seminal vesicles and testes in all groups. Only animals exposed to cadmium showed prostatic intraepithelial neoplasia grade one, being more prevalent in group B ( $p < 0.05$ ), although there was no increase in micronuclei ( $p > 0.05$ ). **Conclusion:** The acidic pH contributed to the formation of precancerous lesions in the prostate gland of animals exposed to cadmium.

**Key words:** Cadmium. Acidification. Neoplasms. Prostate. Pancreas.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1 Câncer.....	11
1.2 Cádmió .....	13
1.3 Cádmió e Câncer .....	17
1.4 Regulação do pH no Organismo .....	17
1.5 Influência do pH nos Tecidos Normais.....	19
1.6 Água Potável.....	20
1.7 pH e Câncer .....	22
REFERÊNCIAS.....	24
2 ARTIGO.....	26
ANEXOS .....	41
Anexo 1 - Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). .....	41
Anexo 2 – Fotomicroscopia da próstata. ....	42
Anexo 3 – Fotomicroscopia do pâncreas sem alterações em todos os grupos (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x).....	43
Anexo 4 – Fotomicroscopia do testículo sem alterações em todos os grupos (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x).....	44
Anexo 5 – Fotomicroscopia do fígado mostrando ausência de neoplasia em todos os grupos (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x). ....	45
Anexo 6 – Fotomicroscopia do rim mostrando ausência de neoplasia em todos os grupos (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x). ....	49
Anexo 7 – Normas de publicação da revista científica a qual o artigo será submetido.....	50

## 1 INTRODUÇÃO

As causas do câncer são variadas, podendo ser endógenas ou exógenas, estando, no entanto, inter-relacionadas. As causas exógenas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas endógenas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas a capacidade do organismo de se defender das agressões externas (RIBEIRO, 2003).

De todos os casos de câncer, 80 a 90% estão associados a fatores ambientais, alguns deles são bem conhecidos como cigarro e câncer de pulmão, exposição excessiva ao sol e câncer de pele, outros estão sendo avaliados como alguns componentes alimentares e outros ainda são completamente desconhecidos (RIBEIRO, 2003).

É crescente a preocupação com o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente ou devido a hábitos e vícios, como elitismo e tabagismo, devido à possibilidade de que a ação mutagênica venha a manifestar-se somente após muitos anos, no aumento da incidência de cânceres ou teratogênese, caracterizando os chamados efeitos cumulativos (MARTINS, 2002).

Existem evidências que apontam no sentido do cádmio poder originar o aparecimento de tumores em múltiplos órgãos, incluindo pulmão, próstata, rim, testículo, fígado e pâncreas (NAVARRO, 2007), tendo este metal sido classificado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), como agente cancerígeno para os humanos (Grupo 1) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993).

A medição do pH no tecido tem mostrado que o microambiente em tumores é geralmente mais ácida do que nos tecidos normais, com exceção de alguns tumores cerebrais que podem ser mais alcalinos do que o cérebro normal. Hipóxia e alteração do pH representam dois fatores que podem ser explorados terapeuticamente para destruir tais células (TANNOCK; ROTIN, 1989).

## 1.1 Câncer

Conhecido há muitos séculos, o câncer foi amplamente considerado como uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos (BRASIL. Instituto Nacional do Câncer, 2011).

Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, pode-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média rendas (BRASIL. Instituto Nacional do Câncer, 2011).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos (BRASIL. Instituto Nacional do Câncer, 2011).

É esperado um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa que o câncer da pele do tipo não melanoma (134 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (Figuras A e B) (BRASIL. Instituto Nacional do Câncer, 2011).

Figura A – Estimativas para o ano 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo o sexo e segundo localização primária

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	17,90	4.520	21,85	10.110	10,08	3.060	13,31
Colón e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Cavidade Oral	9.990	10,41	2.760	13,34	4.180	4,18	1.130	4,92
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6.210	6,49	1.900	9,28	2.690	2,71	880	3,72
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Linfoma não Hodgkin	5.190	5,40	1.560	7,66	4.450	4,44	1.560	6,85
Glândula Tireoide	-	-	-	-	10.590	10,59	3.490	14,97
Sistema Nervoso Central	4.820	5,02	1.190	5,82	4.450	4,46	1.200	5,23
Leucemias	4.570	4,76	1.180	5,81	3.940	3,94	1.180	5,02
Corpo do Útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43.120	44,80	11.100	53,33	38.720	38,61	10.320	44,50
<b>Subtotal</b>	<b>195.190</b>	<b>202,85</b>	<b>51.780</b>	<b>248,60</b>	<b>189.150</b>	<b>188,58</b>	<b>59.280</b>	<b>254,86</b>
Pele não Melanoma	62.680	65,17	14.620	70,39	71.490	71,30	15.900	68,36
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>257.870</b>	<b>267,99</b>	<b>66.400</b>	<b>318,79</b>	<b>260.640</b>	<b>259,86</b>	<b>75.180</b>	<b>323,22</b>

\*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: (BRASIL. Instituto Nacional do Câncer, 2011).

Figura B – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Colón e Reto	14.180	7,3%			Colón e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

\*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: (BRASIL. Instituto Nacional do Câncer, 2011).

A distribuição dos casos novos de câncer segundo o tipo de tumor e segundo as cinco regiões do país mostra-se heterogênea entre Estados e capitais do país (Figura A), o que fica em evidência ao se observar a representação espacial das diferentes taxas brutas de incidência. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste, as menores. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (BRASIL. Instituto Nacional do Câncer, 2011).

A maioria dos pesquisadores reconhece que o câncer é o resultado da ação de fatores externos ambientais atuando conjuntamente com a suscetibilidade individual, com os primeiros desempenhando papel central na causa dos cânceres, e os fatores genéticos um papel secundário (TERRA FILHO; KITAMURA, 2006).

Os fatores ambientais relevantes podem ser divididos em quatro grupos: 1. relacionados aos hábitos e condições de vida (tabagismo e dieta); 2. relacionados ao ambiente de trabalho (agentes, misturas de agentes químicos e radiações); 3. relacionados ao meio ambiente (contaminação da terra, ar, água e alimentos, exposição ao asbesto, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, erionita e radônio); 4. e relacionados a intervenção terapêutica (medicação, radiação) (TERRA FILHO; KITAMURA, 2006).

## **1.2 Cádmio**

O cádmio (Cd) é um metal pesado, de número atômico 48 e peso molecular de 112,411, que foi descoberto por volta de 1815 em minérios contendo carbonato e zinco. O cádmio é um dos mais abundantes elementos não essenciais encontrados no ambiente, sendo muito utilizado em aplicações industriais. Além disso, é um dos componentes da fumaça do cigarro, e conseqüentemente pode contaminar as populações que estão em contato com este metal pesado (LUCHESE, 2007).

O cádmio é comercialmente obtido como um co-produto industrial das atividades de exploração mineira e fundição do zinco e do chumbo. Os componentes com cádmio são utilizados como estabilizadores em produtos como os polímeros de cloreto de vinila (PVC), como pigmentos e, mais usualmente, em baterias e pilhas níquel-cádmio recarregáveis. O cádmio metálico é muito utilizado como um agente anticorrosão e encontra-se também presente como contaminante nos fertilizantes à base de fosfato (LOPES, 2009).

As estimativas indicam que, anualmente, são libertadas para o ambiente cerca de 30 000 toneladas de cádmio, sendo que 4.000 a 13.000 toneladas são de origem antropogênica, as quais incluem fumos, poeiras e restos das fundições de minério, incineração de produtos constituídos por este elemento e queima de combustíveis fósseis. Os fertilizantes e respectivas lamas agrícolas, o tabaco, as águas de resíduos municipais e descargas de esgotos são outra importante fonte deste elemento (LOPES, 2009).

Para além das fontes antropogénicas, o cádmio, pode também ocorrer naturalmente nos sistemas aquáticos onde surge em concentrações bastante variáveis de acordo com a área geográfica. Apesar dos peixes serem uma importante via de contaminação humana com este elemento, as plantas apresentam um poder de absorção superior. Assim, a contaminação dos solos com cádmio é especialmente relevante uma vez que pode representar uma importante porta de entrada deste elemento na cadeia alimentar. Os fertilizantes fosfatados e as lamas provenientes do tratamento de águas residuais utilizadas na atividade agrícola, o lixo que é descarregado nas terras de cultivo, a deposição atmosférica e o cádmio presente nas águas de irrigação constituem as principais fontes de cádmio no solo. Existem espécies como o girassol, a soja, os amendoins e o tabaco que captam e acumulam cádmio em concentrações muito elevadas, em muitos casos superiores às que originam efeitos tóxicos no Homem e noutros animais. A elevada capacidade de absorção do cádmio pela planta tabaco faz com que o fumo constitua uma das principais fontes de exposição a este elemento (LOPES, 2009).

O cádmio entra no organismo, principalmente, por inalação e ingestão. Os pulmões absorvem de 10 a 40% do cádmio inalado, enquanto que o cádmio ingerido através dos alimentos e da água é pouco absorvido pelo trato gastrointestinal (5-7%), sendo a maior parte eliminado pelas fezes. Porém, deficiências de cálcio, ferro e proteínas aumentam a taxa de absorção do cádmio ingerido, como é o caso da população brasileira que tem hábitos alimentares comprometidos e fumantes (boa parte da população) que podem absorver quantidades comparáveis à ingestão diária. O grau de absorção gastrointestinal é dependente da forma química, da dose ingerida de cádmio e de características individuais, tais como género e idade (SOUZA et al., 2010).

Quando a exposição é pequena o cádmio fica retido unido à metalotionina (MT) na mucosa intestinal, ocorrendo a eliminação através da descamação desta

mucosa que se verifica continuamente. Quando os níveis de exposição são mais elevados ultrapassa-se a capacidade da MT para formar complexo com o cádmio, pelo que o metal atravessa a mucosa e passa para a circulação, sendo distribuído principalmente para fígado e rim (LOPES, 2009).

Quando a exposição é reduzida e prolongada no tempo (situação que se verifica na exposição por ingestão), o cádmio acumula-se majoritariamente nos rins (LOPES, 2009).

No homem, o cádmio possui um tempo de meia-vida bastante longo, tendo este valor nos rins e fígado sido estimado em 6 a 38 anos e 4 a 19 anos, respectivamente (LUCHESE, 2007; LOPES, 2009).

Uma vez que o cádmio está presente na maior parte dos alimentos, em concentrações que são muito variáveis (Tabela A), pode dizer-se que os níveis da sua ingestão vão depender não só das condições sob as quais os alimentos são produzidos, mas também dos diferentes hábitos alimentares que as populações apresentam. A alimentação é a principal via de exposição dos seres humanos a este elemento (LOPES, 2009).

Tabela A - Concentração de cádmio presente em alguns alimentos

<b>Alimento</b>	<b>Gama de concentração</b>
Leite	< 10 ppb
Ovos	< 10 ppb
Carne de vaca	< 10 ppb
Pescada	4,1-14,3 ppb (pf)
Salmonete	7,6-28,9 ppb (pf)
Mexilhão	0,13 - 0,14 (mg/kg pf)
Ameijoia	0,14 (mg/kg pf)
Ostra	0,4-40 ppm (ps)
Vieira	3,2-66 ppm (pf)
Camarão	<0,1-2,2 (mg/kg pf)
Sapateira	1 - 13(mg/Kg pf)
Navalheira	0,024-0,504 (mg/kg pf)
Fruta	<1-100 ppb (pf)
Espinafre	0,03-0,31 ppm (pf)
Alface	<0,001-24 ppm (pf)
Couve	2-150 ppb (pf)
Batata	5-180 ppb (pf)
Cenoura	1-220 ppb (pf))
Cebola	<2-90 ppb (pf)
Tomate	<1-80 ppb (pf)
Feijão	20-80 ppb (pf)
Arroz	<1-310 ppb (pf)
Trigo	<5-230 ppb (pf)

**ppm:** partes por milhão; **ppb:** partes por bilião; **pf:** peso fresco; **ps:** peso seco

Fonte: (LOPES, 2009)

Considerando então que a maioria dos alimentos contém cádmio, atribui-se aproximadamente dois terços do valor da ingestão diária de cádmio aos produtos de origem vegetal e um terço aos produtos de origem animal (peixe, moluscos e crustáceos, principalmente) (LOPES, 2009).

