

AVALIAÇÃO DE GLÂNDULAS SALIVARES E INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM DMBA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

AUTOR: JOSÉ PEDRO PATRÍCIO RELVÃO

ORIENTADOR: MESTRE DR. EDUARDO LEITÃO COSTA

CO-ORIENTADOR: PROF. DOUTOR ANTÓNIO SILVÉRIO CABRITA

Coimbra, Junho de 2015

AGRADECIMENTOS

Com a conclusão desta etapa da minha vida, quero expressar o meu reconhecimento e sincero agradecimento a algumas pessoas que tornaram este trabalho possível. Sem a dedicação, o esforço e o empenho destas pessoas tudo seria muito mais difícil. Quero deixar o meu profundo agradecimento:

Ao meu orientador, Mestre Dr. Eduardo Leitão Costa agradeço a orientação, os esclarecimentos de dúvidas e conselhos prestados ao longo de todo este tempo para que a realização deste trabalho fosse possível. Agradeço também a inalcançável disponibilidade, dedicação e empenho prestados. De forma muito especial agradeço todo o apoio e a profunda amizade que compartilhamos.

Ao meu Co-orientador, Professor Doutor António Cabrita agradeço todo o acompanhamento ao longo deste tempo, todos os seus conselhos e conhecimentos transmitidos que foram importantíssimos para a formalização deste trabalho e a minha formação.

Ao Mestre Eng. Ricardo Cabeças pela ajuda na análise estatística dos dados.

A todos os meus amigos agradeço o apoio e amizade ao longo destes anos. Por estarem sempre presentes, nos momentos mais difíceis, dando força e apoio incondicional, mas também por todos os momentos bons que proporcionaram.

Finalmente, quero agradecer de forma especial a toda a minha família, eles que foram sempre o grande apoio durante a minha vida, acreditando sempre em mim. Quero agradecer de forma muito particular à minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão que sempre me apoiaram em tudo e me permitiram investir na minha formação académica e pessoal.

A todos um Muito Obrigado!

Índice

Lista de tabelas	VI
Introdução	1
DMBA	4
Glândulas Salivares	6
Átomos e Tecidos	9
Fluorescência de Raios-X	14
Objetivos	15
Material e Métodos	17
Resultados	21
Discussão	31
Conclusão	35
Bibliografia	37

Lista de Tabelas

I	Percentagens de cada elemento químico nos vários tecidos.	13
II	Média e desvio padrão dos valores obtidos no grupo controlo	22
III	Média e desvio padrão dos valores obtidos no grupo teste	22
IV	Valores de p obtidos entre o grupo controlo e teste	23
V	Média e desvio padrão do grupo controlo obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o potássio (K)	25
VI	Média e desvio padrão do grupo controlo obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o fósforo (P)	26
VII	Média e desvio padrão do grupo controlo obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o Enxofre (S)	26
VIII	Média e desvio padrão do grupo teste obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o potássio (K)	27
IX	Média e desvio padrão do grupo teste obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o fósforo (P)	27
X	Média e desvio padrão do grupo teste obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o Enxofre (S)	28
XI	Valores de p obtidos a partir dos quocientes dos vários elementos relativos ao potássio (K), fósforo (P) e enxofre (S), entre os grupos controlo e teste	28

Abstract

Many injuries which occur in human body is frequently caused by the action of xenobiotics present in the environment and coming into contact with the body. The xenobiotics that induce a morphological damage, also cause functional alterations of varying severity. The aim of this work is to evaluate the elemental structure of submandibular glands in rats intoxicated with 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) using x-ray fluorescence technique (Hitachi modelo SEA 6000VX). This study performed with 20 male Wistar rats with 8 weeks old at the beginning of the study. The rats were distributed into two groups of 10 animals each. In the control group, was maintained for 4 weeks without any inducing manipulation changes. In test group was subjected to the administration of 7,12-dimethyl-benzanthracene (DMBA) three times a week, for 4 weeks at a dose of 20 mg / kg in each takes. At the end of the administration's, the animals were sacrificed and their necropsy was made. The fragments collected were studied under light microscopy, stained by Haematoxylin & Eosin. For elemental structure analysis was used x-ray fluorescence technique (XRF), where the following elements were identified: aluminium, phosphorus, sulfur, chloride, potassium, calcium and iron. Relatively to histologic evaluation, between control and test groups, there were not found significant histopathological changes. Comparatively with elemental structure analysis, in both groups, were found statistically significant differences. These results allow us to conclude that the DMBA administration is an inducer of structural changes in the studied tissue, even when there is no obvious histological changes.

Resumo

Muitas lesões que ocorrem no corpo Humano são frequentemente causadas pela ação de xenobióticos presentes no meio ambiente e que estão em contacto com o nosso corpo. Os xenobióticos que induzem lesões morfológicas, também causam alterações funcionais com variada severidade. Este trabalho teve como principal objetivo a avaliação elemental de glândulas submandibulares em ratos intoxicados, experimentalmente por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), através da análise por fluorescência de Raio-x. Este estudo realizou-se com 20 ratos Wistar com oito semanas de idade no início do estudo. Os animais foram distribuídos em 2 grupos com 10 ratos cada. No grupo controlo os animais foram mantidos sem qualquer manipulação durante 4 semanas. No grupo teste foi submetido à administração de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), três vezes por semana, durante 4 semanas, numa dose de 20mg/Kg em cada dose. No final do período de administrações todos os animais foram sacrificados e foi feita a necropsia. Foram colhidos fragmentos das glândulas submandibulares para avaliação histológica e elemental. Os fragmentos colhidos foram estudados por microscopia de luz através de lâminas coradas com HE. Para a análise elemental usou-se a técnica de análise por Fluorescência de Raios-X (FRX), onde foram identificados os seguintes elementos: alumínio, fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio e ferro. Em ambos os grupos não se verificaram alterações histopatológicas. Com base na análise elemental foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e teste em alguns elementos. Estes resultados permitem-nos concluir que a administração de DMBA é um indutor de alterações estruturais do tecido estudado, mesmo quando não é evidente a existência de alterações histológicas.

Introdução

Algumas substâncias químicas são consideradas tóxicas, quando absorvidas pelo organismo podem provocar uma intoxicação, que consiste, na alteração qualitativa ou quantitativa da atividade celular de um determinado órgão. A capacidade de uma substância tóxica provocar uma intoxicação depende da composição química, da sua dose, concentração, porta de entrada no organismo e tempo de atuação. O grau de toxicidade depende da espécie e da constituição do indivíduo. A sensibilidade para o tóxico varia de indivíduo para indivíduo, dependendo da idade e da função do órgão recetor^{[1][2]}. Estas substâncias são agrupadas em vários grupos, segundo as suas características químicas. O grupo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) destaca-se pelo seu potencial tóxico, constituindo uma ameaça para toda a população. O sistema hematopoiético, pelas suas características biológicas, sofre alterações quando exposto a fatores agressores, como os HPAs. A seriedade dos efeitos que a exposição aos HPAs pode ter sobre o organismo humano, fez com que estes compostos fossem amplamente estudados e surgissem novas medidas preventivas para a exposição a estes compostos^[3]. Podemos encontrar os hidrocarbonetos em produtos como os detergentes ou os solventes, tratando-se de moléculas que contêm apenas



Figura 1: Símbolo usado para as substâncias tóxicas. Fonte: http://negocios.maiadigital.pt/hst/sinalizacao_seguranca/sinalizacao_perigo#toxica.

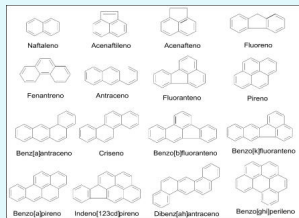


Figura 2: Lista de HPAs de maior impacto Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAgUvMAL/aspectos-ecotoxicologicos-hidrocarbonetos-polyciclicos-aromaticos-rodrigo-ornellas-meire-antonio-azeredo-joao-paulo-machado-torres>.

átomos de carbono e hidrogênio. Fazem parte do grupo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) mais de 100 produtos químicos diferentes, formados principalmente nos processos de combustão incompleta de carvão, petróleo, gás, tabaco e outras substâncias orgânicas como a preparação de alimentos grelhados. A agência dos estados unidos para substâncias tóxicas e o registo da doença escolheram dezassete HPAs de maior impacto para a saúde humana: acenafieno, acenafileno, antraceno, benzantraceno, benzopirenos, benzofluoretano, benzoperileno, benzo fluorantenos, criseno, dibenzantraceno, fluoranteno, fluoreno, indenodipireno, fenantreno e pireno^{[1][2][3][4][5][6][7]}. Os HPAs entram no organismo principalmente pelos níveis ambientais destas substâncias, por emissões vulcânicas, incêndios florestais, combustão de substâncias tóxicas, carvão ou combustíveis^{[3][4][6]}. A contribuição das fontes naturais é muito limitada, restringindo-se praticamente à queima de florestas e emissões vulcânicas, devendo-se então principalmente a fontes antropogénicas. Esta pode-se dividir em quatro grandes grupos: Emissões domésticas - predominantemente associadas à queima de carvão, petróleo, gás, lixo entre outras substâncias orgânicas como o tabaco; Emissões de transportes - ocorrem essencialmente ao nível do solo. A emissão de HPAs através destas fontes depende de vários fatores, como por exemplo, do tipo de combustível e da qualidade deste; Emissões industriais - estão relacionadas com a produção de coque, produção primária de alumínio e preservação de madeiras; Origens agrícolas - estão associadas principalmente à queima de matéria orgânica de campos e de florestas^{[2][6]}. Os HPAs constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem dois ou mais anéis benzénicos ligados, constituídos por átomos de carbono e hidrogênio organizados sob forma linear, angular ou agrupada. Estas substâncias, bem como seus derivados nitrados oxigenados, em virtude das suas propriedades físico-químicas e da grande distribuição ambi-

ental, o risco de contaminação humana é significativo. Em geral, as concentrações ambientais de seus derivados nitrados oxigenados são cerca de 100 a 1000 vezes inferiores às dos HPAs^{[2][3]}. Caracterizam-se por serem pouco solúveis em água e, em geral, a sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis. Apresentam também coeficientes de partição octanol/água superiores a 1000, demonstrando grande afinidade lipofílica que aumenta com o número de anéis aromáticos da molécula, sendo por esta razão, rapidamente absorvidos através da pele, por ingestão ou por inalação e distribuídos rapidamente no organismo^{[2][3]}. A composição e a complexidade das misturas de HPAs dependem das fontes emissoras. Em geral, essas misturas são bastante complexas, contendo uma grande variedade de HPAs, em diferentes níveis de concentração^{[1][2][8][7]}. Tanto os HPAs como os seus derivados estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de neoplasias no homem^[3]. Cerca de 6,5 milhões de pessoas morrem de cancro anualmente, cujos tratamentos são dispendiosos, demorados, com eficácia diminuída e normalmente trazem muito sofrimento aos doentes, mostrando a importância do entendimento, da avaliação e do controlo da exposição humana a substâncias que possuam atividade carcinogénica/mutagénica podendo trazer, particularmente quando se sabe que a grande maioria dos cancros resulta de interações genéticas e ambientais, sendo as causas externas (ambientais), em conjugação com fatores de suscetibilidade adquirida, as mais importantes. No caso dos HPAs e dos seus derivados, isto é feito geralmente através da monitorização dos níveis ambientais destas substâncias, do conhecimento das suas vias de penetração no organismo, de seu metabolismo, bem como da avaliação precoce de seus efeitos fisiológicos^{[3][9]}. De entre o elevado número de HPAs conhecidos, temos o 7,12 – dimetilbenzantraceno (DMBA), que é um protótipo sintético de HPA. Sendo um dos mais potentes agentes carcinogénicos conhecidos^{[2][4]}.

