

**Resposta toxicológica do amianto crisotila brasileiro: um estudo sobre toxicologia por inalação subcrônica com doses múltiplas por 90 dias com recuperação em 92 dias para avaliar as respostas celular e patológica.**

David M. Bernstein  
Consultor em Toxicologia, Genebra, Suíça.

Rick Rogers  
Rogers Imaging Corporation, Needham, Massachusetts, EUA.

Paul Smith  
Research & Consulting Company Ltd. Füllinsdorf, Suíça.

Jörg Chevalier  
EPS Experimental Pathology Services AG, MuttENZ, Suíça.

**RESUMO:**

Estudos de toxicologia por inalação com amianto crisotila foram feitos no passado em doses excessivamente altas sem considerar o número e as dimensões da fibra. Assim sendo, as exposições ultrapassavam os níveis de sobrecarga dos pulmões tornando a avaliação quantitativa destes estudos difícil, se não impossível. Para avaliar a resposta celular e patológica do pulmão de ratos a um aerossol bem definido de amianto crisotila, um estudo de toxicologia por inalação subcrônica por 90 dias foi conduzido usando-se o crisotila comercial brasileiro (CA 300). O protocolo foi baseado naquele estabelecido pela Comissão Européia para a avaliação de fibras vítreas sintéticas. O estudo também foi destinado a avaliar o potencial de reversibilidade das alterações e permitir associação de respostas com a dose de fibra no pulmão e a influência do comprimento da fibra.

Ratos machos Wistar foram aleatoriamente designados para um grupo de controle de ar e para dois grupos de exposição a CA 300 a concentrações médias de aerossol de fibra de 76 fibras L > 20  $\mu\text{m}/\text{cm}^3$  (total de 3.413 fibras/cm<sup>3</sup>) ou 207 fibras L > 20  $\mu\text{m}/\text{cm}^3$  (total de 8.941 fibras/cm<sup>3</sup>). Os animais foram expostos usando-se um sistema de fluxo inalatório pelo nariz por cinco dias consecutivos, 6 horas por dia, durante 13 semanas consecutivas (65 exposições) seguidos de um período de não exposição subsequente que durou 92 dias. Os animais foram sacrificados após a cessação da exposição e após 50 e 92 dias de recuperação em não exposição. Em cada sacrifício, cada subgrupo de ratos foi avaliado para a determinação da carga pulmonar; exame histopatológico; resposta à proliferação celular; lavagem brônquio-alveolar com determinação de células inflamatórias e para a análise por microscopia confocal.

Apesar dos 90 dias de exposição e dos 92 dias de recuperação, a exposição uma média de 76 fibras L > 20  $\mu\text{m}/\text{cm}^3$  (total de 3.413 fibras/cm<sup>3</sup>) ao crisotila resultou em nenhuma fibrose (escore Wagner 1,8 a 2,6) em nenhum momento e apenas um aumento mínimo nos PMNs. Em um estudo comparável sobre a fibra CMS biossolúvel conduzido em um nível de exposição semelhante, o classe Wagner 4 de fibrose foi observado com um aumento moderado nos PMNs. Os autores atribuíram isto a um efeito de sobrecarga

devido ao grande número de partículas. A dose mais alta de crisotila usada no estudo atual ultrapassou tanto em termos de fibras com  $L > 20 \mu\text{m}$  quanto no total de fibras/ $\text{cm}^3$  a concentração usada em qualquer outro estudo comparável subcrônico de fibras. Mesmo assim, a resposta global a esta dose excessivamente alta de crisotila foi menor do que aquela de MMVF21 ou E-glass a concentrações consideravelmente menores.

Como previsto em recentes estudos de biopersistência do crisotila, este estudo mostra claramente que exposição a uma concentração 5.000 vezes maior do que o US-TLV, o crisotila não produz qualquer resposta patológica significativa.

## **INTRODUÇÃO:**

Recentes estudos de biopersistência por inalação mostraram que o crisotila sai muito rapidamente do pulmão. Estes estudos proporcionaram uma base mecânica para a diferenciação do crisotila, um mineral em serpentina, do amianto anfibólio. Entretanto, permanece a contradição dos estudos de toxicologia por inalação crônica do crisotila que foram conduzidos com exposição a concentrações muito altas e que resultaram em uma resposta tumorigênica. Recentemente, estes estudos foram avaliados em detalhes e demonstraram que atendiam ao paradigma de sobrecarga pulmonar tornando, dessa forma, a avaliação quantitativa destes estudos difícil, se não impossível.

Para avaliar a resposta toxicológica ao crisotila, um estudo de toxicologia por inalação subcrônica em doses múltiplas por 90 dias foi conduzido com o crisotila brasileiro usando um aerossol bem definido. O crisotila usado neste estudo é o mesmo que foi avaliado no estudo de biopersistência por inalação (Bernstein et al., 2004). O protocolo de estudo usado para este estudo seguiu aquele estabelecido pela Comissão Européia para a avaliação de fibras minerais sintéticas (Bernstein & Reigo, 1999) com a exceção das regras de contagem e dimensionamento de fibra. Estas foram adaptadas ao uso de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) a fim de assegurar detecção das fibras de crisotila. Além disso, os pulmões foram analisados usando microscopia confocal a fim de proporcionar uma real avaliação de distribuição de fibra e resposta celular.

## **MATERIAIS E MÉTODOS:**

As fases de exposição e em vida do estudo foram conduzidas na Research and Consulting Company Ltd., Füllinsdorf, Suíça. A contagem e o dimensionamento de fibra foram conduzidos por subcontrato com a RCC na Gesellschaft für Staubmesstechnik und Arbeitsschutz GmbH (GSA), Neuss, Alemanha. A análise por microscopia confocal foi conduzida por Rogers Imaging Corporation, Needham, Mass., EUA.

Amostras de fibra:

As fibras de crisotila usadas neste estudo foram obtidas da Mina Cana Brava localizada

em Minaçu no estado de Goiás no Brasil. As fibras eram do mesmo lote usado para o estudo de biopersistência por inalação relatado anteriormente (Bernstein et al., 2004).

A fibra de crisotila é monoclinica na estrutura cristalina e tem uma estrutura laminada única descrita abaixo. As fibras estão presentes na mina em todas as categorias de tamanho variando de “longas” (maiores do que 10 mm: graus 4T, 4K, 4A e 3T na Escala de Peneiramento Quebec Canadense (QSS), Cossette & Delvaux, 1979), “médias” (fibras entre 5 e 9 mm: QSS graus 4X, 4Z e 5K) a “curtas” (abaixo de 5 mm: QSS graus 5R, 6D, 7M e 7T) no comprimento.

A composição química e a estrutura do crisotila são marcadamente diferentes das dos anfibólios, tal como tremolita ou amosita (Hodgson, 1979).

**Tabela 1 Composição química típica (em porcentagem)**

Composto	Crisotila <sup>1</sup>	Tremolita <sup>2</sup>	Amosita <sup>2</sup>
SiO <sub>2</sub>	40,90	55,10	49,70
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5,88	1,14	0,40
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	6,85	0,32	0,03
FeO	--	2,00	39,70
MnO	--	0,10	0,22
MgO	34,00	25,65	6,44
CaO	Traços	11,45	1,04
K <sub>2</sub> O	0,02	0,29	0,63
Na <sub>2</sub> O	0,03	0,14	0,09
H <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	*	3,52	1,83
H <sub>2</sub>	*	0,16	0,09
CO <sub>2</sub>	*	0,06	0,09
* Perda de ignição	12,20		
Total	99,95	99,93	100,26

1. Mina Cana Brava

2. Hodgson (1979); pág. 80-81

\* H<sub>2</sub>O<sup>+</sup>, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> foram incluídos juntos como perda de ignição na análise.

Caracterização da amostra de fibra:

O estoque de fibras de crisotila usadas neste estudo foi do mesmo lote usado no estudo de biopersistência por inalação (Bernstein et al., 2004). As dimensões médias das fibras do estoque estão mostradas na Tabela 2a..

**Tabela 2a Dimensões das fibras do estoque de crisotila**

Fibras WHO do total de fibras (%)	Fibras L>20µm do total de fibras (%)	Fibras L 5-20µm do total de fibras (%)	Fibras L<5µm do total de fibras (%)	Faixa de diâmetro (µm)	Faixa de comprimento (µm)	Diâmetro médio ± SD (µm)	Comprimento médio ± SD (µm)
15,1	1,4	13,9	84,7	0,03-0,7	0,8-90	0,17±0,1	3,53±14,09

GMD ( $\mu\text{m}$ )	GSD-D	GML ( $\mu\text{m}$ )	GSD-L	Razão de aspecto
0,15	1,86	2,55	4,15	28,4

As concentrações de fibra para exposição foram inicialmente escolhidas com base em pré-estudo de calibração ensaiado para serem de 50 e 150 fibras/cm<sup>3</sup>, o que corresponde, no protocolo de inalação subcrônica de fibra da CE (Bernstein & Riego, 1999), aos níveis de dose média e alta recomendados para exposição. Entretanto, devido à variação na distribuição da fibra de estoque, a concentração média de fibra para exposição a alta dose foi de 207 f/cm<sup>3</sup> L>20  $\mu\text{m}$  e a de média dose foi de 76 f/cm<sup>3</sup> L>20  $\mu\text{m}$ .

A nomenclatura de níveis de dose “média” e “alta” é usada em toda esta publicação de modo a corresponder aos grupos conforme recomendado nos protocolos da CE e para facilitar a comparação na discussão de outras exposições efetuadas usando o protocolo da CE.

**Tabela 3**

Concentração gravimétrica média (mg/m <sup>3</sup> )			Número médio de fibras (f/cm <sup>3</sup> )		
Grupo	Alvo	Atingido	Total	WHO	L>20 $\mu\text{m}$
Médio	1,3	1,32	3.413	536	76
Alto	3,3	3,56	8.941	1.429	207
Razão Alto/Médio	2,5	2,7	2,6	2,7	2,7

Total = quaisquer objetos com uma razão de aspecto de 3:1 (mínima) sem quaisquer limites para comprimento e diâmetro.