Atualmente, as ingestões admissíveis de cádmio situam-se em 7,0 µg/kg peso corporal por semana (LOPES, 2009).

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. O efeito negativo da calagem na fitodisponibilidade dos metais é devido, principalmente, ao aumento da capacidade de troca catiônica e à formação de hidróxidos e carbonatos de baixa solubilidade, como: por exemplo:  $\text{Cd}(\text{OH})_2$   $K_{ps} = 2,5 \times 10^{-14}$  (CUNHA et al., 2008).

### 1.3 Cádmio e Câncer

Estudos *in vitro* têm demonstrado o potencial genotóxico do cádmio. Utilizando-se cloreto de cádmio em doses acima de 0.1 µg/ml, se observam alterações cromossômicas em cultivo de células de ovário de hamster. Em outros estudos com formas aniônicas do cádmio (nitrato de cádmio ou sulfato de cádmio) também foram observadas as mesmas alterações (NAVARRO, 2007).

O mecanismo celular e molecular implicado na carcinogenicidade do cádmio inclui ativação de proto-oncogenes, inativação dos genes supressores de tumor, rompimento da adesão celular e inibição do reparo de DNA (WAALKES, 2003).

O cádmio pode unir-se a bases da molécula de DNA produzindo modificação química e assim danificando esta molécula. Além disso, apresenta grande afinidade pelos grupos sulfidril, o que poderia interferir nas proteínas do fuso (NAVARRO, 2007).

O papel dos radicais livres na genotoxicidade associada ao cádmio tem se confirmado. Tem-se sugerido também que os radicais formados pelo complexo metalotioneína-cádmio poderiam ser responsáveis pelo dano ao DNA (NAVARRO, 2007).

O cádmio parece não ter ação cancerígena sobre a mucosa bucal nas exposições crônicas, promovendo apenas diminuição da espessura deste epitélio (MOTTA et al., 2004).

### 1.4 Regulação do pH no Organismo

Existem três sistemas primários reguladores da concentração de íon hidrogênio nos líquidos corporais que evitam a acidose ou alcalose: os sistemas químicos de tampões ácido-base dos líquidos corporais, que imediatamente se combinam com o ácido ou com a base evitando alterações excessivas na concentração de íon hidrogênio; o centro respiratório, que regula a remoção de gás carbônico - CO<sub>2</sub> (e, portanto, de ácido carbônico - H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) do líquido extracelular; e os rins, que podem excretar urina ácida ou alcalina, reajustando assim a concentração de íon hidrogênio no líquido extracelular de volta ao normal durante a acidose ou alcalose (GUYTON; HALL, 2006).

Quando ocorre uma alteração na concentração de íon hidrogênio, o sistema tampões dos líquidos corporais reage em fração de segundo para minimizar estas mudanças. Os sistemas tampões não eliminam os íons hidrogênio do organismo nem os adiciona, somente os mantêm estacionados até que o equilíbrio possa ser restabelecido. A segunda linha de defesa, o sistema respiratório, também atua em poucos minutos para eliminar o  $\text{CO}_2$  e, conseqüentemente, o  $\text{H}_2\text{CO}_3$  do organismo. Estas primeiras duas linhas de defesa impedem que a concentração de íon hidrogênio se altere excessivamente até que a terceira linha de defesa, a mais lenta – os rins -, possa eliminar o excesso de ácido ou base do organismo. Embora os rins sejam relativamente lentos para responder, comparado com as outras defesas eles são, no decurso de um período de horas ou vários dias, sem dúvida o mais potente dos sistemas reguladores ácido-básico (GUYTON; HALL, 2006).

Todos esses sistemas tampões funcionam juntos em razão de os íons hidrogênio serem comuns nas reações de todos os sistemas. Portanto, sempre que há uma mudança na concentração de íon hidrogênio no líquido extracelular, o equilíbrio de todo o sistema tampão muda ao mesmo tempo. Este fenômeno é chamado de princípio isoídrico (GUYTON; HALL, 2006).

A primeira linha de defesa inclui o hidrogênio e o bicarbonato. Sem o tamponamento, a produção e a ingestão diária de ácidos provocariam grandes mudanças na concentração de íon hidrogênio no líquido corporal, sendo o sistema tampão bicarbonato o mais importante no líquido extracelular. O resultado, em consequência disso, é a tendência a diminuir os níveis de  $\text{CO}_2$  no sangue; entretanto, a diminuição de  $\text{CO}_2$  no sangue inibe a respiração e diminui a velocidade de expiração do  $\text{CO}_2$ . O aumento de bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ ) que ocorre no sangue é compensado por sua excreção renal aumentada (GUYTON; HALL, 2006).

Uma segunda linha de defesa contra alterações ácido-básicas é o controle da concentração do  $\text{CO}_2$  do líquido extracelular pelos pulmões. Um aumento da pressão parcial de gás carbônico ( $\text{PCO}_2$ ) do líquido extracelular diminui o pH, enquanto a diminuição na  $\text{PCO}_2$  eleva o pH. Portanto, ajustando-se a  $\text{PCO}_2$  para mais ou para menos, os pulmões podem efetivamente regular a concentração de íon hidrogênio do líquido extracelular. Um aumento na ventilação elimina o  $\text{CO}_2$  do líquido extracelular, que, por ação das massas, reduz a concentração de íon hidrogênio. Inversamente, a ventilação diminuída aumenta o  $\text{CO}_2$  e, desse modo,

também a concentração de íon hidrogênio do líquido extracelular (GUYTON; HALL, 2006).

O mecanismo pelo qual os rins excretam urina ácida ou básica é o seguinte: grandes quantidades de íons bicarbonato são filtrados continuamente para os túbulos, e, sendo excretados para a urina, isto remove a base do sangue. Por outro lado, grandes quantidades de íons hidrogênio também são secretadas para a luz tubular pelas células epiteliais tubulares, desse modo removendo ácido do sangue. Caso mais íons hidrogênio sejam excretados do que íons bicarbonato filtrados, haverá uma perda efetiva de ácido dos líquidos extracelulares. Inversamente, se mais bicarbonato é filtrado do que hidrogênio é secretado, haverá uma perda efetiva de base (GUYTON; HALL, 2006).

Um tampão é uma solução que resiste a mudanças de pH quando se adicionam pequenas quantidades de ácido ou base (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

### **1.5 Influência do pH nos Tecidos Normais**

As mudanças no pH afetam profundamente a ionização das proteínas e, conseqüentemente, a atividade de diversas enzimas. A redução do pH diminui o débito cardíaco e a pressão do sangue arterial, enquanto o aumento no pH leva a constrição de pequenas artérias e pode desencadear arritmias. Mudanças no pH associadas à pressão parcial do dióxido de carbono ( $p\text{CO}_2$ ), afetam a oxigenação dos tecidos pela modificação da forma da curva de saturação de hemoglobina, influenciando, desta maneira, a facilidade com que a hemoglobina libera seu oxigênio para os tecidos (BAYNES; DOMINICZAK, 2007).

Tanto a acidose quanto a alcalose apresentam uma série de efeitos indesejáveis. Efeitos deletérios da acidose são: sobrecarga respiratória, anorexia, náuseas, vômitos, alterações neurológicas, hiperpotassemia, diminuição da responsividade às catecolaminas, depressão da contratilidade miocárdica, vasoconstrição renal, oligúria e resistência a ação da Insulina. Já os efeitos deletérios da alcalose incluem: hipocalcemia por diminuição do cálcio ionizável, hipopotassemia com aumento da perda urinária de potássio, efeito da alteração da relação potássio intracelular/ potássio extracelular no miocárdio com suscetibilidade a arritmias, aumento da afinidade da hemoglobina (Hb) pelo oxigênio ( $\text{O}_2$ ) (desvio da

curva de dissociação para a esquerda), com hipóxia tecidual e acidose paradoxal do líquor com piora das condições neurológicas (ÉVORA; GARCIA, 2008).

A acidose metabólica pode resultar de várias causas gerais: (1) incapacidade dos rins de excretar os ácidos metabólicos normalmente formados pelo organismo, (2) formação de quantidades excessivas de ácidos metabólicos no organismo, (3) adição de ácidos metabólicos ao corpo, pela ingestão, ou infusão, de ácidos, e (4) perda de base dos líquidos corporais, que tem o mesmo efeito que adicionar ácido aos líquidos corporais. Algumas condições específicas que provocam acidose metabólica: acidose tubular renal, diarreia, vômito do conteúdo intestinal, diabetes melito, ingestão de ácidos e insuficiência renal crônica (GUYTON; HALL, 2006).

Na acidose metabólica, as compensações primárias incluem aumento da frequência de ventilação, que reduz a  $p\text{CO}_2$ , e compensação renal, que, através da adição de novo bicarbonato ao líquido extracelular, ajuda a minimizar a queda inicial na concentração extracelular de  $\text{HCO}$  (GUYTON; HALL, 2006).

A retenção excessiva de bicarbonato ou a perda de íons hidrogênio do organismo resultam em alcalose metabólica. A alcalose metabólica não é tão comum como a acidose metabólica. Algumas das causas da alcalose metabólica são: alcalose provocada pela administração de diuréticos (exceto os Inibidores da Anidrase Carbônica), excesso de aldosterona, vômito de conteúdo gástrico e ingestão de substâncias alcalinas (GUYTON; HALL, 2006).

Na alcalose metabólica, as compensações primárias consistem na diminuição da ventilação, que eleva a  $p\text{CO}_2$ , e no aumento da excreção renal de íons bicarbonato, que ajuda a compensar a elevação inicial da concentração de íons bicarbonato no líquido extracelular (GUYTON; HALL, 2006).

## **1.6 Água Potável**

A água potável atende um padrão de potabilidade que tem como referência um conjunto de valores usados como parâmetro da qualidade, que não oferece riscos à saúde, sendo destinada à ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, independentemente de sua origem (BRASIL. Ministério da Saúde, 2011).

Esta água também atende aos padrões organolépticos, que é um conjunto de parâmetros caracterizados por provocar estímulos sensoriais que afetam a aceitação

para consumo humano, mas que não necessariamente implicam risco à saúde (BRASIL. Ministério da Saúde, 2011). Os padrões organolépticos de potabilidade estão especificados na Tabela B.

Tabela B – Padrões organolépticos da água potável

Parâmetro	CAS	Unidade	VMP <sup>(1)</sup>
Alumínio	7429-90-5	mg/L	0,2
Amônia (como NH <sub>3</sub> )	7664-41-7	mg/L	1,5
Cloro	16887-00-6	mg/L	250
Cor Aparente <sup>(2)</sup>	-	uH	15
1,2 diclorobenzeno	95-50-1	mg/L	0,01
1,4 diclorobenzeno	106-46-7	mg/L	0,03
Dureza	-	mg/L	500
Etilbenzeno	100-41-4	mg/L	0,2
Ferro	7439-89-6	mg/L	0,3
Gosto e odor <sup>(3)</sup>	-	Intensidade	6
Manganês	7439-96-5	mg/L	0,1
Monoclorobenzeno	108-90-7	mg/L	0,12
Sódio	7440-23-5	mg/L	200
Sólidos dissolvidos totais	-	mg/L	1000
Sulfato	14808-79-8	mg/L	250
Sulfeto de hidrogênio	7783-06-4	mg/L	0,1
Surfactantes	-	mg/L	0,5
Tolueno	108-88-3	mg/L	0,17
Turbidez <sup>(4)</sup>	-	UT	5
Zinco	7440-66-6	mg/l	5
Xilenos	1330-20-7	mg/L	0,3

\* (1) VMP: valor máximo permitido; (2) uH: Unidade Hazen (mg Pt–Co/L); (3) Intensidade máxima de percepção para qualquer característica de gosto e odor com exceção do cloro livre, nesse caso por ser uma característica desejável em água tratada; (4) UT: Unidade de turbidez. CAS: número de referência de compostos e substâncias químicas adotado pelo *Chemical Abstract Service*.

