

A biopersistência do amianto crisotila brasileiro por inalação.

David M. Bernstein^{1a}, Rick Rogers², Paul Smith³

¹ Consultor em Toxicologia, Genebra, Suíça;
² da Rogers Imaging Corporation, Needham, Massachusetts;
³ da Research & Consulting Company Ltd., Füllinsdorf, Suíça

Resumo

Com o entendimento inicial da relação entre amianto e doença, pouca informação se dispunha quanto a se os dois diferentes grupos do mineral chamado amianto tinham potenciais iguais ou diferentes de causar doença.

Ele é normalmente descrito como sendo uma fibra resistente, que, se inalada, poderia permanecer no pulmão e causar doenças. E foi apenas com o recente desenvolvimento de um protocolo padronizado para a avaliação da biopersistência de fibras minerais no pulmão que se demonstrou que a cinética de depuração da crisotila é completamente diferente da apresentada pelos anfíbolos, sendo a crisotila rapidamente eliminada do pulmão. Além disso, estudos epidemiológicos também apontaram diferenças entre o amianto crisotila e o anfíbólio.

Os estudos sobre biopersistência mencionados anteriormente indicaram que, após inalada, a crisotila do Canadá e da Califórnia eram rapidamente eliminadas do pulmão. No entanto, observaram-se variações na mineralogia da crisotila de região para região. Esse fato costuma estar mais associado às variações das forças que criaram as fibras do minério centenas de anos atrás. No presente estudo, foram avaliados a dinâmica e o índice de eliminação da crisotila oriunda da mina de Cana Brava (na região centro-oeste do Brasil) em um estudo de biopersistência por inalação em ratos.

Em fibras vítreas sintéticas, notou-se que a biopersistência de fibras maiores que 20 µm estava diretamente relacionada à causa de doenças em potencial. O estudo teve como objetivo determinar a depuração pulmonar (biopersistência), além da translocação e distribuição internas. Como as fibras mais longas têm mostrado maior potencial patogênico, optou-se por usar amostras³ de crisotila com mais de 450 fibras/cm³ maiores que 20 µm em exposição por aerossol.

1) Estudo de depuração de fibra (digestão pulmonar): Ao dia 1, 2 ou 7, semana 2, meses 1, 3, 6 ou 12 após 5 dias (6 horas diárias) de exposição por inalação, os pulmões dos animais foram digeridos a baixa temperatura e o resíduo, posteriormente analisado por microscopia de transmissão de elétrons (na GSA Corp.) para se determinar o número total de fibras de crisotila encontradas, bem como a sua distribuição por tamanho (comprimento e diâmetro) nos pulmões. Esse procedimento de digestão pulmonar atinge todo o pulmão sem que haja possibilidades de identificar em quais locais as fibras estão localizadas. 2) Estudo sobre a distribuição das fibras (microscopia confocal): Incluiu-se esse procedimento para que fosse possível identificar a localização das fibras no pulmão. Após 2 dias, 2 semanas, 3, 6 e 12 meses de exposição, os pulmões dos grupos de animais foram analisados usando-se microscopia confocal com o objetivo de determinar o local anatômico, a orientação e a distribuição das fibrilas de crisotila retidas nas vias respiratórias e as fibras translocadas para o tecido linfóide associado ao brônquio (BALT) subjacente aos bronquíolos dos pulmões dos ratos

^a Este estudo foi realizado com o apoio da SAMA Mineração de Amianto LTDA.
O endereço para correspondência do Dr. David M. Bernstein, Consultor em Toxicologia, é 40 chemin de la Petite-Boissière, 1208 Genebra, Suíça. E-mail: davidb@itox.ch

Dado isso, se as fibras forem removidas desses tecidos, elas estarão efetivamente neutralizadas no pulmão. Embora a translocação das fibras para o BALT e o tecido linfático seja considerada importante – como nos casos de doenças humanas relacionadas a amianto –, não há relatos, na literatura médica, de alterações patológicas no BALT e no tecido linfático causadas por amianto (3, 4).

Observou-se que a crisotila é removida rapidamente do pulmão. Fibras maiores que 20 μm foram depuradas em um tempo médio de 1,3 dias, mais provavelmente por dissolução e quebra em fibras menores. As fibras menores também foram rapidamente depuradas do pulmão – com fibras de 5 a 20 μm sendo depuradas ainda mais rapidamente ($T_{1/2} = 2,4$ dias) do que as de < 5 μm de comprimento ($T_{1/2} = 23$ dias). Esperava-se que a divisão das fibras maiores aumentasse o número das menores, o que poderia ser o responsável por essa diferença nos índices de depuração. Essas fibras menores jamais foram encontradas em grupo, e sim de forma separada, em fibrilas inteiras (às vezes, desenroladas em uma das extremidades). As fibras menores, livres, se encontravam nos cantos do septo alveolar, ao passo que as fibras maiores, ou seus fragmentos, estavam nos macrófagos alveolares. O mesmo se deu com as fibras no tecido linfático, à medida que apareciam livres ou em linfócitos fagocíticos. Esses resultados sustentam as evidências demonstradas por McDonald e McDonald (1997) de que as fibras de crisotila, são depuradas (eliminadas) rapidamente do pulmão ao contrário das fibras de anfíbólio, que persistem.

A biopersistência do amianto crisotila no Brasil em decorrência de inalação.

David M. Bernstein^{1a}, Rick Rogers², Paul Smith³

¹ Consultor em Toxicologia, Genebra, Suíça;
² da Rogers Imaging Corporation, Needham, Massachusetts;
³ da Research & Consulting Company Ltd., Füllinsdorf, Suíça

Com o entendimento inicial da relação entre amianto e doença, pouca informação se dispunha quanto a se os dois diferentes minerais chamados amianto tinham potenciais iguais ou diferentes de causar doença.

Eles são normalmente descritos como sendo uma fibra resistente, que, se inalada, poderia permanecer no pulmão e causar doenças. E foi apenas com o recente desenvolvimento de um protocolo padronizado para a avaliação da biopersistência de fibras minerais no pulmão (Bernstein & Riego-Sintes, 1999) que se demonstrou que a cinética de depuração da crisotila é completamente diferente da apresentada pelos anfíbolios, sendo a crisotila rapidamente eliminada do pulmão (Bernstein et al., 2003 a & b). Além disso, estudos epidemiológicos recentes também apontaram as diferenças entre o amianto crisotila e o anfíbolio (Hodgson & Darnton, 2000; & Berman & Crump, 2004).

Os estudos sobre biopersistência mencionados anteriormente indicaram que, após ser inalada, a crisotila proveniente do Canadá e da Califórnia era rapidamente depurada do pulmão. No entanto, observaram-se variações na mineralogia da crisotila de região para região. Esse fato costuma estar mais associado às variações das forças que criaram as fibras do minério centenas de anos atrás. No presente estudo, foram avaliados a dinâmica e o índice de depuração da crisotila oriunda da mina de Cana Brava (na região centro-oeste do Brasil) em comparação com um estudo feito em ratos sobre biopersistência posterior à inalação.

Assim como em outros estudos sobre a biopersistência da crisotila, o protocolo deste estudo foi elaborado para atender às recomendações específicas do Protocolo Interim para a Biopersistência por Inalação de fibras vítreas sintéticas da Comissão Européia (Bernstein & Riego-Sintes, 1999). Em fibras vítreas sintéticas, notou-se que a biopersistência superior a 20 µm estava relacionada à causa de doenças em potencial (Bernstein, 1998; Bernstein et al., 2001 a&b). Conforme descrição abaixo, as especificações do protocolo para a contagem e a classificação por tamanho das fibras foram modificadas para que abrangessem as dimensões menores das fibras de crisotila em relação às minerais. Além disso, a disposição das fibras no pulmão também foi determinada usando-se microscopia confocal.

MÉTODOS

As fases de exposição e de análise do estudo foram realizadas na Research and Consulting Company Ltd., em Füllinsdorf, Suíça. Já a contagem e a classificação por tamanho das fibras foram feitas mediante contrato RCC na Gesellschaft für Staubmesstechnik und Arbeitsschutz GmbH (GSA), em Neuss, Alemanha. A análise por microscopia confocal foi feita pela Rogers Imaging Corporation, em Needham, Massachusetts, EUA.

Características da amostra de crisotila

As fibras de crisotila usadas neste estudo foram obtidas na Mina de Cana Brava, localizada em Minaçu, no estado brasileiro de Goiás. Em relação à estrutura cristalina, essa fibra é monoclinica, além de possuir uma estrutura cilíndrica singular a ser descrita posteriormente. Na mina, há fibras de todos os tamanhos, indo de 'longas' (maiores do que 10 mm: classificações 4T, 4K, 4A e 3T na Escala de Screening Canadense de Quebec (QSS), Cossette & Delvaux, 1979), passando por 'médias' (fibras entre 5 e 9 mm: classificadas pela QSS como 4X, 4Z e 5K) até 'curtas' (com menos de 5 mm: de acordo com a QSS, 5R, 6D, 7M e 7T).

A composição química e a estrutura da crisotila são reconhecidamente diferentes das de anfibólios como a tremolita ou a amosita (Hodgson, 1979).

| Composto | Crisotila1 | Tremolita2 | Amosita2 |
|--------------------------------|------------|------------|----------|
| SiO ₂ | 40.90 | 55.10 | 49.70 |
| Al ₂ O ₃ | 5.88 | 1.14 | 0.40 |
| Fe ₂ O ₃ | 6.85 | 0.32 | 0.03 |
| FeO | | 2.00 | 39.70 |
| MnO | | 0.10 | 0.22 |
| MgO | 34.00 | 25.65 | 6.44 |
| CaO | traço | 11.45 | 1.04 |
| K ₂ O | 0.02 | 0.29 | 0.63 |
| Na ₂ O | 0.03 | 0.14 | 0.09 |
| H ₂ O ⁺ | * | 3.52 | 1.83 |
| H ₂ | * | 0.16 | 0.09 |
| CO ₂ | * | 0.06 | 0.09 |
| *Perda de ignição | 12.20 | | |
| Total | 99.95 | 99.93 | 100.26 |

Tabela 1: Composição química padrão (%)

1. Mina de Cana Brava
2. Hodgson (1979); pp. 80-81

* H₂O⁺, H₂ e CO₂ foram agrupados como perda de ignição na análise.

A estrutura química da crisotila contém uma camada de silicato de composição $(\text{Si}_2\text{O}_5)_n^{2n-}$, na qual três dos átomos O (oxigênio) de cada tetraedro são compartilhados com os tetraedros adjacentes e uma camada sem silicato da composição $[\text{Mg}_3\text{O}_2(\text{OH})_4]_n^{+2n}$. Na crisotila, as distâncias entre os oxigênios apicais em uma camada regular (ideal) de silicato são mais curtas (0,305 nm) do que as distâncias entre O e O na camada ideal que contém Mg (0,342 nm), o que pode ser responsável pelas camadas irregulares que causam cavidades concêntricas cilíndricas similares a um carpete (Skinner, et al., 1988). Essa estrutura é mostrada na Figura 1a (Speil e Leineweber, 1969), enquanto a micrografia de transmissão de elétrons da crisotila proveniente de Cana Brava é mostrada na Figura 1b (Kiyohara, 1991). Por estar no lado externo da ondulação, a molécula de Mg fica exposta ao ambiente.