WHO = fibra com um comprimento mínimo de 5  $\mu\text{m}$  e um diâmetro máximo de 3  $\mu\text{m}$ .

## PROJETO EXPERIMENTAL

O projeto experimental deste estudo foi baseado no protocolo estabelecido pela Comissão Européia para avaliar a resposta subcrônica às fibras minerais sintéticas (Bernstein & Riego, 1999).

Exposição animal: grupos de 39 ratos machos Wistar (9 semanas de idade), Han-Ibm, ratos de acasalamento de espécies (qualidade SPF), foram expostos através de fluxo somente pelo nariz a concentrações de fibra em aerossol de 76 e 207 fibras L>20  $\mu\text{m}/\text{cm}^3$  por 6 horas/dia, 5 dias/semana por um período de 13 semanas consecutivas. Além disso, um grupo de controle negativo foi exposto de uma maneira similar a ar filtrado.

Sistema de exposição: o sistema de geração do aerossol de fibra foi projetado para movimentar o volume de fibras brutas sem quebrar, moer ou contaminar as fibras

(Bernstein et al., 1994). Os animais foram expostos pelo sistema de exposição para inalação de fluxo próximo ao nariz/focinho apenas. Este sistema é derivado de Cannon, et al. (1983) e é diferente dos sistemas convencionais de exposição pelo nariz apenas em que o aerossol fresco de fibras é fornecido a cada animal individualmente e o ar exalado é imediatamente exaurido.

#### Observações clínicas:

Todos os animais foram observados quanto a morbi-mortalidade antes do início e após o final de cada exposição e pelo menos uma vez nos dias de não exposição, incluindo a fase de quarentena, a fase de aclimação e a fase de observação pós-exposição. Uma observação clínica detalhada quanto a sinais toxicológicos, incluindo a época de início, a intensidade e a duração, foi conduzida em todos os animais no primeiro dia da fase de aclimação, no primeiro dia da exposição (antes da exposição) e duas vezes por semana durante a fase de exposição (antes da exposição diária) e no primeiro dia do período pós-exposição e semanalmente desde então..

#### Pesos dos corpos:

Os pesos dos corpos foram registrados uma vez no começo do período de aclimação, no dia da primeira exposição, antes do início da exposição e, então, semanalmente em toda a fase de exposição, no primeiro dia do período de pós-exposição e a cada segunda semana desde então..

#### Vigilância de doenças:

Amostras de sangue não heparinizadas (aproximadamente 1 ml) foram obtidas, por punção retro-orbital sob leve anestesia por éter, de seis animais adicionais. O sangue foi imediatamente enviado ao Departamento de Microbiologia, à atenção de S. Kehl. O soro foi obtido por centrifugação do sangue. Alíquotas do soro foram usadas para controlar a presença de anticorpos para os seguintes patógenos de roedores: Hantaan vírus, *Bacillus piliformis* (Tyzzer's), vírus linfocítico *choriomeningitis* (LCM), vírus do rato Kilham (KRV), vírus da pneumonia do camundongo (PVM), Reovirus tipo 3 (Reo3), *Sialodacryoadenitis* (SDA) / coronavirus do Rato (RCV), vírus Sendai (vírus Parainfluenza-1), Toolan (H-1), *Mycoplasma pulmonis* e vírus Minute do Camundongo (MVM). Nenhum desses patógenos foi encontrado.

#### Carga pulmonar, histopatologia e proliferação celular:

Células em proliferação foram marcadas por 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) usando uma bomba mini-osmótica que foi implantada três dias antes do sacrifício. Os animais foram anestesiados pela inalação de Halothane<sup>®</sup> liberado para uma máscara facial por um vaporizador. Uma mini-bomba osmótica cheia de BrdU (ALZET 2001) foi, então, cirurgicamente implantada em uma bolsa subcutânea a fim de quantificar a reversão celular (Alza Corp., Modelo 2001; taxa de fluxo 1 µl/h, concentração de BrdU = 50 mg/l).

Os pulmões: os pulmões e a traquéia (seccionada abaixo da laringe) foram removidos com o tecido mediastinal e anexos. O tecido mediastinal contendo os linfonodos mediastinais foi ressecado dos lobos do pulmão e fixado em formalina e guardado à disposição do responsável. Os tecidos / órgãos restantes: a metade inferior da traquéia, os brônquios do tronco principal e os lobos do pulmão foram pesados (registrados como "pulmão, completo").

Lobos do Pulmão Direito (Análise de conteúdo de fibra após digestão de Cinzas a Baixa Temperatura): o brônquio fonte do pulmão direito foi removido, deixando tão pouco tecido bronquial quanto possível nos lobos. Os lobos foram pesados (registrados como “lobos do pulmão direito”) separadamente e inseridos em um saco plástico e profundamente congelados (-20°C).

Lobos do Pulmão Esquerdo (Histopatologia): o brônquio fonte do pulmão esquerdo foi removido logo acima do ponto de bifurcação. O pulmão esquerdo foi pesado (registrado como “lobo do pulmão esquerdo”), então, fixado em solução de formalina tamponada neutra a 10% por instilação a uma pressão de 30 cm H<sub>2</sub>O e imersão por duas horas e subsequentemente armazenado em formalina. Um curto pedaço do duodeno foi tomado e fixado com os lobos do pulmão esquerdo em formalina. O lobo esquerdo permaneceu na fixação de formalina por não mais do que 48 horas. Nesta ocasião, o lobo foi frontalmente cortado. A metade dorsal foi transferida para etanol a 70% junto com o pedaço de duodeno, desidratado, embebido em cera de parafina e armazenada para coloração imuno-histoquímica para avaliação da resposta proliferativa. A metade frontal foi recolocada em formalina até ser processada, embebida e cortada a uma espessura nominal de 4 micra. Dois conjuntos de lâminas foram preparados: um foi corado com hematoxilina e eosina para exame histopatológico e o segundo conjunto foi corado com tricromo para análise específica de colágeno. A traquéia foi processada, embebida e cortada a uma espessura nominal de 4 micra e corada com hematoxilina e eosina.

Lâminas do lobo frontal do pulmão esquerdo e da traquéia foram examinadas histopatologicamente pelo Dr. H. J. Chevalier EPS. Alterações pulmonares crônicas e fibrose foram avaliadas de acordo com o sistema de graduação apresentado por McConnell e Davis (2002). Além disso, a quantidade de deposição de colágeno nas junções brônquios-alveolares foi apresentada como um grau de 0 a 5, conforme descrito no anexo das diretrizes da UE (Bernstein e Riego-Sintes, 1999).

Lavagem Brônquio-alveolar: em subgrupos separados de animais a lavagem brônquio-alveolar foi realizada. Os pulmões foram lavados 6 vezes com 4 ml de soro fisiológico à temperatura ambiente por instilação lenta e remoção de fluido, com massagem torácica. A quantidade total de fluido de lavagem recolhido foi registrada. O fluido de lavagem das duas primeiras lavagens foi recolhido em um tubo de centrifugação em gelo. O volume recolhido desta lavagem foi registrado. Este fluido foi centrifugado a aproximadamente 300g por 10 minutos a cerca de 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de plástico e analisado quanto à atividade enzimática da desidrogenase láctica (LDH), beta-glucuronidase ( $\beta$ -GRS) e para determinação da proteína total.

O fluido de lavagem das outras quatro lavagens foi reunido em um tubo de centrifugação, o volume registrado e centrifugado a aproximadamente 300g por 10 minutos a cerca de 4°C. O sobrenadante foi descartado. Os grumos de células foram re-suspensos com soro fisiológico e reunidos. O volume foi registrado nos dados brutos. O volume total foi sacudido levemente para mistura. Alíquotas da suspensão de células foram tomadas para contagem do total de células, viabilidade de células e contagem de células diferenciais, conforme descrito abaixo.

Contagem de células totais: uma alíquota da suspensão de células foi diluída em corante de Türk (Diagnostik Merck n.º 9277, Merck AG, Darmstadt/Alemanha). Uma alíquota

desta mistura foi introduzida em uma câmara de hemocitômetro e as células totais foram contadas (pelo menos 1 mm<sup>3</sup>).

Ensaio de viabilidade de célula: uma alíquota de 50 µl da suspensão de células foi misturada com 12,5 µl de uma solução azul Trypan aquosa a 0,4% e pipetada para uma câmara de hemocitômetro. Dentro de 5 minutos de mistura pelo menos 200 células foram avaliadas quanto a viabilidade.

Contagem de células diferenciais: de acordo com os resultados da contagem de células totais, uma alíquota de suspensão de células foi diluída com solução de soro fisiológico atingir uma concentração final de aproximadamente 1 milhão de células/ml. Desta suspensão, um esfregaço foi preparado usando uma Cytocentrifuge (Shandon, Instrument Gesellschaft AG, Suíça) e corado com Diff-Quick (Baxter Dade, Suíça). Pelo menos 500 células por esfregaço foram contadas por microscopia ótica. O número de cada tipo de célula, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, células epiteliais e outras células foi contado.

Digestão pulmonar para análise de fibra / partícula:

De 5 ratos por grupo, por determinado tempo no grupo de exposição ao CA 300 e no grupo de exposição a ar controlado os pulmões foram descongelados e o pulmão inteiro foi preparado para análise. O tecido foi inicialmente desidratado, congelado e então seco (secador a frio Edwards EF4 Modulyo) e secado a peso constante para determinar o peso do tecido seco. O tecido seco foi “queimado” em uma unidade de plasma de câmaras múltiplas LFE LTA 504 a 300 W por pelo menos 16 h. Mediante remoção da unidade de “queima”, a cinza de cada pulmão foi pesada e suspensa em 10 ml de metanol usando um banho ultra-sônico de baixa intensidade. Então, a suspensão foi transferida para uma garrafa de vidro com a cuba de combustão e lavagem e o volume foi completado para 20 ml. Uma alíquota foi, então, retirada e filtrada em um filtro de polícarbonato revestido com ouro (tamanho de poro 0,2 µm).