Fonte: (BRASIL. Ministério da Saúde, 2011)

A Portaria nº 2.914 de 12 de Dezembro de 2011 do Ministério da Saúde visa determinar parâmetros de potabilidade para a água de consumo humano: 1. O ideal é que o pH permaneça na faixa de 6,0 a 9,5; 2. O cloro residual livre deve manter um teor máximo de 2 mg/L; e 3. O ferro e o manganês podem estar acima do seu valor máximo permitido de acordo com a tabela dos padrões organolépticos, desde que os demais elementos do padrão de potabilidade não estejam alterados e que as concentrações de ferro não ultrapassem 2,4 mg/L e de manganês 0,4 mg/L (BRASIL. Ministério da Saúde, 2011).

## 1.7 pH e Câncer

Os principais mecanismos que levam a acidez do tumor provavelmente incluem a produção de ácido láctico e hidrólise de ATP em regiões hipóxicas de tumores (TANNOCK; ROTIN, 1989).

É possível diminuir o pH em tumores experimentais através de medidas que se destinam a produzir acidose sistêmica ou modificar o metabolismo do tumor ou do fluxo sanguíneo. Acidose sistêmica pode ser conseguida aumentando o nível de dióxido de carbono no ar inspirado ou pelo fornecimento de bicarbonato na água potável (TANNOCK; ROTIN, 1989).

Uma diferença importante entre muitos tumores sólidos e tecidos circundante normal é o nutricional e o ambiente metabólico. A vasculatura funcional de tumores é muitas vezes insuficiente para suprir as necessidades nutricionais da expansão da população de células tumorais, conduzindo à deficiência de oxigênio e outros nutrientes. Deficiência de nutrientes e condições de acidez pode contribuir à morte celular e necrose no interior de tumores sólidos (TANNOCK; ROTIN, 1989).

Estudos em culturas de tecidos têm demonstrado que a combinação de pH ácido e hipóxia é tóxico para células normais de mamíferos, enquanto que as exposições curtas para qualquer fator de si só, não são muito tóxicos. Esta interação pode contribuir para a morte celular e necrose em tumores sólidos. O pH ácido pode influenciar o resultado da terapia de tumores. Há efeitos bastante pequenos de pH sobre a resposta das células à radiação ionizante, mas a exposição aguda a pH ácido provoca um aumento acentuado em resposta a hipertermia, sendo que este efeito é diminuído em células que estão adaptadas para pH baixo. Acidez pode ter efeitos variados sobre a resposta celular para convencionais fármacos anticancerígenos (TANNOCK; ROTIN, 1989).

Sugere-se que as condições de acidez em tumores podem permitir o desenvolvimento de novos tipos relativamente específicos de terapia que são dirigidos contra os mecanismos que regulam pH sob condições ácidas (TANNOCK; ROTIN, 1989).

O cádmio é um metal que contamina diversos alimentos, e desta forma pode contaminar também os seres humanos, além da exposição ocupacional. O risco de desenvolvimento de câncer em pacientes contaminados por este metal é alto. Por

isso a necessidade de se ter maneiras alternativas e simples de evitar o câncer provocado por este elemento.

Não há estudos na literatura avaliando a influência do pH da água de beber na toxicidade ao cádmio.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do pH da água de beber na gênese do câncer provocada pela intoxicação por cádmio.

## REFERÊNCIAS

- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46.
- BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
- CUNHA, K. P. V. et al. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. **R. Bras. Ci. Solo**, n.32, p. 1319-1328, 2008.
- ÉVORA, P. R. B.; GARCIA, L. V. Equilíbrio ácido-base. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.41, n.3, p. 301-311, 2008.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. Lyon: IARC, 1993. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans ; 58).
- LOPES, A. M. R. M. **Avaliação da contaminação em metais pesados no pescado**: análise da situação do pescado comercializado em Portugal e dos alertas emitidos pelo sistema RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). 2009. 181 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2009.
- LUCHESE, C. **Efeito do cádmio sobre a enzima d-aminolevulinato desidratase de pulmão de ratos *in vitro***: interação com agentes quelantes e antioxidantes. 2007. 61 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- MARTINS, D. I. **Exposição ocupacional a solventes orgânicos em trabalhadores de laboratórios e efeitos genotóxicos**. 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MOTTA, A. C. F. et al. 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**, v. 41, p. 183-188, 2004.
- NAVARRO, R. A. El cadmio, ¿carcinógeno prostático o no? In: CONGRESO VIRTUAL HISPANOAMERICANO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA, 9., 2007, Madrid.

Conferencia nº 625. Disponível em:

[http://www.conganat.org/9congreso/vistalmpresion.asp?id\\_trabajo=625&tipo=1](http://www.conganat.org/9congreso/vistalmpresion.asp?id_trabajo=625&tipo=1).

Acesso em: 16 fev 2012.

RIBEIRO, R. L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro, R. L., Salvadori, D. M. F., Marques E. K. (orgs.). **Mutagênese ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. cap. 7, p. 173-200.

SOUZA, M. C. B. et al. Fatores ambientais e reprodução: metais (chumbo e cádmio): fundamentação da pesquisa. **JBRA Assist. Reprod.**, v. 14, n. 4, 2010.

TANNOCK, I. F.; ROTIN, D. Acid ph in tumors and its potential for therapeutic exploitation. **Cancer Res.**, v. 49, p. 4373-84, 1989.

TERRA FILHO, M.; KITAMURA, S. Câncer pleuropulmonar ocupacional. **J Bras Pneumol.**, n. 32, supl. 1, p. S60-S8, 2006.

WAALKES, M.P. Cadmium carcinogenesis. **Mutat Res.** n.533, p.107-20, 2003.

## 2 ARTIGO

### **INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DO CÂNCER POR INTOXICAÇÃO POR CÁDMIO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

### **INFLUENCE OF pH OF WATER IN THE GENESIS OF CANCER IN CADMIUM POISONING: AN EXPERIMENTAL STUDY IN RATS**

Gisele Maria Soria Golghetto<sup>1</sup>, Gisele Alborghetti Nai<sup>2</sup>, Mariani Paulino Soriano Estrella<sup>3</sup>, Larissa Di Santi Teixeira<sup>4</sup>, Felipe do Carmo Moura<sup>4</sup>, Hermann Bremer Neto<sup>5</sup>, José Luiz Santos Parizi<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Discente de Mestrado, Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Doutora, professora do Departamento de Patologia e do Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Discente de graduação em Medicina, Faculdade de Medicina de Presidente Prudente (FAMEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq).

<sup>4</sup>Discente de graduação em Medicina, Faculdade de Medicina de Presidente Prudente (FAMEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

<sup>5</sup>Doutor, professor do Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

<sup>6</sup>Mestre, professor do Departamento de Patologia, 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.

## RESUMO

**Introdução:** O cádmio é um metal pesado, muito utilizado na indústria. Ele poder originar o aparecimento de tumores em múltiplos órgãos. **Objetivo:** Avaliar o efeito do pH da água ingerida na gênese do câncer provocado por cádmio. **Material e métodos:** Utilizou-se 98 ratos Wistar, machos, divididos em 7 grupos: A – 15 ratos que receberam solução de cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$  - 400mg/L) na água de beber com pH neutro (pH 7,0); B – 15 ratos que receberam  $\text{CdCl}_2$  (400mg/L) na água de beber com pH ácido (pH 5,0); C – 15 ratos, que receberam  $\text{CdCl}_2$  (400mg/L) na água de beber com pH básico (pH 8,0). D – 15 ratos que receberam água com pH ácido (pH 5,0); E – 15 ratos que receberam água com pH básico (pH 8,0); F – 15 ratos, que receberam água com pH neutro (pH 7,0); G – 8 ratos que receberam ciclofosfamida em dose única (50mg/kg) subcutânea no primeiro dia do experimento (controle positivo do teste do micronúcleo). Ratos dos grupos A a F foram eutanasiados após 6 meses e os do grupo G, 24 horas após o início do experimento. Retirou-se fígado, rins, pâncreas, próstata, vesícula seminal e testículos para histopatologia e medula óssea para o teste do micronúcleo. **Resultados:** Não foram observadas lesões pré-neoplásicas nem neoplásicas no fígado, rins, pâncreas, vesícula seminal e testículos em todos os grupos. Somente animais expostos ao cádmio apresentaram neoplasia intraepitelial prostática de grau um, sendo mais prevalente no grupo B ( $p < 0,05$ ), porém não houve aumento de micronúcleos ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** O pH ácido contribuiu para formação de lesões pré-neoplásicas na próstata dos animais expostos ao cádmio.

**Palavras-chave:** cádmio, acidificação, neoplasias, próstata, pâncreas.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cadmium is a heavy metal, widely used in industry. It may give rise to the appearance of tumors in multiple organs. **Objective:** To evaluate the effect of the pH of the water in the genesis of cancer caused by cadmium. **Material and methods:** We used 98 Wistar rats were divided into seven groups: A - 15 rats that received solution of cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$  - 400mg / L) in drinking water with a neutral pH (pH 7.0), B - 15 rats that received  $\text{CdCl}_2$  (400 mg / L) in the drinking water at acidic pH (pH 5.0), C - 15 rats that received  $\text{CdCl}_2$  (400 mg / L) in drinking water with basic pH (pH 8.0), D - 15 rats that received water at acidic pH (pH 5.0), E - 15 rats that received water with basic pH (pH 8.0), F - 15 rats that received water at neutral pH (pH 7.0 ); G - 8 rats that received cyclophosphamide as a single dose (50mg/kg) on the first day of the experiment (positive control for micronucleus test). Rats of groups A a F were euthanized after 6 months and the group G, 24 hours after the start of the experiment. We removed liver, kidneys, pancreas, prostate, seminal vesicles, testes for histopathology, and bone marrow for the micronucleus test. **Results:** There were no pre-neoplastic or neoplastic lesions in liver, kidneys, pancreas, seminal vesicles and testes in all groups. Only animals exposed to cadmium showed prostatic intraepithelial neoplasia grade one, being more prevalent in group B ( $p < 0.05$ ), although there was no increase in micronuclei ( $p > 0.05$ ). **Conclusion:** The acidic pH contributed to the formation of precancerous lesions in the prostate gland of animals exposed to cadmium.

**Key words:** cadmium, acidification, neoplasms, prostate, pancreas.

## INTRODUÇÃO

A maioria dos pesquisadores reconhece que o câncer é o resultado da ação de fatores externos ambientais atuando conjugadamente com a suscetibilidade individual, com os primeiros desempenhando papel central na causa dos cânceres, e os fatores genéticos um papel secundário<sup>14</sup>.

O cádmio (Cd) é um metal pesado, descoberto por volta de 1815 em minérios contendo carbonato e zinco. É um dos mais abundantes elementos não essenciais encontrados no ambiente, em componentes da fumaça do cigarro, sendo muito utilizado em aplicações industriais<sup>17</sup>. O cádmio entra no organismo, principalmente, por inalação e ingestão<sup>12</sup>, sendo que a maioria dos alimentos contém cádmio. Atribui-se aproximadamente dois terços do valor da ingestão diária de cádmio aos produtos de origem vegetal (amendoim, girassol, entre outros) e um terço aos produtos de origem animal (peixe, moluscos e crustáceos, principalmente)<sup>12</sup>. O cádmio é comercialmente obtido como um co-produto industrial das atividades de exploração mineira e fundição do zinco e do chumbo. Os componentes com cádmio são utilizados como estabilizadores em produtos como os polímeros de cloreto de vinila (PVC), como pigmentos e, mais usualmente, em baterias e pilhas de níquel-cádmio recarregáveis, como as baterias de aparelhos celulares. O cádmio metálico é muito utilizado como um agente anticorrosão e encontra-se também presente como contaminante nos fertilizantes à base de fosfato<sup>4</sup>. Também é encontrado em produtos odontológicos como ligas de prata, utilizadas na ortodontia, e alginato<sup>6</sup>. A ingestão diária máxima de cádmio deve ser de 1 mg/kg de massa corporal<sup>17</sup>, sendo que a concentração de cádmio encontrada em vegetais, peixes e crustáceos pode variar entre 0,1 a 2,2mg/Kg<sup>12</sup>.