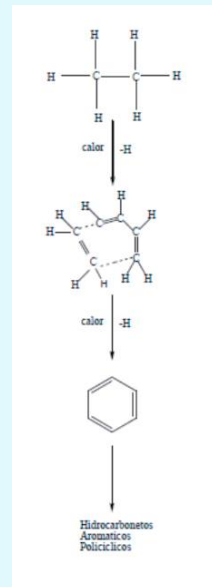


Figura 3: Pirossíntese de HPAs iniciada com etano. Fonte: Isabel, P., Jesus, M. "Avaliação Morfológica e Molecular na Administração Experimental de DMBA", Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Química, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. (2011).



Figura 4: Confeção de alimentos, das principais origens dos HPAs. Fonte: <http://www.alunosonline.com.br/quimica/benzopireno-um-composto-aromatico-cancerigeno.html>.



Figura 5: Fumo de tabaco que contém DMBA. Fonte: <http://www.alunosonline.com.br/quimica/benzopireno-um-composto-aromatico-cancerigeno.html>.

DMBA

O DMBA é um hidrocarboneto ($C_{20}H_{16}$) com uma massa molar de 256,34 g/mol e ponto de ebulição de 122-123°C (395,15-396,15 K) sendo classificado como carcinogénico. Apresenta uma estrutura química derivada do antraceno em que a adição do núcleo benzénico à região K e a adição de dois grupos metilo à região L do antraceno, conferem à molécula maior efeito carcinogénico^[2]. O DMBA é uma substância tóxica presente no ar, em alguns alimentos e no fumo do tabaco. O tabagismo em humanos tornou-se uma problemática nos dias de hoje, por estar relacionado com uma série de doenças graves, sendo sugerido que o uso de tabaco está associado a 70-80% de tumores orais, e que a percentagem aumenta com o sinergismo de álcool e tabaco. Encontramos grandes concentrações de DMBA (40-100 ng por cigarro) na fração do alcatrão presente no fumo do tabaco. O DMBA é frequentemente utilizado para investigação na indução de mutações ou de tumores, por ser um potente carcinogénico. É usado na indução de tumores de pele, da mama e de necrose supra-renal em ratos. Na literatura podemos encontrar algumas referências relativamente às doses que provocam estes efeitos. Quando se administra uma dose única de 30 mg (em óleo vegetal) por via oral, ou 5 mg por via endovenosa (emulsão líquida), induz tumores mamários em ratos de estirpe Sprague-Dawley e também provoca necrose supra-renal em 2-3 dias. Um outro estudo também demonstrou que uma quantidade menor, 20 mg, dado por via oral, também induz rapidamente tumores mamários. Para uma única dose de DMBA dada na alimentação em ratos de estirpe Sprague-Dawley, a dose letal média (DL50) é de 27 mg/100 g e a dose que provoca lesão supra-renal foi de 30 mg por rato (18 mg/100 g). Para uma única injeção intravenosa, a DL50 é 4,75 mg/100 g e a dose ideal para indução da lesão supra-renal foi de 5 mg

por rato (3 mg/100 g). O DMBA também é utilizado em vários estudos na indução de tumores de pele^[2]. O máximo de absorção de DMBA ocorre entre 3-6 horas após a ingestão, sendo primeiramente metabolizado no fígado, em que a excreção biliar é a sua principal via de eliminação. Cerca de 96-97% do DMBA está presente na bÍlis já na forma de metabolitos. Na glândula mamária apresenta o pico de concentração entre 3-6 horas, variando de estudo para estudo, provavelmente devido aos diferentes veÍculos e modos de administração. Vários estudos indicam que o DMBA é rapidamente absorvido no trato intestinal e tende a acumular-se no tecido adiposo. O DMBA sofre reações oxidativas extensas na posição reativa do anel, para produzir intermediários reativos eletrofÍlicos. Estes intermediários vão interagir com o DNA e com proteÍnas e estão potencialmente envolvidos na etiologia de tumores induzidos por quÍmicos^{[1][2]}. O DMBA torna-se um potente carcinogénico após ser oxidado por uma forma ativa, em trÊs etapas para o metabolito DMBA-3,4-diol-1,2-epóxico. Os produtos de metabolização do DMBA ligam-se covalentemente a bases do DNA, sendo associados a mutações no DNA, podendo criar distúrbios na formação do fuso durante a divisão celular com a indução de aneuploidias, poliploidias e instabilidade cromossómica, em linhagens celulares. Estas alteraões cromossómicas podem induzir carcinogénese ou morte celular^[4]. O DMBA é ativado no tecido hepático pela isoforma 1B1 (CYP1B1) do citocromo P450 ao intermediário 3,4-epóxico, que é então hidrolisada a 3,4-diol pelo epóxico hidrolase microssomal. Este composto sofre novamente epoxidação nas posiões 1,2 pelo CYP1A1 ou pelo CYP1B1 para formar o metabolito final, DMBA-3,4- diol-1,2-epóxico. Só é possível quantificar/qualificar os metabolitos do DMBA, se presentes, depois de serem extraÍdos dos órgãos/tecidos^[1].

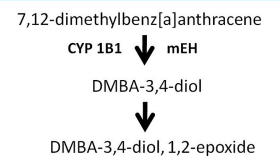


Figura 6: Compostos que podem resultar da metabolização do DMBA. Fonte: <http://ebm.sagepub.com/content/236/7/765/F4.expansion>.

Glândulas Salivares

Este grupo de glândulas classificam-se como glândulas exócrinas e localizam-se na cavidade oral, para onde fazem a excreção da saliva. Cada glândula salivar é formada por elementos parenquimatosos (ácinos e sistema de ductos) revestidos e sustentados por tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo forma o estroma glandular, composto por uma cápsula e septos conjuntivos que dividem os ácinos e os ductos em lobos e lóbulos e ainda contém os vasos sanguíneos, linfáticos e os nervos que suprem as glândulas. Os ácinos podem ser constituídos por células serosas, por células mucosas ou pelos dois tipos de células ao mesmo tempo (células mistas). As células serosas são identificadas como células piramidais, com núcleo esférico, e as células mucosas, com núcleos achatados localizados na base. Os ácinos abrem-se em vários ductos, formando o sistema de ductos que é formado por ductos intercalares, ductos estriados e ductos excretores. Os ductos intercalares são os mais próximos dos ácinos e os menores ductos do sistema, originando os ductos estriados que por sua vez reúnem-se em ductos progressivamente de maior calibre, os ductos excretores^[10].

As glândulas salivares apresentam-se assim em dois grandes grupos, três pares de glândulas salivares maiores (parótidas, submandíbulares e sublinguais) e as glândulas salivares menores. Todas estas glândulas produzem saliva e fazem a sua excreção para a cavidade oral. A saliva tem um papel importante na manutenção da cavidade oral, para além de fazer o controlo de Ca e P dos dentes, também faz a proteção de tecidos duros e moles da cavidade oral. Tem função digestiva, bactericida, imunológica e ainda facilita a gustação. O fluxo salivar varia ao longo do dia tendo um reduzido fluxo de manhã, aumentando à tarde e é quase nulo durante o sono. Quando muito estimulada pode chegar à produção

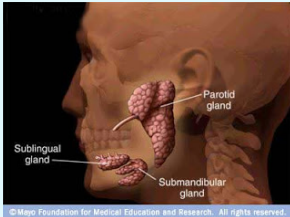


Figura 7: Glândulas salivares maiores Fonte: <http://alunojon.blogspot.pt/2012/08/adenoma-pleomorfo-na-glandula-parotida.html>.



Figura 8: Principais funções da saliva Fonte: <http://www.saliva.com.br/saliva/func>.

de 4 ml por minuto, com uma produção diária de cerca de 1000 ml. Aproximadamente 93% da saliva é produzida pelas glândulas salivares maiores. A viscosidade difere entre as três maiores glândulas, a saliva da glândula parótida é a menos viscosa, a da sublingual é intermédia e a mais viscosa é a da submandibular. As glândulas salivares menores são estimadas entre 600 e 1.000, são pequenas, independentes e encontradas praticamente em toda a cavidade oral, com exceção de gengiva e da porção anterior do palato duro. A maioria das glândulas salivares menores é constituída por ácinos com células mucosas e serosas, tendo por isso uma função glandular do tipo mista. Apresentam pequenos ductos que se abrem na cavidade oral, onde fazem a excreção da saliva. Pertencem às glândulas salivares menores as glândulas labiais, bucais, palatinas, glossopalatinas e linguais, dependendo da sua localização^[10]. As glândulas salivares maiores são constituídas por grande número de ácinos, ao redor das quais o estroma é muito bem desenvolvido. Temos então dentro deste grupo de glândulas as parótidas, as submandibulares e as sublinguais. A parótida é uma glândula acinosa composta, em que a sua porção secretora é formada exclusivamente por células serosas. Esta é a maior das três glândulas salivares. O estroma apresenta acúmulos de tecido adiposo no seu interior, além disso, toda glândula parótida apresenta um ou mais linfonodos no seu estroma, que foram incorporados durante o desenvolvimento. Localiza-se entre o ramo da mandíbula e o processo estilóide do osso temporal, tendo uma relação íntima com a artéria carótida externa e com o nervo facial. Faz a excreção da saliva para a cavidade oral pelo ducto parotídeo^[10]. A submandibular é uma glândula mista com ácinos constituídos maioritariamente por células serosas, sendo os restantes constituídos por células mucosas. Localiza-se ao longo do corpo da mandíbula com relação íntima com o músculo milohioideo, que separa o lobo superficial do lobo profundo. Tem aproxi-

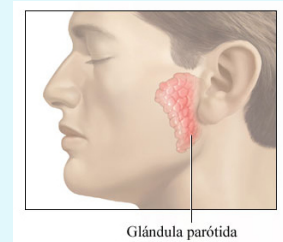


Figura 9: Glândula parótida Fonte: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=G1%C3%A2ndula+Par%C3%B3tida&lang=3.