Regras de contagem para a avaliação de amostras de ar e pulmão por microscopia eletrônica de transmissão:

Todas as fibras visíveis a uma ampliação de 10.000x foram levadas em consideração. Todos os objetos vistos sob esta ampliação foram dimensionados sem nenhum limite inferior ou superior imposto nem no comprimento nem no diâmetro. O comprimento e o diâmetro bivariados foram registrados individualmente para cada objeto medido. As fibras foram definidas como qualquer objeto que tivesse uma proporção de pelo menos 3:1. O diâmetro foi determinado na maior largura do objeto. Todos os outros objetos foram considerados como partículas não fibrosas. As regras de interrupção de contagem de cada amostra foram definidas conforme a seguir: para partículas não fibrosas o registro de partículas foi interrompido quando um total de 30 partículas foi registrado. Para fibras o registro foi interrompido quando 500 fibras com comprimento  $\geq 5\mu\text{m}$ , diâmetro  $\leq 3\mu\text{m}$  (WHO, 1985) ou um total de 1.000 fibras e partículas não fibrosas foram registradas. Se este número de fibras não foi atingido após avaliação de 0,15 mm<sup>2</sup> de superfície de filtro, campos adicionais de visão foram contados até 500 fibras WHO serem atingidas ou um total de 5 mm<sup>2</sup> de superfície de filtro serem avaliados, mesmo se um total de 500 fibras WHO contáveis não fosse atingido. A avaliação de fibras curtas

(comprimento  $<5\mu\text{m}$ ) foi interrompida quando 100 fibras curtas foram atingidas.

Microscopia confocal:

No outro subgrupo de animais, os pulmões (seccionados abaixo da laringe) foram coletados e o tecido mediastinal fixado foi ressecado dos lobos do pulmão e descartado. Os pulmões inteiros, incluindo a árvore traqueobrônquica, foram pesados. Os pulmões foram fixados em solução Karnovsky e enviados a Rogers Imaging Corporation (Needham, MA) para análise por microscopia confocal.

A microscopia confocal foi realizada usando um microscópio de varredura a laser Sarastro 2000 (Molecular Dynamics, Inc.) equipado com um laser de íon argônio de 25 mW e um microscópio vertical (Optiphot-2; NiOn, Inc.) modificado para imagem de luz refletida. Este microscópio confocal foi usado para registrar os dados de imagem de dois modos:

Modo 1) Imagem fluorescente de canal simples. Usada para registrar estruturas rotuladas com fluoróforos não específicos tais como tecido de pulmão. Ajustes ópticos de bancada para o Sarastro 2000 CLSM foram: excitação – 488 nm (amarelo Lúifer), emissão  $>510$  filtro passa longa, potência do laser 12 mW, transmissão de 10%, voltagem fotomultiplicadora ajustada entre 500 – 700 Volts.

Modo 2) Imagem refletida e fluorescente em canal duplo. Os ajustes ópticos de bancada foram os mesmos que para o Modo 1, exceto que um divisor de feixe secundário de 510 nm foi colocado em frente ao PMT-1 para direcionar luz polarizada de comprimento de onda curto das fibras para o PMT-2, para aperfeiçoar a imagem das fibras. Constituintes celulares rotulados fluorescentemente e fibras (e partículas) refletivas/refrativas foram representados simultaneamente com esta disposição. Cada “exposição” produziu duas imagens digitais.

Uma imagem registrada de cada modo foi uma mostra bidimensional (x,y), de pixels de 512 x 512 cada qual com um valor de intensidade de 0 a 254 unidades na escala cinza (um valor de saturação indicada de 255 da escala de intensidade). Seções ópticas (x,y), individualmente e em série de profundidade, foram registradas em várias posições ao longo do eixo z ajustando a altura do estágio usando motores escalonadores controlados por computador. Imagens e séries de imagens foram analisadas e preparadas para apresentação empregando programa especializado de computador.

As imagens foram registradas por meio de uma objetiva de 40X. As dimensões de voxels no volume registrado (dimensões x, y e z, respectivamente) foram de 0,126  $\mu\text{m}$ , 0,126  $\mu\text{m}$  e 0,3  $\mu\text{m}$ . As dimensões de cada volume registrado foram de: 64,5  $\mu\text{m}$  x 64,5  $\mu\text{m}$  x 7,5  $\mu\text{m}$  totalizando 31.145  $\mu\text{m}^3$  de parênquima pulmonar registrado por série de seção.

Métodos morfométricos: o número de fibras dentro dos vários compartimentos anatômicos foi determinado por microscopia confocal empregando técnicas de seção óptica serial. As estratégias de amostragem foram concebidas para permitir a

determinação do número e da localização das fibras retidas dentro do parênquima e das vias aéreas condutoras.

*Estratégia de amostragem para parênquima.*

Como o parênquima proporciona cerca de 90% do volume do pulmão e varia pouco de uma região para outra do pulmão, é prontamente possível adquirir campos de visão aleatórios do parênquima dos quais dados quantitativos podem ser obtidos. Nosso procedimento foi colocar a objetiva do microscópio aleatoriamente sobre a amostra do pulmão exposta na superfície do encaixe de epóxi, coletar uma série de imagens em profundidade, retornar à profundidade de partida inicial, mover duas larguras de campo no eixo positivo x e repetir o processo. Vinte séries de profundidade foram obtidas desta maneira de cada fração de pulmão examinado (quatro por animal). Se o perímetro da seção do pulmão fosse encontrado, a objetiva era movida duas larguras de campo no eixo positivo x e o escalonamento era continuado no eixo negativo x. Em cada local, se o perfil de uma via aérea condutora estava no volume a ser registrado pela série em profundidade, o campo de visão era pulado e outra etapa era feita até ser encontrado um volume que não contivesse uma via aérea. Cada volume era registrado obtendo 25 seções ópticas separadas por 0,3 $\mu$ m ao longo do eixo z.

As fibras em cada volume foram detectadas por escaneamento ascendente e descendente pelas séries de imagens de profundidade enquanto se procuravam os pontos ou as linhas brilhantes característicos que indicavam uma fibra ou partícula refletiva ou refrativa. A pessoa contando as fibras não sabia de qual grupo experimental as imagens foram tomadas, isto é, a contagem era feita sob condições “simples cego”. Estas contagens proporcionaram dados com unidades de (número de fibras / volume do parênquima em micra cúbica). Sabendo o volume representado por cada série de profundidade e o volume do parênquima (incluindo espaços de ar) no pulmão inteiro do animal, como fixado, a carga de fibras no parênquima do pulmão podia ser calculada. O compartimento anatômico no qual a fibra ocorria era registrado. As fibras no parênquima eram classificadas como ocorrendo nos alvéolos, dutos alveolares ou brônquiolos respiratórios, em contato com a superfície de tecido, em dutos alveolares ou alvéolos, mas não em contato com tecido no volume registrado, no todo ou em parte dentro dos macrófagos alveolares.

*Estratégia de amostragem para vias aéreas.*

As vias aéreas ocupam apenas 10% do volume total do pulmão inflado e existem como uma estrutura similar a árvore que é relativamente grossa em comparação com as estruturas do parênquima. Em consequência, um campo de visão posicionado aleatoriamente em uma amostra de pulmão tem uma probabilidade bastante baixa de conter algum perfil de parede de via aérea. Em vez disso, foi eficaz e válido prosseguir ao longo de uma linha aleatoriamente posicionada na superfície da amostra de pulmão e registrar volumes sempre que a linha encontrava uma via aérea cujo eixo era bastante paralelo à superfície normal da amostra que as camadas de tecido na parede da via aérea eram prontamente discernidas. Cinco séries de profundidade (dimensões idênticas à série de profundidade de parênquima) foram registradas em cada uma das 4 frações de pulmão por animal e estas pilhas mantinham, na média, 75,2 $\mu$ m de perfil de parede de via aérea cada uma.

### *Células inflamatórias.*

As células inflamatórias de ocorrência esperada nos espaços alveolares seriam, por exemplo, neutrófilos. Eficiente estratégia de amostragem aleatória concebida para revelar a distribuição de carga de fibra também revela a natureza de células inflamatórias com relação às fibras e permite observações imparciais deste compartimento pulmonar.

## RESULTADOS

### Validação do procedimento de digestão pulmonar.

O procedimento de microscopia confocal é não invasivo, pois um cubo do pulmão é analisado em três dimensões e não requer processamento do tecido pulmonar. Para assegurar que os procedimentos de digestão pulmonar e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) usados neste estudo não afetaram a recuperação das fibras de crisotila presentes no pulmão, os resultados obtidos com o procedimento de digestão pulmonar / TEM foram comparados com aqueles obtidos usando microscopia confocal. Os resultados desta análise confirmaram que há uma correlação muito boa entre o número total de fibras no pulmão, quando comparados o procedimento de digestão pulmonar / TEM e a metodologia confocal. Na dose média o coeficiente de correlação entre os dois métodos foi  $r^2=0,92$  e na dose alta  $r^2=0,99$  indicando que o procedimento de digestão / TEM não afeta o número de fibras recuperadas dos pulmões.

### Concentração e Distribuição do Tamanho de Fibra no Aerossol de Exposição

A exposição por inalação foi conduzida como planejado pelo período de exposição de 90 dias. A concentração gravimétrica média no aerossol e o número médio correspondente de fibras/cm<sup>3</sup> na atmosfera de exposição são apresentados na Tabela 4. As dimensões de fibra bivariadas foram determinadas duas vezes durante a primeira semana de exposição e uma vez por semana após isso. A concentração gravimétrica foi determinada diariamente. As dimensões médias do aerossol de fibra estão mostradas na Tabela 5.

As concentrações de fibra para exposição foram inicialmente escolhidas, com base em pré-estudo de calibração ensaiado, para serem 50 e 150 fibras/cm<sup>3</sup> o que corresponde no protocolo de inalação subcrônica de fibra da CE (Bernstein & Riego, 1999) aos níveis de dose média e alta recomendados para exposição. Entretanto, devido a variação na distribuição da fibra de estoque, a concentração média de fibra para exposição a alta dose era de 207 f/cm<sup>3</sup> L>20µm e a de média dose era de 76 f/cm<sup>3</sup> L>20µm.