Existem evidências que apontam no sentido do cádmio poder originar o aparecimento de tumores em múltiplos órgãos, incluindo pulmão, próstata, rim, testículo, fígado e pâncreas<sup>8</sup>, tendo este metal sido classificado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), como agente cancerígeno para humanos (Grupo 1)<sup>3</sup>. O mecanismo celular e molecular implicado na carcinogenicidade do cádmio inclui ativação de proto-oncogenes, inativação dos genes supressores de tumor, rompimento da adesão celular e inibição do reparo de DNA<sup>16</sup>.

O teste de micronúcleo é ferramenta amplamente utilizada para pesquisa e aferição da segurança de inúmeras substâncias, classificando-as ou não como carcinogênicas, fornecendo resultados com forte suporte estatístico<sup>2</sup>. A facilidade da sua realização leva a ampla adoção mundial como teste genotoxicidade *in vitro* assim como no monitoramento da população humana<sup>2</sup>.

A medição do pH no tecido tem mostrado que o microambiente em tumores é geralmente mais ácido do que nos tecidos normais, com exceção de alguns tumores cerebrais que podem ser mais alcalinos do que o cérebro normal. Os principais mecanismos que levam a acidez do tumor provavelmente incluem a produção de ácido láctico e hidrólise de ATP em regiões hipóxicas de tumores. Assim, hipóxia e alteração do pH representam dois fatores que podem ser explorados terapêuticamente para destruir tais células<sup>13</sup>. Deficiência de nutrientes e alterações de pH podem contribuir com a morte celular e necrose no interior de tumores sólidos<sup>13</sup>.

O cádmio é um metal pesado que além da exposição ocupacional, contamina diversos alimentos, e desta forma pode contaminar também os seres humanos. O risco de desenvolvimento de câncer em pacientes contaminados por este metal é alto. Por isso a necessidade de se ter maneiras alternativas e simples de evitar o câncer provocado por este elemento. Não há estudos na literatura avaliando a influência do pH da água de beber na toxicidade ao cádmio. A hipótese do presente trabalho foi de que o pH básico da água possa diminuir a carcinogenicidade do cádmio.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do pH da água ingerida na gênese do câncer provocada pela intoxicação por cádmio.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Protocolo animal**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (CEUA – UNOESTE) (Protocolo nº 1167).

Foram utilizados 98 ratos Wistar (*Ratus Norvegicus albinus*), adultos, machos, com peso entre 200 a 250g. Os animais foram separados e agrupados em número de quatro em caixas grandes retangulares, medindo 49x34x16cm, preconizadas para alojamento de cinco ratos adultos. Os ratos foram colocados em biotério climatizado com umidade, temperatura e fotoperíodo de 12 horas 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 dada aos animais na água de beber, todos os dias durante 6 meses, dissolvido na concentração de 400mg/L (adaptado de MOTTA et al.<sup>7</sup>). A água foi acidificada com ácido clorídrico e alcalinizada com hidróxido de sódio. A troca da água do bebedouro foi realizada tres 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.

Os animais foram divididos em 7 grupos: A – 15 ratos que receberam solução de cloreto de cádmio na água de beber com pH neutro (pH 7,0); B – 15 ratos que receberam solução de cloreto de cádmio na água de beber com pH ácido (pH 5,0); C – 15 ratos, os quais receberam solução de cloreto de cádmio na água de beber com pH básico (pH 8,0). D – 15 ratos que receberam água de beber com pH ácido (pH 5,0); E – 15 ratos que receberam água de beber com pH básico (pH 8,0); F – 15 ratos, os quais receberam água com pH neutro (pH 7,0); G – 8 ratos, os quais receberam ciclofosfamida (Genuxal, Baxter Oncology GmbH, Halle/Westfalen, Alemanha) em dose única subcutânea (50mg/kg) no primeiro dia do experimento (grupo controle positivo para o teste do micronúcleo)<sup>5</sup>. Animais de todos os grupos receberam água e ração à vontade.

Os ratos dos grupos A a F foram eutanasiados 6 meses após o início do experimento. Os ratos do grupo G foram eutanasiados 24 horas após o início do experimento. A eutanásia foi realizada com Tiopental (Syntec, EUA), na dose de 100 mg/kg administrado na cavidade peritoneal<sup>10</sup>. Os indicativos de morte foram: ausência de movimentos respiratórios, ausência de batimentos cardíacos e perda dos reflexos protetores<sup>10</sup>. A necropsia foi realizada com abertura mento-púbica dos animais para retirada do fígado, rins, pâncreas, próstata, vesícula seminal e testículos de cada rato para análise microscópica.

### **Análise anatomopatológica**

Os órgãos retirados 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 5µm foram obtidos e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil).

A análise histopatológica foi realizada para determinar o tipo de lesão encontrada no fígado, rim, pâncreas, próstata, vesícula seminal e testículos: lesões hiperplásicas, lesões pré-neoplásicas, lesões neoplásicas benignas e lesões neoplásicas malignas. A análise das lâminas foi cega e realizada por um avaliador (GAN).

### **Teste do micronúcleo**

O teste do micronúcleo foi realizado para determinar a genotoxicidade do cádmio.

Foi coletado material da medula óssea do fêmur de cada rato no momento da eutanásia e foram realizadas duas lâminas por animal<sup>5</sup>. As lâminas foram coradas pelo corante de Giemsa (Dolles, São Paulo, Brasil). Para determinação do número de micronúcleos foram contados 2000 eritrócitos policromáticos por animal (1000 em cada lâmina) utilizando-se microscópio óptico, no aumento de 400x<sup>5</sup>. Micronúcleos foram considerados como uma estrutura com a membrana circundante, menores de um terço do diâmetro do núcleo associado, semelhante na intensidade de coloração e microscopia no mesmo plano focal do núcleo associado<sup>15</sup>. A análise das lâminas foi cega e realizada por um avaliador (MPSE) e revisada por outro observador (GAN), que concordou com os resultados.

### **Análise estatística**

Para a avaliação da variável displasia prostática utilizou-se o teste da Razão de Verossimilhança (*Likelihood Ratio*). A verificação de onde ocorreram as diferenças foi feita pelo uso do Resíduo Padronizado Ajustado.

A variável frequência de micronúcleos não apresentou normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ( $p=0.001$ ) e também não apresentou homogeneidade das variâncias ( $p=0.001$ ) pelo teste de Levene, portanto, optou-se pelo uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de comparação múltipla dos postos pelo teste de Dunn.

Todos os testes estatísticos foram realizados ao nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS**

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<sup>4</sup>. Nos animais do grupo D e E, não foi possível se estabelecer a causa *mortis* após a necropsia.

### **Análise anatomopatológica**

Não foram observadas alterações hiperplásicas, lesões pré-neoplásicas nem neoplásicas benignas ou malignas no fígado, rins, pâncreas, vesícula seminal e testículos em todos os grupos avaliados (A a F).

Animais de todos os grupos apresentaram hiperplasia nodular prostática (Figuras 1A e 1B). Somente animais dos grupos expostos ao cádmio (A, B e C) apresentaram neoplasia intraepitelial prostática de grau um (PIN I) (Figuras 1C e 1D) ( $p < 0.05$ ), sendo que os animais do grupo B (exposição ao cádmio em água de beber com pH ácido) diferiram significativamente dos animais dos grupos A e C (Tabela 1). Um animal do grupo B apresentou adenocarcinoma da próstata (Figuras 1E e 1F).

Tabela 1 – Frequência de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) grau um nos grupos estudados (n=85).

<b>Grupo</b>	<b>PIN* presente (%)</b>
<b>A</b>	3/14 (21,4%) <sup>a</sup>
<b>B</b>	4/15 (26,6%) <sup>b</sup>
<b>C</b>	3/14 (21,4%) <sup>a</sup>
<b>D</b>	0/14 (0%) <sup>c</sup>
<b>E</b>	0/13 (0%) <sup>c</sup>
<b>F</b>	0/15 (0%) <sup>c</sup>

\*PIN: Neoplasia intraepitelial prostática.

Letras minúsculas comparam grupos no mesmo momento. Letras minúsculas diferentes:  $p < 0,05$ .

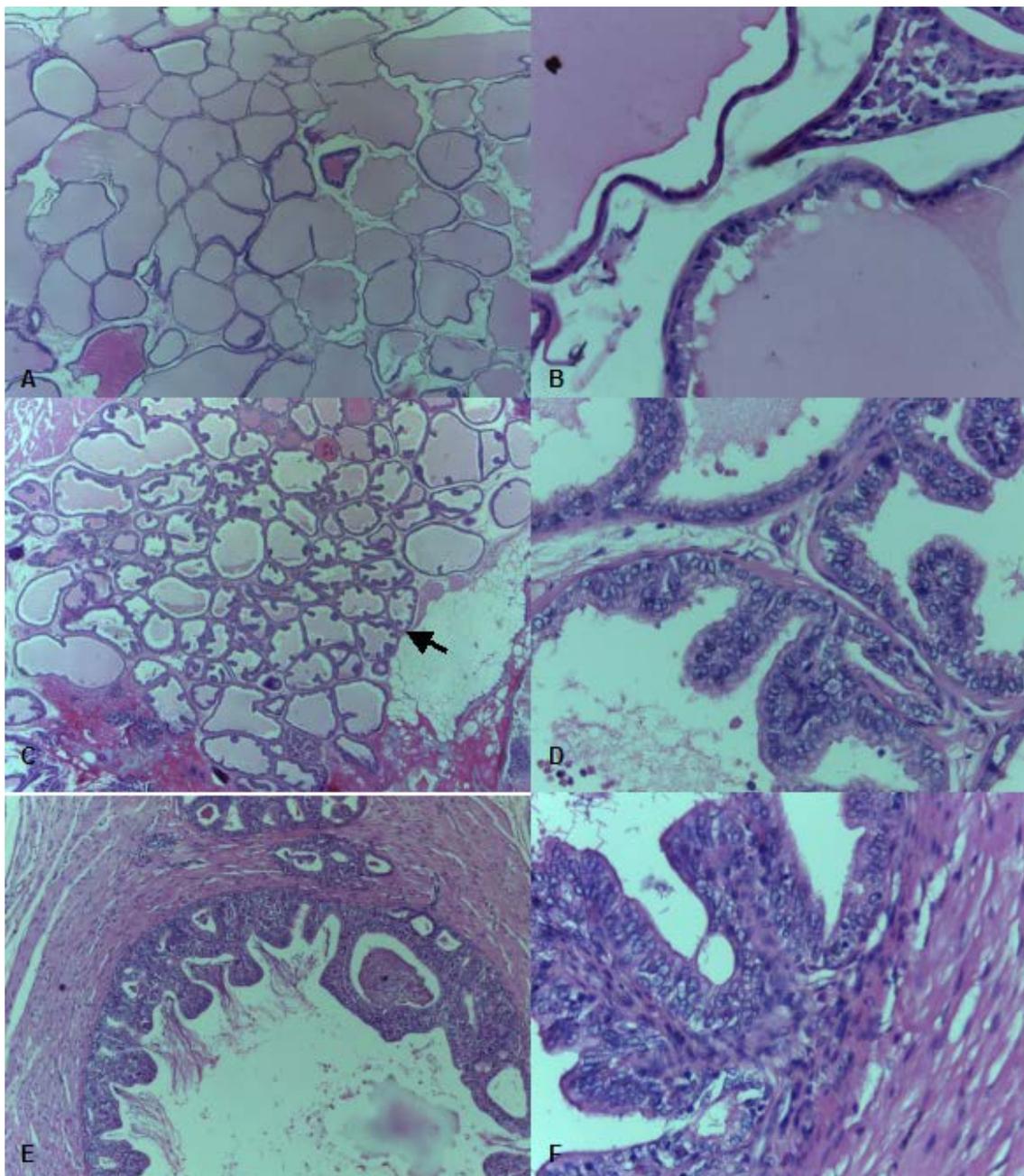


Figura 1 – Fotomicroscopia da próstata. A – Hiperplasia nodular – animal do grupo A (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). B – Detalhe do epitélio prostático normal (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x). C – Área de neoplasia intraepitelial prostática grau um (PIN I) (seta) – animal do grupo A (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). D - Detalhe da imagem anterior mostrando células com nucléolos (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x). E – Adenocarcinoma da próstata - animal do grupo B (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x). F – Detalhe da imagem anterior mostrando células pleomórficas e nucléolos evidentes (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x).