Figura 10: Glândula submandibular Fonte: http://www.brandonhitchcock.co.nz/submandibular_gland.html.

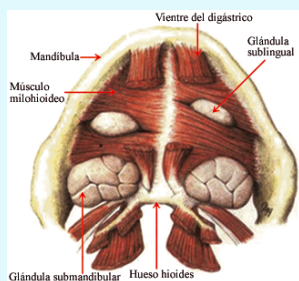


Figura 11: Glândulas sublinguais
 Fonte: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Gl%C3%A2ndula+Sublingual&lang=3.

madamente metade do tamanho da parótida, com um formato em U. Ocupa quase todo o trígono submandibular, com relações com a veia facial, artéria facial e o nervo marginal da mandíbula. Apresenta ductos estriados longos, ductos intercalares curtos e faz a excreção da saliva para a cavidade oral pelo ducto de Wharton. Esta glândula contribui com cerca de 60-67% da secreção salivar não estimulada^{[10][11]}. As glândulas sublinguais são um conjunto de glândulas muito próximas que estão ligadas por um estroma comum e envolvidas por uma cápsula, localizada na membrana mucosa do assoalho da boca. Representa a menor das glândulas salivares maiores (2 a 4 cm). Nestas glândulas quase todos os ácinos apresentam células mucosas com semiluas serosas^[10]. Localizam-se no assoalho da boca, acima do músculo milohioideo, estendendo-se da linha média até a região do segundo molar, bilateralmente. Mantem relações com o freio lingual, corpo mandibular, glândula e ducto salivar submandibular, nervos e vasos linguais, ventre lingual, músculos gênio-hioideo, genioglosso e milohioideo^{[10][12]}. As doenças não neoplásicas das glândulas salivares podem classificar-se como distúrbios do desenvolvimento, doenças inflamatórias agudas (virais e bacterianas) e crônicas, doenças granulomatosas, doenças imunológicas, sialolitíase, lesões quísticas, sialoadenose e trauma. Normalmente afetam com mais frequência as glândulas salivares maiores. Os tumores das glândulas salivares correspondem, a cerca de 3% das afeções da região da cabeça e pescoço, sendo a maioria de origem epitelial. Os tumores benignos são os mais frequentes, representando cerca de 54 a 79% destas doenças, enquanto os malignos representam 21 a 46% dos tumores. O adenoma pleomórfico é o tumor mais comum em glândulas salivares por representar cerca de 50% de todas as neoplasias destas glândulas. O cistoadenoma papilífero linfomatoso, corresponde 4 a 14% de todos os tumores, sendo o segundo mais frequente^[13]. Aproximadamente 25% dos tumores

da parótida, 50% dos tumores da submandíbular, 81% dos tumores das glândulas salivares menores são malignos. O tumor maligno mais comum da glândula parótida é o carcinoma mucoepidormóide. O carcinoma adenóide quístico é o tumor maligno mais frequente da glândula Submandíbular e das glândulas salivares menores^[14]. Cerca de 95% dos nódulos palpáveis da glândula parótida são de origem tumoral, sendo a mais frequentemente afetada (64 a 80%). O palato é o sítio mais comum dos tumores de glândulas salivares menores. O curso clínico destas neoplasias é caracterizado, por um crescimento insidioso e uma aparência inofensiva, ainda assim podem estar presentes sinais indicativos de malignidade, como dor e paralisia de nervo craniano. Os tumores malignos de baixo grau de malignidade e em estádios iniciais, são usualmente curáveis por resseção adequada como único tratamento. As lesões neoplásicas das glândulas salivares são mais frequentes em mulheres, na 3ª década de vida para os tumores benignos e na 6ª década de vida para os malignos. O prognóstico, portanto, depende da localização, do tipo histológico, do grau de diferenciação e estágio clínico do tumor^{[13][14][15]}.

Átomos e Tecidos

A evolução do Universo surgiu na sequência de reações nucleares entre as partículas fundamentais do meio cósmico, cujo efeito mais importante foi a formação dos elementos químicos. Nos primeiros instantes, logo após o *Big Bang*, o Universo era extremamente quente e denso, em que não havia átomos, prótons ou neutrões, pois as altíssimas temperaturas impossibilitavam que os seus constituintes se ligassem. Com a diminuição da temperatura, permitiu a génese de prótons e neutrões. Os átomos dos elementos químicos mais leves, principalmente Hidrogénio (H) e Hélio (He), foram os primeiros a ser formados, quando o Universo



Figura 12: Sialografia da glândula parótida Fonte: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Sialografia&lang=3.

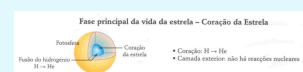


Figura 13: Nucleossíntese primordial Fonte: <http://cosmicapoeira.blogspot.pt/uma-estrela-entra-na-sequencia.html>.

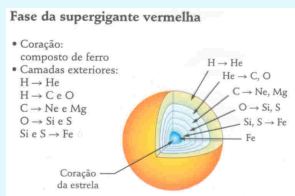


Figura 14: Nucleossíntese estelar Fonte: http://profs.ccems.pt/PauloPortugal/CFQ/Arquitectura_Universo/Arquitectura_Universo.html.

Figura 15: Tabela periódica Fonte: <http://www.tabelaperiodicacompleta.com/wp-content/uploads/2011/12/tabela-periodica-completa.png>.

era denso e quente, chamada de nucleossíntese primordial. Os demais elementos têm sua origem no interior das estrelas e foram sintetizados por reações nucleares de fusão, em que núcleos mais leves resultam em núcleos mais pesados, chamada de nucleossíntese estelar. Há presença de diversos elementos químicos no corpo dos seres humanos. Saber quais os elementos que compõem o corpo humano é essencial para entender como funciona, seus mecanismos fisiológicos e de como interagem as suas estruturas. Eles são essenciais para o bom funcionamento do nosso organismo, a ausência ou deficiência destes elementos podem gerar um funcionamento inadequado do organismo, gerar doenças ou até mesmo levar à morte. Muitos destes elementos químicos são obtidos através dos alimentos e da água que bebemos. Cerca de 96% do nosso corpo é composto por quatro elementos, oxigênio, carbono, hidrogênio e azoto. Os outros elementos apresentam-se em quantidade bem menores, mas não são menos importantes, para o funcionamento do corpo humano^[16].

Os principais elementos do corpo humano são: Oxigênio (O) - É o elemento químico que está presente em maior quantidade no corpo humano (cerca de 65% da massa corporal total). Constituinte da água e das moléculas orgânicas (que contêm carbono e hidrogênio, produzidos por um sistema vivo). É necessário para a respiração celular, que produz trifosfato de adenosina (ATP), uma substância química muito rica em energia. Carbono (C) - É um dos elementos mais importantes para a vida. Compõe as principais cadeias das moléculas orgânicas (lipídios, hidratos de carbono e proteínas) presentes no nosso organismo. Corresponde a cerca de 19% da massa corporal total. Hidrogênio (H) - É o elemento químico mais abundante no universo. Compõe a água, todos os alimentos e grande parte das moléculas orgânicas presentes no corpo humano. Corresponde a cerca de 10% da massa corporal total do corpo humano. Azoto (N) - Presente nos ácidos nucleí-

cos (DNA e RNA) e proteínas. Corresponde a cerca de 3,1% da massa corporal. Cálcio (Ca) - Dos minerais que formam o corpo humano, o cálcio é o mais abundante e vital para o nosso desenvolvimento. Encontra-se ao longo de praticamente todo o corpo, principalmente, na formação e composição de ossos e dentes. Necessário para muitos processos corporais, como por exemplo, coagulação sanguínea, contração muscular e regulação de proteínas. Corresponde a cerca de 1,5% da massa corporal. Encontrado no queijo, leite, iogurte, vegetais verdes folhosos e peixe. Fósforo (P) - Componente de muitas proteínas, ácidos nucleicos (DNA, RNA) e trifosfato de adenosina (ATP), necessário para a estrutura normal de ossos, dentes e produção de energia. Corresponde a cerca de 1% da massa corporal. Encontrado em laticínios, peixes, carnes vermelhas e cereais integrais. Potássio (K) – É muito importante na condução de impulsos neuromusculares. A forma ionizada (catião) está presente no fluído intracelular. Corresponde a cerca de 0,30% da massa corporal. Encontrado nas frutas e vegetais frescos, especialmente banana, couve, batata e pão integral. Enxofre (S) - Elimina metais pesados, como mercúrio ou chumbo, altamente prejudiciais ao organismo. Está localizado nos aminoácidos e é componente de muitas proteínas. Corresponde a cerca de 0,25% da massa corporal. Sódio (Na) - Essencial no sangue para manter o equilíbrio de água, é necessário para a condução de impulsos neuromusculares. A forma ionizada (Na⁺) está presente no fluído extracelular. Corresponde a cerca de 0,20% da massa corporal. Encontrado em carnes, peixes, leguminosas (lentilha), cereais integrais e vegetais. Cloro (Cl) - Normalmente encontrado no corpo humano para o modo de ião negativo (Cl⁻), que neutraliza as cargas positivas dos fluidos, que devem ser neutros. Trata-se de um electrólito importante para manter o equilíbrio normal de líquido no corpo. Corresponde a cerca de 0,15% da massa corporal. Magnésio (Mg) – Permite o ATP guardar energia na célula. Necessário

Oxigénio

Símbolo: O

Número atómico: 8

Massa atómica: 16u

Carbono

Símbolo: C

Número atómico: 6

Massa atómica: 12u

Hidrogénio

Símbolo: H

Número atómico: 1

Massa atómica: 1,0u

Azoto

Símbolo: N

Número atómico: 7

Massa atómica: 14u

Cálcio

Símbolo: Ca

Número atómico: 20

Massa atómica: 40u

Fósforo

Símbolo: P

Número atómico: 15

Massa atómica: 31u

Potássio

Símbolo: K

Número atômico: 19

Massa atômica: 39u

Enxofre

Símbolo: S

Número atômico: 16

Massa atômica: 32u

Sódio

Símbolo: Na

Número atômico: 11

Massa atômica: 23u

Cloro

Símbolo: Cl

Número atômico: 17

Massa atômica: 35u

Magnésio

Símbolo: Mg

Número atômico: 12

Massa atômica: 24u

Ferro

Símbolo: Fe

Número atômico: 26

Massa atômica: 56u

para o funcionamento de muitas enzimas e reações metabólicas essenciais. Atua na formação de anticorpos e alívio do stress. Corresponde a cerca de 0,1% da massa corporal. Encontrado nos cereais integrais, soja, legumes e frutas (limão). Ferro (Fe) – É essencial no metabolismo de quase todos os organismos vivos. É encontrado na hemoglobina (proteína distribuidora do oxigênio do sangue) e em algumas enzimas necessárias para a produção de ATP. Capta o oxigênio dos pulmões e distribui para o resto do corpo, através do sangue. Corresponde a cerca de 0,1% da massa corporal. Encontrado em carnes, aves, músculos e leguminosas (feijão)^[16].