Figure 1a Illustration of the layered structure of chrysotile
(Speil and Leineweber (1969), Figure 5, p. 169)

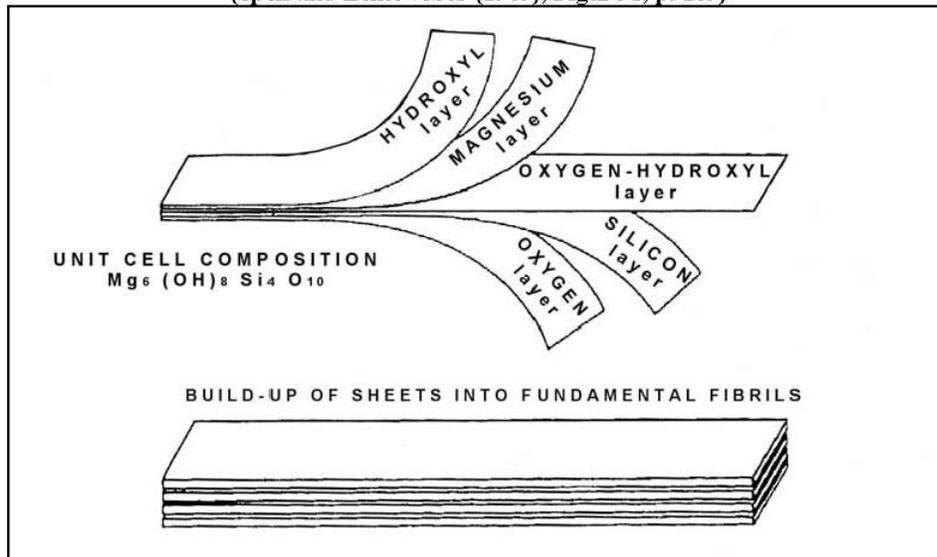
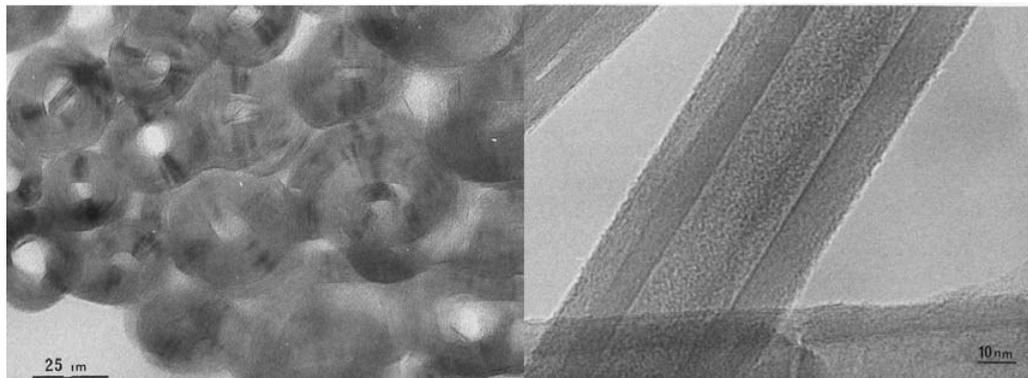
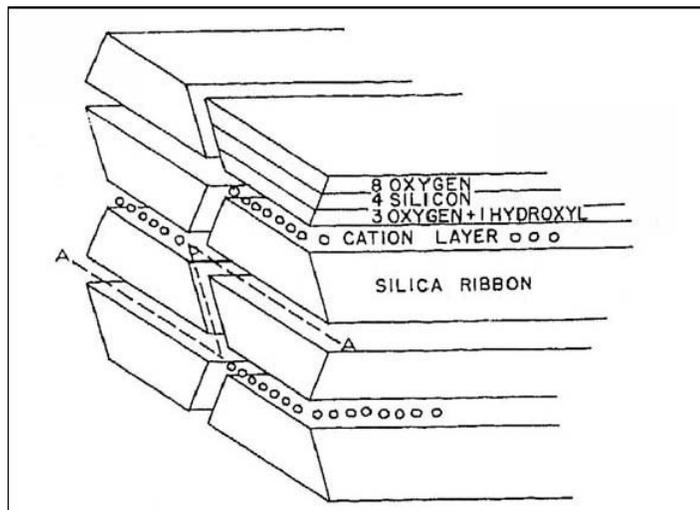


Figura 1b



Por outro lado, em anfibólios como a tremolita, a forma da estrutura básica é de um feixe 'I' com um tetraedro (SiO_4)⁻⁴ com ligações nos vértices para uma cadeia tetraédrica dupla que recobre uma camada de Ca_2Mg_5 . Ao contrário do que acontece com a crisotila, na tremolita, o Mg fica preso em uma estrutura em feixe 'I'. Isso é mostrado na Figura 2.

Figura 2 (reprodução de Speil e Leineweber (1969), Figura 9, p. 174)



Escolha da Crisotila:

Antes do início da exposição, realizou-se um Teste de Geração de Aerossol (Projeto RCC 634048) nas amostras de 4 classificações comerciais de crisotila – todas das principais produções. Os objetivos desse teste eram o de escolher a classificação de fibra de crisotila que tivesse a maior fração de fibras com mais de 20 μm e o de assegurar que a amostra pudesse receber o aerossol de maneira uniforme. Os resultados desses testes encontram-se na Tabela 2. Os valores para CA300 foram escolhidos para o estudo sobre biopersistência como os que mais bem atendiam aos critérios indicados acima.

Tabela 2: Resumo dos resultados obtidos com os testes de geração de aerossol.

| | CA 600 | CA 500 | CA 400 | CA 300 |
|--|---------------|--------|--------|--------------|
| PRIMEIRA GERAÇÃO DE AEROSSOL | | | | |
| Concentração obtida (mg/m ³) | 6.3 | 12.6 | 6.9 | 9.0 |
| SEGUNDA GERAÇÃO DE AEROSSOL | | | | |
| Concentração obtida (mg/m ³) | não realizada | 2.2 | 9.0 | 8.3 |
| Número total de fibras/cm ³ | 12968 | 8743 | 23435 | 28990 |
| Número de fibras WHO/cm ³ | 2977 | 1935 | 5364 | 7648 |
| Número de fibras WHO maiores que 20 μm /cm ³ | 595 | 358 | 1875 | 3132 |
| Porcentagem de fibras WHO/total de fibras | 23 % | 22 % | 23 % | 26 % |
| Porcentagem de fibras longas/total de fibras | 5 % | 4 % | 8 % | 11 % |
| Porcentagem de fibras longas/fibras WHO | 20 % | 19 % | 35 % | 41 % |

Projeto Experimental

O projeto experimental da análise e da biopersistência, já apresentado em detalhes anteriormente (Bernstein

et al., 1994; Bernstein et al, 2003a&b), encontra-se resumido abaixo. Em especial, por serem considerados essenciais a uma interpretação correta desses estudos, os detalhes da contagem e os procedimentos para a classificação por tamanho são reiterados.

Exposição Animal: Grupos de 56 ratos machos (Fischer 344), de 4 até 8 semanas de vida (qualidade SPF), foram expostos a uma concentração de fibras, por aerossol (somente por vias respiratórias), de 450 fibras/cm³ L>20 µm durante 6 horas diárias por 5 dias consecutivos. Essa concentração correspondia a três vezes o valor exigido pelo Protocolo de Biopersistência da CE (Bernstein e Riego-Sintes, 1999), para que se pudesse esclarecer qualquer dúvida quanto à exposição suficiente por fibras longas e em relação à maior concentração dessas fibras já relatada em um estudo feito com roedores. Além disso, um grupo controle negativo foi exposto de forma similar ao ar filtrado. Para que se pudesse comparar este a estudos sobre inalação de fibra, atuais e anteriores, usaram-se ratos Fischer 344 [CDF (F-344)/CrIBR] do Charles River Laboratories (Kingston, Nova York, EUA).

Sistema de Exposição: O sistema de geração de aerossol com as fibras foi elaborado para armazenar as fibras em grande quantidade sem quebrar, danificar ou contaminá-las (Bernstein et al. (1994)). Os animais foram expostos a um sistema de inalação apenas por vias respiratórias. Esse sistema foi derivado de Cannon, et al. (1983), sendo diferente dos sistemas de exposição respiratórios convencionais na medida em que o aerossol fresco com as fibras é aplicado a cada animal individualmente e o ar exalado, imediatamente exaustado.

Depuração da fibra: Em 1, 2 ou 7 dias, 2 semanas, 1, 3, 6 ou 12 meses após a exposição, os pulmões dos animais foram digeridos a baixa temperatura e os resíduos posteriormente analisados pelo microscópio de transmissão de elétrons (na GSA Corp.) para se determinar o número total de fibras de crisotila encontradas, bem como a sua distribuição (em termos de comprimento e diâmetro) nos pulmões. Esse procedimento de digestão pulmonar atinge todo o pulmão sem que haja possibilidades de identificar em quais locais as fibras estão localizadas.

Distribuição da fibra: Usou-se esse procedimento para determinar a distribuição das fibras em vários compartimentos pulmonares. Em 2 dias, 2 semanas, 3, 6 e 12 meses após a exposição, os pulmões dos animais foram preparados e analisados por microscopia confocal. Estudaram-se tanto os locais em que as fibrilas de crisotila se encontram nas vias respiratórias quanto as fibras translocadas para o tecido linfóide associado ao brônquio (BALT) em relação aos bronquíolos.

Análise da Digestão Pulmonar de Fibra/Partícula:

Em 7 ratos por grupo por tempo no grupo de exposição CA300 e em outros 7 ratos do grupo de exposição de controle do ar a cada 1 dia, 1, 6 e 12 meses, os pulmões eram descongelados e preparados para análise. O tecido era inicialmente desidratado, aplicando-se secagem por congelamento (secador por congelamento Edwards EF4 Modulyo) até atingir um peso constante, suficiente para se determinar o peso do tecido seco. O plasma do tecido seco era queimado em uma unidade de plasma com várias câmaras LFE™ LTA 504 com uma potência de 300 watts por, pelo menos, 16 horas. Após a remoção da unidade, os resíduos dos pulmões eram pesados e suspensos em uma solução de 10 ml de metanol em um banho ultra-sônico de baixa intensidade. Em seguida, a suspensão era transferida para uma garrafa de vidro com a solução de enxágüe de combustão e o volume em 20 ml. Então se removia uma parte e filtrava-a usando um filtro de policarbonato revestido a ouro (o tamanho do poro é de 0,2 µm).

Validação:

Os procedimentos de análise usados na recuperação da fibra (digestão pulmonar e microscopia de transmissão de elétrons) foram validados de acordo com uma análise comparativa independente com microscopia confocal, não-invasiva (analisou-se um cubo do pulmão em três dimensões), e não aparentaram ter influência no tamanho ou no número de fibras medidas.

Regras de contagem para a avaliação das amostras de ar e do pulmão por meio da microscopia de transmissão de elétrons:

Foram consideradas todas as fibras visíveis a uma ampliação de 10.000x. Todos os objetos vistos nesse parâmetro não apresentavam limites superiores ou inferiores aos impostos no que se referia a comprimento e diâmetro. O comprimento bivariado e diâmetro foi registrado de forma individual para cada objeto avaliado. As fibras foram definidas como qualquer objeto que tivessem uma proporção de pelo menos 3:1. O diâmetro foi determinado de acordo com a maior largura do objeto. Todos os demais objetos foram considerados partículas não-fibrosas.

As regras de parada para a contagem em cada amostra foram definidas da seguinte forma: Para partículas não-fibrosas, interrompeu-se o registro de partículas quando já havia 30 partículas recolhidas. Já para as fibras, isso aconteceu quando havia 500 fibras com comprimento de $\geq 5 \mu\text{m}$, diâmetro de $\leq 3 \mu\text{m}$ (WHO, 1985) ou um total de 1000 fibras e partículas não-fibrosas. Caso esse número de fibras não fosse alcançado após a avaliação de $0,15 \text{ mm}^2$ de superfície de filtro, outros campos na visualização eram contados até que houvesse 500 fibras WHO ou um total de 5 mm^2 de superfície de filtro avaliada, mesmo que não se alcançasse um total de 500 fibras WHO passíveis de contagem. A avaliação de fibras curtas ($< 5 \mu\text{m}$) era interrompida quando se atingiam 100 fibras desse tipo.

Imagens Confocais das Fibras e do Tecido Pulmonar.

Os pulmões dos animais a serem analisados por microscopia confocal receberam um fixador Karnovski por meio de uma leve instilação a uma pressão de 30 cm em H₂O por duas horas com imersão simultânea no fixador. Em seguida, a traquéia foi ligada e os pulmões inflados receberam o mesmo fixador. Posteriormente, os lobos apicais foram divididos em cinco partes ($10 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$) paralelas ao hilo, desidratadas em uma fermentação etanólica até atingir o grau absoluto, permanecendo com 0,005% em amarelo e colocadas em plástico Spurr para análise microscópica (Rogers et al., 1999). As superfícies planas foram preparadas a partir de blocos de plástico reforçados contendo os pedaços do pulmão usando-se um micrótomo com faca de vidro. O lobo apical foi escolhido para avaliar a deposição em pequenos roedores de laboratório (Raabe et al., 1977) e a maior concentração foi mostrada no lobo apical à direita.