**Tabela 4 Concentração gravimétrica média do aerossol e número médio correspondente de fibras / cm<sup>3</sup> na atmosfera de exposição.**

Concentração gravimétrica média (mg / m <sup>3</sup> )			Número de fibras (f/cm <sup>3</sup> )		
Grupo	Alvo	Atingido ± S.D.	Total	WHO	L>20µm

Média	1,3	1,32±0,06	3.413	536	76
Alta	3,3	3,56±0,37	8.941	1.429	207
Razão alta/média	2,5	2,7	2,6	2,7	2,7

Total=todos os objetos com uma razão de aspecto (mínima) de 3:1 sem nenhum limite para comprimento e diâmetro.

WHO=fibras maiores do que 5µm de comprimento e menor do que 3µm de diâmetro.

S.D.=desvio padrão das Médias Semanais (Semanas 1 a 13).

**Tabela 5 Dimensões médias da fibra**

	Dose média CA300	Dose alta CA300
<b>Diâmetro</b>		
Faixa (µm)	0,03 – 1,1	0,03 – 2,7
Média geométrica (µm)	0,14	0,15
Desvio padrão geométrico	1,98	1,97
Média aritmética (µm)	0,16	0,17
S.D.	0,10	0,11
Média geométrica (µm)	0,14	0,15
S.D.	1,98	1,97
Mediana (µm)	0,15	0,15

<b>Comprimento</b>		
Faixa (µm)	0,6 – 110	0,7 – 130
Média geométrica (µm)	2,87	2,89
Desvio padrão geométrico	4,21	4,27
Média aritmética (µm)	4,00	4,07
S.D.	16,53	17,05
Média geométrica (µm)	2,87	2,89
S.D.	4,21	4,27
Mediana (µm)	2,5	2,5

S.D.=Desvio padrão.

### **Carga e Depuração Pulmonar de Fibra**

A carga de fibra no pulmão de subgrupos de animais analisados em seguida ao final do período de exposição de 90 dias e após 50 dias e 92 dias de recuperação isenta de exposição está resumida nas Tabelas 6 e 7 para doses média e alta, respectivamente.

**Tabela 6 Dose média**

Ponto no tempo do sacrifício	Após 90 dias de exposição	Após 50 dias de recuperação	Após 92 dias de recuperação
<b>Número de fibras (em milhões de fibras)</b>			
Total de fibras/pulmão	147,1	25,6	21,5
Fibras WHO/pulmão	19,7	6,1	5,4
Fibras L>20µm/pulmão	0,6	0,1	0,1
<b>Diâmetro da fibra</b>			
Faixa (µm)	0,03 – 0,70	0,03 – 0,80	0,03 – 1,8
Média aritmética (µm)	0,10	0,11	0,11
S.D.	0,06	0,07	0,08
Média geométrica (µm)	0,08	0,09	0,09
S.D.	7,72	7,72	7,72
Mediana (µm)	0,08	0,08	0,08
<b>Comprimento da fibra</b>			
Faixa (µm)	0,7 – 90	0,8 – 48	1,0 – 48
Média aritmética (µm)	3,50	4,30	4,20
S.D.	2,80	3,20	3,00
Média geométrica (µm)	2,90	3,50	3,50
S.D.	3,50	3,50	3,50
Mediana (µm)	2,8	3,3	3,3
<b>Volume e superfície de fibra</b>			
Volume médio (µm³)	0,06	0,09	0,09
S.D.	0,014	0,015	0,016
Volume total (mm³)	0,008	0,002	0,002
S.D.	0,001	0,001	0,0004
Área de superfície média (µm²)	1,29	1,73	1,79
S.D.	0,248	0,307	0,154
Área de superfície total (cm²)	1,81	0,46	0,38
S.D.	0,247	0,254	0,086
Razão de aspecto	46,4	44,6	45,4
Comprimento total (m)	509,2	109,1	89,5

**Tabela 7 Dose alta**

Ponto no tempo do sacrifício	Após 90 dias de exposição	Após 50 dias de recuperação	Após 92 dias de recuperação
<b>Número de fibras (em milhões de fibras)</b>			
Total de fibras/pulmão	273,4	50,4	42,8
Fibras WHO/pulmão	45,8	12,3	10,7
Fibras L>20µm/pulmão	1,1	0,2	0,2
<b>Diâmetro da fibra</b>			
Faixa (µm)	0,03 – 2,8	0,03 – 0,73	0,03 – 1,2
Média aritmética (µm)	0,13	0,15	0,13
S.D.	0,09	0,09	0,08
Média geométrica (µm)	0,11	0,12	0,11
S.D.	7,72	7,72	7,72
Mediana (µm)	0,12	0,13	0,12
<b>Comprimento da fibra</b>			

Faixa ( $\mu\text{m}$ )	0,6 – 50	0,7 – 45	0,8 – 50
Média aritmética ( $\mu\text{m}$ )	3,50	4,30	4,20
S.D.	2,90	3,10	3,00
Média geométrica ( $\mu\text{m}$ )	2,80	3,60	3,50
S.D.	3,50	3,50	3,50
Mediana ( $\mu\text{m}$ )	2,6	3,4	3,3
<b>Volume e superfície de fibra</b>			
Volume médio ( $\mu\text{m}^3$ )	0,11	0,13	0,11
S.D.	0,023	0,019	0,012
Volume total ( $\text{mm}^3$ )	0,028	0,007	0,005
S.D.	0,011	0,001	0,001
Área de superfície média ( $\mu\text{m}^2$ )	1,76	2,30	1,98
S.D.	0,442	0,190	0,179
Área de superfície total ( $\text{cm}^2$ )	4,76	1,15	0,86
S.D.	2,286	0,159	0,243
Razão de aspecto	33,1	36,6	40,4
Comprimento total (m)	949,3	214,9	178,0

## OBSERVAÇÕES EM VIDA

### Pesos de corpos

Não houve diferenças estatísticas nos pesos médios de corpos ou no ganho médio de peso de corpos em todo o período de exposição e recuperação.

### Pesos de pulmões

Um aumento dependente da dose em pesos de pulmões foi observado no sacrifício em seguida ao período de exposição de 90 dias e após a recuperação de 50 dias.

Aos 90 dias de recuperação a diferença entre grupos não era mais estatisticamente significativa.

**Tabela 8 Pesos de pulmões (médias / desvio padrão do grupo)**

Tempo	Controle	Dose média	Dose alta
Após 90 dias de tratamento	1,41 0,07	1,60* 0,17	1,87** 0,13
Após 50 dias de recuperação	1,46 0,09	1,68* 0,17	1,91** 0,25
Após 92 dias de recuperação	1,68 0,11	1,70 0,12	1,83 0,16

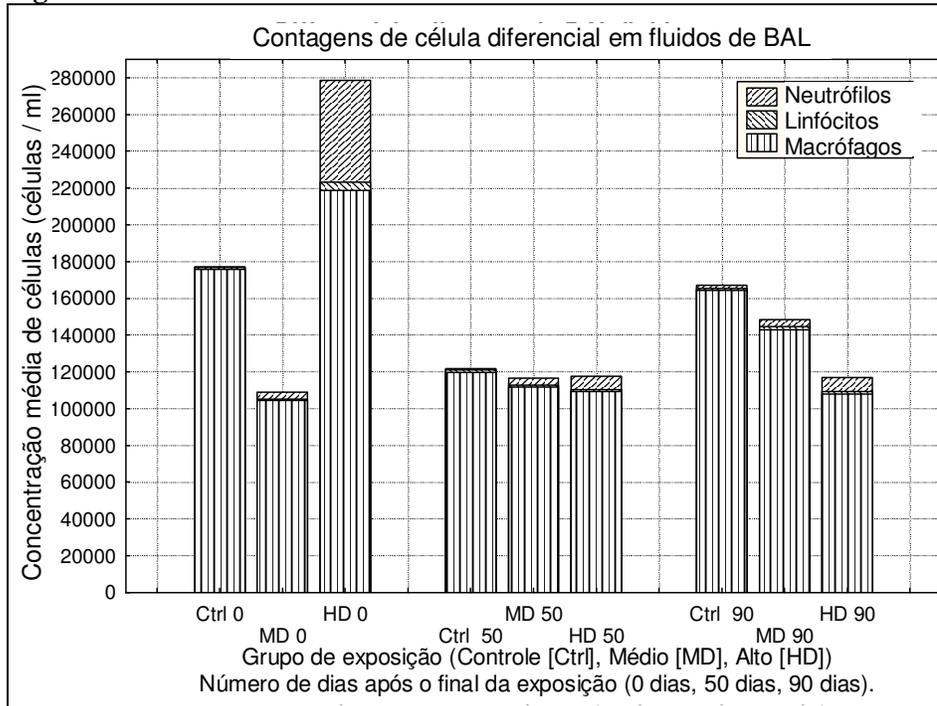
\* / \*\* Teste Dunnett baseado em sig. de variância recolhido a 5% ou 1% de nível.

### Lavagem bronquioalveolar

As lavagens bronquioalveolares foram realizadas em subgrupos de cinco ratos para cada grupo de dose e em cada época de sacrifício em seguida à cessação da exposição. Os resultados das contagens diferenciais de célula estão mostrados na Figura 1. Os valores médios para os volumes de fluido de lavagem bronquioalveolares recuperados foram similares em todos os grupos e não houve nenhum efeito adverso na viabilidade celular. Com a exceção de uma redução na alta dose após a recuperação de 92 dias, não houve diferenças estatisticamente significantes nos números de macrófagos. Para neutrófilos, não houve diferença estatisticamente significante entre a dose média e o controle em qualquer tempo. Na alta dose, imediatamente após cessação da exposição houve um

aumento estatisticamente significativo dos neutrófilos que foi reduzido após 50 e 92 dias. A Tabela 10 mostra os resultados de desidrogenase láctica (LDH),  $\beta$ -glucuronidase e proteína total. Novamente, as diferenças mais notáveis ocorreram imediatamente em seguida à cessação da exposição na LDH de alta dose e proteína total. Após 50 dias não houve diferenças estatisticamente significantes enquanto que após 92 dias houve de novo para LDH e proteína total.