Existem também elementos que entram no corpo humano e que até aos dias de hoje ainda não se conhece qualquer função útil para o organismo. O alumínio é um dos mais comuns, entra no nosso corpo por exemplo, através do uso das panelas na hora de cozinhar os alimentos, mas é facilmente eliminado pela urina, em poucas horas ou dias. Muitos destes elementos são mais perigosos como é o caso dos metais pesados (Chumbo, mercúrio). Estes entram no corpo e não são eliminados podendo (dependendo da quantidade) desencadear graves doenças^[16]. A variação das propriedades físicas entre os tecidos e a sua variabilidade dentro de qualquer tipo de órgão ou tecido particular, para muitas propriedades podem ser diretamente relacionados com a composição do tecido. O fator relevante pode ser a composição bioquímica, para proporções de instância de lípidos, proteínas e água no tecido, ou pode ser a sua composição a um nível elementar, ou uma combinação de ambos. As percentagens elementares dos tecidos podem ser calculadas e são apresentadas na Tabela I, em que uma grande variedade de tecidos é analisada. Os valores foram retirados de ICRP (1975), atualizado por Woodard e White (1986), em conjunto com algumas estimativas da composição para vários ossos inteiros dados por White et al (1987). Estes valores foram

selecionados a partir de 24 diferentes análises ósseas listados por White et al. Foram retirados de sete grupos homogêneos de tecidos, incluindo todos os tecidos moles, tecidos moles excluindo adiposo e medula amarela e tecidos que se encontram em faixas específicas de teor de água^[17].

Tabela I: Percentagens de cada elemento químico nos vários tecidos.

Tecidos	H	C	N	O	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca	Fe
Bexiga	10,5	9,6	2,6	76,1	0,2		0,2	0,2	0,3	0,3		
Sangue Total	10,2	11,0	3,3	74,5	0,1		0,1	0,2	0,3	0,2		0,1
Vasos Sanguíneos	9,9	14,7	4,2	69,8	0,2		0,4	0,3		0,1	0,4	
Osso Cortical	3,4	15,5	4,2	43,5	0,1	0,2	10,3	0,3			22,5	
Osso esponjoso	8,5	40,4	2,8	36,7	0,1	0,1	3,4	0,2	0,2	0,1	7,4	0,1
Crânio	5,0	21,2	4,0	43,5	0,1	0,2	8,1	0,3			17,6	
Coluna Vertebral	7,1	25,8	3,6	47,2	0,1	0,1	5,1	0,3	0,1	0,1	10,5	
Cérebro	10,7	9,5	1,8	76,7	0,2		0,3	0,2	0,3	0,3		
Mama	10,6	33,2	3,0	52,7	0,1		0,1	0,2	0,1			
Tecido Conjuntivo	9,4	20,7	6,2	62,2	0,6			0,6	0,3			
Olhos	10,7	6,9	1,7	80,3			0,1	0,1		0,2		
Tecido adiposo	11,4	59,8	0,7	27,8	0,1		0,1		0,1			
Coração	10,3	12,1	3,2	73,4	0,1	0,1	0,2		0,3	0,2		0,1
Intestino Delgado	10,6	11,5	2,2	75,1	0,1	0,1	0,1		0,2	0,1		
Rim	10,3	13,2	3,0	72,4	0,2	0,2	0,2		0,2	0,1		
Fígado	10,2	13,9	3,0	71,6	0,2	0,3	0,3					
Pulmão	10,3	10,5	3,1	74,9	0,2	0,2	0,3		0,3	0,2		
Músculo Cardíaco	10,4	13,9	2,9	71,8	0,1	0,2	0,2		0,2	0,3		
Músculo Esquelético	10,2	14,3	3,4	71,0	0,1	0,2	0,3		0,1	0,4		
Ovário	10,5	9,3	2,4	76,8	0,2	0,2	0,2		0,2	0,2		
Pancreás	10,6	16,9	2,2	69,4	0,2	0,2	0,1		0,2	0,2		
Pele	10,0	20,4	4,2	64,5	0,2	0,1	0,2		0,3	0,1		
Espinal medula	10,7	14,5	2,2	71,2	0,2	0,4	0,2		0,3	0,3		
Baço	10,3	11,3	3,2	74,1	0,1	0,3	0,2		0,2	0,3		
Estômago	10,4	13,9	2,9	72,1	0,1	0,1	0,2		0,1	0,2		
Testículos	10,6	9,9	2,0	76,6	0,2	0,1	0,2		0,2	0,2		
Tiróide	10,4	11,9	2,4	74,5	0,2	0,1	0,1		0,2	0,1		
Traqueia	10,1	13,9	3,3	71,3	0,1	0,4	0,4		0,1	0,4		

Fluorescência de Raios-X

A análise por fluorescência de raios X é um método de análise elementar qualitativo e quantitativo que se aplica à identificação de praticamente todos os elementos. O princípio deste método é muito simples, baseia-se na medição das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra. Induz transições eletrônicas entre níveis mais internos dos átomos utilizando radiações eletromagnéticas de energia adequada. A gama da radiação de raios-X é a região com comprimentos de onda entre 10^{-2} e 10 nm, com energias muito superiores ao visível^{[18][19][20]}. Na reorganização do átomo e regresso ao estado fundamental, estes átomos podem libertar o excesso de energia através da emissão de um fóton X, de energia igual à diferença de energia de ligação dos níveis entre os quais se deu a transição. Ou seja, quando um fóton com energia na região dos raios-X interage com os eletrões da camada mais interna do átomo, esses eletrões são removidos, deixando uma lacuna nesse lugar. Esta lacuna pode ser preenchida por eletrões da camada seguinte ou mesmo de camadas mais afastadas, para promover a estabilidade. Como resultado, há um excesso de energia no processo, que é manifestado na forma de emissão de raios-X característicos de cada átomo presente na amostra^{[18][19]}. A técnica de análise por Fluorescência de Raios-X (XRF) permite a identificação de quase todos os elementos da tabela periódica. Para conseguirmos identificar e conhecer a concentração dos elementos da amostra, através da fluorescência de raio X, é necessário relacionar a intensidade da radiação da fluorescência com a concentração de determinado elemento na amostra. Elementos com número atômico inferior a 11 (sódio) apresentam energias de emissão de raios-X característico inferiores a 1 keV, não detetáveis na maioria dos equipamentos^{[19][21]}. Trata-se de uma técnica não destrutiva

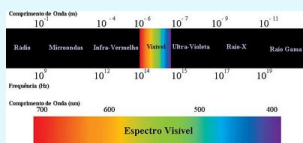


Figura 16: Espectro eletromagnético Fonte: <https://harmoniadomundo.wordpress.com/2013/03/23/estrelas3/>.



Figura 17: Demonstração do comportamento do elétron quando o átomo é excitado Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAA7YgAL/quimiluminescencia-bioluminescencia>.

e que na maior parte dos casos não necessita de qualquer preparação prévia da amostra, permitindo ainda a deteção simultânea dos diferentes elementos constituintes da amostra. Esta é uma técnica rápida, segura, simples, permite a utilização de amostras sólidas, líquidas e gasosas e tem custos reduzidos relativamente a outras técnicas de identificação. A grande limitação da técnica de Fluorescência de Raios-X será a complexidade da interpretação dos espectros assim como a quantificação da abundância de cada elemento. Em amostras irregulares e com distribuição elementar heterogénea, torna-se impossível uma determinação quantitativa. A radiação de fundo, que consiste numa emissão de radiação pelos elementos constituintes do equipamento, da fonte de raios-X e plataformas de colocação de amostra, tem que ser tida sempre em conta na leitura, pois está sempre presente em cada determinação^{[18][19]}.

Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo a avaliação elemental das glândulas submandibulares em ratos intoxicados, experimentalmente com 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), através da análise por Fluorescência de Raio-X.