Imagens simultâneas da fibra e do pulmão: Para determinar a orientação anatômica e a distribuição das fibrilas de crisotila retidas no tecido pulmonar, foram examinadas grandes áreas do pulmão em bloco. Para obter os micrográficos, usou-se um Sarastro 2000 CLSM com laser argon-íon configurado a 25mW para fluorescente e imagens que refletissem a luz. As imagens foram registradas usando-se luz refletida (488 nm de excitação, $< 510 \text{ nm}$ de emissão) das fibras com lentes 40x ou 60x planApo.

A crescente suscetibilidade do sinal luminoso refletido foi obtida usando-se um filtro de 488 nm à frente do PMT usado para detectar as imagens das fibras. O espectro de emissão fluorescente >510 nm foi direcionado para um detector em separado para obter a morfologia celular e a estrutura do pulmão. As imagens digitais foram sobrepostas para mostrar as posições das fibras em relação ao tecido pulmonar; a imagem 1 do par apresentava as estruturas pulmonares (cinza) e o espaço livre (preto) e a imagem 2, as fibras (vermelho). As vias respiratórias e os compartimentos pulmonares que continham as fibras foram analisados, gerando-se projeções tridimensionais das seções visíveis do pulmão que revelavam a orientação e a distribuição das fibras no tecido pulmonar. Essas projeções tridimensionais foram geradas usando-se os softwares ImageSpace ou Voxel View (Vital Images, Inc., Fairfield, IA). Para melhorar a apresentação visual dos dados reconstruídos, os perfis das fibras foram submetidos a um procedimento de segmentação com o intuito de remover interferências de espectros entre a seção que continha o pulmão e a seção das imagens que apresentavam as fibras. pair

Análise das imagens: Os micrográficos digitais eram compostos de uma matriz (X,Y) formada por pixels, com cada um deles sendo um valor de intensidade entre 0 e 255 em escala de cinza. As seções óticas no eixo Z foram registradas ajustando-se a altura do espaço a ser avaliado com a ajuda de motores stepper. Os valores de intensidade (em pixels) do tecido pulmonar rotulado como fluorescente foram avaliados diretamente a partir das imagens e expressos de forma quantitativa usando-se técnicas de threshold. Para contar as fibras, foram usados procedimentos bidimensionais de contagem de objetos e planimetria digital em 3D (ImageSpace, Molecular Dynamics). As intensidades de pixel exclusivas dos pulmões, fibras e vias respiratórias apresentadas nos micrográficos analisados foram somadas para que se conhecessem as medidas da área. Para obter informações sobre o volume, determinou-se a espessura da seção ótica a partir do procedimento de largura máxima (Brismar, et al. 1996) e da multiplicação pela área do tecido. Dessa forma, foram obtidos dados morfométricos precisos como, por exemplo, a quantificação da intensidade da fluorescência, as distâncias entre dois pontos, o número de ocorrências por campo, as estruturas ligadas X superfície e as medidas da área e do volume diretamente a partir das imagens.

Quantificação Confocal das Fibras.

Distribuição da fibra: Examinaram-se de dois a cinco pedaços do tecido pulmonar do lobo apical direito de cada animal. Em cada um dos pedaços, foram selecionados campos de visão que contivessem perfis de tecido linfático e, em seguida, fizeram-se as imagens. Os perfis da fibra em cada micrográfico foram contados e expressos em termos de números de fibra por área do tecido pulmonar identificado. Tendo em vista o objetivo deste estudo, o tecido foi dividido em diversos compartimentos. Os perfis das vias respiratórias com diâmetros luminiais inferiores a 300 µm foram incluídos no compartimento das vias respiratórias. Os campos pulmonares que apresentavam septos alveolares e/ou perfis de dutos alveolares foram incluídos no compartimento alveolar. Já o compartimento linfático foi identificado de forma separada do interstício.

Análise microscópica in situ: Foram realizados dois tipos de análise: uma para determinar o número de fibras por pulmão e o respectivo tamanho médio e outra para identificar a distribuição das fibras nos compartimentos linfáticos e não-linfáticos. Para determinar o número de fibras por pulmão, elas foram contadas a partir dos micrográficos confocais feitos em três a cinco regiões de cada lobo pulmonar apical. Em seguida, a área do tecido e o número de fibras por micrográfico foram convertidos em fibras por volume de tecido, multiplicando-se pela espessura da seção. Já os volumes pulmonares foram estimados por meio de contagem estereológica (Weibel, 1984) ou de planimetria digital (ImageSpace software, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Para determinar o número de fibras por pulmão, estimou-se o comprimento da fibra a partir de análise da seção. Com base nos comprimentos médios, o número de fibras foi estimado a partir desses volumes. Como a avaliação de fibras pulmonares no pulmão é muito suscetível ao local em que ela se encontra em relação ao foco, o número de perfis de fibra foi estimado e multiplicado pelo comprimento médio medido *em bloco*, usando-se técnicas de análise por seção. A partir desses cálculos,

determinou-se o número de fibras por pulmão (<5 µm, 5-20 µm e >20 µm) para cada um dos grupos de exposição.

Dimensões da fibra. Os comprimentos de fibra avaliados a partir de fibras com aerossol – antes da exposição e posterior à inalação (pulmão esquerdo) – foram determinados por análise TEM e comparados a comprimentos de fibra *in situ* nos pulmões, conforme avaliação feita a partir das seções óticas microscópicas. Para obter maior precisão na avaliação dos comprimentos de fibra *in situ*, calculou-se a espessura da seção ótica considerando todas as lentes usadas. A espessura da seção ótica foi de 1,5 µm para imagens feitas com uma lente 40x (1.0 NA) de imersão em óleo e de 1,3 µm para seções registradas com uma lente 60x PlanApo (1.4 NA) do mesmo tipo. A orientação da fibra em relação às seções óticas foi ajustada para a distância total percorrida pelo motor stepper durante o processo.

RESULTADOS:

Biopersistência por inalação:

O Protocolo de Biopersistência por Inalação da CE especifica que a atmosfera de exposição à qual os animais são expostos deve ter pelo menos 100 fibras/cm³ com mais de 20 µm. Neste estudo, o número de fibras com mais de 20 µm na atmosfera de exposição foi proporcionalmente aumentado até atingir 465 fibras com L>20 µm/cm³, para que se pudesse maximizar qualquer possível efeito dessas fibras sobre a depuração no pulmão. Os números referentes à concentração e à distribuição do grupo de controle de ar e do exposto à crisotila estão na Tabela 3. Esses resultados são diferentes daqueles apresentados no pré-teste (Tabela 2), em que se optou pela amostra CA300 usada neste estudo.

Tabela 3: Número e distribuição das fibras (por tamanho) no aerossol de exposição à crisotila.

| Grupo de Exposição | Concentração Gravimétrica mg/m ³ | Número de Fibras avaliadas | Número total de fibras/cm ³ | Fibras WHO/cm ³ | Fibras WHO (%) | Número de fibras com ≥20 µm/cm ³ | Fibras com ≥20 µm/cm ³ (%) | Varição no Diâmetro (µm) | Varição no Tamanho (µm) | GMD (µm) (Desvio Padrão) | GML (µm) (Desvio Padrão) | Diâmetro Médio (µm) Desvio Padrão | Tamanho Médio (µm) Desvio Padrão | Diâmetro aritmético Tamanho (µm) | Diâmetro geométrico Tamanho (µm) | Taxa de aspecto |
|--------------------|---|----------------------------|--|----------------------------|----------------|---|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| Controle de Ar | - 0.07(1) (0.03) | 15 | 0 | 0 | - | 0 | - | 0.0 3 – 0.4 | 0.9 – 4.5 | 0.13 (2.1 5) | 1.73 (1.4 9) | 0. 17 (0. 10) | 1.8 8 (0. 08 6) | 0. 1 8 | 0.1 6 | 1 7. 3 |
| Crisotila CA300 | 4.32 (0.36) | 30 79 | 922 6 | 20 98 | 23 % | 46 5 | 22 % | 0.0 1 – 1.5 | 0.6 – 80 | 0.12 (1.9 3) | 2.75 (2.3 6) | 0. 15 (0. 09) | 4.3 3 (5. 85) | 0. 1 4 | 0.1 1 | 5 2. 0 |

(1) Valores negativos são atribuídos a variações de peso no filtro causadas pela desumidificação no ar seco usado durante a exposição. Esse valor é apresentado aqui como uma indicação do nível de precisão do método de avaliação.

Conforme mostra a Figura 3, todas as fibras maiores ($L > 20 \mu\text{m}$) na atmosfera de exposição eram $0,6 \mu\text{m}$ menores em diâmetro e, assim, potencialmente mais respiráveis. A Figura 4 mostra a distribuição bivariada de comprimento e diâmetro das fibras recuperadas do pulmão 1 dia após a interrupção da exposição. As concentrações e dimensões médias da fibra são apresentadas na Tabela 4 para todos os 8 momentos.