**Figura 1**



**Tabela 9 Bioquímica clínica**

	LDH Gkat/l	B-GRS U/ml	PROTEÍNA T mg/l
APÓS 3 MESES DE TRATAMENTO			
Controle	1,01	3,78	37
Média dose	1,52	4,38	77
Alta dose	2,83**	8,40	182**
APÓS 50 DIAS DE RECUPERAÇÃO			
Controle	1,63	6,12	91
Média dose	1,41	6,49	88
Alta dose	1,94	7,89	107

APÓS 92 DIAS DE RECUPERAÇÃO			
Controle	1,12	4,14	41
Média dose	1,98*	5,43	101**
Alta dose	1,81*	5,97	104**

### Análise da proliferação de células

Os resultados da análise de proliferação por BrdU estão resumidos na Tabela 10. Estão mostrados os resultados de proliferação de célula de subgrupos de 3 ratos dos grupos de tratamento de controle de ar e alta dose na época da recuperação de 92 dias. Esta análise foi conduzida para proporcionar uma indicação da tendência entre o controle a alta dose 92 dias após a cessação da exposição.

A análise de proliferação de célula em pulmões de ratos aos 92 dias de recuperação não indica nenhuma resposta celular significativa nos três compartimentos pulmonares examinados; bronquíolos terminais, parênquima e pleura.

**Tabela 10 Índice de proliferação de células de via aérea de tecido pulmonar após 92 dias de recuperação.**

Achados		Grupo de exposição		
		Controle	Média dose	Alta dose
Região de bronquíolo terminal	Média	8,0		8,31
	Desvio padrão	2,19		2,87
	N	3		3
Parênquima pulmonar	Média	1,43		1,58
	Desvio padrão	1,03		0,98
	N	3		3
Pleura (células / cm)	Média	22,2		21,3
	Desvio padrão	8,65		7,24
	N	3		3

Estatísticas: testes Anova + Dunnett. (Dois lados) \*P<=5%; \*\*P<=1%; \*\*\*P<=0,1%.

STD: desvio padrão. N: número de animais.

Blocos sombreados indicam que não foram medidos.

### Achados de histopatologia no pulmão:

Um resumo detalhado dos achados histopatológicos é mostrado na Tabela 11 para as três datas de sacrifício. A severidade das mudanças histológicas foi classificada por EPS usando uma escala de graduação de 1 a 5 com 1 = muito leve; 2 = leve; 3 = moderado; 4 = marcado e 5 = massivo. Um escore de zero indica que não foi observado qualquer achado..



**Tabela 11 Severidade média de achados/grupo/época de sacrifício**

Achado	Grupo de exposição			
	Sacrifício	Controle	Dose média	Dose alta
Macrófagos alveolares	0	0	1,2	1,4
	50	0,2	0,2	0,6
	92	0	0	0,4
Microgranulomas – na junção bronquíolo-alveolar	0	0	1,6	2,0
	50	0	0,6	1,8
	92	0	1,4	2,0
Bronquiolização alveolar	0	0	0,0	1,2
	50	0	0	0,4
	92	0	0,4	1,2
Fibrose – na junção bronquíolo-alveolar	0	0	1,0	2,0
	50	0	0,8	2,0
	92	0	1,2	2,0

Além disso, os pulmões foram avaliados usando o sistema de graduação descrito por McConnell e Davis (2002) que é um refinamento do sistema original de graduação de Wagner. Classes 1 a 3 representam mudanças celulares enquanto classes 4 a 8 representam graus diferentes de fibrose começando com mínima deposição de colágeno ao nível do bronquíolo terminal e alvéolos (classe 4).

Como mostrado na Tabela 12, no grupo de exposição de média dose ao crisotila apenas uma resposta celular foi observada ou imediatamente após o final da exposição ou durante o período de recuperação de 92 dias (classe 3 McConnell-Davis (Wagner) refletido e classe 1 EPS (muito leve)). No grupo de alta dose, um leve grau de fibrose intersticial foi observado correspondendo a classe 4 McConnell-Davis (Wagner) e classe EPS 2. Além disso, a porcentagem média de fibrose no pulmão foi avaliada em cada época de sacrifício conforme McConnell e Davis (Wagner), como mostrado na Tabela 13. A resposta muito leve no grupo de média dose foi observada em menos de 0,2% dos pulmões. Mesmo no grupo de alta dose, a resposta leve observada ocorreu em menos de 1,4% dos pulmões.

**Tabela 12 Graduação média de acordo com o Sistema de Graduação Wagner**

Grupos de exposição			
Sacrifício	Controle	Média dose	Alta dose
0	1,0	2,6	4,0
50	1,2	1,8	4,0

92	1,0	2,6	4,0
----	-----	-----	-----

**Tabela 13 Percentagem média de fibrose medida no sacrifício**

Sacrifício	Grupos de exposição		
	Controle	Média dose	Alta dose
0	0	0,10	1,39
50	0	0,03	1,32
92	0	0,19	1,26

### **Resultados histopatológicos após 90 dias de exposição:**

No grupo de controle, classe 1 Wagner foi diagnosticada em todos os ratos.

No grupo de média dose, classe 2 Wagner foi diagnosticada em 2 ratos e classe 3 Wagner foi observada em 3 ratos. Estes achados foram caracterizados por macrófagos/microgranulomas alveolares na junção bronquíolo-alveolar. Nos ratos com classe 3 Wagner, bronquiólização alveolar também foi observada. Em 4 ratos, fibrose focal mínima foi observada nos microgranulomas. Uma vez que a severidade e a distribuição desta fibrose eram restritas a um ou dois focos nos microgranulomas, a lesão foi classificada com classe 3 Wagner.

No grupo de alta dose, classe 4 Wagner foi diagnosticado em todos os ratos. Este achado foi caracterizado por macrófagos/microgranulomas alveolares e bronquiólização alveolar em 4 ratos e fibrose na junção bronquíolo-alveolar em todos os ratos.

### **Resultados histopatológicos após 90 dias de exposição e 45 dias de recuperação:**

No grupo de controle, classe 1 Wagner foi diagnosticada em 4 ratos e classe 2 foi diagnosticada em 1 rato, enquanto a classe 2 Wagner foi caracterizada por mínima agregação de macrófagos.

No grupo de média dose, classe 1 Wagner foi diagnosticada em 1 rato e classe 2 Wagner foi observada em 4 ratos. Estes achados foram caracterizados por macrófagos/microgranulomas alveolares na junção bronquíolo-alveolar. Em 3 ratos, mínima fibrose local foi observada em microgranulomas. Uma vez que a severidade e a distribuição desta fibrose eram restritas a um ou dois focos, a fibrose foi considerada insuficiente para classificação como classe 4 Wagner.

No grupo de alta dose, classe 4 Wagner foi diagnosticada em todos os ratos. Este achado foi caracterizado por macrófagos/microgranulomas alveolares e fibrose na

junção bronquíolo-alveolar.

### **Resultados histopatológicos após 90 dias de exposição e 92 dias de recuperação:**

No grupo de controle, classe 1 Wagner foi diagnosticada em todos os ratos.

No grupo de média dose, classe 2 Wagner foi diagnosticado em 3 ratos, classe 3 foi observado em 1 rato e classe 4 foi observado em 1 rato. Estas descobertas foram caracterizadas por microgranulomas na junção bronquioalveolar. No rato com classe 3, bronquiolarização alveolar foi diagnosticada na junção bronquioalveolar. No rato com classe 4, ligeira fibrose foi observada na junção bronquioalveolar. Em um rato, mínima fibrose focal foi observada em microgranulomas. Uma vez que a severidade e a distribuição desta fibrose eram restritas a um ou dois focos, a fibrose foi considerada insuficiente para classificação como classe 4 Wagner.

### **MICROSCOPIA CONFOCAL:**

#### **Volume de tecido pulmonar examinado – método microscópico confocal versus exame histopatológico:**

Na presente investigação,  $2,49 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  de pulmão foram examinados por microscopia confocal. O tecido pulmonar amostrado para este estudo foi distribuído por uma região 25 vezes maior do que aquela tipicamente observada para histopatologia de rotina.

O exame histológico é tipicamente limitado a anomalias estruturais de células ou grupos de células com um tamanho mínimo de 10 micra. A análise microscópica confocal, como conduzida neste estudo, foi feita a uma resolução de 0,1 microns, 3 vezes maior na resolução do que aquela obtível por análise histopatológica tradicional.

Em conseqüência, o volume de tecido amostrado aqui era distribuído bem mais uniformemente por todo o pulmão e, dessa forma, forneceu uma amostra adequada para análises quantitativas. O uso de análise microscópica confocal quantitativa produziu um exame detalhado de fibrilas e sua associação a células de tecido pulmonar para dar resultados robustos de uma maneira imparcial.

#### **Aparência de tecido pulmonar, fibras, macrófagos alveolares e neutrófilos**

As Figuras 2, 3, 4 e 5 mostram seções ópticas através de regiões do parênquima (Figuras 2 a 4) ou vias aéreas (Figura 5) de animais dos grupos de tempo de exposição de 90 dias, recuperação de 0 dias; exposição de 90 dias, recuperação de 50 dias; e exposição de 90 dias, recuperação de 92 dias, respectivamente. Cada uma destas Figuras mostra três colunas com imagens confocais de tecido pulmonar dos grupos de tratamento de alta dose, média dose e controle de ar, respectivamente. A Figura 4 possui duas filas mostrando (fila superior) células livres localizadas adjacente ao tecido septal parenquimal (fila inferior).

A aparência típica de macrófagos mudou durante o curso do tempo de recuperação. A 0 dias de recuperação em grupos de tratamento de média e alta dosagem (ver Figuras 2A e 2B) macrófagos freqüentemente apareciam grandes e esponjosos e eram ocasionalmente vistos em grupos. Após 50 dias de recuperação em grupos de tratamento de média e alta dosagem (ver Figuras 3A e 3B) macrófagos estavam às vezes agrupados, mas eram raramente ampliados e apenas eram esponjosos quando grandes, o que raramente foi observado. Macrófagos esponjosos geralmente estavam em vias aéreas e estavam talvez mortos e no processo de serem eliminados. Após 92 dias de recuperação em grupos de tratamento de média e alta dosagem (ver Figuras 4A, 4C e 4E) macrófagos não ocorreram em grupos e, embora o tamanho deles fosse ocasionalmente maior do que aquele dos macrófagos no grupo de controle de ar, tipicamente todos os macrófagos eram de tamanho similar (cerca de 10 micra de diâmetro).