### Teste do micronúcleo

Não houve aumento na frequência de micronúcleos no grupo exposto ao cádmio independente do pH da água (Figuras 2 e 3). Houve diferença entre o número de micronúcleos somente em relação ao grupo controle positivo (ciclofosfamida) e todos os outros grupos estudados (independente da exposição ao cádmio e pH da água) ( $p < 0.0001$ ).

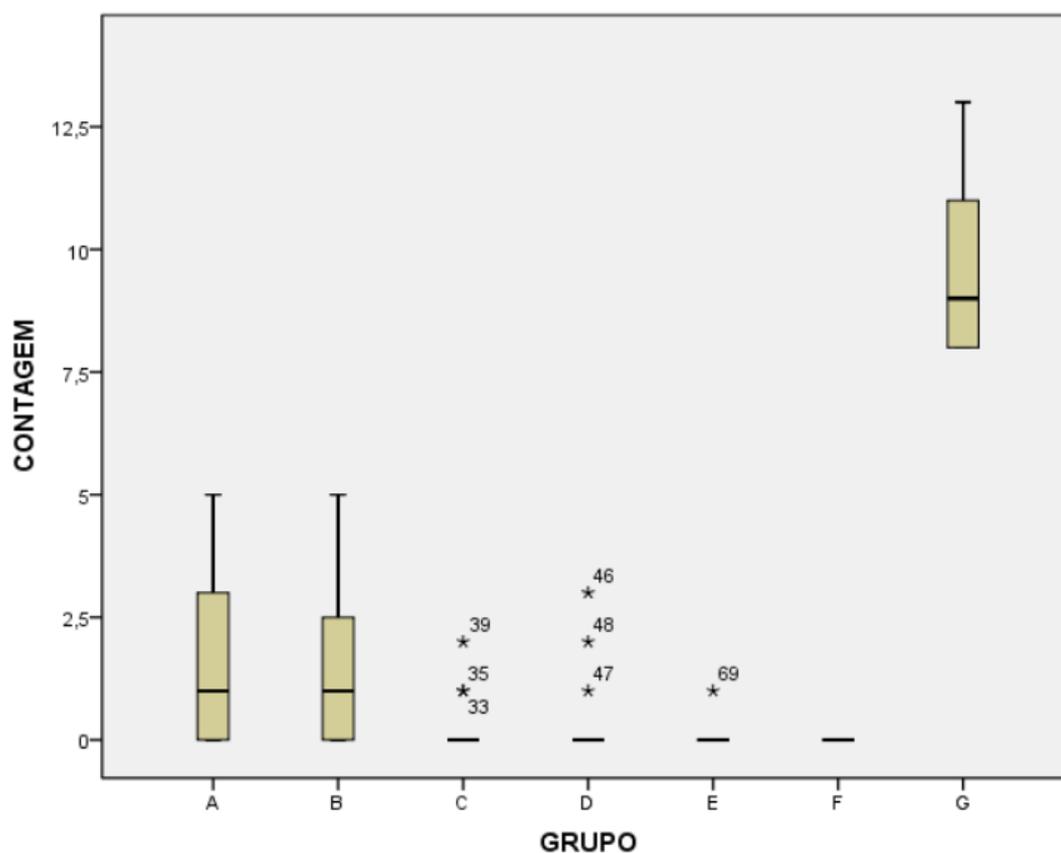


Figura 2 – Contagem de micronúcleos por grupo estudado (mediana e interquartis).

\**outlier*: a numeração sobre o *outlier* corresponde à numeração dos animais.

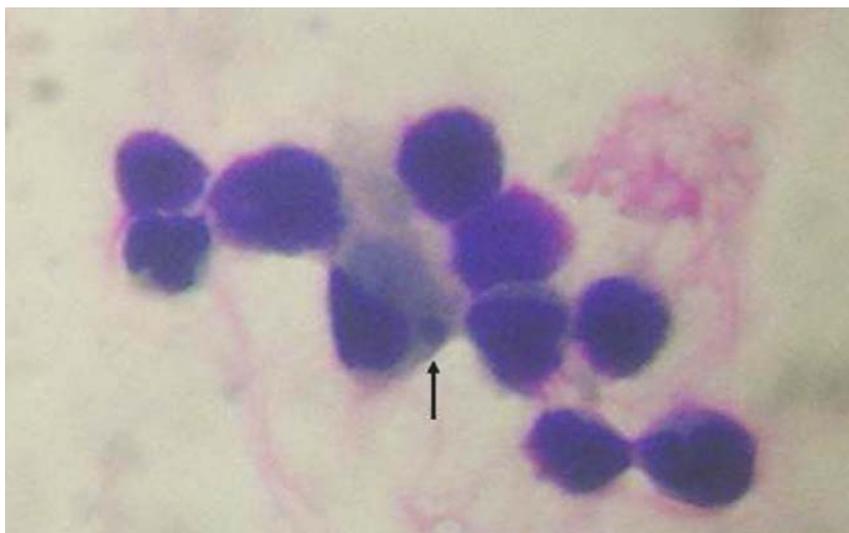


Figura 3 – Eritrócito policromático com micronúcleo (seta) – animal exposto ao cloreto de cádmio em água com pH neutro (Coloração de Giemsa, aumento de 1000x).

## DISCUSSÃO

O cádmio está presente na maior parte dos alimentos, em concentrações que são muito variáveis e a alimentação é uma das principais vias de exposição dos seres humanos a este elemento<sup>4</sup>. Atribui-se aproximadamente dois terços do valor da ingestão diária de cádmio aos produtos de origem vegetal e um terço aos produtos de origem animal (peixe, moluscos e crustáceos, principalmente)<sup>4</sup>. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a ingestão diária máxima de cádmio deve ser de 1 mg/kg de massa corporal<sup>17</sup>. Neste estudo, os animais foram expostos a 400mg de cádmio / litro de água ingerida, um valor bem acima da ingestão diária permitida, simulando situações de contaminação ambiental em larga escala.

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. O efeito negativo da calagem na fitodisponibilidade dos metais é devido, principalmente, ao aumento da capacidade de troca catiônica e à formação de hidróxidos e carbonatos de baixa solubilidade<sup>1</sup>. Assim, neste estudo o uso de pH em diferentes concentrações foi realizado para avaliar se em animais, o pH também poderia influenciar na absorção e no efeito cancerígeno do cádmio. Além disso, estudos em culturas de tecidos têm demonstrado que a combinação de pH ácido e hipóxia é tóxica para células normais de mamíferos<sup>13</sup>. Sugere-se que as condições de acidez em tumores podem permitir

o desenvolvimento de novos tipos relativamente específicos de terapia que são dirigidos contra os mecanismos que regulam pH sob condições ácidas<sup>13</sup>.

O cádmio interfere em muitas funções celulares, principalmente pela formação de complexos com grupos externos de compostos orgânicos, tais como as proteínas, resultando na inibição de atividades essenciais. Além disso, pode provocar alterações nos sistemas antioxidantes, estimulando o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e eventualmente morte celular<sup>11</sup>.

Este metal pode unir-se a bases da molécula de DNA produzindo modificação química e assim danificando esta molécula. Além disso, apresenta grande afinidade pelos grupos sulfidríla, o que poderia interferir nas proteínas do fuso<sup>8</sup>. O papel dos radicais livres na genotoxicidade associada ao cádmio tem se confirmado. Tem-se sugerido também que os radicais formados pelo complexo metalotioneína-cádmio poderiam ser responsáveis pelo dano ao DNA<sup>8</sup>.

Somente animais dos grupos expostos ao cádmio (A, B e C) apresentaram neoplasia intraepitelial prostática de grau um (PIN I) (p<0,05), corroborando com outros estudos que mostram que o cádmio provoca lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na próstata<sup>8</sup>. Animais do grupo B (expostos ao cádmio em água de beber com pH ácido) apresentaram maior prevalência de lesões pré-neoplásicas do que os animais do grupo A e C (p<0,05). Além disso, um animal do grupo B apresentou adenocarcinoma da próstata, o que não foi verificado em nenhum outro grupo de estudo. Isto sugere que o pH ácido das soluções pode ter contribuído na maior formação destas lesões neste grupo, mostrando que talvez o pH tenha influência na gênese de neoplasias associadas ao cádmio. A hiperplasia nodular prostática observada em todos os animais, provavelmente ocorreu devido ao envelhecimento destes.

Neste estudo não foram observadas lesões pré-neoplásicas nem neoplásicas benignas ou malignas no fígado, rins, pâncreas, vesícula seminal e testículos, independente do grupo estudo, com ou sem exposição ao cádmio e independente do pH da água. Isto pode ter ocorrido, pois os pulmões absorvem de 10 a 40% do cádmio inalado, enquanto que o cádmio ingerido através dos alimentos e da água é pouco absorvido pelo trato gastrointestinal (5-7%), sendo a maior parte eliminada pelas fezes<sup>12</sup>. Embora, quando a exposição é prolongada no tempo (situação que se verifica na exposição por ingestão), o cádmio acumula-se majoritariamente nos rins<sup>17</sup>, não observamos formação de neoplasias neste órgão.

Embora, estudos *in vitro* tenham demonstrado o potencial genotóxico do cádmio<sup>16</sup>, no presente estudo não se observou aumento de formação de micronúcleos nos animais expostos a este elemento, apesar da exposição ao cádmio ter sido maior que em estudo anterior<sup>7</sup> o qual usou 300mg/L. Isto pode ter ocorrido devido ao tipo de exposição – ingestão – onde há menor absorção deste metal pesado<sup>12</sup>. Além disso, o fato de um agente físico ou químico não causar aumento de formação de micronúcleos, não exclui a possibilidade de este ser genotóxico ou mutagênico.

O teste de micronúcleo é usado extensivamente em testes de genotoxicidade de produtos químicos, pois os micronúcleos são facilmente visualizados nos eritrócitos e são fortes indicativos para mensuração de aberrações cromossômicas<sup>2</sup>. Por este motivo, neste estudo escolheu-se este teste para avaliação da genotoxicidade do cádmio em relação pH da água. Porém, este teste detecta substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos (substâncias clastogênicas) ou que interferem na formação do fuso mitótico<sup>2</sup>, e estes não são os únicos mecanismos de mutagenicidade e genotoxicidade envolvidos na gênese do câncer pelo cádmio. Assim, outros testes de genotoxicidade devem ser realizados, assim como outros tipos de exposições devem ser estudados para melhor definição da influência do pH da água na lesão genotóxica provocada pelo cádmio.

Deve ser lembrado que existe uma diferença entre a capacidade que um agente tem para causar dano e a possibilidade de que este agente cause dano. O potencial intrínseco de um agente tóxico para lesar a saúde só se concretiza se houver condições para que este agente alcance o(s) órgão(s) crítico(s) que ele pode danificar<sup>9</sup>. Isto, associado aos dados do presente estudo, sugere que o cádmio mesmo em altas doses é pouco absorvido pelo trato digestório e tem uma menor chance de provocar neoplasias nos órgãos alvo, exceto na próstata.