Figure 3

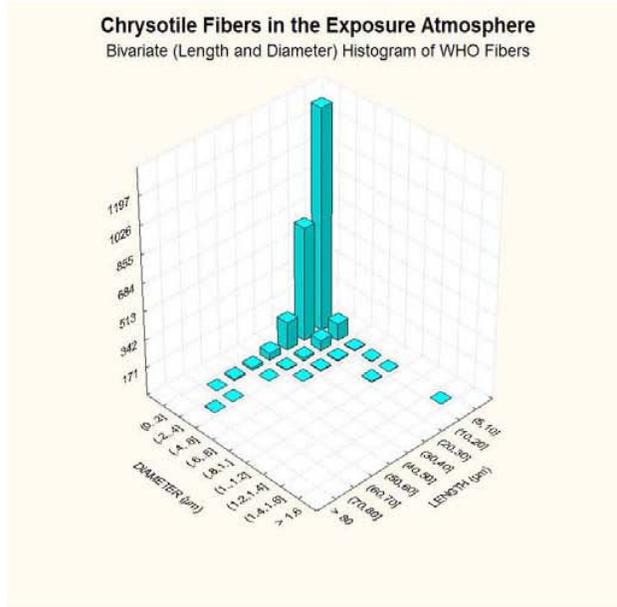


Figure 4

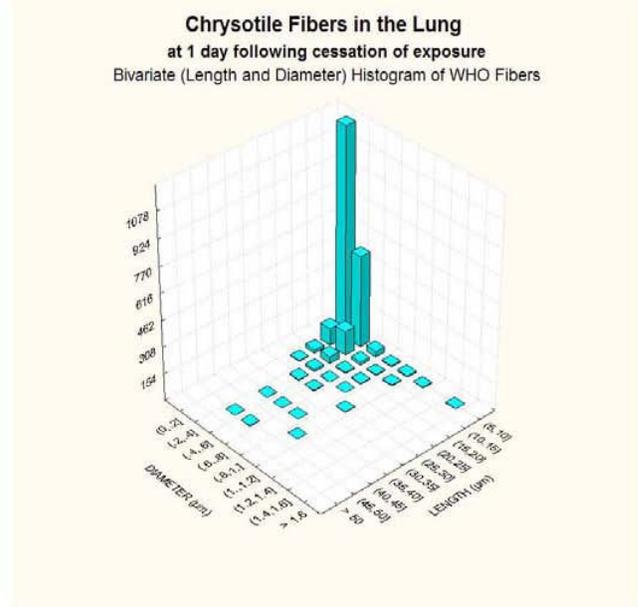


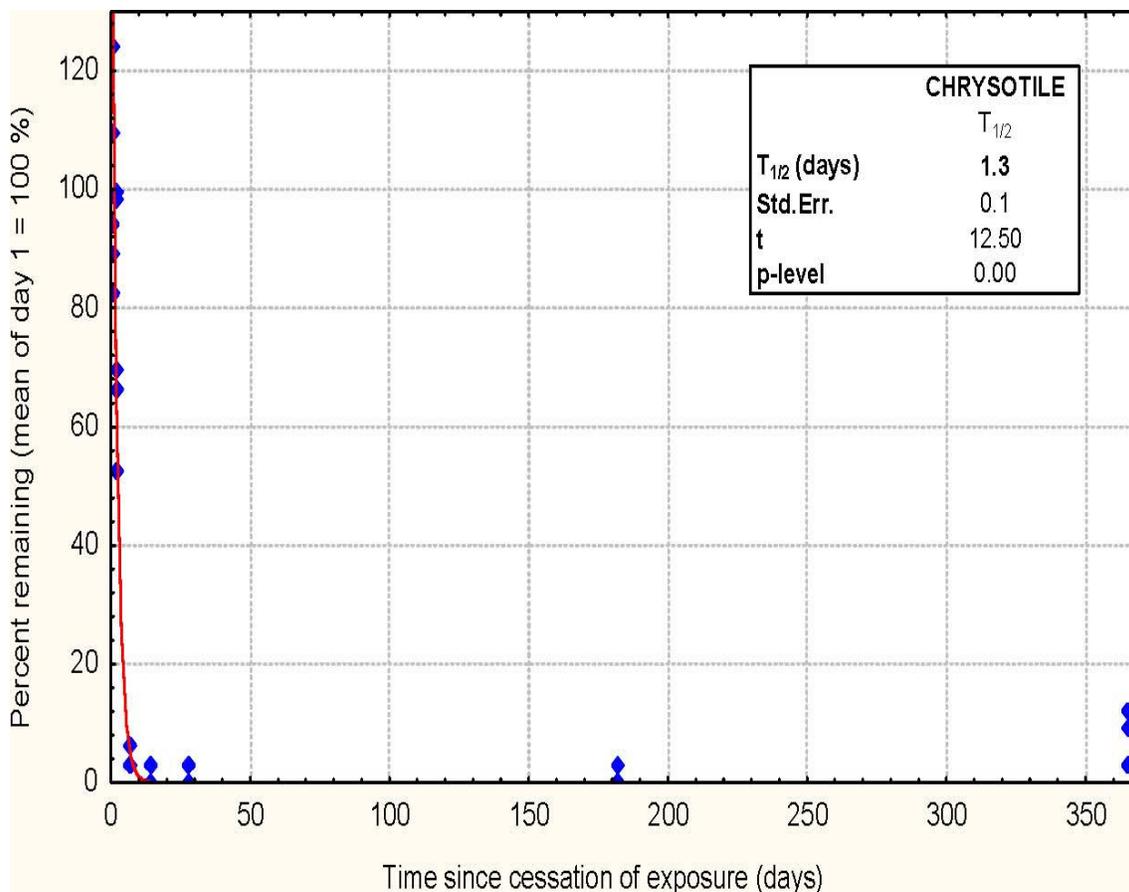
Tabela 4

| Momento do sacrifício (tempo após a interrupção da última exposição) | 1 dia | 2 dias | 7 dias | 2 seman as | 1 mês | 3 meses | 6 meses | 12 meses |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|---------------------|---------------------|
| Avaliados após a Digestão Pulmonar usando-se a Microscopia de Transmissão de Elétrons | | | | | | | | |
| Número de Fibras avaliadas | 4046 | 4033 | 1290 | 1147 | 841 | 673 | 751 | 868 |
| Número TOTAL de fibras/pulmão x 106 ± Desvio Padrão | 38.2 ± 15.2 | 28.8 ± 5.5 | 10.3 ± 3.5 | 10.8 ± 4.5 | 6.3 ± 2.3 | 3.0 ± 0.5 | 4.2 ± 0.5 | 1.1 ± 0.1 |
| Fibras WHO/pulmão x 106 ± Desvio Padrão | 5.5 ± 1.2 | 5.0 ± 0.6 | 0.7 ± 0.2 | 0.6 ± 0.1 | 0.3 ± 0.08 | 0.2 ± 0.03 | 0.2 ± 0.03 | 0.3 ± 0.03 |
| TOTAL (%) | 14.4% | 17.5% | 6.8% | 5.3% | 4.8% | 5.1% | 5.3% | 29.3% |
| Número de Fibras L≥20 µm/pulmão x 106 ± Desvio Padrão | 0.148 ± 0.248 | 0.114 ± 0.310 | 0.006 ± 0.002 | 0.002 ± 0.002 | 0.002 ± 0.002 | 0.000 | 0.001 ± 0.002 | 0.014 ± 0.006 |
| TOTAL (%) | 0.4% | 0.4% | 0.1% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 1.2% |
| Número de Fibras L<5 µm/pulmão x 106 ± Desvio Padrão | 32.7 ± 14.1 | 23.8 ± 5.2 | 9.6 ± 3.5 | 10.2 ± 4.4 | 6.0 ± 2.2 | 2.9 ± 0.5 | 4.0 ± 0.5 | 0.8 ± 0.1 |
| TOTAL (%) | 85.6% | 82.5% | 93.2% | 94.7% | 95.2% | 94.9% | 94.7% | 70.7% |
| Varição no Diâmetro (µm) | 0.03 - 1.5 | 0.03 - 2.0 | 0.01 - 0.8 | 0.01 - 0.8 | 0.03 - 2.0 | 0.03 - 0.7 | 0.03 - 0.8 | 0.02 - 0.7 |
| Varição no Tamanho (µm) | 0.3 - 50 | 0.4 - 60 | 0.5 - 25 | 0.5 - 20 | 0.7 - 20 | 0.7 - 18 | 0.5 - 20 | 0.7 - 35 |
| GMD (µm) | 0.11 | 0.13 | 0.11 | 0.11 | 0.13 | 0.12 | 0.11 | 0.11 |
| Desvio Padrão | 2.01 | 1.88 | 1.89 | 1.85 | 1.76 | 1.89 | 1.69 | 2.01 |
| GML (µm) | 2.32 | 2.58 | 1.87 | 1.86 | 1.79 | 1.79 | 1.97 | 3.63 |
| Desvio Padrão | 1.98 | 1.94 | 1.80 | 1.71 | 1.69 | 1.69 | 1.69 | 1.84 |
| Diâmetro Médio (µm) | 0.14 | 0.16 | 0.13 | 0.13 | 0.15 | 0.14 | 0.12 | 0.14 |
| Desvio Padrão | 0.11 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.06 | 0.09 |
| Comprimento Médio (µm) | 3.01 | 3.27 | 2.26 | 2.19 | 2.08 | 2.10 | 2.30 | 4.42 |
| Desvio Padrão | 2.78 | 2.78 | 1.71 | 1.51 | 1.41 | 1.46 | 1.52 | 3.35 |
| Diâmetro geométrico Tamanho (µm) | 0.15 | 0.15 | 0.12 | 0.12 | 0.14 | 0.13 | 0.12 | 0.12 |
| Taxa de aspecto | 26.9 | 26.9 | 25.5 | 23.7 | 18.2 | 20.8 | 23.5 | 44.3 |
| Determinados a partir de Microscopia Confocal | | | | | | | | |
| Tamanho Médio, µm (Desvio Padrão) | | 5.12 (2.94) | | 5.72 (3.79) | | 4.22 (2.35) | 4.89 (2.24) | 3.91 (1.93) |

Depuração da Fibra:

Fibras com mais de 20 µm depositadas no pulmão ‘desaparecem’ mais rapidamente, como mostra a Figura 5, com um tempo médio de depuração dessas fibras de 1,3 dias.

Figura 5
Biopersistência da Crisotila
Fibras L > 20 µm



Os tempos de depuração (Tabela 5) foram determinados a partir de procedimentos especificados no protocolo de Biopersistência por Inalação da CE.

Tabela 5

| Comprimento da Fibra | Tempo de Depuração T1/2 |
|----------------------|---|
| > 20 µm | 1,3 dias |
| WHO / 5 – 20 µm | 2,4 dias |
| < 5 µm | T1/2 23 dias 2,5 fase aguda/133 fase lenta |

Nenhuma fibra maior de que 20 µm foi observada após 91 dias da exposição. Após 182 dias, encontrou-se uma fibra longa em um rato e em 365 dias, já haviam sido encontrado um total de 1, 3 ou 4 fibras longas a partir das 250 avaliadas nas amostras do filtro. Esse número de fibras, quando extrapolado para o pulmão inteiro, corresponde a 900 fibras L>20 µm/pulmão em 182 dias e a 13.500 fibras L>20 µm/pulmão em 365 dias. Após exposição similar da amosita (fibra de anfibólio insolúvel), haveria aproximadamente 2.000.000 fibras L>20 µm/pulmão restantes em 182 dias e 1.300.000 fibras L>20 µm/pulmão remanescente em 365 dias (Retirado de Hesterberg et al., 1998).

Conforme mostra a Tabela 4, todas as frações são rapidamente depuradas do pulmão. Após 6 meses de interrupção na exposição, o percentual total de fibras WHO aparenta se estabilizar em torno de 5 %. No entanto, em 12 meses, esse valor sobe para 29%, o que poderia indicar que fibras menores do 5 μm estão sendo dissolvidas ou depuradas mais rapidamente. Embora o diâmetro médio não mude radicalmente, indicando que as fibras estão se rompendo, a variação máxima dos diâmetros diminui.

Análise Confocal Microscópica:

O estudo sobre biopersistência clássico, conforme definição dos protocolos da CE, envolve a digestão completa do pulmão do rato para que se determinem o número e a distribuição das fibras a cada momento. A análise TEM das amostras apresenta um valor que conta apenas com o número e o tamanho das fibras removidas do pulmão. Não é possível determinar em que locais do pulmão as fibras se encontram.

Para poder determinar a disposição dessas fibras remanescentes no pulmão, foi realizada uma análise microscópica confocal nos lobos pulmonares colocados em plásticos. Lentes como as do microscópio (as lentes objetivas), muito próximas da amostra a ser examinada, aproximam a luz de um foco em uma determinada distância. Se elas forem boas o suficiente, haverá um plano em que os objetos estarão em foco. Para usar um microscópio convencional de forma eficaz, é preciso cortar uma fatia extremamente fina do material com o objetivo de impedir que tecidos acima ou abaixo do plano de foco prejudiquem a qualidade da imagem final. O microscópio confocal supera o convencional nesse aspecto, já que desconsidera a luz fora de foco, usando um diafragma temporizador, para formar uma imagem precisa, de alta qualidade, mesmo que haja material próximo fora do plano de foco. Isso significa que as amostras não precisam ser cortadas a menor espessura possível para que possam ser examinadas. Na verdade, é possível obter uma imagem do material no plano de foco mesmo que esse plano esteja a centenas de micrômetros no interior da amostra.

Demonstração microscópica das fibras de crisotila retidas no pulmão.

O limite de detecção do método confocal usado na quantificação da disposição das fibras de crisotila no pulmão era de, aproximadamente, 150 nm resolução ponto a ponto. Como grande parte das fibras estava propensa a apresentar vários perfis oblíquos no sentido longitudinal, a maioria das fibrilas com mais de 150 nm de diâmetro foi detectada. Isso propiciou um levantamento preciso de todas as fibras com mais de 20 μm no pulmão no dia 1, como mostra a Figura 6, dado que, observadas por TEM, elas possuíam espessuras superiores a 0,15 μm . Fibras menores com diâmetros maiores do que 0,15 μm estavam presentes em um número consideravelmente maior do que as fibras mais finas (diâmetro < 0,15 μm), também como uma forma de oferecer uma excelente forma de contagem dessas fibras. Foram observados resultados similares durante todo o estudo, com os resultados dos 12 meses sendo mostrados na Figura 7. É interessante observar que as fibras mais finas e menores (especialmente com menos de 5 μm) estão aumentando em termos percentuais, o que indica que a crisotila restante continua sendo dissolvida no pulmão.