Em todos os grupos de recuperação, as imagens registradas (ver Figura 5) dos animais de alta dose (Painel A), média dose (Painel B) e controle de ar (Painel C) mostram perfis de lúmen de via aérea revestidos com células ciliadas. Raramente as fibras aparecem na superfície do lúmen. Quando presentes, as fibras CA300 aparecem como material similar a fibrila (vermelho) em superfície de célula ciliada (seta, Painel A), como mostrado por este painel de imagens do grupo de exposição de 90 dias, recuperação de 92 dias.

#### **Associações entre macrófagos e partículas e/ou fibras**

Houve agrupamentos ocasionais de macrófagos alveolares, mas apenas em regiões onde fibras longas estavam presentes. O número de partículas em macrófagos alveolares nos grupos de média e alta dosagem caiu 10 a 20 vezes ao longo do curso de 0 a 92 dias de recuperação indicando uma depuração constante de material muito pequeno do compartimento pulmonar.

#### **Células inflamatórias**

Para distinguir entre macrófagos e neutrófilos, tais células foram especificamente buscadas e registradas para visualizar o núcleo em cada, forma de crescente em macrófagos e multilobulado em neutrófilos.

Nenhuma célula inflamatória foi observada nas imagem coletadas aleatoriamente dados usados para calcular a compartimentação de fibras dentro do pulmão.

Entretanto, para investigar a presença de neutrófilos, uma busca deliberada foi conduzida no tecido do pulmão para localizar e identificar especificamente neutrófilos. Alguns neutrófilos foram observados em espaços de ar alveolares nos animais dos grupos de média e alta dose com exposição de 90 dias e recuperação de 92 dias, após busca deliberada exaustiva por este tipo de célula. Por exemplo, ao buscar especificamente neutrófilos, aproximadamente 84% das células livres eram macrófagos alveolares e 16% das células livres encontradas em espaços alveolares na região de parênquima em pulmão de alta dose eram neutrófilos. Observou-se que vários neutrófilos continham fibras parcialmente fagocitadas. A busca deliberada na região de parênquima no pulmão de um rato do grupo de média dose rendeu 97% de macrófagos alveolares e 3% de neutrófilos.

**Figura 2**

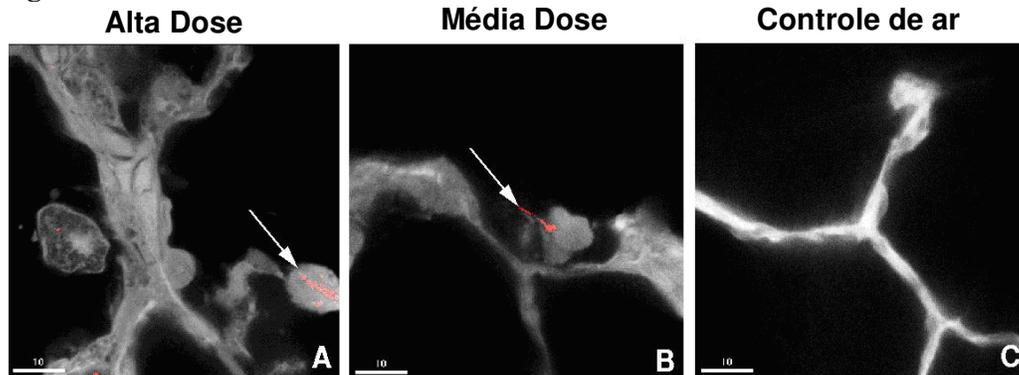


Figura 3 Micrográficos confocais da região de parênquima de campos de visão representativos registrados de três grupos de tratamento aos 90 dias de exposição, 0 dia de recuperação: alta dose (Painel A), média dose (Painel B) e controle de ar (Painel C). Os painéis mostram fibras CA300 (vermelhas) completamente fagocitadas (seta, Painel A) e parcialmente fagocitada (seta, Painel B). A barra representa 10 micrômetros.

**Figura 3**

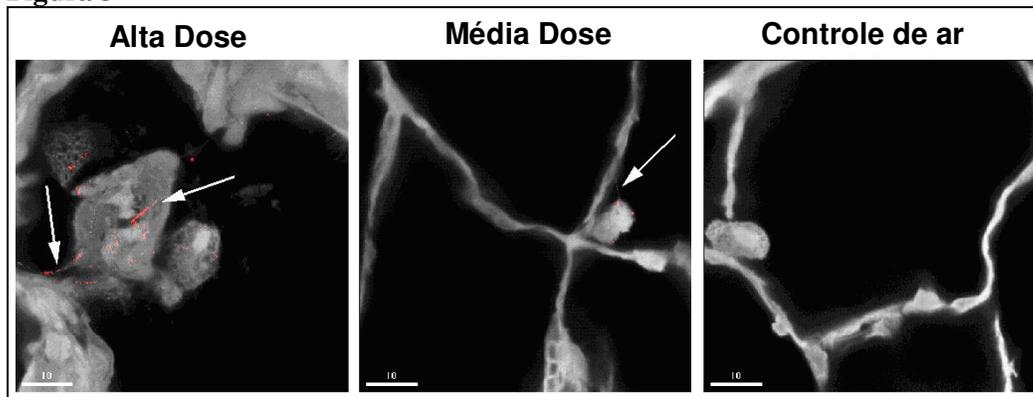


Figura 4 Micrográficos confocais da região de parênquima de campos de visão representativos registrados de três grupos de tratamento aos 90 dias de exposição, 50 dias de recuperação: alta dose (Painel A), média dose (Painel B) e controle de ar (Painel C). Observem as fibras CA300 (vermelhas) completamente fagocitadas (seta, Painel A) e parcialmente fagocitadas (seta, Painel B). A barra representa 10 micrômetros.

**Figura 4**

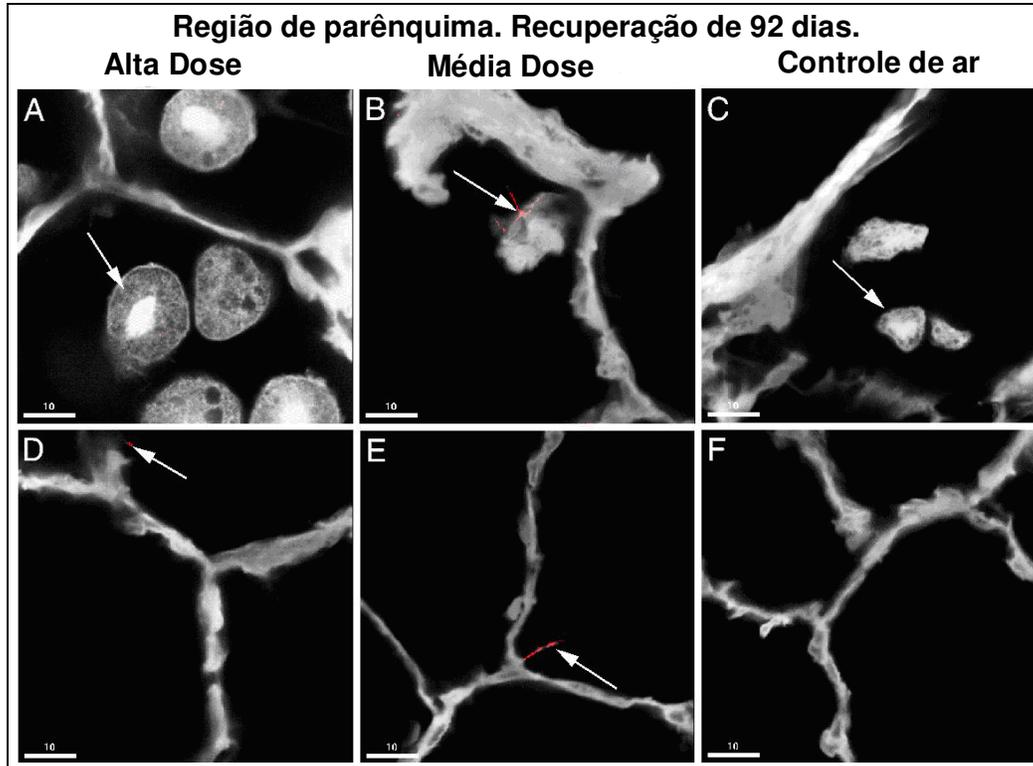


Figura 5 Micrográficos confocais da região de parênquima de campos de visão representativos registrados de três grupos de tratamento aos 90 dias de exposição, 92 dias de recuperação alta: alta dose (Painel A), média dose (Painel B) e controle de ar (Painel C). Material particulado fino (vermelho) pode ser visto dentro dos macrófagos alveolares esponjosos (seta, Painel A). Ocasionalmente, neutrófilos com fibras parcialmente fagocitadas foram observados em espaços alveolares (seta, Painel B). Macrófagos alveolares estavam ocasionalmente presentes na região de parênquima de animais de controle de ar (Painel C). Os campos de visão da região de parênquima típicos (Painéis D a F) mostram septos alveolares e, muito raramente, uma fibra em contato com a superfície epitelial alveolar (Painel E). A barra representa 10 micrômetros.