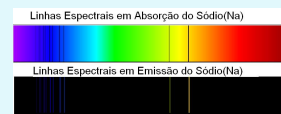
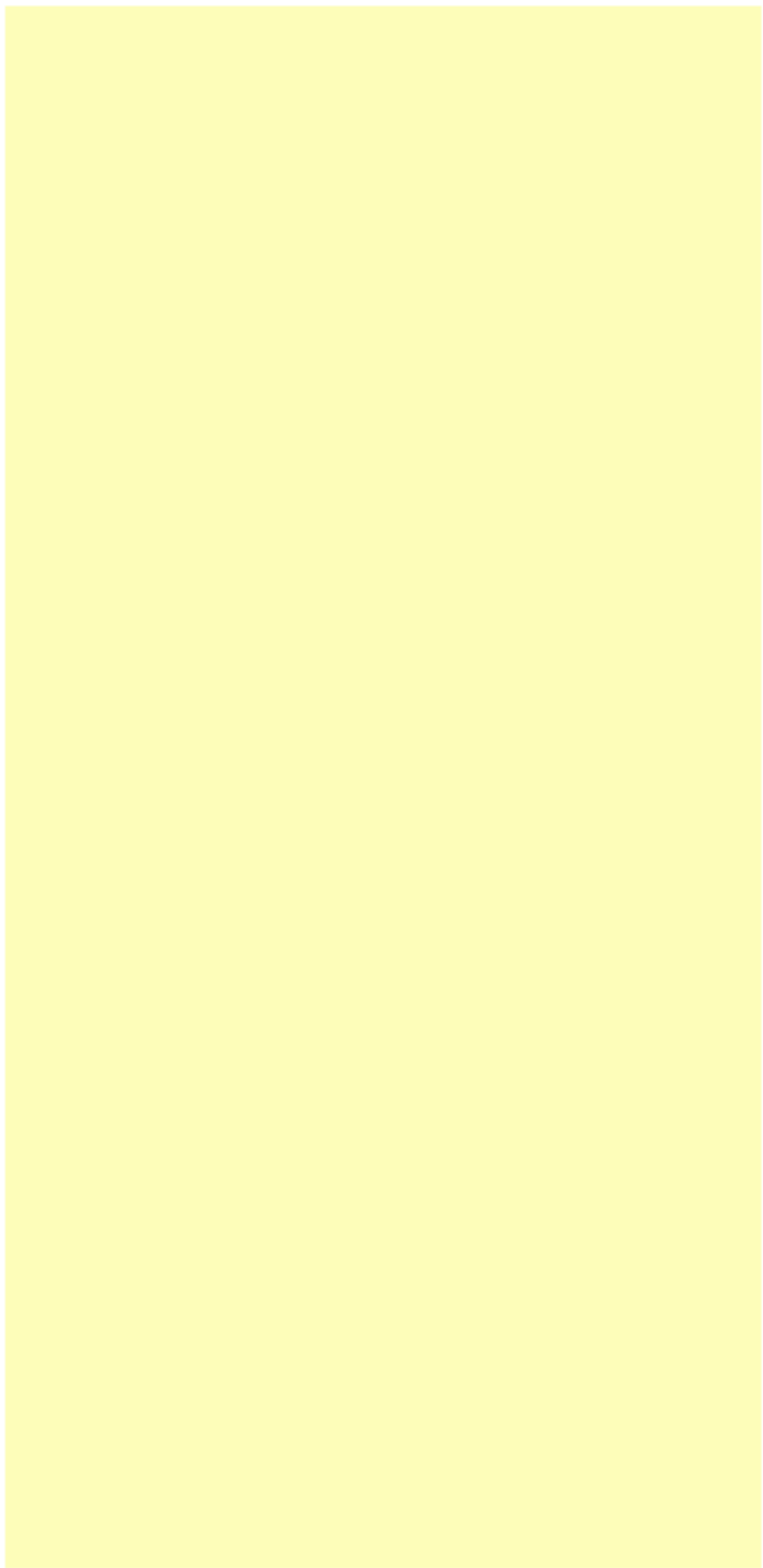
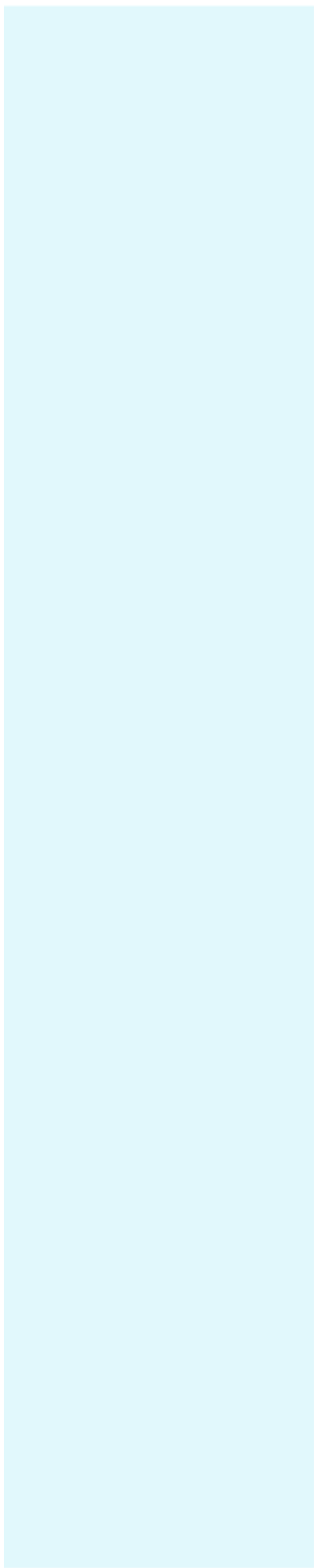


Figura 18: Linhas espectrais do sódio (Na) Fonte: <https://harmoniadomundo.wordpress.com/2013/03/23/estrelas3/>.



Material e Métodos

Neste estudo foram utilizados 20 ratos Wistar machos, com oito semanas no início do estudo, mantidos nas condições fisiológicas de manutenção e manipulação, de acordo com a legislação em vigor. Foram mantidas todas as condições ambientais que permitem assegurar condições fisiológicas dos animais em ensaio, nomeadamente, temperatura, humidade, ciclos de luz-escuro e condições da cama das gaiolas. A alimentação e o fornecimento de água foi feito tendo em conta os parâmetros anatomofisiológicos da espécie e a manutenção respeitou as condições de higiene e stress mínimo dos animais. Os ratos foram distribuídos por dois grupos com 10 animais cada um. O grupo I constitui o grupo controlo, mantido durante 4 semanas sem qualquer manipulação indutora de alterações. O grupo II foi submetido à administração de 7,12 - dimetilbenzantraceno (DMBA), três vezes por semana, durante 4 semanas, numa dose de 20 mg/Kg em cada toma, diluído em azeite. No final do período de administrações todos os animais foram sacrificados por excesso anestésico, administrado por via intramuscular, fazendo-se de seguida a respetiva necrópsia. Esta permitiu excluir a presença de patologia não induzida. De cada animal foi colhida a glândula submandibular e feito o estudo desta a partir de lâminas de HE. Foi feita avaliação histopatológica e a análise elemental das

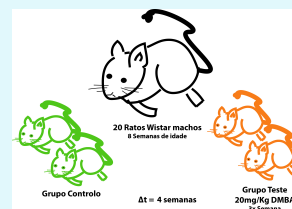


Figura 19: Ilustração do procedimento experimental. Fonte: imagem facultada pelo SPE.



Figura 20: Equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.

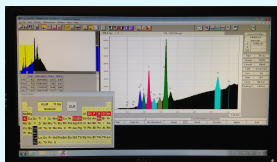


Figura 21: *Software* do equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.

glândulas submandibular dos vários animais. Para a análise elemental usou-se a técnica de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX), técnica que não necessita de tratamento de amostra: é uma técnica não-destrutiva. As amostras mencionadas foram colocadas, individualmente, sob a forma de bloco de parafina, num suporte. Este suporte é constituído por um paralelepípedo formado por compostos orgânicos (de baixo número atômico portanto não interferentes no resultado) que previne algumas interferências que provêm do suporte metálico do equipamento, como por exemplo do silício (Si). Fez-se incidir raios-X com energias de 15 keV, com um tempo de exposição de 200s, em cada uma das amostras. Em cada amostra foram feitas 3 análises em diferentes sítios do tecido. Para energias baixas, como os 15 keV foi necessário utilizar-se o gás inerte hélio (He), para que as interferências relativas ao ar atmosférico, especificamente do gás árgon (Ar), fossem anuladas. Após a leitura, retirou-se a amostra do suporte. Foi feita a análise dos seguintes elementos: alumínio (Al) fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio (K), cálcio (Ca) e ferro (Fe). A análise estatística foi feita com o programa estatístico RTM, sendo feita a média e desvio padrão das amostras para cada elemento do grupo de controlo e grupo de teste. Para comparar as médias das amostras entre o grupo de teste e o grupo de controlo foi feito o teste t-Student para um nível de confiança de 95%.

No seguimento deste trabalho, procedeu-se à remoção do DMBA e dos seus respetivos metabólitos no fígado e na gordura perirenal. É uma extração líquido-líquido, que envolve a partição do analito entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo os solventes utilizados, o clorofórmio (CHCl_3) e o metanol (CH_3OH), na relação de duas partes para uma. Nas extrações para compostos hidrofílicos usa-se PBS (solução tampão de fosfato) como solvente, mas para compostos lipofílicos usa-se uma solução de clorofórmio/metanol (2:1). Como o DMBA é lipofílico, usou-se como solvente a so-

lução de clorofórmio/metanol (2:1) As soluções preparadas foram analisadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Esta análise foi realizada nas seguintes condições: injetor automático (Shimadzu, Sil-20AHT/20 ACHT), uma coluna de fase reversa Zorbax ODS (4.6 mm ID x 250mm, 5 m), com um detetor UV-VIS (Shimadzu, SPD-20A/SPD- 20AV) e um detetor de fotodiodos UV-VIS (Shimadzu, SPD-M20A). Utilizou-se um gradiente 50:50 acetoni-trilo:água até 100% de acetonitrilo em 30 minutos, com um fluxo de 1 ml/min. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C em todas as leituras experimentais^[22].

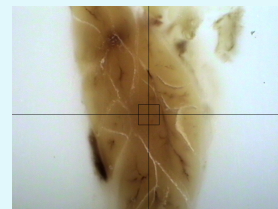
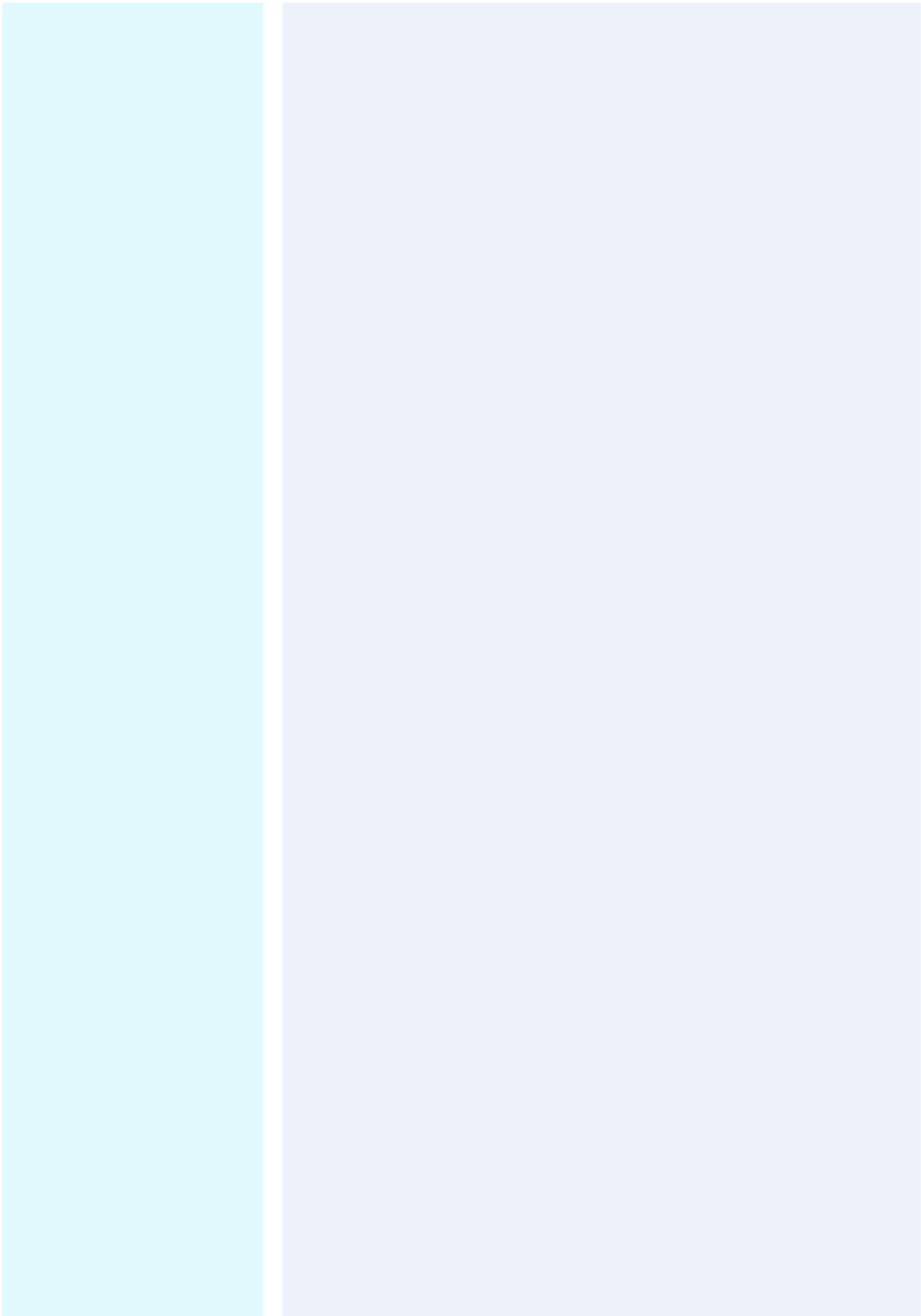


Figura 22: Ilustração do local de incidência do feixe de raio-x Fonte: imagem fotografada pelo autor.