Figura 6

COMPRIMENTO $d < 0,15 \mu\text{m}$ e $d \Rightarrow .15 \mu\text{m}$ em 1 dia

A partir do procedimento de digestão pulmonar usando Microscopia de Transmissão de elétrons

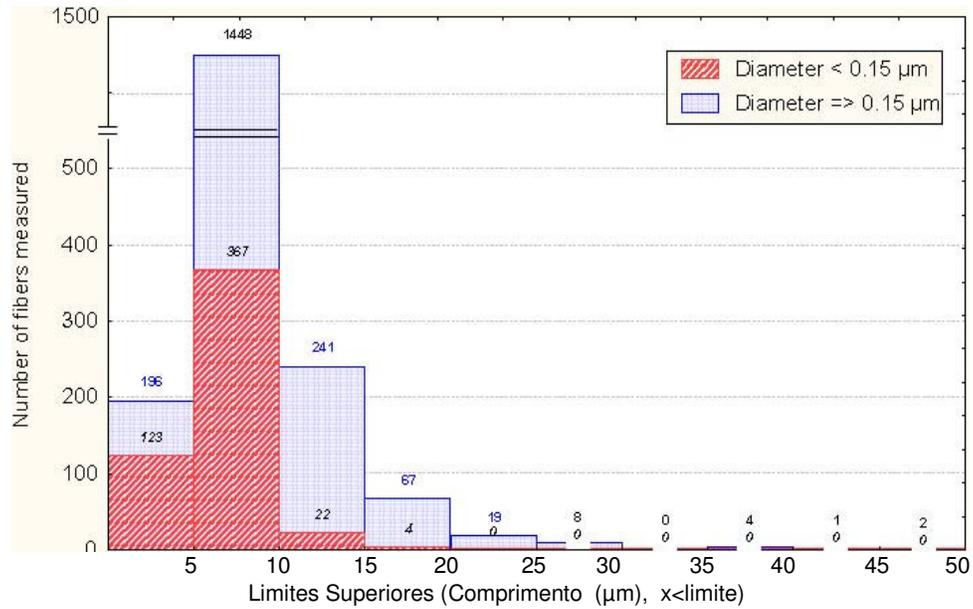
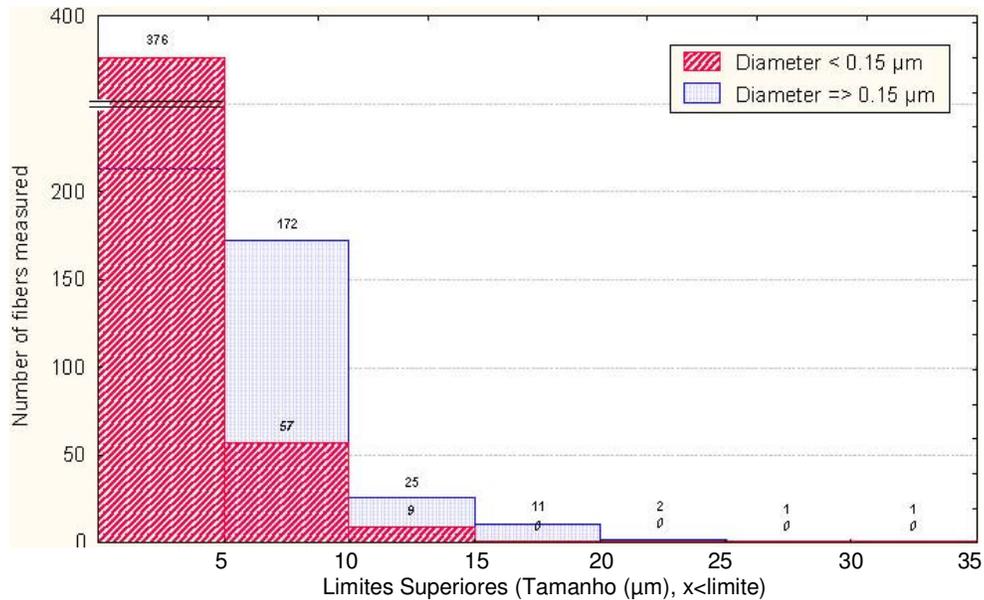


Figura 7

COMPRIMENTO $d < 0,15 \mu\text{m}$ e $d \Rightarrow 0,15 \mu\text{m}$ em 1 ano

A partir do procedimento de digestão pulmonar usando Microscopia de Transmissão de Elétrons



Infelizmente, não havia nenhuma análise confocal planejada para o 1º dia posterior à interrupção da exposição, uma vez que não se esperava uma depuração tão rápida. O primeiro momento de observação com a microscopia confocal foi no 2º dia posterior à interrupção da exposição de 5 dias.

Com 2 dias, as fibras de crisotila aparentavam estar bem distribuídas por todo o pulmão, tanto nas vias respiratórias quanto no parênquima. Elas apareciam como fibrilas inteiras, separadas, às vezes desenroladas em uma das extremidades. Foram encontradas fibras nas estruturas ciliares e macrófagos das vias respiratórias (Figura 8c, f), nos alvéolos e nos dutos linfáticos (Figura 8b, e). Encontrou-se apenas uma fibra longa ocasional nos alvéolos (Figura 8a, d) com outras fibras menores parcialmente fagocitadas pelos macrófagos alveolares. Como a exposição era de 5 dias, no 2º dia após a última sessão, as fibras tinham entre 2 e 6 dias para serem depuradas. Com um tempo de depuração de 1,3 dias, poucas fibras longas permaneceriam por mais de 2 dias.

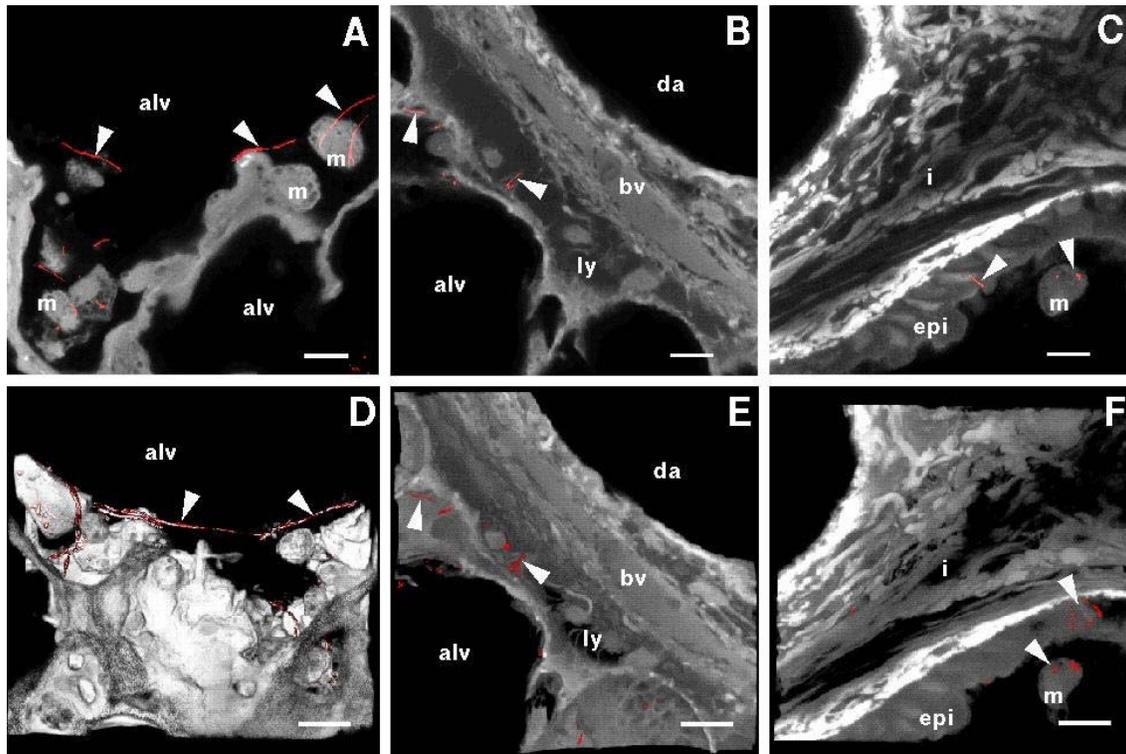


Figura 8 Micrografia confocal do pulmão em 2 dias após a interrupção da exposição. As imagens a, b & c mostram uma única imagem original da região. Já d, e & f apresentam as imagens em 3D reconstruídas das mesmas regiões, compostas por 70 seções. As barras são de 10 µm.

Em 2 semanas após a interrupção da exposição, foram nitidamente observadas fibras de crisotila nas vias respiratórias ciliares indicando que o transporte mucoso ciliar das fibras ainda estava em atividade (Figura 9 c, f). Observou-se que os macrófagos estavam fagocitando as fibras de crisotila, apesar do tamanho das fibras ser consideravelmente menor do que o observado após 2 dias de exposição (Figura 9a,d). Também se notaram fibras nos linfáticos distais (Figura 9 b, e), tanto em linfócitos livres quanto em fagocíticos.

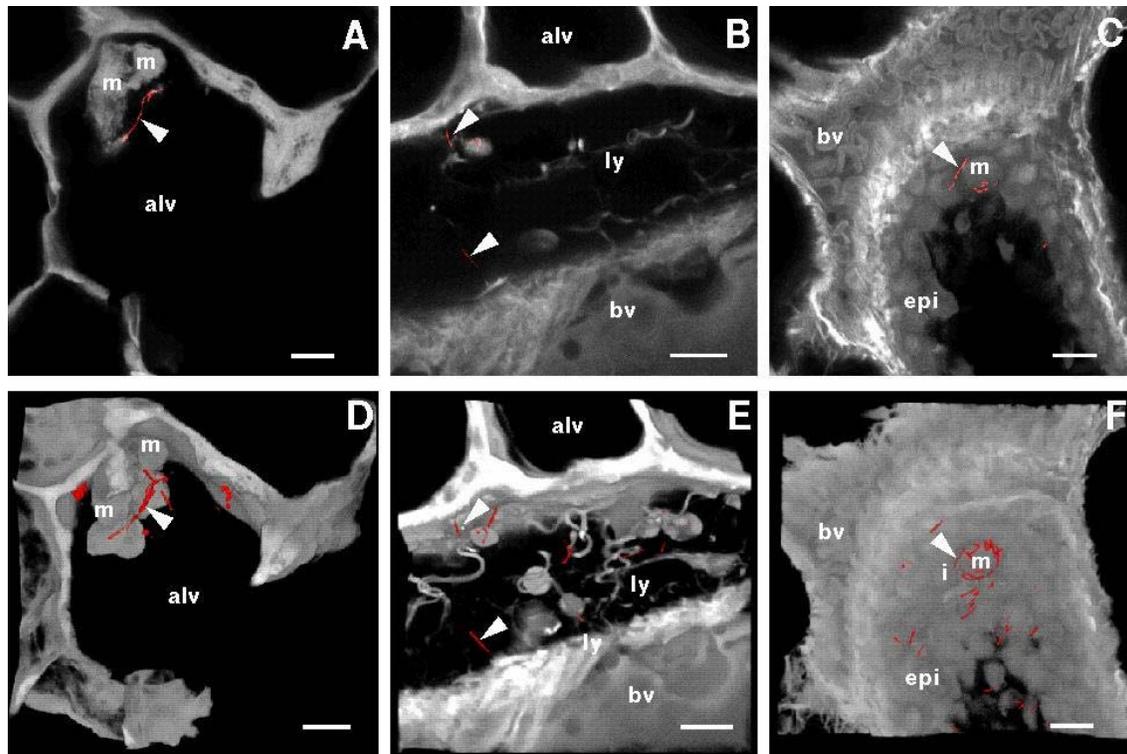


Figura 9 Micrografia confocal do pulmão em 2 semanas após a interrupção da exposição. As imagens a, b & c mostram uma única imagem original da região. Já d, e & f apresentam as imagens em 3D reconstruídas das mesmas regiões, compostas por 70 seções. As barras são de 10 μ m.

Em 3 meses após a exposição, há uma redução ainda maior no número e no tamanho das fibras encontradas. Os macrófagos continuam sendo ocasionalmente observados na fagocitação alveolar das fibras pequenas de crisotila e dos fragmentos não-fibrosos (Figura 10a, d). Essas fibras pequenas e fragmentos não-fibrosos também foram observados no epitélio alveolar. (Figura 10b, e). Seis meses após a exposição, eram observadas principalmente fibras menores nas superfícies do epitélio ou dos alvéolos (Figura 10c, f), ou ainda nos linfáticos. As fibras nos alvéolos não estão associadas aos macrófagos alveolares.