Figura 5

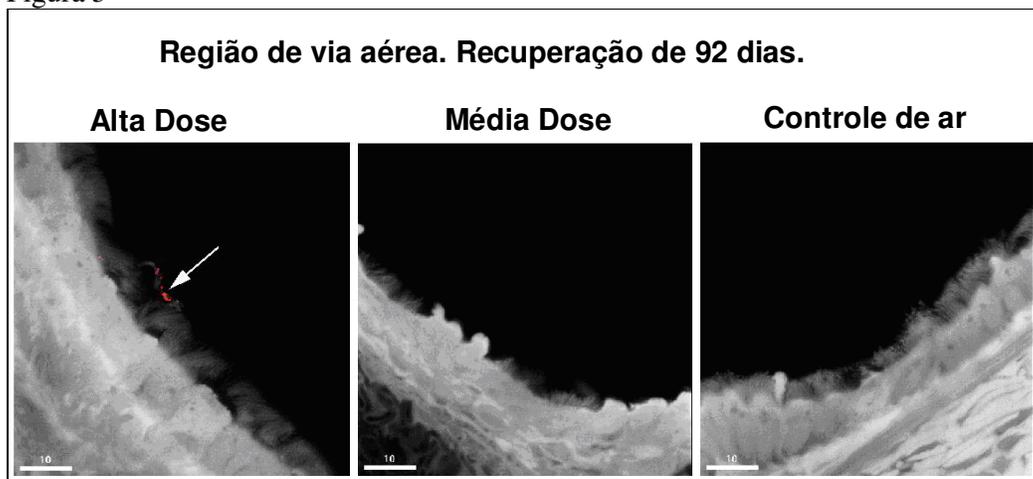


Figura 6 Micrográficos confocais da região de via aérea de campos de visão representativos registrados de três grupos de tratamento aos 90 dias de exposição, 92 dias de recuperação: alta dose (Painel A), média dose (Painel B) e controle de ar (Painel C). Estes painéis mostram perfis

de lúmen de via aérea revestidos com células ciliadas. As fibras raramente aparecem na superfície do lúmen a essa época; fibrilas mais finas (vermelhas), quando presentes, aparecem nas superfícies de células ciliadas (seta, Painel A). A barra representa 10 micrômetros.

## DISCUSSÃO

### Biopersistência

Recentes publicações claramente mostram para fibras minerais sintéticas a relação da biopersistência com a toxicidade por inalação crônica e a resposta tumoral a injeção intraperitoneal crônica no rato (Bernstein et al., 2001a & 2001b). Na essência, se uma fibra dissolver rapidamente e desaparecer do pulmão, ela não causará um efeito cancerígeno. A aceitação deste conceito foi incorporada em 1997 na Diretriz da Comissão Européia sobre fibras minerais feitas pelo homem (Comissão Européia, 1997).

Mostrou-se que a crisotila é rapidamente removida do pulmão logo após inalação em experimentos animais (Bernstein et al., 2003a, 2003b, 2004, 2005a, 2005b, 2005c) com depuração das fibras mais longas ( $L > 20\mu\text{m}$ ) variando de 0,3 a 11,4 dias.

Como a crisotila é uma fibra mineral que ocorre naturalmente, não é surpreendente que haja algumas ligeiras diferenças em biopersistência dependendo da origem e da classe comercial testada. Entretanto, face a gama de solubilidade das camadas da fibra mineral a crisotila se situa na direção do final da escala e varia desde a fibra menos persistente até uma fibra com biopersistência na faixa de lãs de vidro e rocha. Ela é menos biopersistente do que as fibras cerâmicas testadas ou os vidros de finalidades especiais (Hesterberg et al., 1998) e mais de 50 vezes menos biopersistente do que os anfíbolios.

A rápida depuração das fibras longas de crisotila do pulmão, quer dizer aquelas fibras que não podem ser efetivamente depuradas por macrófagos, proporciona uma indicação do que pode acontecer quando a crisotila é inalada. Enquanto as fibras vítreas sintéticas (SVF) possam se dissolver congruentemente (todos os elementos componentes se dissolvendo a taxas proporcionais a seus mol equivalentes na fibra) ou incongruentemente (lixiviando com liberação intensificada de elementos específicos, Christensen et al., 1994) as fibras de crisotila parecem se separar em pequenas partículas e fibras menores. Em pH ácido, tal como ocorre no macrófago, a crisotila se torna menos estável ocorrendo a depuração/desintegração das fibras longas de crisotila. Wypych et al. (2005) mostraram *in vitro* que a lixiviação ácida das fibras de crisotila remove as folhas similares a brucita restando essencialmente sílica amorfa.

A desintegração das fibras proporciona uma base para compreender a potencial toxicidade da crisotila. A crisotila não age como uma fibra *in vivo*, mas preferencialmente como uma partícula. A rápida desintegração das fibras de crisotila resulta na exposição a um número maior de partículas de sílica amorfa e fibras mais curtas.

### **Estudos de inalação crônica de crisotila:**

Se o modo primário de ação da crisotila a altas doses é por meio de uma liberação intensificada de partícula resultante do colapso estrutural das fibras longas, então, os resultados observados nos estudos de inalação crônica de crisotila devem ser coerentes com aqueles relatados para altas concentrações de partículas não fibrosas.

As concentrações de exposição e cargas pulmonares para uma série de estudos conduzidos com protocolos similares em fibras vítreas sintéticas e amianto serpentina e anfíbio foram recentemente avaliadas (Bernstein & Hoskins, 2005). As exposições a amianto nestes estudos foram incluídas como controles positivos com a concentração de exposição baseada em 10mg/m<sup>3</sup> de massa de aerossol. Isto resultou, para a crisotila, em uma concentração total de exposição ao aerossol de fibra de 102.000 fibras/cm<sup>3</sup> com 10.600 WHO fibras/cm<sup>3</sup> (Hesterberg et al., 1993). A carga pulmonar correspondente foi de 54.810.000.000 fibras/pulmão após 24 meses de exposição.

O conceito de tumor pulmonar induzido por sobrecarga de partículas no rato tem sido discutido extensivamente (Morrow, 1988, 1992; Oberdorster et al., 1992, 1995 a&b; Bellman et al.; Hext, 1994). A exposição a alta dose de particulados pelo rato está relacionada a perda da capacidade dos macrófagos de depurar as partículas, o que posteriormente dispara uma resposta inflamatória que pode levar a doença. Bernstein & Hoskins (2005) avaliaram este nível de exposição para crisotila com base nestes critérios e mostraram que a resposta tumoral pulmonar em estudos de inalação crônica de crisotila pode ser provocada em termos de uma alta concentração de partículas pouco solúveis e de média toxicidade .

### **Comparativo de exposição ao número de fibras:**

Como resumido na Tabela 4, a concentração média de exposição à crisotila para todos os comprimentos de fibra foi de 3.413 fibras/cm<sup>3</sup> no grupo de exposição de média dose e 8.941 fibras/cm<sup>3</sup> no grupo de exposição de alta dose.

Bellmann et al. (2003) em um estudo similar de inalação por 3 meses, que foi baseado no mesmo protocolo, investigou os efeitos biológicos de uma microfibras de vidro com finalidade especial (microfibras E-glass), da fibra de lã de rocha MMVF21 e de uma nova fibra de aplicação a alta temperatura (fibra de silicato de cálcio emagnésio-, CMS) em ratos Wistar.

A Tabela 14 apresenta as características comparativas de exposição a aerossol do crisotila a partir deste estudo e de três fibras usadas no estudo de Bellman et al. (2003). A exposição a crisotila em alta dose ultrapassou, tanto em termos do número de fibras L>20µm quanto a exposição total partícula/fibra por cm<sup>3</sup>, a exposição para todas as três das fibras estudadas por Bellmann et al. (E-glass, MMVF21 & CMS).

Ao comparar o número de fibras com o comprimento>20µm e diâmetro <1µm por cm<sup>3</sup>, que corresponde às fibras que podem ser inaladas pelo rato (respirável pelo rato), a

crisotila de média dose é similar ao CMS de alta dose. Isto é de importância particular, pois Bellmann et al. (2003) concluíram que:

“Os resultados do grupo de exposição a CMS indicaram que os efeitos podem ser determinados pela presença de partículas não fibrosas e que a fibrose pode não ser preditivo de atividade cancerígena de amostras de fibra, se a preparação da fibra contiver uma fração significativa de partículas não fibrosas.”

**Tabela 14 Características comparativas de exposição a aerossol de crisotila, E-glass, MMVF21 & CMS**

Grupo	Número total de fibras e partículas por cm <sup>3</sup>	Fibras com comprimento <5µm por cm <sup>3</sup>	Fibras com comprimento =5-20µm por cm <sup>3</sup>	Fibras com comprimento >20µm por cm <sup>3</sup>	Fibras com comprimento >20µm diâmetro <1µm por cm <sup>3</sup>	Fibras WHO por cm <sup>3</sup>	Número de partículas por cm <sup>3</sup>	Concentração gravimétrica (mg/m <sup>3</sup> )
<b>RESULTADOS DO CRISOTILA A PARTIR DESTE ESTUDO</b>								
Crisotila média	3.413	2.877	460	76	76	536	--	1,3
Crisotila alta	8.941	7.512	1.222	207	207	1.429	--	3,6
<b>RESULTADOS PARA E-GLASS, MMVF21 &amp; CMS A PARTIR DE BELLMANN ET AL. (2003)</b>								
E-glass baixa	579	337	181	17	14	198	44	2,4
E-glass média	1.771	993	572	51	43	623	154	7,0
E-glass alta	5.655	3.431	1.744	142	120	1.887	337	17,3
MMVF21 baixa	131	28	59	17	9	77	26	3,3
MMVF21 média	372	79	175	58	29	232	61	11,6
MMVF21 alta	1.176	254	533	174	85	705	217	37,0
CMS alta	3.070	287	819	173	105	990	1.793	49,5

### **Comparação de crisotila com fibras vítreas sintéticas:**

Mesmo com esta possível limitação na interpretação dos resultados da exposição à crisotila, ainda é informativo comparar a resposta de crisotila à resposta de E-glass, MMVF21 & CMS como avaliados com protocolos similares. Como quase todos os mesmos pontos finais foram avaliados em ambos os estudos, reproduzimos na Tabela 15 a tabela sumário que foi apresentada por Bellmann et al. (2003) e adicionamos a esta tabela os resultados para crisotila do presente estudo. Além disso, adicionamos na Tabela 14 a concentração de exposição de aerossol de fibra para a fração de comprimento maior do que 20µm e para a exposição total a fibra & particulado.

Como mencionado acima, a exposição à crisotila de média dose corresponde, em termos de exposição a aerossol, mais à exposição a CMS de alta dose. Mesmo com uma

exposição a concentração mais alta de partículas totais, a crisotila de média dose produziu menos resposta inflamatória do que a exposição similar de CMS. Em particular, a exposição à crisotila de média dose não resultou em nenhuma fibrose intersticial enquanto a exposição a CMS produziu fibrose.