## **CONCLUSÃO**

O cádmio provocou o aparecimento de lesões pré-neoplásicas na próstata e o pH ácido contribuiu para uma maior prevalência destas nos animais expostos a este elemento. Porém, mesmo em alta concentração, o cádmio adicionado à água de beber não causou formação de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no fígado, rins, pâncreas, vesícula seminal e testículos, nem aumento do número de micronúcleos nos animais expostos, independente do pH da água.

## AGRADECIMENTOS

A Edvaldo Mamede dos Santos, pelo preparo das soluções.

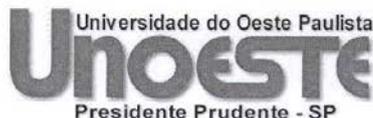
## REFERÊNCIAS

1. CUNHA, K.P.V. *et al.* Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. *R. Bras. Ci. Solo*, v. 32, p.1319-1328, 2008.
2. FLORES, M.; YAMAGUCHI, U.M. Teste de Micronúcleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. *Revista Saúde e Pesquisa*, v.1, n. 3, p. 337-40, 2008.
3. IARC. International Agency for Research on Cancer. *Metals*. In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. IARC,1993.
4. JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination - Impact of environmental pollution on health: balanced risk. *British Medical Bulletin*, v.68, p. 167-82, 2003.
5. MACGREGOR, J.T. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res.*, v. 189, n. 2, p.103-12, 1987.
6. MENEZES, L.M.; FREITAS, M.P.M.; GONÇALVES, T.S. Biocompatibilidade dos materiais em Ortodontia: mito ou realidade? *Rev Dental Press Ortop Ortop Facial*, v.14, n. 2), p. 144-7, 2009.
7. MOTTA, A.C.F *et al.* 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*, v. 41, p.183-188, 2004.
8. NAVARRO, R.A. *El cadmio, ¿carcinogéno prostático o no?* 9º Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Nº 625. Conferencia. 2007. Disponível em [http://www.conganat.org/9congreso/vistaImpresion.asp?id\\_trabajo=625&tipo=1](http://www.conganat.org/9congreso/vistaImpresion.asp?id_trabajo=625&tipo=1). Acesso em 03 set 2013.
9. OPAS. Organização Pan-americana da Saúde no Brasil. *Doenças relacionadas ao trabalho: manual de procedimentos para os serviços de*

- saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. Disponível em:< [www.opas.org.br](http://www.opas.org.br)>. Acesso em: 03 set 2013.
10. PAIVA, F.P.; MAFILLI, V.V.; SANTOS, A.C.S. *Curso de Manipulação de Animais de Laboratório*. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. 2005. Disponível em: [http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha\\_manipulacao.pdf](http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf). Acesso em 03 set 2013.
  11. SOUZA, V.L. *et al.* Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. *Acta Bot Bras*, v. 23, n. 2, p. 343-54, 2009.
  12. SOUZA, M.C.B. *et al.* Fatores Ambientais e Reprodução: Metais (chumbo e cádmio). Fundamentação da pesquisa. *JBRA Assist. Reprod*, v. 14, n. 4, p.38-42, 2010.
  13. TANNOCK, I.F.; ROTIN, D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res*, v. 49, p. 4373-84, 1989.
  14. TERRA FILHO, M.; KITAMURA, S. Câncer pleuropulmonar ocupacional. *J Bras Pneumol*, v. 32, Supl 1, p. S60-S8, 2006.
  15. TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*, v. 271, p. 69-77, 1992.
  16. WAALKES, M.P. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res*, v. 533, p.107-20, 2003.
  17. WHO. World Health Organization. *Environmental Health Criteria, Cadmium*. 1<sup>st</sup> ed., v. 134. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1992.

## ANEXOS

### Anexo 1 - Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).

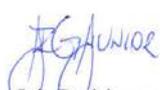


Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq)  
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

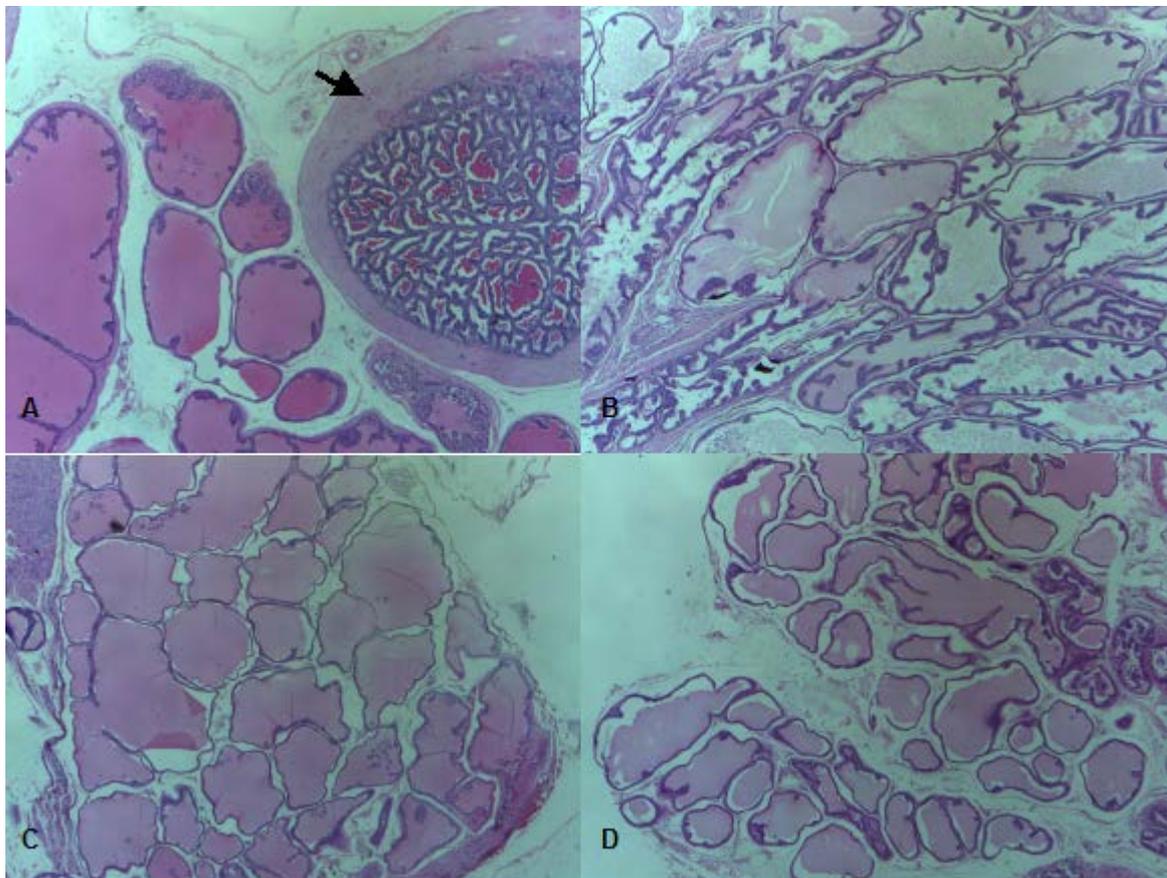
#### PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA DE BEBER NA GÊNESE DO CÂNCER POR INTOXICAÇÃO POR CÁDMIO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS" cadastrado no Programa Especial de Iniciação Científica (PEIC) na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº 1167 tendo como pesquisador responsável a Profa. GISELE ALBORGHETTI NAI, os docentes HERMANN BREMER NETO, JOSE LUIZ SANTOS PARIZI, PAULO EDUARDO PARDO, o técnico CARLOS ALEXANDRE SANT'ANNA DE OLIVEIRA e os acadêmicos FELIPE DO CARMO MOURA, LARISSA DI SANTI TEIXEIRA, MARIANI PAULINO SORIANO ESTRELLA, PATRICIA FAVARO DOS SANTOS e a mestranda GISELE MARIA SORIA GOLGHETTO foi avaliado e **APROVADO** nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente-SP, em reunião realizada em 21/06/2012.

Presidente Prudente, 26 de junho de 2012..

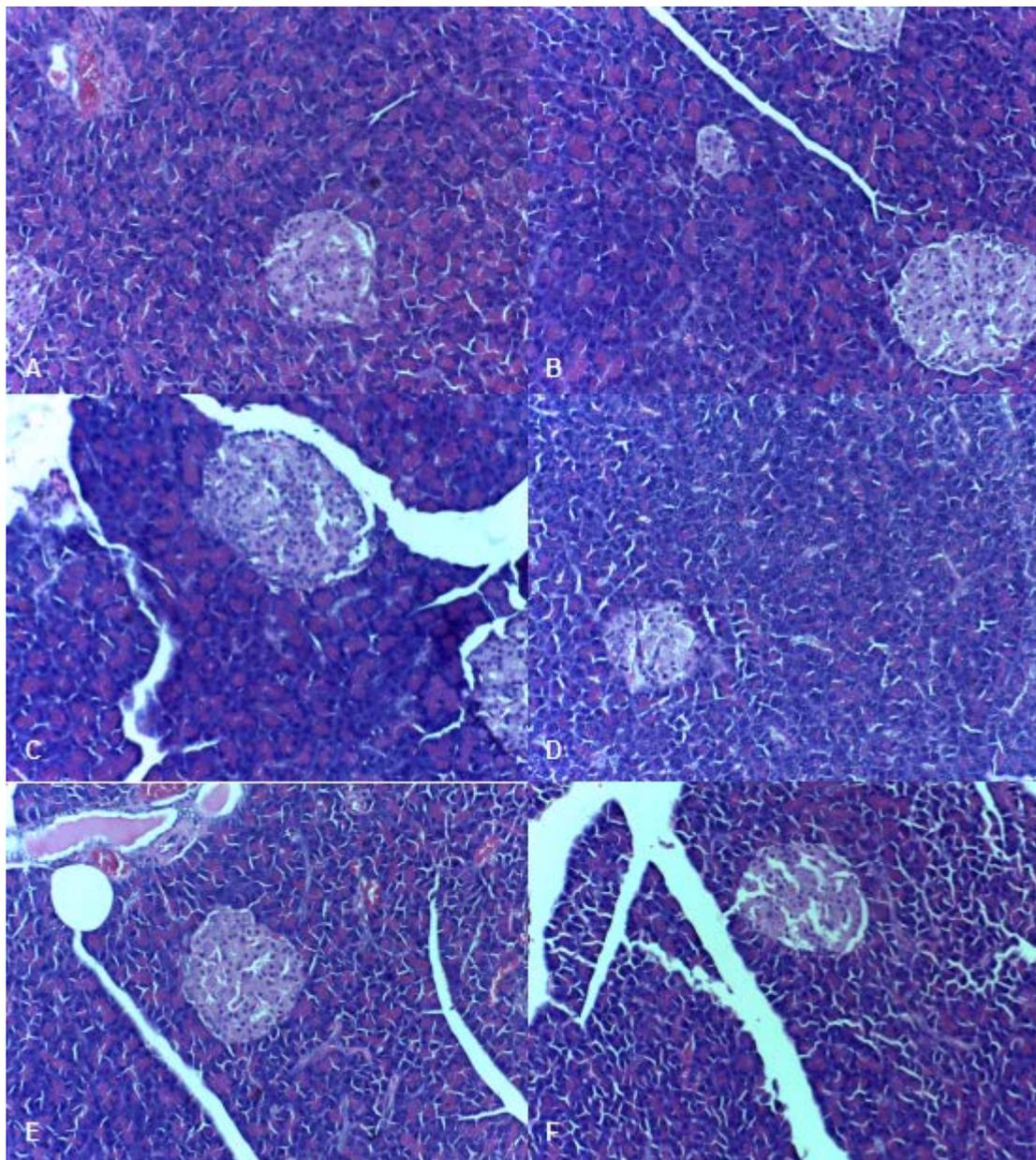
  
Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.  
Coordenador Científico da CCPq