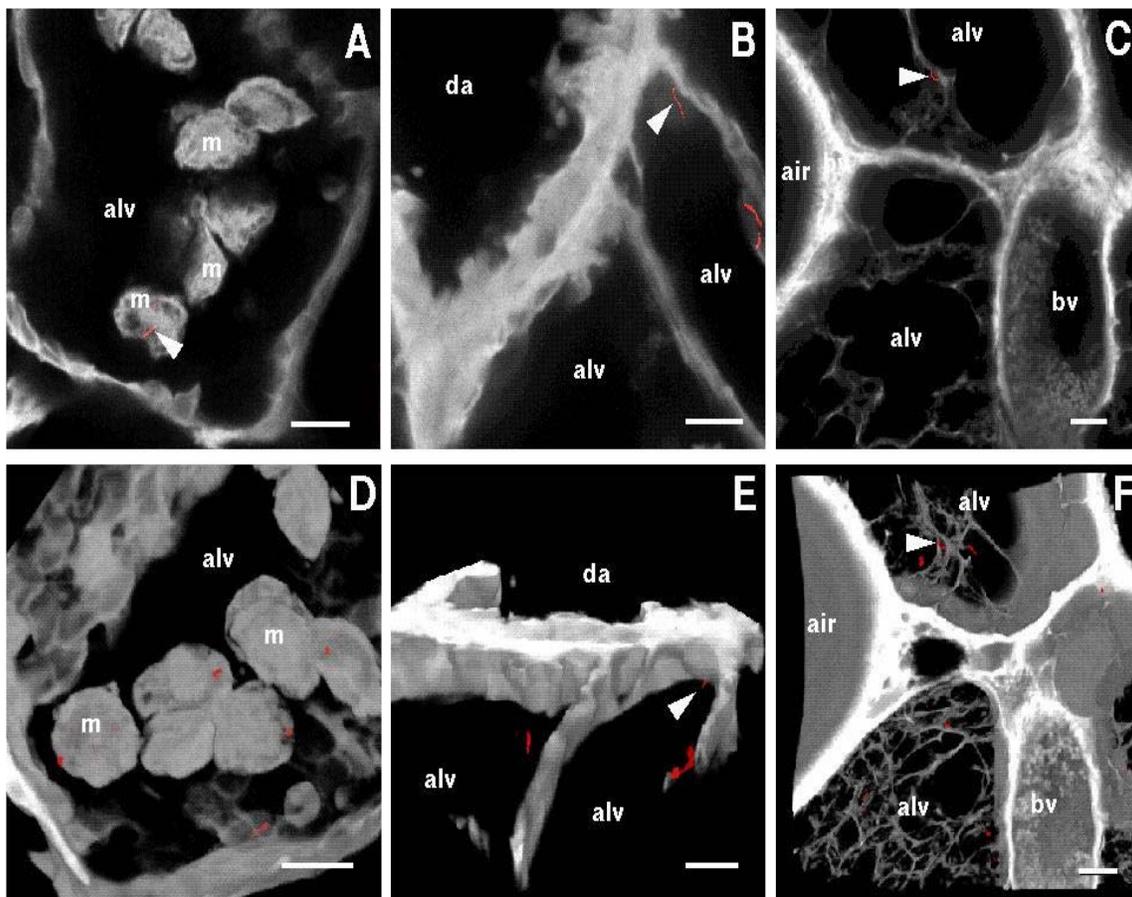


Figura 10 Micrografia confocal do pulmão em 6 meses (imagens a-d & b-e) e em 12 meses (imagens c & f) após a interrupção da exposição. As imagens a, b & c mostram uma única imagem original da região. Já d, e & f apresentam as imagens em 3D reconstruídas das mesmas regiões, compostas por 70 seções. As barras das imagens a,b,d & e são de 10 μ m. Para as imagens c & f as barras são de 50 μ m

Os números de fibras encontradas em função do tempo nas vias respiratórias, nos epitélios bronquiais e alveolares, no interstício e nos macrófagos alveolares são mostrados na Figura 11. Entre 2 dias e 2 meses, há uma redução no número de fibras observadas em todos os compartimentos. Após 6 meses da exposição, não havia mais fibras no interstício. Após 12 meses, as fibras só eram observadas na superfície epitelial ou nos linfáticos. Essas fibras na superfície epitelial não estavam associadas a macrófagos ou outra resposta celular (Figura 10c, f).

Embora essas imagens confocais permitam a quantificação de onde as fibras de crisotila se localizam no pulmão, elas não mostram o surfactante pulmonar, que é muito importante na mediação da dissolução no pulmão. Praticamente todas as fibras observadas estavam na camada do surfactante e, por isso, estavam sujeitas a uma dissolução mais rápida com a biodegradação da crisotila sendo o fator dependente (26). Além disso, Etherington et al. (1981) observou que os macrófagos podem gerar um pH muito baixo na superfície da membrana do macrófago e as partículas ligadas com valores de pH tão baixos quanto os 3,5 encontrados. A crisotila é mais solúvel nesse nível de acidez. Ao entrar em contato com ácidos diluídos ou mesmo meios aquosos pH<10, o magnésio mostrou dissociação imediata da superfície da fibra (Atkinson, 1973; Hargreaves & Taylor 1946; Nagy & Bates, 1952) o que resulta em uma fibra lixiviada (Atkinson, 1973).

Os resultados de nosso estudo estão consistentes em relação a esses mecanismos propostos, que levam à divisão das fibras de crisotila maiores em pedaços menores.

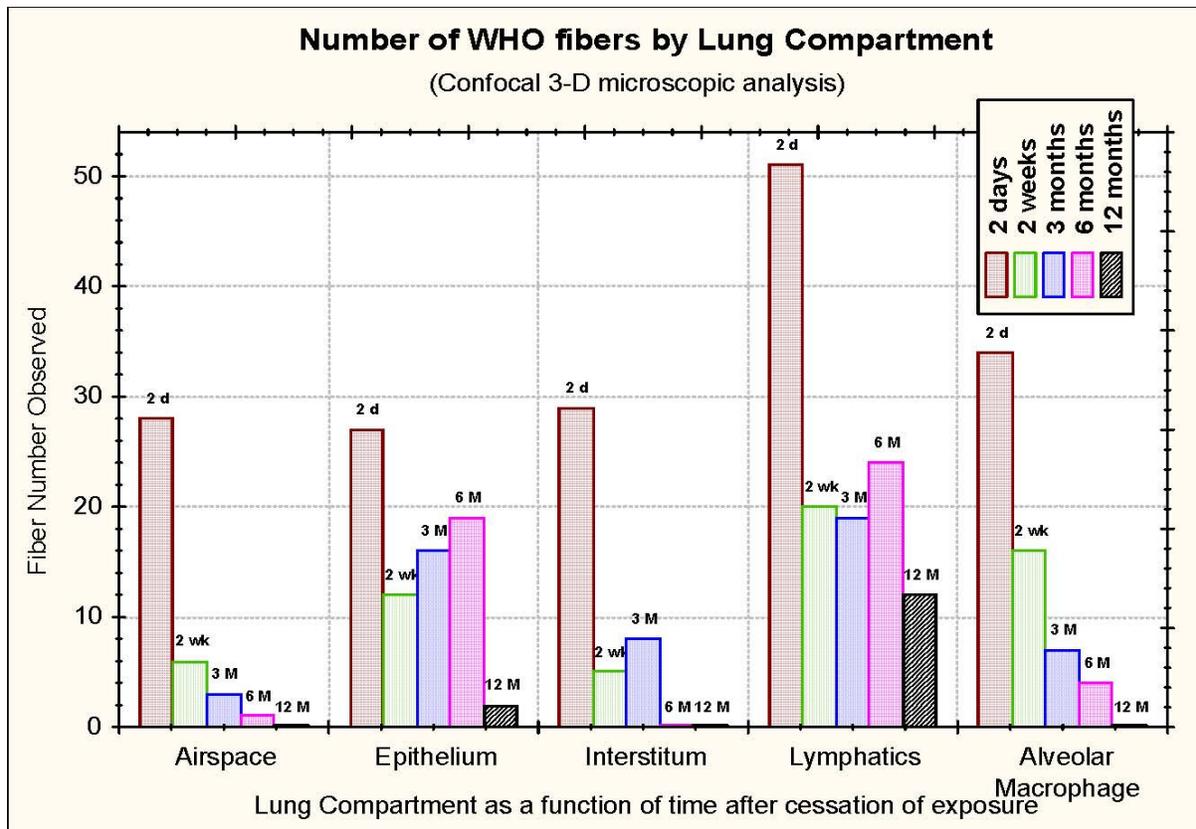


Figura 11

DISCUSSÃO:

Química estrutural da fibra e dissolução rápida:

Na crisotila, o hidróxido de magnésio de cada camada fica mais próximo da superfície da fibra, com o tetraedro de sílica dentro da estrutura (veja Figura 1). Na água, a dissolução da crisotila mostrou ser afetada pela capacidade de armazenamento da solução líxivia; a quantidade de Mg e SiO₂ aumenta na mesma proporção desse armazenamento (Smith, 1973). Determinou-se que essa reação seria controlada por infusão por meio de uma camada de água próxima à superfície do minério.

No pulmão, trabalhos extensos sobre a forma de dissolução de fibras vítreas sintéticas (SVF) usando técnicas de dissolução in-vitro e biopersistência por inalação demonstraram que o pulmão possui uma vasta capacidade de armazenamento (Matson, 1994). Esses estudos também mostraram que é necessário um índice de fluxo in-vitro equivalente a 1 ml/min para que se consiga o mesmo índice de dissolução da SVF que ocorre no pulmão. Além disso, a crisotila é mais solúvel em pH ácido e, assim, pode ser afetada por uma fagocitose completa (ou mesmo parcial) das fibras pelos macrófagos.

Com a crisotila, há a impressão de que à medida que o magnésio se dissolve, a fibra se quebra em pedaços menores. Por isso, os ratos foram expostos a um número muito grande de fibras longas passíveis de respiração (450 fibras $L > 20 \mu\text{m}/\text{cm}^3$, $\text{GMD} = 0.096 \mu\text{m}$), no 6 dia do estudo (1 dia após a interrupção da exposição) já havia várias fibras dissolvidas ou quebradas.

Dose aplicada e depuração comparativa:

Para avaliar qual foi a proporção de depuração da dose depositada no pulmão no primeiro ponto de análise (1 dia após a interrupção da exposição) e quais são as cargas relativas de crisotila em comparação com o amianto do tipo anfíbólio e uma fibra mais solúvel, comparamos os dados deste estudo com outros dois estudos sobre biopersistência de crisotila (Bernstein et al., 2003 a&b), bem como com um estudo sobre amianto do tipo tremolita (Bernstein et al., 2003b), amianto do tipo amosita e a fibra de lã de rocha solúvel MMVF 34 (Hesterberg et al., 1998). Nos estudos sobre a amosita e a MMVF 34, as concentrações por exposição ao aerossol foram de 150 fibras $L > 20 \mu\text{m}/\text{cm}^3$. Nos estudos sobre a biopersistência da crisotila do Canadá e da Calidria, as concentrações por exposição ao aerossol foram de 200 fibras $L > 20 \mu\text{m}/\text{cm}^3$. No estudo sobre biopersistência da tremolita, a concentração por exposição ao aerossol foi de 100 fibras $L > 20 \mu\text{m}/\text{cm}^3$. Como já afirmamos anteriormente, as concentrações por exposição à crisotila foram de 450 fibras $L > 20 \mu\text{m}/\text{cm}^3$.

Com ambos os anfibólios (amosita e tremolita), há apenas uma pequena quantidade de depuração das fibras longas após a interrupção da exposição praticamente sem depurações posteriores. No estudo sobre a biopersistência da tremolita, a resposta histopatológica dos pulmões foi examinada após os 5 dias de exposição, descobrindo-se uma reação granulomatosa e fibrótica após a interrupção da exposição (que persistiu durante os 12 meses de observação). No mesmo estudo, a crisotila não apresentou respostas inflamatórias ou patológicas após os 5 dias de exposição (Bernstein et al., 2003b).

Embora todas as crisotilas tenham sido depuradas com relativa rapidez, foram observadas diferenças entre os três tipos estudados. A crisotila da Calidria, conhecida por ser uma crisotila de fibra curta, foi depurada mais rapidamente (tempo médio para fibras maiores do que $20 \mu\text{m}$ de 0,3 dias).

O tempo médio para a depuração da crisotila brasileira foi de 1,3 dias. Ao final dos 12 meses, foram avaliadas entre 2 e 3 fibras longas após o processo de digestão pulmonar. No entanto, a concentração por exposição da crisotila brasileira foi de 465 fibras $L > 20 \mu\text{m}/\text{cm}^3$, em lugar das 150 ou 200 fibras $L > 20 \mu\text{m}/\text{cm}^3$ para outras fibras avaliadas, o que resulta em uma concentração muito elevada de fibras WHO 2.098 fibras/ cm^3 e um total de 9.226 fibras/ cm^3 . É muito provável que esse alto índice de exposição seja resultado de uma resposta muito diferente da esperada em concentrações por exposições menores. Ainda assim, o número de fibras observado em 12 meses não foi diferente, em termos estatísticos, do observado para a fibra HT, que possuía um tempo médio de 6 dias de depuração para fibras longas.