Resultados

O valor médio das contagens está descrito de forma sucinta nas tabelas II,III,IV. O valor médio de contagens por segundo para o Al foi de $0,63 \pm 0,80$ no grupo controlo e de $0,24 \pm 0,30$ no grupo teste, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0190$). O P mostrou um valor médio de contagens por segundo de $37,95 \pm 15,28$ no grupo controlo, descendo para $32,09 \pm 11,94$ no grupo teste, não evidenciando uma diferença estatisticamente significativa. O S mostrou um valor médio de contagens por segundo de $83,72 \pm 31,27$ no grupo controlo, descendo para $69,26 \pm 20,90$ no grupo teste, evidenciando uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0395$). O valor médio das contagens por segundo para o Cl foi de $0,24 \pm 0,70$ no grupo controlo e de $0,05 \pm 0,13$ no grupo teste, não evidenciando uma diferença estatisticamente significativa. O K mostrou um valor médio de contagens por segundo de $2,02 \pm 1,98$ no grupo controlo, aumentando para $2,95 \pm 1,95$, não evidenciando uma diferença estatisticamente significativa. O Ca obteve um valor médio de contagens por segundo de $45,32 \pm 8,78$ no grupo de controlo e $95,01 \pm 30,37$ no grupo de teste, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$). Por último o Fe obteve os valores de $25,09 \pm 14,47$ no grupo de controlo e $42,30 \pm 33,54$ no grupo de teste, evidenciado

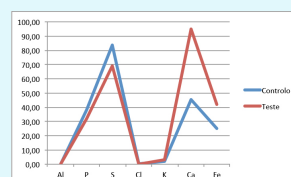


Figura 23: Distribuição dos valores médios entre os grupos controlo e teste

uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0214$). Tomando o valor médio ajustado de cada elemento, conforme descrito no capítulo de material e métodos, temos as assinaturas elementais que passamos a descrever. Para o grupo controle: Al0,6 P38 S84 Cl0,2 K2 Ca45 Fe25. Para o grupo teste: Al0,2 P32 P69 Cl0,05 K3 Ca95 Fe42.

Tabela II: Média e desvio padrão dos valores obtidos no grupo controle

Controlo		
Elementos	Média	Desvio padrão
Al	0,63	0,80
P	37,95	15,28
S	83,72	31,27
Cl	0,24	0,70
K	2,02	1,98
Ca	45,32	8,78
Fe	25,09	14,47

Tabela III: Média e desvio padrão dos valores obtidos no grupo teste

Teste		
Elementos	Média	Desvio padrão
Al	0,24	0,30
P	32,09	11,94
S	69,26	20,90
Cl	0,05	0,13
K	2,95	1,95
Ca	95,01	30,37
Fe	42,30	33,54

Tabela IV: Valores de p obtidos entre o grupo controlo e teste

t-Test	
Elementos	Valor de p
Al	0,0190
P	0,0829
S	0,0395
Cl	0,1063
K	0,0641
Ca	0,0000
Fe	0,0214

O valor médio dos rácios está descrito de forma sucinta nas tabelas [V](#), [VI](#), [VII](#), [VIII](#), [IX](#), [X](#), [XI](#). O rácio do valor médio das contagens por segundo entre Al/K foi de $0,91 \pm 2,84$ no grupo de controlo e de $0,09 \pm 0,14$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio do valor médio das contagens por segundo entre P/K foi de $21,96 \pm 30,53$ no grupo de controlo e de $18,39 \pm 17,51$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio do valor médio das contagens por segundo entre S/K no grupo de controlo foi de $46,67 \pm 69,62$ e no grupo de teste foi de $35,99 \pm 31,26$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/K foi de $0,01 \pm 0,05$ no grupo de controlo e de $0,03 \pm 0,07$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/K no grupo de controlo foi de $27,26 \pm 43,26$ e no grupo de teste foi de $58,36 \pm 59,15$, mostrando uma subida estatisticamente significativa ($p=0,0299$). O rácio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/K no grupo

de controlo foi de $11,74 \pm 16,92$ e no grupo de teste foi de $26,74 \pm 40,43$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. Relativamente ao rácio do valor médio das contagens por segundo entre Al/P no grupo de controlo foi de $0,02 \pm 0,04$ e no grupo de teste foi de $0,01 \pm 0,01$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio do valor médio das contagens por segundo entre S/P no grupo de controlo foi de $2,05 \pm 0,66$ e no grupo de teste foi de $2,40 \pm 0,73$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/P no grupo de controlo foi de $0,05 \pm 0,05$ e no grupo de teste foi de $0,11 \pm 0,07$, mostrando uma subida estatisticamente significativa ($p=0,0027$). O rácio do valor médio das contagens por segundo entre K/P no grupo de controlo foi de $0,00 \pm 0,00$ e no grupo de teste foi de $0,00 \pm 0,01$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/P no grupo de controlo foi de $1,11 \pm 0,50$ e no grupo de teste foi de $3,32 \pm 1,63$, evidenciado mostrando uma subida estatisticamente significativa ($p<0,0001$). O rácio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/P no grupo de controlo foi de $0,60 \pm 0,45$ e no grupo de teste foi de $1,39 \pm 0,84$, mostrando uma subida estatisticamente significativa ($p=0,0003$). O rácio do valor médio das contagens por segundo entre Al/S no grupo de controlo foi de $0,01 \pm 0,01$ e no grupo de teste foi de $0,00 \pm 0,00$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio do valor médio das contagens por segundo entre P/S no grupo de controlo foi de $0,41 \pm 0,13$ e no grupo de teste foi de $0,50 \pm 0,28$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/S no grupo de controlo foi de $0,02 \pm 0,02$ e no grupo de teste foi de $0,04 \pm 0,03$, mostrando uma subida estatisticamente significativa ($p=0,0039$). O rácio do valor médio das contagens por segundo entre K/S no grupo de controlo foi

de $0,01 \pm 0,04$ e no grupo de teste foi de $0,00 \pm 0,00$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/S no grupo de controlo foi de $0,66 \pm 0,68$ e no grupo de teste foi de $0,51 \pm 0,14$, mostrando uma descida estatisticamente significativa ($p=0,0003$). O rácio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/S no grupo de controlo foi de $0,40 \pm 0,62$ e no grupo de teste foi de $0,69 \pm 0,19$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. Tomando o valor médio ajustado de cada rácio, conforme descrito no capítulo de material e métodos, temos as assinaturas dos rácio elementais que passamos a descrever. Para o grupo controlo: ALK0,9 PK22 SK47 ClK0,01 CaK27 FeK12; ALP0,02 SP2 CIP0,05 KP0,00 CaP1,1 FeP0,6; ALS0,01 PS0,4 CIS0,02 KS0,01 CaS0,7 FeS0,4. Para o grupo teste: ALK0,09 PK18 SK36 ClK0,03 CaK58 FeK27; ALP0,01 SP2 CIP0,01 KP0,0 CaP3,3 FeP1,4; ALS0,00 PS0,5 CIS0,04 KS0,00 CaS0,5 FeS0,7.

Tabela V: Média e desvio padrão do grupo controlo obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o potássio (K)

Controlo		
Elementos	Média	Desvio padrão
Al/K	0,91	2,84
P/K	21,96	30,53
S/K	46,67	69,62
Cl/K	0,01	0,05
Ca/K	27,26	43,26
Fe/K	11,74	16,92

Tabela VI: Média e desvio padrão do grupo controle obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o fósforo (P)

Controlo		
Elementos	Média	Desvio padrão
Al/P	0,02	0,04
S/P	2,05	0,66
Cl/P	0,05	0,05
K/P	0,00	0,00
Ca/P	1,11	0,50
Fe/P	0,60	0,45

Tabela VII: Média e desvio padrão do grupo controle obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o Enxofre (S)

Controlo		
Elementos	Média	Desvio padrão
Al/S	0,01	0,01
P/S	0,41	0,13
Cl/S	0,02	0,02
K/S	0,01	0,04
Ca/S	0,66	0,68
Fe/S	0,40	0,62

Tabela VIII: Média e desvio padrão do grupo teste obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o potássio (K)

Teste		
Elementos	Média	Desvio padrão
Al/K	0,09	0,14
P/K	18,39	17,51
S/K	35,99	31,26
Cl/K	0,03	0,07
Ca/K	58,36	59,15
Fe/K	26,64	40,43

Tabela IX: Média e desvio padrão do grupo teste obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o fósforo (P)

Teste		
Elementos	Média	Desvio padrão
Al/P	0,01	0,01
S/P	2,40	0,73
Cl/P	0,11	0,07
K/P	0,00	0,01
Ca/P	3,32	1,63
Fe/P	1,39	0,84

Tabela X: Média e desvio padrão do grupo teste obtidos a partir dos quocientes entre os vários elementos e o Enxofre (S)

Teste		
Elementos	Média	Desvio padrão
Al/S	0,00	0,00
P/S	0,50	0,28
Cl/S	0,04	0,03
K/S	0,00	0,00
Ca/S	0,51	0,14
Fe/S	0,69	0,19