  
Profa. Dra. Rosa Maria B. Nogueira  
Coordenadora do CEP - UNOESTE

**Anexo 2 – Fotomicroscopia da próstata.**

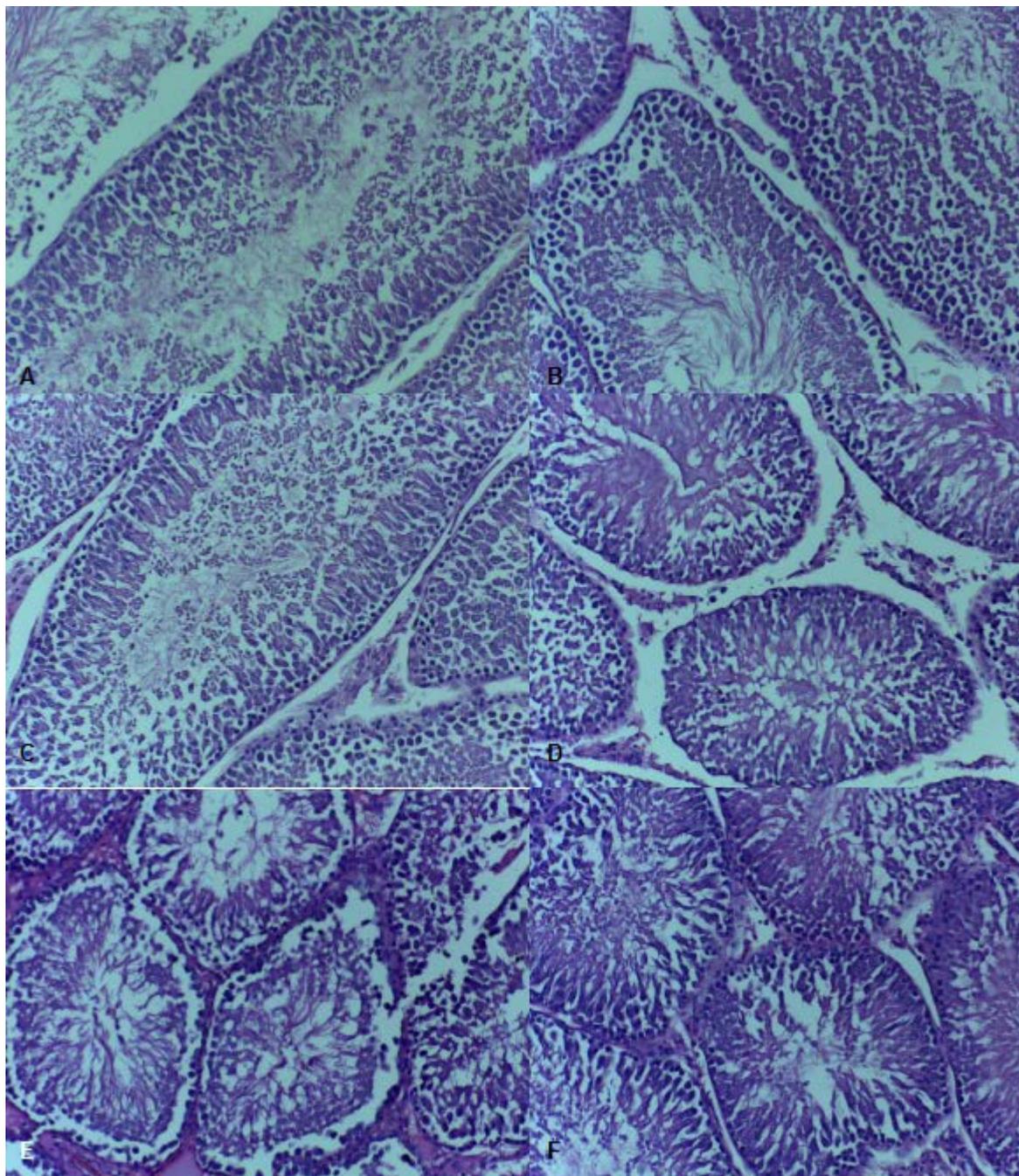
A – Próstata com hiperplasia nodular e vesícula seminal (seta) sem alterações - animal do Grupo C (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). B – Fotomicroscopia da próstata com hiperplasia nodular de animal do Grupo D (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). C – Fotomicroscopia da próstata com hiperplasia nodular de animal do Grupo E (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). D – Fotomicroscopia da próstata com hiperplasia nodular de animal do Grupo F (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x).

**Anexo 3 – Fotomicroscopia do pâncreas sem alterações em todos os grupos (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x).**



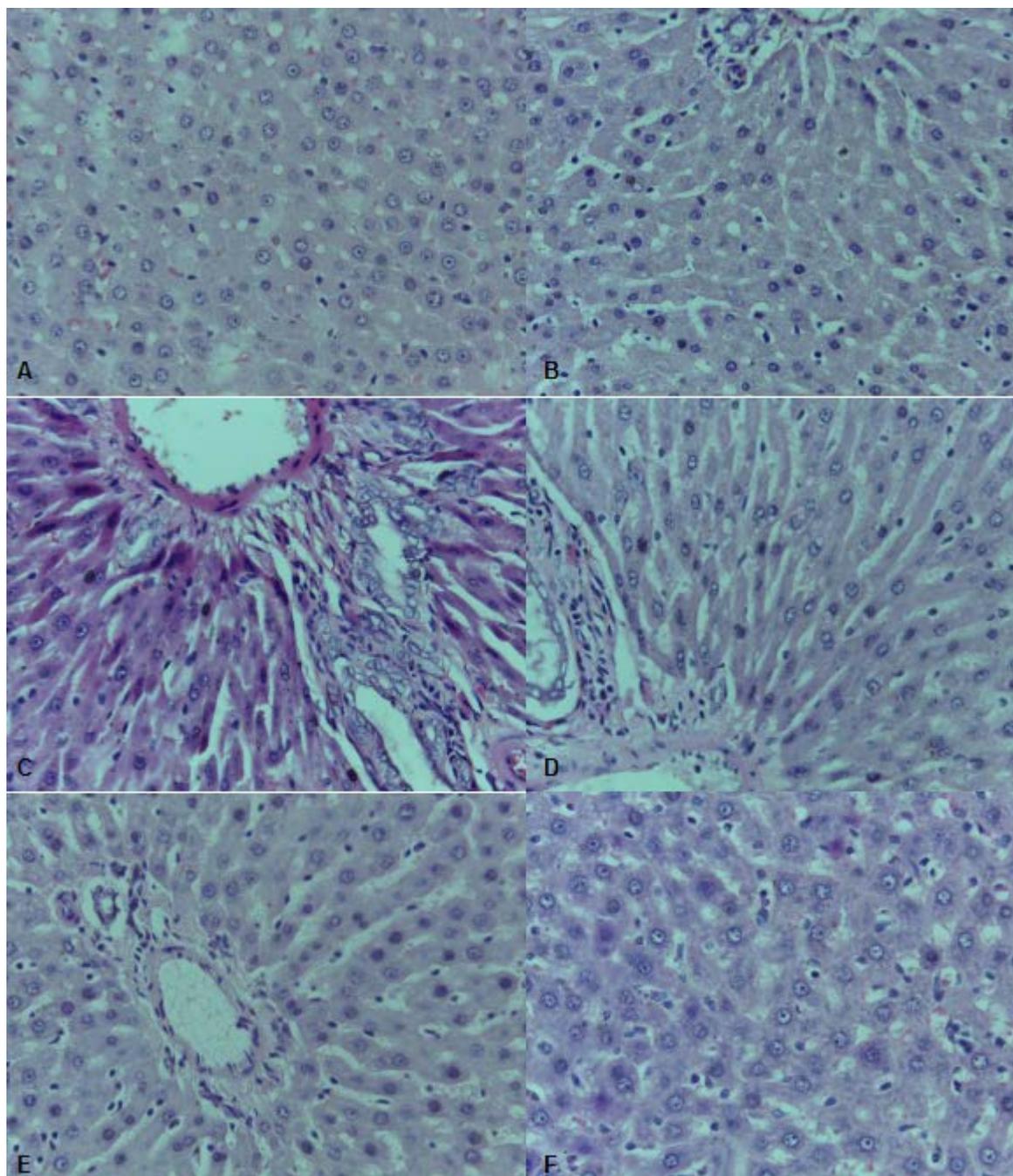
A – animal do grupo A. B – animal do grupo B. C – animal do grupo C. D – animal do grupo D. E – animal do grupo E. F – animal do grupo F.

**Anexo 4 – Fotomicroscopia do testículo sem alterações em todos os grupos (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x).**



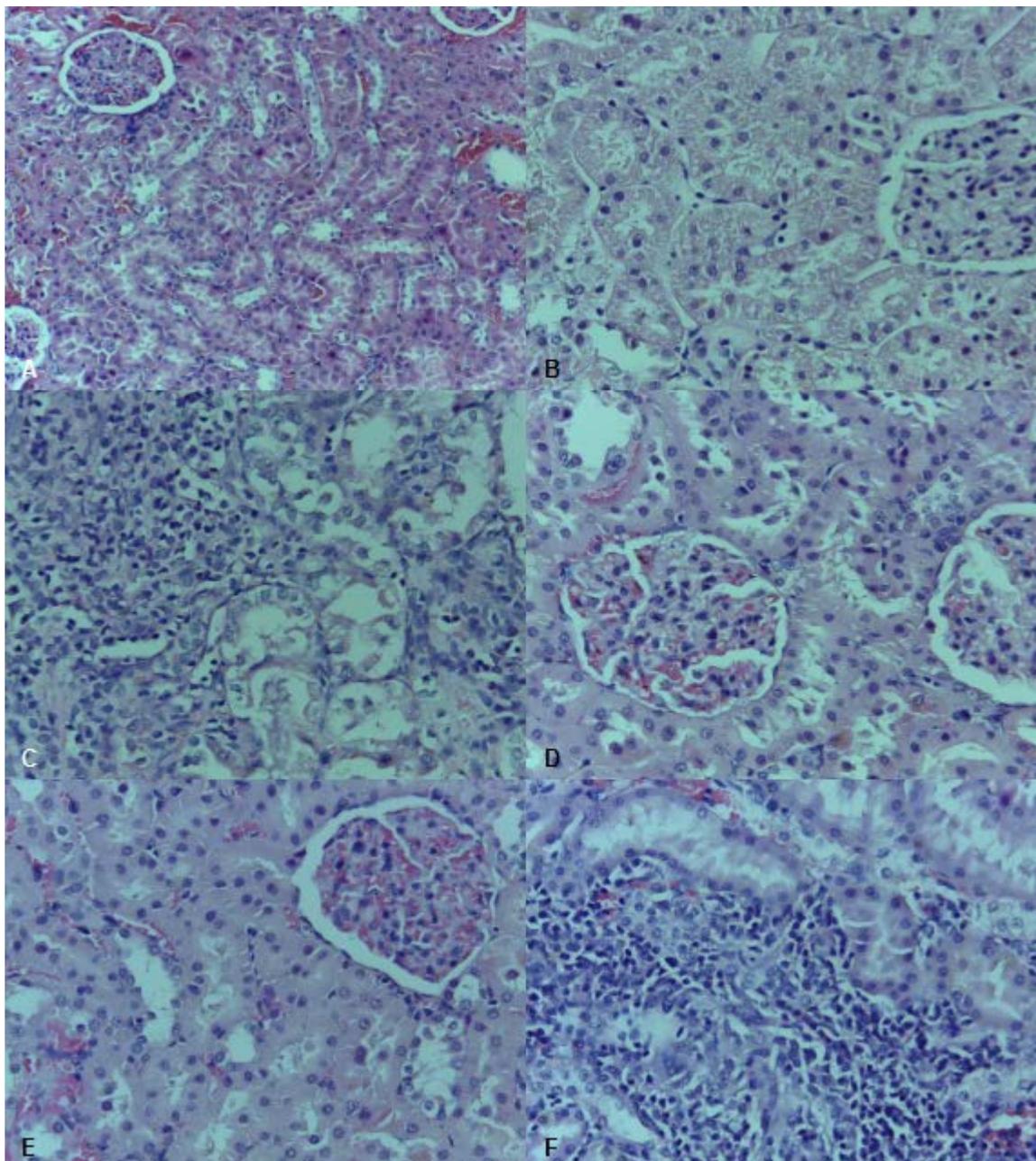
A – animal do grupo A. B – animal do grupo B. C – animal do grupo C. D – animal do grupo D. E – animal do grupo E. F – animal do grupo F.