Com a fibra HT, não se observou resposta fibrótica ou tumorigênica após estudo toxicológico sobre inalação crônica em números similares de fibras longas (Kamstrup et al., 1998).

A crisotila canadense estudada era pertencente à classificação têxtil de fibras longas e apresentou depuração em um tempo médio de 16 dias para fibras superiores a 20 µm. Porém, esse número é, de certa forma, enganoso, já que 1 dia após a interrupção da exposição (quando foi feita a primeira avaliação), já havia mais de 50% a menos de fibras em comparação com a fibra HT ou os anfibólios. Observou-se essa rápida redução muito embora a concentração por exposição ao aerossol fosse de 200 fibras L>20 µm/cm³ para a crisotila canadense, em lugar das 150 fibras L>20 µm/cm³ para a HT e os anfibólios. Esse índice é mostrado na Figura 12, que apresenta as reais medidas das fibras pulmonares para cada animal, além da substituição da crisotila canadense e da fibra HT no período que se estende dos 14 aos 90 dias. Após 365 dias, não havia mais fibras da crisotila canadense – embora, como dissemos anteriormente, ainda houvesse algumas fibras HT longas.

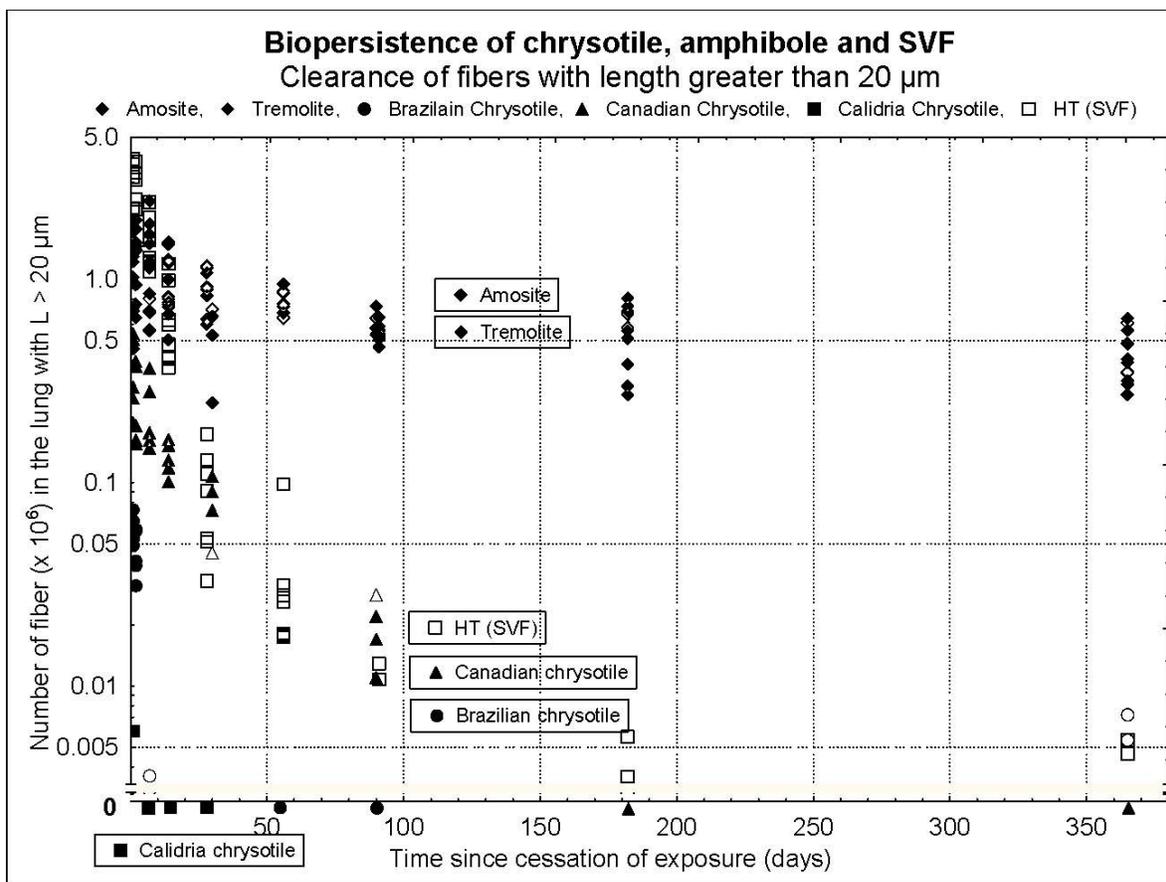


Figura 12

Há claramente uma grande diferença entre as biopersistências dos amianto do tipo serpentina e dos anfibólios. Além disso, como a serpentina é uma fibra extraída da natureza, parece que há algumas diferenças na biopersistência de acordo com o local em que ela é extraída. No entanto, o ponto positivo da crisotila é sua solubilidade, além de variar da fibra menos biopersistente até uma com biopersistência similar a de vidros e lãs de pedra.

Ela continua sendo menos biopersistente do que a cerâmica e vidros especiais (Hesterberg et al., 1998), além de ser muito menos biopersistente do que os anfibólios.

Comparação com outros estudos sobre biopersistência de crisotila:

Este estudo apresenta a terceira aplicação do protocolo de biopersistência da CE para a crisotila. Nos dois estudos citados anteriormente, avaliaram-se a crisotila canadense e a Calidria (Bernstein et al., 2003 a & b). O tempo médio de depuração das fibras superiores a 20 µm foi de 16 dias para a primeira e de 0,3 para a segunda. Já a vida média das fibras superiores a 20 µm para a crisotila brasileira deste estudo foi de 2,3 dias, o que novamente comprova que a crisotila não é biopersistente no pulmão.

Ilgren e Chatfield (1998a) analisaram estudos anteriores que apresentavam estimativas de depuração da crisotila com base na sílica do pulmão. Esses estudos apresentavam tempos médios de depuração consideravelmente maiores do que os apresentados aqui. Essa análise, no entanto, não diferenciava a depuração como uma função do tamanho da fibra ou do compartimento no pulmão. Conforme vimos em nosso estudo, as fibras longas de crisotila são depuradas mais rapidamente do que as fibras curtas acumuladas no pulmão e nos linfáticos. Esses estudos anteriores, em sua maioria, usaram períodos de exposição que variavam de 3 a 12 meses e consideraram um intervalo de concentrações por exposição entre 2 e 10 mg/m³. O que é de particular importância neles é a ausência de qualquer investigação sobre a concentração de outros silicatos presentes no aerossol e, em especial, de fibras de anfíbólio como a tremolita. Wagner et al., (1980), afirmou que “todas os materiais continham impurezas” nas amostras de crisotila estudadas por ele – embora ele não identifique essas impurezas.

Depuração da fibra curta:

Para todas as exposições por fibra, há muito mais fibras mais curtas, menores que as fibras de comprimento maior que 20 µm e mais ainda que as menores que 5 µm. A depuração das fibras menores mostrada por esses estudos era similar ou mais rápida do que a depuração de poeiras patogênicas insolúveis (Muhle et al., 1987; Stoeber et al., 1970).

O problema do possível efeito das fibras de crisotila menores foi analisado por estudos sobre inalação crônica relatados por Ilgren, & Chatfield (1997 & 1998b). Neles, foi usada uma concentração por exposição de 7 horas diárias, 5 vezes semanais durante 12 meses igual a 7,8 mg/m³ de crisotila Coalinga. Observou-se que essa crisotila era relativamente menor em relação à maioria das fibras com menos de 5 µm. Não foi observada resposta fibrótica ou tumorigênica após a exposição a essa fibra. Resultados similares foram relatados em outro estudo feito com a fibra Coalinga por Muhle et al. (1987). Além disso, essa fibra foi testada em quatro estudos IP com doses de até 3 mg e riscos cancerígenos relatados em até 10 % (Muhle et al., 1987; Pott et al., 1987; Rittinghausen et al., 1992). Esses estudos sustentam que a crisotila menor não é carcinogênica seguida de inalação e exposição IP a concentrações relativamente altas.

Em outro estudo, Davis et al. (1986) expôs grupos de ratos por inalação à amosita. A amosita com fibras mais curtas (1,7% <5 µm) não causou câncer maligno em 42 ratos, ao passo que a amosita com fibras longas (30% >5 µm, 10% >10 µm), de mesmo diâmetro, causou câncer em 8 de 40 animais.

Em um relato feito recentemente pela Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças), intitulado ‘Expert Panel on Health Effects of Asbestos and Synthetic Vitreous Fibers: The Influence of Fiber Length’, especialistas disseram que “Dadas as descobertas feitas por estudos epidemiológicos, de laboratório, e de genotoxicidade in vitro, além da capacidade do pulmão de depurar fibras curtas, os estudiosos acreditam que há uma forte tendência de que os amianto e as SVFs inferiores a 5 µm não causam câncer em seres humanos” (ATSDR, 2003; EPA, 2003). Além disso, Berman & Crump (2004), em seu documento técnico para EPA sobre riscos relacionados a amianto, descobriram que fibras menores aparentemente não contribuem para a doença.

Estudos sobre inalação crônica:

Os estudos sobre biopersistência demonstram claramente as diferenças entre a crisotila de serpentina e os anfibólios tremolita e amosita. Essas diferenças aparentam estar relacionadas às variações na estrutura química entre as serpentinas e os anfibólios e possivelmente influenciam o pH ácido associado ao macrófago na fibra de crisotila.

No entanto, os estudos sobre inalação crônica da crisotila e dos anfibólios chegaram à conclusão de que essas diferenças nem sempre são aparentes.

Em análise feita por Berman e Crump (1995) a respeito dos estudos sobre a resposta dos animais às doses no âmbito do amianto, concluiu-se que:

- fibras menores (menos do que algo em torno de 5 e 10 μm) aparentemente não contribuem para o risco de câncer;
- além de um padrão, mínimo, o potencial aumenta na medida em que o tamanho aumenta, pelo menos até 20 μm (e possivelmente até algo em torno de 40 μm); thinner
- grande parte das fibras que contribuem para o risco de câncer é fina e possui diâmetros inferiores a 0,5 μm ; e o maior potencial deve ser das fibras ainda mais finas. Na verdade, parece que as fibras com maior potencial são consideravelmente mais finas do que o limite máximo aceito como respirável;
- componentes identificáveis (fibras e feixes) de estruturas complexas (agrupamentos e matrizes) que apresentam o tamanho necessário podem contribuir para o risco de câncer porque essas estruturas ficam normalmente separadas no pulmão. Por isso, elas devem ser identificadas individualmente durante a análise, para se determinar a concentração de amianto;
- para análise adequada da atividade biológica, é preciso preparar as amostras por meio de um procedimento de transferência direta; e
- com base nos estudos sobre a resposta dos animais às doses, o tipo de fibra (por exemplo, mineralogia da fibra) tem aparentemente apenas um efeito modesto no risco de câncer (pelo menos entre os vários tipos de amianto).

No que se refere à ausência de diferenciações observadas nos estudos sobre resposta às doses, os autores afirmam que isso pode ser resultante, em última análise, do tempo de vida limitado do rato em relação à biodurabilidade dos tipos de fibra de amianto analisados nesses estudos. No entanto, deve-se ressaltar também que na dosagem em massa de 10 mg/m^3 usada em grande parte dos estudos sobre inalação crônica de crisotila, a concentração por exposição correspondente era de aproximadamente 1.000.000 de partículas & fibras/ cm^3 , 90% das quais partículas ou fibras curtas. Demonstrou-se que altas concentrações de poeiras patogênicas insolúveis comprometem os mecanismos de depuração do pulmão, causam inflamações e respostas tumorigênicas no rato, em um fenômeno normalmente conhecido como sobrecarga pulmonar (Bolton et al., 1983; Muhle et al., 1988; Morrow, 1988; Oberdorster, 1995; Bellmann et al., 2003).