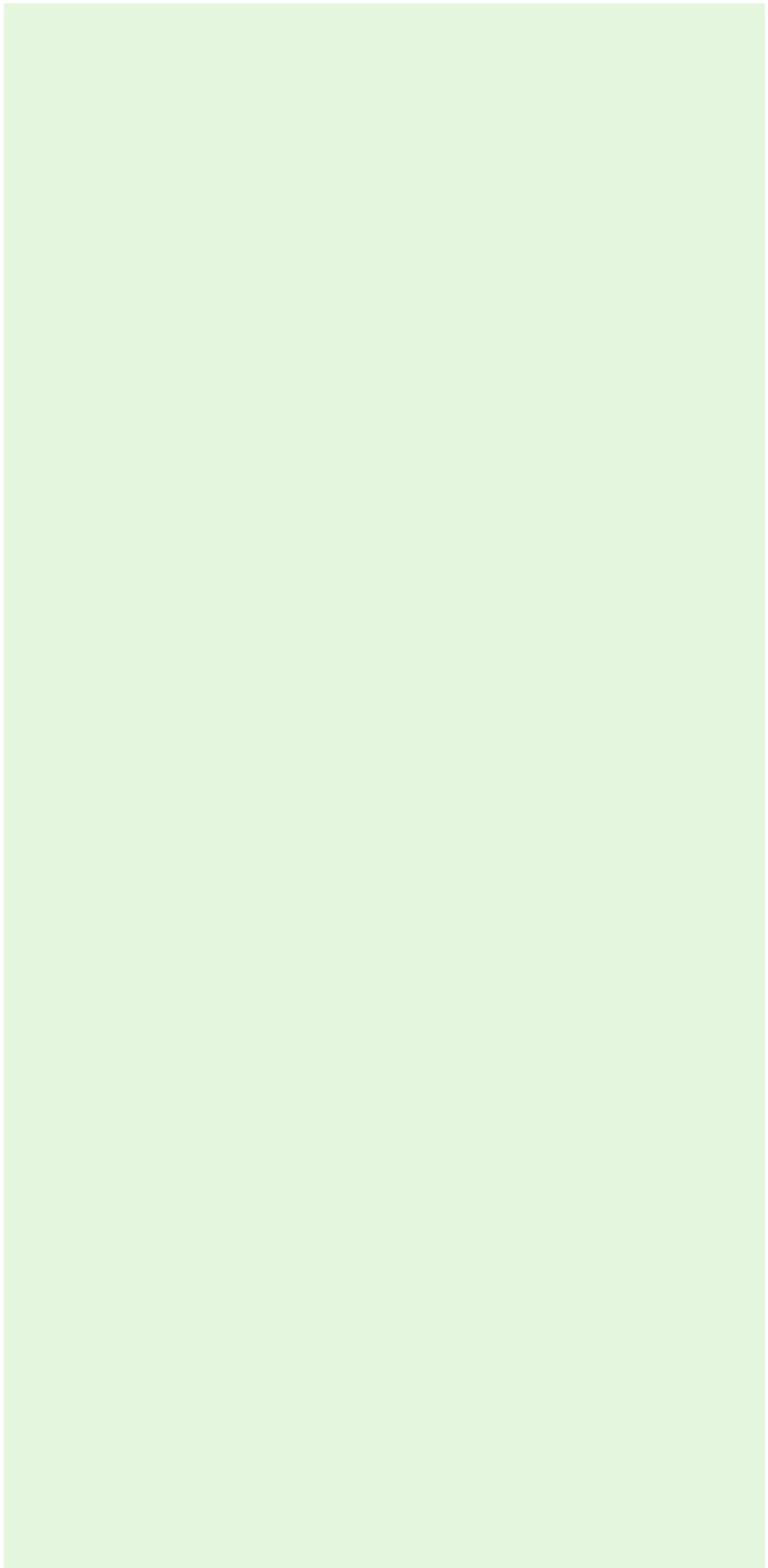
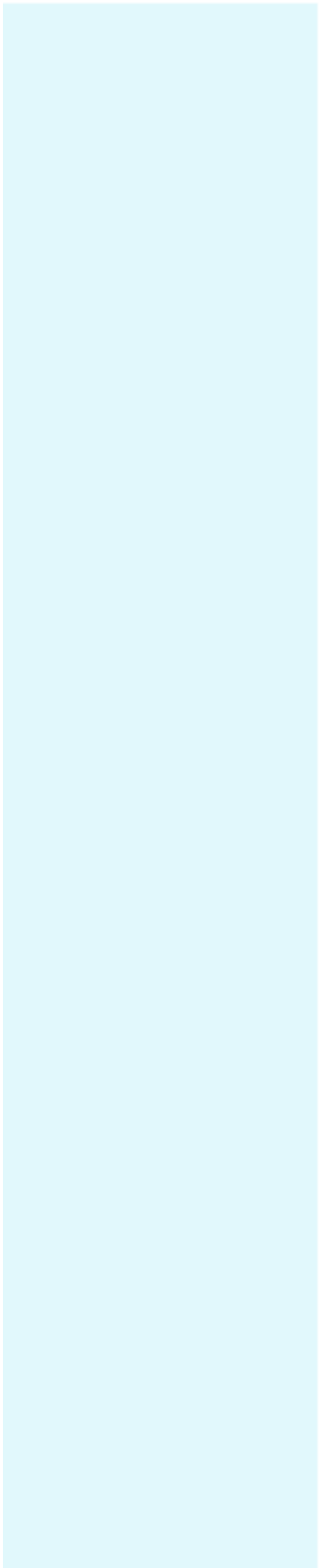
Tabela XI: Valores de p obtidos a partir dos quocientes dos vários elementos relativos ao potássio (K), fósforo (P) e enxofre (S), entre os grupos controlo e teste

Valor de p			
Elementos	/K	/P	/S
Al	0,0898	0,0605	0,0557
P	0,3177	—	0,1217
S	0,2010	0,0532	—
Cl	0,1834	0,0027	0,0039
K	—	0,1419	0,1891
Ca	0,0299	0,0000	0,0003
Fe	0,0672	0,0003	0,0592

No que se refere à análise morfológica do tecido submetido a análise elemental não se verificam diferenças significativas entre o grupo controlo e teste.

Na análise dos cromatogramas das extracções dos fígados de ratos do grupo controlo, o pico do tempo de retenção referente ao DMBA (aprox. 29 min) não foi detetado. Em termos quantitativos,

a concentração de DMBA determinada pelo HPLC nos fígados do grupo controlo foi de 0 mg de DMBA por 1 g de fígado. Nos cromatogramas das extracções dos fígados de ratos do grupo teste, o pico do tempo de retenção referente ao DMBA (aprox 29 min) foi detetado apenas num rato, em que a concentração do DMBA determinada pelo HPLC nesse fígado foi de 0,454 μg de DMBA por 1 g de fígado. Foi ainda possível quantificar o DMBA no tecido adiposo de quatro ratos do grupo controlo e de cinco ratos do grupo teste. Nos cromatogramas das extracções do tecido adiposo destes ratos, o pico do tempo de retenção referente ao DMBA (aprox 29 min), não apareceu nos ratos do grupo controlo, sendo detetado em todos os ratos do grupo teste. As concentrações do DMBA determinadas pelo HPLC no tecido adiposo desses ratos estão compreendidas entre 2,75 μg e 6,04 μg de DMBA por 1 g de tecido adiposo. Quanto à quantificação do DMBA nos tecidos, hepático e adiposo, nos ratos do grupo teste, observou-se uma diferença significativa dos resultados obtidos. No tecido hepático do grupo teste, apenas se quantificou o DMBA num rato, numa pequena concentração (0,454 μg de DMBA por 1 g de fígado). No tecido adiposo do grupo teste, quantificou-se o DMBA em todos os ratos, numa grande concentração (2,75 μg e 6,04 μg de DMBA por 1 g de tecido adiposo). Esta diferença pode estar relacionada com a função do fígado em biotransformar os xenobióticos e com o carácter lipofílico do DMBA. Ao comparar os valores das concentrações obtidas com a dose de DMBA administrado (20 mg / Kg), observa-se que a concentração obtida corresponde a uma percentagem inferior a 1% da dose administrada.



Discussão

Todos os resultados são obtidos de amostras de tecidos, a partir de blocos de parafina, tratados todos nas mesmas condições. Assim, é de esperar que a existirem diferenças significativas entre elas sejam causadas unicamente por outras situações, não técnicas. Como a única diferença, existente entre as amostras do controlo e do grupo teste, é apenas a indução da lesão, esta é a única causa esperada das diferenças. No grupo teste, ao qual foi administrado DMBA, consideramos ainda sub-grupos, em função do doseamento deste xenobiótico no corpo. Foi feito o doseamento de DMBA nos tecidos hepático e adiposo, colhidos no momento do sacrifício. No caso do fígado, seria de esperar que tivesse ocorrido a metabolização total deste xenobiótico. No tecido adiposo, que é uma topografia de acumulação, era de esperar que se encontrasse alguma concentração, mas muito baixa. No caso do tecido hepático vamos considerar duas situações, uma com ausência do tóxico, o que é esperado devido ao tempo de intervalo entre a exposição do DMBA e o sacrifício, e outra com a presença de pequenas concentrações de xenobiótico. No caso de haver ainda alguma concentração deste xenobiótico seria de considerar que o metabolismo hepático do DMBA fosse mais lento. Assim, relativamente ao fígado, dividimos o grupo teste em dois subgrupos, um

[18] Santos, E.S., et al, "Espectrometria de fluorescência de raios-X na determinação de espécies químicas". Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 2013: 9(17): 3413-3432.

[19] SILVA, R.B., Ana, "Avaliação morfológica e elemental num modelo experimental de intoxicação com metais pesados", Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Química Forense, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. (2014)

[16] José Antonio Ramos Atance "Bioquímica bucodental", Editorial Síntesis, 1996.

[17] Duck, F.A., "Physical Properties of Tissue - A Comprehensive Reference Book". University Press, Cambridge. Academic press, 1990

sem DMBA no tecido hepático e outro com algum DMBA no tecido hepático. No caso do tecido adiposo, era de esperar que houvesse alguma acumulação, pelo que seguindo esta lógica definimos dois subgrupos no grupo teste, um com DMBA acumulado e outro sem a presença de DMBA. Dado o número diminuto de cada subgrupo torna-se impossível tirar conclusões. A fluorescência de raio-x é uma técnica confiável, rápida, segura e simples. Esta é uma técnica não destrutiva que não necessita de preparação prévia da amostra. Esta técnica não nos permite a identificação de elementos mais leves tais como o hidrogénio, o que é uma limitação, caso queiramos a identificação destes elementos^{[18][19]}.