**Anexo 5 – Fotomicroscopia do fígado mostrando ausência de neoplasia em todos os grupos (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x).**



A – animal do grupo A. B – animal do grupo B. C – animal do grupo C. D – animal do grupo D. E – animal do grupo E. F – animal do grupo F.

**Anexo 6 – Fotomicroscopia do rim mostrando ausência de neoplasia em todos os grupos (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x).**



A – animal do grupo A. B – animal do grupo B. C – animal do grupo C. D – animal do grupo D. E – animal do grupo E. F – animal do grupo F.

**Anexo 7 – Normas de publicação da revista científica a qual o artigo será submetido.**



ISSN 1676-2444 *versão impressa*

ISSN 1678-4774 *versão online*

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPMML), continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, de periodicidade bimestral (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro), é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) e da Sociedade Brasileira de Citopatologia (SBC). É indexado no Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), no Periódica e no Chemical Abstracts e é integrante da base de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO). Destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias: artigos originais, de revisão, de atualização, experimentais, relatos de caso, comunicações breves e cartas aos editores. Os trabalhos podem ser submetidos no idioma inglês.

### **Análise dos trabalhos**

O manuscrito recebido será enviado para, pelo menos, dois avaliadores independentes, pares científicos, de renome e com conhecimento específico na área contemplada pelo artigo. Após análise pelos avaliadores, o editor-chefe do JBPMML entrará em contato com o autor principal comunicando os passos a serem seguidos na aceitação do trabalho para publicação ou sua eventual rejeição.

### **Direitos autorais**

Os autores devem enviar um termo de responsabilidade, assumindo formalmente a autoria do trabalho e oficializando a transferência de direitos autorais (copyright transfer statement).

O Sistema de Gestão de Publicações (SGP) do JBPMML possui o modelo desse documento e as instruções para preenchê-lo e enviá-lo.

## Ética

Estudos realizados com seres humanos, incluindo órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (<http://www.bioetica.ufrgs.br/res19696.htm>). O trabalho a ser publicado deverá ser acompanhado de certificado de aprovação do Comitê de Ética da Instituição onde foi realizada a pesquisa, em consonância com a Declaração de Helsinki, 1989 (<http://www.bioetica.ufrgs.br/helsin4.htm>).

Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, devem ser respeitados os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C., 1996).

As drogas e substâncias químicas eventualmente utilizadas na realização do trabalho devem ser identificadas com precisão.

Não devem ser utilizados nomes ou iniciais do paciente nem informados nomes comerciais, de empresas e/ou registros de hospitais.

## Resumos e unitermos

Independentemente do idioma no qual o trabalho foi escrito, devem constar dois resumos: um em português (Resumo) e outro em inglês (Abstract). Os resumos devem identificar os objetivos, os procedimentos e as conclusões do trabalho (máximo de 250 palavras para artigos originais, artigos de revisão e artigos de atualização; e máximo de 100 palavras para relatos de caso e comunicações breves). Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver um resumo também nesse idioma.

Os unitermos, palavras que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de três a seis, utilizando o vocabulário controlado Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da BIREME, acrescidos de outros termos, quando necessário. Devem ser apresentados em português e inglês. Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver descritores também nesse idioma.

## Agradecimentos

Devem ser breves, diretos e dirigidos apenas à pessoa ou à instituição que contribuiu substancialmente para a elaboração do trabalho. Devem ser incluídos após as conclusões e antes das referências bibliográficas.

## **Estrutura do texto**

### **Artigos originais**

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original, inédita, que possam ser replicados ou generalizados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências bibliográficas devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir.

### **Comunicações breves**

São relatos curtos que devem apresentar: 1) dados de estudos preliminares com achados sugestivos que garantam uma investigação mais definitiva; 2) estudos de replicação; e 3) estudos negativos de tópicos importantes. Esses artigos devem ter até 1.500 palavras, incluir resumo não-estruturado e, no máximo, uma tabela ou figura, além das referências bibliográficas.

### **Artigos de revisão**

Serão aceitos apenas mediante convite.

Avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto, devem incluir conclusões e ter até 5 mil palavras. A organização do texto, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses artigos, exige-se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.

### **Artigos de atualização**

São trabalhos descritivos e interpretativos baseados na literatura recente sobre a situação global em que se encontra determinado assunto. Devem conter até 3 mil palavras. A estrutura do texto fica a critério do autor, mas deve haver um resumo não-estruturado no idioma do texto e outro em inglês, além de referências bibliográficas.

### **Relatos de caso**

São trabalhos de observações clinicolaboratoriais originais, acompanhados de análise e discussão. Devem conter até 1.500 palavras. A estrutura deve apresentar, no mínimo, os seguintes tópicos: Introdução, Relato(s) dos(s) caso(s) e Discussão. Incluir um resumo não-estruturado no idioma do texto e outro em inglês.

### **Cartas aos editores**

Inclui cartas que visam a discutir artigos recentes publicados na revista ou a relatar pesquisas originais ou achados científicos significativos. Cartas breves, com no máximo 500 palavras (incluindo referências, sem tabelas ou figuras), serão consideradas se

estiver explícita a frase "para publicação".

## Referências

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, em ordem alfabética numerada. Devem seguir as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR-6023 (agosto 2000). Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores.

Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

### Exemplos:

- Artigos de periódicos (um só autor)  
COTRIM, F. L. S. Coleta de sangue para dosagem de triglicerídeos. *J Bras Patol*, v. 33, n. 4, p. 201-02, 1997.
- Artigos de periódicos (mais de três autores)  
ABREU, E. S. *et al.* Doença de Hodgkin infanto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com o vírus Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análise morfológica imuno-histoquímica e por hibridização in situ. *J Bras Patol*, v. 33, n. 4, p. 178-84, 1998.
- Artigo de periódico *on-line*  
YAZLE, J. S. R. *et al.* Assistência hospitalar como indicador da desigualdade social. *Rev Saúde Publ*, São Paulo, v. 31, n. 5, 1997. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/rsp>. Acesso em: 23 mar. 1998.
- Livros no todo (dois autores)  
RINGSVEN, M. K.; BOND, D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. Albany, N.Y.: Delmar Publishers, 1996.
- Capítulos ou parte de livro editado por outro autor  
SCIVOLETO, R. Sistema nervoso autônomo. *In: ZANINI, A. C.; OGA, S. Farmacologia aplicada*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. Cap. 9; p. 97-141.
- Parte de livro em meio eletrônico  
SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. *In: \_\_\_\_\_ Entendendo o meio ambiente*. São Paulo, 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>. Acesso em: 8 mar.1999.
- Evento em meio eletrônico  
SILVA, R. N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total da educação. *In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE*, 4., 1996, Recife. *Anais eletrônicos...* Recife: UFPe, 1996. Disponível em: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/educ/ce04.htm>. Acesso em:

21 jan.1997.

- Tese ou dissertação  
OLIVEIRA, C. M. *Isolamento e caracterização de estreptococos de placa dental*. Rio de Janeiro, 1974. Tese (doutoramento) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Citações no texto  
Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão *et al.*, como, por exemplo, Higashi *et al.*

## **Tabelas e figuras**

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não-repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

O SGP aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png.

## **Abreviações e nomes de medicamentos**

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não-disponíveis para prescrição.

As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parênteses.

## **Contato com a secretaria do JBPML**

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial  
Tel.: (21) 3077-1400  
e-mail: [jbpml@sbpc.org.br](mailto:jbpml@sbpc.org.br)

## Como submeter um artigo ao JPBML

Como submeter um artigo ao JPBML

1. Entre em [www.jpml.org.br](http://www.jpml.org.br).

2. Se você já é cadastrado, digite seu login e sua senha e clique no botão "Entrar no SGP".

Se ainda não é cadastrado, clique em "Quero me Cadastrar".

3. Primeiro passo: no campo "Informe seu Email", cadastre o e-mail que será usado para receber os avisos e informações do Sistema de Gestão de Publicações (SGP). Clique em "Continuar cadastro".

4. Segundo passo: preencha os campos do cadastro. Atenção: os campos marcados com \* são obrigatórios.

Clique em "Continuar cadastro". Aparecerá a mensagem "Seu cadastro no SGP foi concluído com sucesso". Um e-mail com o login e a senha informados será enviado para seu endereço cadastrado.

Nesta mesma página, clique em "Voltar".

5. Você será encaminhado à página inicial do SGP, com login e senha. Nesta página, digite o login e a senha que você cadastrou e clique em "Entrar no SGP".

Obs.: o login e a senha estão no e-mail que o SGP lhe enviou no final do seu cadastro.

6. Na página de abertura do SGP aparece uma mensagem informando ser esta a primeira vez que você acessa o sistema. Caso contrário, a mensagem informa quantas vezes já o acessou, data e hora do último acesso e que você tem acesso com nível de autor.

7. Observe o menu do lado esquerdo da tela. Se você ainda não submeteu nenhum artigo pelo SGP, todos os itens do menu estão indicados com quantidade "zero".

8. Para submeter um artigo, clique em "Submeter novo artigo para Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial".

9. Janela "Passo 1": informar a classificação do artigo (manuscrito):

- Artigo de revisão
- Artigo original
- Carta ao editor
- Comunicação breve
- Relato de caso

Clique na opção correspondente à classificação do artigo. Por exemplo: Artigo original.

10. Janela "Passo 2": anexar imagens e/ou gráficos usados no artigo. Todas as imagens e/ou gráficos devem estar em um dos seguintes formatos: jpg, gif, png, pdf ou tif.

Após anexar imagens/gráficos, clique em "Enviar imagens". Caso o artigo não tenha imagens, clique em "Não necessito enviar imagens".

11. Nesta janela o autor pode conferir as imagens que enviou e enviar mais. Caso não tenha enviado imagens, aparecerá a mensagem "Nenhuma imagem foi enviada pelo autor".

Clique em "Próximo".

12. Janela "Passo 3": inserir/editar/excluir novos co-autores.

Para cada novo co-autor devem ser preenchidos os campos "Nome", "Titulação", "Cargo" e, opcionalmente, CPF (pedido para posteriormente gerar o termo de Copyright, que garante os direitos autorais).

A ordem de importância dos autores pode ser alterada clicando nas setas amarelas (para cima ou para baixo). O primeiro nome será considerado o autor principal, e os demais, co-autores.

Após inserir/editar/excluir novos co-autores, clique em "Gravar" e em "Próximo".

Se não houver novos co-autores, clique em "Próximo".

13. Janela "Passo 4": preencher com o título do artigo e descritores (palavras-chave ou key words). Essas informações devem ser escritas na língua nativa do autor (por exemplo, português ou espanhol) e em inglês.

Clique em "Próximo".

14. Janela "Passo 5": preencher com o resumo (abstract). O autor também pode incluir informações adicionais, como o nome da instituição, nome e endereço para correspondência e se recebeu suporte financeiro.

Também é possível redigir uma Carta ao Editor contendo informações adicionais que considere importantes. Somente o editor terá acesso a esta carta. Clique em "Próximo".

15. Janela "Passo 6": redigir o artigo propriamente dito. É fornecido um editor de texto com os comandos necessários para formatação. É possível "colar" um texto já escrito e formatado em MS Word. Clicar em "Próximo".

16. Janela "Passo 7": Transferência de Declaração de Direitos Autorais (Copyright Transfer Statement). Preencher os campos solicitados, imprimir e enviar para a SBPC/ML pelo fax (21) 2205-3386. Clicar em "Próximo".

17. Janela "Passo 8": formato de visualização do artigo (html ou pdf). Nesta janela, o autor decide se vai submeter o artigo ou vai excluí-lo e desistir de fazê-lo.

18. Janela "Concluído": indica que você terminou o processo de submissão do artigo.

19. Você receberá um e-mail comunicando que o artigo foi submetido a avaliação.