Mesmo ao comparar a crisotila de alta dose com mais de duas vezes a exposição ao total de partícula/fibra do CMS, enquanto níveis similares de fibrose foram observados na escala Wagner, a exposição à crisotila resultou em uma menor resposta PMN.

Quando a crisotila de alta dose é comparada a E-glass e MMVF21, a concentração de exposição ao total de fibra/partícula foi de 1,6 e 7,6 vezes maior enquanto a exposição a fibras  $L > 20 \mu\text{m}$  foi de 1,7 e 2,4 vezes maior ou crisotila.

**Tabela 15 Comparação de amianto crisotila com fibras vítreas sintéticas: principais achados em diferentes datas de sacrifício pós-exposição. Adaptado de Bellmann et al. (2003), Tabelas 5 e 15 com a inclusão dos resultados para crisotila deste estudo.**

Parâmetro	Dose	Crisotila			E-glass			MMVF21			CMS				
		No sacrifício (semana)			No sacrifício (semana)			No sacrifício (semana)			No sacrifício (semana)				
		0	7	14	1	7	14	1	7	14	1	7	14		
Concentração de exposição: total de fibras e partículas/cm <sup>3</sup>	Baixa				579			131							
	Média	3413			1771			372							
	Alta	8941			5655			1176			3070				
Concentração de exposição de fibra: fibras $L > 20 \mu\text{m}/\text{cm}^3$ com diâmetro $< 1 \mu\text{m}$	Baixa				14			9							
	Média	76			43			29							
	Alta	207			120			85			105				
Aumento no peso do pulmão	Baixa														
	Média	+	+	+++	+++	+	+								
	Alta	++	++	+++	+++	++	++	++	+						
Parâmetros bioquímicos em BAL (LDH, R-glucuronidase, proteína)	Baixa														
	Média				++	++	+								
	Alta <sub>+</sub>	+	+	+++	+++	++	+++	+	+						
Aumento de PMN em BAL	Baixa				+										
	Média				+++	+++	+	++	+						
	Alta	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
Proliferação de epitélio bronquiolar terminal	Baixa														
	Média							+							
	Alta							++				++			
Proliferação de células parenquimais alveolares	Baixa														
	Média							++				+			
	Alta										++				
Proliferação de células pleurais	Baixa														
	Média							+							
	Alta										+				
Fibrose intersticial	Baixa				+	+	+	+							
	Média <sub>+</sub>	+	+	+	+	++	+	+	+						
	Alta <sub>++</sub>	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++			

Nota: Blocos sombreados indicam nenhuma exposição para este nível de dose.

Preenchimentos em diagonal indicam nenhuma medição para este nível de dose.  
Diferença significativa comparada a controles (teste de Dunnett de dois lados) indicada por +, p<0,05 ou escore EPS 1 para fibrose; ++, p<0,01 ou escore EPS 2 para fibrose; +++, p<0,001 ou escore EPS 3 para fibrose.

### **Depuração de fibra curta:**

Como detalhado na Tabela 4, e como é característica para todas as exposições à fibra, há muito mais fibras curtas menores que 20µm de comprimento e mesmo mais, menores que 5µm de comprimento. Bernstein et al. (----) mostraram que a depuração das fibras curtas em estudos de biopersistência ou é similar a ou mais rápida do que a depuração de poeiras agressivas insolúveis (Stoeber et al., 1970; Muhle et al., 1987). Entretanto, como apresentado acima, com todas as poeiras agressivas insolúveis, as concentrações incomumente altas podem retardar a depuração e resultar nos fenômenos de sobrecarga de pulmão. Muito embora medidas específicas de taxas de depuração de macrófagos não fossem tomadas neste estudo, é muito provável que a alta dose de crisotila no presente estudo se aproximou do ou ultrapassou o nível que produziria sobrecarga de pulmão. Isto é suportado pelos resultados do nível de média dose que a 5.000 vezes o US-TLV para amianto crisotila não produz nenhuma resposta fibrótica.

Em um relatório recente emitido pela Agency for Toxic Substances and Disease Registry intitulada “Expert Panel on Health Effects of Amiantos and Synthetic Vitreous Fibers: The Influence of Fiber Length”, os especialistas afirmaram que “Dados os achados de estudos epidemiológicos, estudos em animais de laboratório e estudos de genotoxicidade in vitro combinados com a capacidade do pulmão de depurar fibras curtas, os especialistas concordaram que há um peso forte de evidência que o amianto e as SVF (fibras vítreas sintéticas) menores do que 5µm são improváveis de causar câncer em humanos.” (ATSDR, 2003; U.S. Environmental Protection Agency [EPA], 2003). Além disso, Berman e Crump (2004) em seu documento de suporte técnico para a EPA sobre risco relacionado a amianto também concluíram que fibras mais curtas não parecem contribuir para doenças.

### **Conclusões:**

Estudos de toxicologia por inalação com amianto crisotila foram realizados no passado com doses excessivamente altas sem considerar o número ou as dimensões da fibra. Como tal, as exposições ultrapassaram os níveis de sobrecarga do pulmão tornando a avaliação quantitativa destes estudos difícil, se não impossível.

Este estudo é o primeiro a avaliar a resposta celular e patológica no pulmão de rato a um aerossol bem definido de amianto crisotila em um estudo de toxicologia por inalação subcrônica. O protocolo, baseado naquele estabelecido pela Comissão Européia para a avaliação de fibras vítreas sintéticas, também era destinado a avaliar o potencial para reversibilidade de quaisquer tais mudanças e permitir a associação de respostas com a dose de fibra no pulmão e a influência do comprimento de fibra.

Apesar dos 90 dias de exposição e dos 92 dias de recuperação, a crisotila, à exposição média de 76 fibras L>20µm/cm<sup>3</sup> (3.413 fibras totais/cm<sup>3</sup>) não resultou em nenhuma fibrose (escore Wagner 1,8 a 2,6) em qualquer etapa e apenas um mínimo aumento em

PMNs. Em um estudo comparável sobre a fibra de CMS biosolúvel a um nível de exposição similar, a classe 4 Wagner de fibrose foi observada com um aumento moderado em PMNs. Os autores atribuíram isto a um efeito de sobrecarga devido ao grande número de partículas. A dose mais alta de crisotila usada no presente estudo ultrapassou tanto em termos de fibras  $L > 20 \mu\text{m}$  quanto fibras totais/ $\text{cm}^3$  a concentração usada em qualquer outro estudo comparável subcrônico de fibras. Mesmo assim, a resposta global a esta dose excessivamente alta de crisotila foi menor do que aquela de MMVF21 ou E-glass a concentrações consideravelmente inferiores.

Como previsto pelos recentes estudos de biopersistência sobre crisotila, este estudo claramente mostra que naqueles a uma concentração de exposição de 5.000 vezes maior do que o US-TLV, a crisotila não produz nenhuma resposta patológica significativa.

## Referências

- 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.
- Bellmann, B., H. Muhle, O. Creutzenberg, and R. Mermelstein. 1992. Irreversible pulmonary changes induced in rat lung by dust overload. *Environ Health Perspect* 97:189-91.
- Bernstein, D., J. Chevalier, and P. Smith. 2005. Comparison of Calidria Chrysotile Asbestos to Pure Tremolite: Final Results of the Inhalation Biopersistence and Histopathology Examination Following Short-Term Exposure. *Inhal Toxicol* 17 (9):427-449.
- 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., 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., 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., R. Rogers, and P. Smith. 2005. The biopersistence of Canadian chrysotile asbestos following inhalation: Final Results Through 1 Year After Cessation of Exposure. *Inhal Toxicol* 17 (1):1-14.
- Bernstein, D., R. Rogers, and P. Smith. 2005. The biopersistence of Canadian chrysotile asbestos following inhalation: final results through 1 year after cessation of exposure. *Inhal Toxicol* 17 (1):1-14.
- Bernstein, David M., Rick Rogers, and Paul Smith. 2004. The biopersistence of Brazilian chrysotile asbestos following inhalation. *Inhalation Toxicology* 16 (9):745-761.
- Christensen, V. R., S. L. Jensen, M. Guldborg, and O. Kamstrup. 1994. Effect of chemical composition of man-made vitreous fibers on the rate of dissolution in vitro at different pHs. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 5:83-6.

- 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.
- 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., W. C. Müller, E. E. McConnell, J. Chevalier, J. G. Hadley, D. M. Bernstein, P. Thevenaz, and R. Anderson. 1993. Chronic inhalation toxicity of size-separated glass fibers in Fischer 344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 20 (4):464-76.
- Hext, P. M. 1994. Current perspectives on particulate induced pulmonary tumours. *Hum Exp Toxicol* 13 (10):700-15.
- 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.
- McConnell, E. E., and J. M. Davis. 2002. Quantification of fibrosis in the lungs of rats using a morphometric method. *Inhal Toxicol* 14 (3):263-72.
- Morrow, P. E. 1988. Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundam Appl Toxicol* 10 (3):369-84.
- Oberdorster, G. 1995a. Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles. *Regul Toxicol Pharmacol* 21 (1):123-35.
- Oberdorster, G. 1995b. The NTP talc inhalation study: a critical appraisal focused on lung particle overload. *Regul Toxicol Pharmacol* 21 (2):233-41.
- Oberdorster, G., J. Ferin, and P. E. Morrow. 1992. Volumetric loading of alveolar macrophages (AM): a possible basis for diminished AM-mediated particle clearance. *Exp Lung Res* 18 (1):87-104.
- WHO. 1985. Reference Methods for Measuring Airborne Man-Made Mineral Fibres (MMMF), WHO/EURO MMMF Reference Scheme. Edited by W. E. T. C. f. M. a. E. A. MMMF. Vol. EH-4. Copenhagen: World Health Organisation.
- Wypych, F., L. B. Adad, N. Mattoso, A. A. Marangon, and W. H. Schreiner. 2005. Synthesis and characterization of disordered layered silica obtained by selective leaching of octahedral sheets from chrysotile and phlogopite structures. *J Colloid Interface Sci* 283 (1):107-12.