Os elementos que apresentaram valores que evidenciam diferenças estatisticamente significativas do valor médio das contagens ($p < 0,05$), entre o grupo controlo e o grupo teste, foram o enxofre (S), o cálcio (Ca), o ferro (Fe) e o alumínio (Al). O enxofre (S) é um elemento muito presente nas proteínas. Em relação a este elemento verificou-se um decréscimo no grupo teste, o que pode ter sido resultado de uma alteração presente nas proteínas. Sendo assim, justifica-se fazer um estudo mais pormenorizado, como o estudo proteómico, para perceber com detalhe a origem destas alterações. Selecionando proteínas com variação significativa no tecido, sugerimos fazer então um pequeno estudo de transcriptómica para avaliar melhor a sua síntese^{[16][17]}. Em relação ao cálcio (Ca) verificou-se um aumento no grupo teste. Estando como se sabe, o cálcio muito presente na forma de ião (Ca^{2+}) nas células e na matriz celular, é expectável que a origem desta alteração se encontre nestas estruturas. Sabemos que um Ca é fundamental para a fisiologia celular, estando presente em quase todos os aspetos da vida celular, incluindo em muitas actividades, como por exemplo a conformação proteica e estando muito presente no citoplasma e organitos. Os iões de cálcio encontram-se geralmente como reserva no retículo endoplásmico sendo, em certas condi-

ções celulares, libertados para o citosol. Este ião tem muitas funções celulares, que incluem a regulação genica, a proliferação e a morte celular. Seria interessante perceber a localização deste ião na célula, nestes grupos estudados, para melhor conhecer os mecanismos que podem estar em causa.^{[16][17]} O ferro (Fe) tem uma presença importante no corpo humano, fazendo parte de grupos prostéticos de proteínas, como nos casos da hemoglobina e da mioglobina e na forma de ião. No corpo humano a grande maioria do ferro encontra-se na hemoglobina do eritrócito (2,1g). Os macrófagos possuem também uma quantidade razoável (600mg). A mioglobina nos músculos tem cerca de 300mg de ferro e a maioria do restante (1g) está localizada no fígado. Existem muitas possibilidades, em termos de fisiologia celular, para explicar alterações da sua concentração que possam justificar o aumento de ferro verificado no grupo teste. Sabe-se que o Fe entra na célula, é transportado para a mitocôndria, para síntese de metaloproteínas. Contudo, o Fe é considerado potencialmente tóxico, pois em condições aeróbicas ele catalisa a propagação de ROS (reactive oxygen species) e a síntese de radicais altamente reativos, como por exemplo o radical hidroxilo. Sugere-se um estudo mais aprofundado em que se esclareça melhor a origem destas alterações. Na nossa opinião seria interessante proceder a microdissecção a laser para separar células e estudar separadamente o teor deste elemento. Parece-nos ainda que seria muito interessante um pequeno estudo focado nas metaloproteínas do tecido^{[16][17]}. Em relação ao alumínio (Al), os estudos até hoje conhecidos ainda não indicam qualquer função útil para o organismo, não tendo informação suficiente sobre este elemento que nos permita perceber a origem da alteração observada. Sabemos que obtivemos um decréscimo no grupo teste em relação ao grupo controlo, podendo ser explicado por exposição ambiental^{[16][17]}.

Em relação aos rácios, os que apresentam diferenças esta-

[16] José Antonio Ramos Atance "Bioquímica bucodental", Editorial Síntesis, 1996.

[17] Duck, F.A., "Physical Properties of Tissue - A Comprehensive Reference Book". University Press, Cambridge. Academic press, 1990

tisticamente significativas, são os valores médios das contagens por segundo entre Cl/P (P = 0,0027), Cl/S (P = 0,0039), Ca/K (P = 0,0000), Ca/S (P = 0,003), Fe/P (P = 0,0003). As assinaturas dos rácios elementais são para o grupo controlo AIK 0,9; PK22; SK47; CIK0,01; CaK27; FeK12; AIP0,02; SP2; CIP0,05; KP0,00; CaP1,1; FeP0,6; AIS0,01; PS0,4; CIS0,02; KS0,01; CaS0,7; FeS0,4 e para o grupo teste AIK0,09; PK18; SK36; CIK0,03; CaK58; FeK58; AIP0,01; SP2; CIP0,01; KP0,0; CaP3,3; FeP1,4; AIS0,00; PS0,5; CIS0,04; KS0,00; CaS0,5; FeS0,7. Os rácios e as assinaturas permitem-nos perceber que existem alterações estruturais nos grupos deste estudo, as quais podem ser a base da patogenia da situação em estudo. É ainda de salientar que o estudo histológico simples, não morfométrico, não mostrou diferenças morfológicas importantes entre os dois grupos descritos. Assim, temos de admitir que pode haver alterações estruturais significativas antes de haver alterações morfológicas. É aceitável, pelos motivos já expostos, que as alterações ao nível elemental possam significar alterações moleculares sem alterações morfológicas. Sendo assim, é de supor que existam situações de patologia que só possam ser identificadas, diagnosticadas, com recurso à análise elemental e molecular, mesmo considerando a patologia não toxicológica.

Conclusão

Estes resultados permitem-nos concluir desde já que administração de DMBA é um indutor de alterações estruturais do tecido estudado, mesmo quando não é evidente haver alterações histológicas. Não podemos com este estudo inicial provar a gravidade das alterações induzidas nem da irreversibilidade delas. Utilizando o conhecimento já estabelecido da ação destes elementos, agora estudados, é de supor que para pequenas variações se encontrem apenas alterações reversíveis. Em nossa opinião é necessário estabelecer agora de forma objetiva e simples os conceitos de alteração estrutural - funcional e de lesão, o que passamos a fazer.

Lesão: alteração morfológica que pode ser documentada por registo histológico, sendo uma situação que traduz uma alteração da função, podendo ser reversível ou irreversível.

Alteração estrutural – funcional: alteração de uma estrutura do corpo humano não traduzida por alteração morfológica, documentada ao nível atómico ou molecular.

Propomos ainda estabelecer o conceito de assinatura elemental como a descrição das relações entre os elementos presentes num determinado tecido e procurar relacioná-lo com o tipo de tecido e as doenças que o atingem.

Assinaturas elementais - descrição da presença dos elementos

no tecido, avaliados em condições standardizadas.

Assinatura de rácios elementais – conjunto de rácios entre os elementos de um tecido, avaliados em condições standardizadas.

Para continuação deste estudo sugere-se a sua complementação com estudos de proteómica de transcriptómica. Estes ensaios poderão num futuro não muito distante estabelecer novos conceitos, o de biopsia química para o estudo das moléculas tecidulares e de biopsia elemental para o estudo dos átomos dos tecidos.

Bibliografia

- [1] “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects”. Scientific Committee on Food. (2002)
- [2] Isabel, P., Jesus, M. “Avaliação Morfológica e Molecular na Administração Experimental de DMBA”, Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Química, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. (2011).
- [3] Netto, A. D. P., Moreira, J. C., Dias, A. E. X. O., Ferreira, L. F. V., Oliveira, A. S. “Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitratos (NHPAS): uma revisão metodológica”. Química Nova, 2000:23(6); 765–773
- [4] Katz, I. S. S. “Mielotoxicidade por 7,12-dimetilbenzantraceno e sua repercussão na resposta imunológica dos camundongos airmax e airmin”, Dissertação para obtenção do grau de doutorado em imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (2012).
- [5] Ganesan, S., Bhattacharya, P., Keating, F.A. “7,12-Dimethylbenz[a]anthracene exposure induces the DNA

repair response in neonatal rat ovaries". *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 272(3).

- [6] Alam, S.M., Saborit, J. M. D., Stark, C., Harrison, R.M. "Using atmospheric measurements of PAH and quinone compounds at roadside and urban background sites to assess sources and reactivity". *Atmospheric Environment*, 77 (2013); 24-35.
- [7] Amigo, G.S., Yusty, M.A.L., Lozano, J.S. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from buzzards (*Buteo buteo*) and tawny owl (*Strix aluco*) by liquid chromatography with fluorescence detection.". *Journal of AOAC International*, 2002;85(1); 141-145.
- [8] Ravindra, K., R. Sokhi, and R. Van Grieken, Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 2008;42(13); 2895-2921;
- [9] Guimarães, J.R.P.F. "Toxicology of diesel vehicular emissions: an occupational and public health matter". *Revista de Estudos Ambientais*, 2004;6(1); 82-94.
- [10] Barcellos, K.S.A., L. E. C. Andrade, "Histopathology and Immunopathology in Minor Salivary Glands of Patients with Sjögren's Syndrome (SSj)". *Rev Bras Reumatol*, 2005;45(4); 215-23.
- [11] Lima, A.N., et al. "Sialolithiasis in the submandibular gland: a clinical report". *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac., Camaragibe*, 2013;13(1); 23-28.
- [12] Santos, J.N., et al. "Hyperplasia of the sublingual salivary glands: a case report". *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac., Camaragibe*, 2012;12(3); 13-16.

- [13] Lima, S.S., et al. "Epidemiologic profile of salivary gland neoplasms: analysis of 245 cases". *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005; 71(3); 335-40.
- [14] Ministério da Saúde (Brasil). "Salivary gland tumors". *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2002, 48(1): 9-12
- [15] Brunotto, M., A. M. Zarate, J. L. Barra, A. Malberti,. "Graph models for phenotype and genotype association between oral mucosa and submandibular gland tumorigenesis in rat". *J Oral Pathol Med.* 2009; 38; 463–469.
- [16] José Antonio Ramos Atance "Bioquímica bucodental", Editorial Sintesis, 1996.
- [17] Duck, F.A., "Physical Properties of Tissue - A Comprehensive Reference Book". University Press, Cambridge. Academic press, 1990
- [18] Santos,E.S., et al, "Espectrometria de fluorescência de raios-X na determinação de espécies químicas". *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 2013: 9(17): 3413-3432.
- [19] SILVA,R.B., Ana, "Avaliação morfológica e elemental num modelo experimental de intoxicação com metais pesados", Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Química Forense, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. (2014)
- [20] Ferretti, M., "Princípios e aplicações de espectroscopia de fluorescência de Raios X (FRX) com instrumentação portátil para estudo de bens culturais". *Revista CPC*, São Paulo, 2009; 7; 74-98.
- [21] Belmonte, E.P., " Espectrometria por Fluorescência de raios x por reflexão total: um estudo simulado utilizando o mé-

todo de Monte Carlo”. Dissertação para obtenção do grau de mestre em ciências em engenharia nuclear, Universidade Federal do rio de Janeiro. (2005)

[22] Pohanish, R. P.; (2012). "Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens."Sixth edition. Elsevier. USA.