Resumo:

A mineralogia das fibras de crisotila e dos anfibólios mostra diferenças na estrutura e na química desses dois minerais. Ao contrário da construção em camadas irregulares da crisotila, que aparenta resultar em maior suscetibilidade à degradação, as fibras de anfibólio são estruturas rígidas impermeáveis resistentes à degradação. Essas diferenças se refletem nos estudos sobre biopersistência por inalação, que claramente diferenciam a crisotila dos anfibólios, e mostram que quanto mais longas forem as fibras de crisotila, mais rapidamente elas são eliminadas do pulmão – ao passo que anfibólios maiores permanecem. Por conta das dificuldades no método de estudo e concentrações por exposição maiores de partículas/fibras, os estudos sobre inalação crônica feitos com amianto são difíceis de interpretar (em parte devido a efeitos não especificados dessas concentrações usadas nos estudos).

Revisões quantitativas recentes, que analisaram dados de estudos epidemiológicos disponíveis para determinar a potencialidade do amianto em causar câncer de pulmão e mesotelioma relacionados ao tipo de fibra, também diferenciaram a crisotila do amianto anfibólio (Hodgson e Darnton, 2000; Berman & Crump, 2004). As análises mais recentes também concluíram que fibras mais finas e longas são as que apresentam maior potencial.

Observou-se que a crisotila brasileira é removida mais rapidamente do pulmão. Fibras maiores que 20 µm foram depuradas em um tempo médio de 1,3 dias, muito provavelmente por dissolução e quebra em fibras menores. As fibras menores também foram rapidamente depuradas do pulmão – com fibras de 5 a 20 µm sendo depuradas ainda mais rapidamente ($T_{1/2} = 2,4$ dias) do que as de comprimento < 5 µm. Essas fibras menores remanescentes jamais foram encontradas em grupo, e sim de forma separada, em fibrilas inteiras (às vezes, desenroladas em uma das extremidades). As fibras menores, livres, se encontravam nos cantos do septo alveolar, ao passo que as fibras maiores, ou seus fragmentos, estavam nos macrófagos alveolares. O mesmo se deu com as fibras no tecido linfático, à medida que apareciam livres ou em linfócitos fagocíticos. Esses resultados sustentam as evidências de que as fibras de crisotila, em relação às fibras de anfibólio, são eliminadas rapidamente do pulmão.

Referências:

Atkinson, R.J. 1973. Chrysotile asbestos: Colloidal Silica Surfaces in Acidified Suspensions. *J. Colloid Interface, Sci.* 42:624-628.

ATSDR. 2003. Report on the Expert Panel on Health Effects of Asbestos and Synthetic Vitreous Fibers: The Influence of Fiber Length. Atlanta, GA.: Prepared for: Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Health Assessment and Consultation.

Bellmann, B., H. Muhle, O. Creutzenberg, H. Ernst, M. Muller, D. M. Bernstein, and J. M. Riego Sintes. 2003. Calibration study on subchronic inhalation toxicity of man-made vitreous fibers in rats. *Inhal Toxicol* 15 (12):1147-77.

Berman, D. W., K. S. Crump, E. J. Chatfield, J. M. Davis, and A. D. Jones. 1995. The sizes, shapes, and mineralogy of asbestos structures that induce lung tumors or mesothelioma in AF/HAN rats following inhalation. *Risk Anal* 15 (2):181-95.

Berman, D.W., and K.S. Crump. 2004. Technical support document for a protocol to assess asbestos-related risk. Washington, DC 20460: Office of Solid Waste and Emergency Response, U.S. Environmental Protection Agency.

Bernstein, D. M., J. Chevalier, and P. Smith. 2003. Comparison of Calidria chrysotile asbestos to pure tremolite: inhalation biopersistence and histopathology following short-term exposure. *Inhal Toxicol* 15 (14):1387-419.

Bernstein, D. M., R. Mast, R. Anderson, T. W. Hesterberg, R. Musselman, O. Kamstrup, and J. Hadley. 1994. An experimental approach to the evaluation of the biopersistence of respirable synthetic fibers and minerals. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 5:15-8.

Bernstein, D. M., J. M. Riego Sintes, B. K. Ersboell, and J. Kunert. 2001a. Biopersistence of synthetic mineral fibers as a predictor of chronic inhalation toxicity in rats. *Inhal Toxicol* 13 (10):823-49.

Bernstein, D. M., J. M. Riego Sintes, B. K. Ersboell, and J. Kunert. 2001b. Biopersistence of synthetic mineral fibers as a predictor of chronic intraperitoneal injection tumor response in rats. *Inhal Toxicol* 13 (10):851-75.

Bernstein, D. M., and J. M. R. Riego-Sintes. 1999. Methods for the determination of the hazardous properties for human health of man made mineral fibers (MMMF). Vol. EUR 18748 EN, April. 93, <http://ecb.ei.jrc.it/DOCUMENTS/Testing-Methods/mmmfweb.pdf>: European Commission Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Unit: Toxicology and Chemical Substances, European Chemicals Bureau.

Bernstein, D. M., R. Rogers, and P. Smith. 2003. The biopersistence of Canadian chrysotile asbestos following inhalation. *Inhal Toxicol* 15 (13):1247-74.

Bolton, R. E., J. H. Vincent, A. D. Jones, J. Addison, and S. T. . Beckett. 1983. An overload hypothesis for pulmonary clearance of UICC amosite fibres inhaled by rats. *Br. J. Ind. Med.* 40:264-272.

Brismar, H., A. Patwardhan, G. Jaremko, and J. Nyengaard. 1996. Thickness estimation of fluorescent sections using a CLSM. *J. Microscopy* 184 (2):106-116.

Cannon, W. C., E. F. Blanton, and K. E. McDonald. 1983. The flow-past chamber: an improved nose-only exposure system for rodents. *Am Ind Hyg Assoc J* 44 (12):923-8.

Cossette, M. , and P. Delvaux. 1979. Technical Evaluation of Chrysotile Asbestos Ore Bodies. In *Short Course in Mineralogical Techniques of Asbestos Determination*, edited by R. C. Ledoux: Mineralogical Association of Canada.

Cruxên Barros de Oliveira, M. 1989. Mineralogical Analysis Chrysotile, Technical Report Nr. 36 889. CEP 01064-970 São Paulo, Brazil: IPT, Instituto de Pesquisas Tecnológicas.

Davis, J. M., J. Addison, R. E. Bolton, K. Donaldson, A. D. Jones, and T. Smith. 1986. The pathogenicity of long versus short fibre samples of amosite asbestos administered to rats by inhalation and intraperitoneal injection. *Br J Exp Pathol* 67 (3):415-30.

Etherington, D. J., D. Pugh, and I. A. Silver. 1981. Collagen degradation in an experimental inflammatory lesion: studies on the role of the macrophage. *Acta Biol Med Ger* 40 (10-11):1625-36.

Hargreaves, A., and W.H. Taylor. 1946. An X-ray Examination of decomposition products of chrysotile (asbestos) and serpentine. *Mineral. Mag.* 27:204-216.

Hesterberg, T. W., G. Chase, C. Axten, W. C. Miller, R. P. Musselman, O. Kamstrup, J. Hadley, C. Morscheidt, D. M. Bernstein, and P. Thevenaz. 1998. Biopersistence of synthetic vitreous fibers and amosite asbestos in the rat lung following inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol* 151 (2):262-75.

Hesterberg, T. W., G. A. Hart, J. Chevalier, W. C. Müller, R. D. Hamilton, J. Bauer, and P. Thevenaz. 1998b. The importance of fiber biopersistence and lung dose in determining the chronic inhalation effects of X607, RCF1, and chrysotile asbestos in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 153 (1):68-82.

Hodgson, A.A. 1979. Chemistry and Physics of Asbestos. In *Asbestos: Properties, Applications and Hazards*, edited by L. M. a. S. S. Chissick. New York: John Wiley & Sons.

Hodgson, J. T., and A. Darnton. 2000. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann Occup Hyg* 44 (8):565-601.

Ilgren, E., and E. Chatfield. 1997. Coalinga fibre – A short, amphibole-free chrysotile. Evidence for lack of fibrogenic activity. *Indoor Built Environ* 6:264–276.

Ilgren, E., and E. Chatfield. 1998. Coalinga Fibre – A Short, Amphibole-Free Chrysotile Part 2: Evidence for Lack of Tumourigenic Activity. *Indoor Built Environ* 7:18-31.

Ilgren, E., and E. Chatfield. 1998. Coalinga Fibre: A Short, Amphibole-Free Chrysotile, Part 3: Lack of Biopersistence. *Indoor Built Environ* 7:98-109.

Kamstrup, O., J. M. Davis, A. Ellehauge, and M. Guldborg. 1998. The biopersistence and pathogenicity of man-made vitreous fibres after short- and long-term inhalation. *Ann Occup Hyg* 42 (3):191-9.

Kamstrup, O., A. Ellehauge, C. G. Collier, and J. M. Davis. 2002. Carcinogenicity studies after intraperitoneal injection of two types of stone wool fibres in rats. *Ann Occup Hyg* 46 (2):135-42.

Kiyohara, P.K.: 1991. Estudo da interface crisotila-cimento Portland em compósitos de fibro-cimento por métodos óptico-eletrônicos., Tese de Doutorado, apres. EPUSP, São Paulo.

Mattson, Stephanie M. 1994. Glass Fibres in Simulated Lung Fluid: Dissolution Behavior and Analytical Requirements. *Annals of Occupational Hygiene* 38:857-877.

McDonald, J. C., and A. D. McDonald. 1997. Chrysotile, tremolite and carcinogenicity. *Ann Occup Hyg* 41 (6):699-705.

Morrow, P. E. 1988. Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundam Appl Toxicol* 10 (3):36-84.

Muhle, H., F. Pott, B. Bellmann, S. Takenaka, and U. Ziem. 1987. Inhalation and injection experiments in rats to test the carcinogenicity of MMMF. *Ann Occup Hyg* 31 (4B):755-64.

Nagy, B., and T.F. Bates. 1952. Stability of Chrysotile Asbestos. *Am. Mineral.* 37:1055-1058.

Oberdorster, G. 1995. Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles. *Regul Toxicol Pharmacol* 21 (1):123-35.

Pott, F., U. Ziem, F. J. Reiffer, F. Huth, H. Ernst, and U. Mohr. 1987. Carcinogenicity studies on fibres, metal compounds, and some other dusts in rats. *Exp Pathol* 32 (3):129-52.

Raabe, O. G., Yeh, H. C., Newton, G. J., Phalen, R. F., and Velasquez, D. J. 1977. Deposition of inhaled monodisperse aerosols in small rodents. In *Inhaled particles IV*, ed. W. H. Walton. Proceedings of an international symposium organized by the British Occupational Hygiene Society, Edinburgh, 22–26 September 1975, vol. 1, pp. 3–21. Oxford: Pergamon Press.

Rittinghausen, S., H. Ernst, H. Muhle, and U. Mohr. 1992. Atypical malignant mesotheliomas with osseous and cartilaginous differentiation after intraperitoneal injection of various types of mineral fibres in rats. *Exp Toxicol Pathol* 44 (1):55-8.

Rogers, R. A., J. M. Antonini, H. Brismar, J. Lai, T. W. Hesterberg, E. H. Oldmixon, P. Thevenaz, and J. D. Brain. 1999. In situ microscopic analysis of asbestos and synthetic vitreous fibers retained in hamster lungs following inhalation. *Environ Health Perspect* 107 (5):367-75.

Skinner, H.C.W., M. Ross, and C. Frondel, Eds. 1988. *Asbestos and Other Fibrous Minerals.*: Oxford University Press.

Stoeber, W. , H. Flachsbart, and D. Hochrainer. 1970. Der Aerodynamische Durchmesser von Latexaggregaten und Asbestfassern. *Staub-Reinh. Luft* 30:277-285.

Wagner, J. C., G. Berry, J. W. Skidmore, and F. D. Pooley. 1980. The comparative effects of three chrysotiles by injection and inhalation in rats. *IARC Sci Publ* (30):363-72.

Weibel, E.R. 1984. *The Pathway for Oxygen.* Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.

WHO. 1985. Reference Methods for Measuring Airborne Man-Made Mineral Fibres (MMMMF), WHO/EURO MMMF Reference Scheme. Edited by WHO EURO Technical Committee for Monitoring and Evaluating Airborne MMMF. Vol. EH-4. Copenhagen: World Health Organisation.