CYNTHIA DER TOROSSIAN TORRES NEVES

**Influência do ph da água de beber na gênese da alteração óssea
por cádmio: estudo experimental em ratos**

São Paulo

2014

CYNTHIA DER TOROSSIAN TORRES NEVES

**Influência do ph da água de beber na gênese da alteração óssea
por cádmio: estudo experimental em ratos**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós- Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Xavier de Oliveira

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Neves, Cynthia Der Torossian Torres.

Influência do pH da água de beber na gênese da alteração óssea por cádmio: estudo experimental em ratos / Cynthia Der Torossian Torres Neves; orientador Jefferson Xavier de Oliveira. -- São Paulo, 2014.

51 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Versão corrigida.

1. Cádmio – Toxicidade. 2. Água - pH. 3. Densidade óssea – Alteração. I. Oliveira, Jefferson Xavier de. II. Título.

Neves CDTT. Influência do ph da água de beber na gênese da alteração óssea por cádmio: estudo experimental em ratos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A minha dissertação eu dedico a **Deus**, que me deu forças quando não tinha. Que me deu sabedoria quando não sabia mais o que fazer. Que me deu paciência, alegria e amor durante todo este período de aprendizado e todos os dias da minha vida.

Dedico meu marido **Daniel**, que em nenhum momento desta caminhada me deixou desistir. Esteve sempre ao meu lado. Pude contar com seu ombro amigo em todos os momentos. Agradeço sua compreensão nas minhas ausências e por sempre me fazer uma pessoa melhor.

Aos meus pais **Celso** e **Cleide** que me deram uma profissão. Que me ensinaram a crescer como profissional, e me incentivaram a dar mais um passo a cada dia. Agradeço pelo amor incondicional e por torcerem comigo para eu realizar este sonho de ser mestre.

Ao meu irmão **Daniel**, que vibra comigo a cada conquista.

Aos meus saudosos avôs **Francisco**, **Mary**, **Olga** e **Jay**, que sempre incentivaram aos estudos.

Aos meus sogro e sogra **Osterlino** e **Carmen**, que sonharam comigo para que este momento acontecesse.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Jefferson Xavier de Oliveira, que me ensinou a ser uma pesquisadora.

A secretária da disciplina de Radiologia da FOU SP, Maria Aparecida Pinto, pelo carinho e atenção. Sua mão esteve sempre estendida, com um sorriso no rosto acalmava nossos corações. Vou levá-la como uma amiga.

A Profa. Dra. Giselle Alborghetti Nai, por deixar com que eu fizesse parte desta linha de pesquisa com cádmio para realizar as análises da densidade óssea.

A amiga Daniela Miranda Richarte de Andrade Salgado pela amizade e me ajudar na compreensão dos dados estatísticos.

A colega Maria Bruna Rezende Silva Martins de Oliveira, ao Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada e ao Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho por abrirem as portas da UNESP de Araçatuba e Presidente Prudente para que eu realizasse as análises do DEXA e Ensaio Biomecânicos.

RESUMO

Neves CDTT. Influência do pH da água de beber na gênese da alteração óssea por cádmio: estudo experimental em ratos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

O cádmio (Cd) é um metal pesado e dos mais abundantes elementos encontrados no ambiente. Existem evidências de sua relação com a osteopenia, osteoporose, e osteomalacia e fragilidade do tecido ósseo. Este estudo visa avaliar o efeito do pH da água de beber na gênese da alteração óssea provocada pela intoxicação por cádmio. Neste estudo, foram utilizados 90 ratos Wistar (*Ratus Norvegicus albinus*), adultos, machos, divididos em 6 grupos, aos quais foram administrados: A - solução de cloreto de Cd (400mg/L) com pH neutro (pH 7,0); B - solução de cloreto de Cd (400mg/L) com pH ácido (pH 5,0); C - solução de cloreto de Cd (400mg/L) com pH básico (pH 8,0). D - pH ácido (pH 5,0); E - pH básico (pH 8,0); F - pH neutro (pH 7,0). No fêmur esquerdo de cada rato avaliou-se a densidade óssea, por meio do densitômetro de dupla emissão (DEXA), ensaios biomecânicos e escala de HU na tomografia computadorizada espiral. Os resultados demonstram que a densidade óssea reduziu nos grupos que receberam cádmio e no grupo sem administração de cádmio para o pH 5 ocorreu uma redução da densidade mineral óssea (DMO) e do conteúdo mineral ósseo (CMO). A rigidez biomecânica mostrou-se aumentada para o grupo com pH 5 sem cádmio. Como conclusão geral o cádmio reduziu a densidade óssea.

Palavras-chave: Cádmio. pH. Densidade óssea.

ABSTRACT

Neves CDTT. The influence of the pH of the drinking water in the bone alteration origin caused by cadmium: experimental study in rats [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

The cadmium (Cd) is a heavy metal, one of the most abundant elements found in the environment. There are evidences of its relationship in osteopenia, osteoporosis e osteomalacia and fragility of the bone tissue. This study aims to evaluate the effect of the pH of the drinking water in the bone alteration origin caused by cadmium intoxication. This study involved 90 wistar rats (*Ratus Norvegicus albinus*), adults, males, divided in 6 groups, were witch one received: A - cadmium choride solution (400mg/L) with neutral ph (pH 7,0); B – cadmium choride solution (400mg/L) with acid ph (pH 5,0); C -cadmium choride solution (400mg/L) with basic ph (pH 8,0); D – with acid ph (pH 5,0); E – basic ph (pH 8,0); F – neutral pH (pH 7,0). Left femurs from each rat were evaluated by bone density, DEXA, biomechanic test, HU scale from computerized tomography. The results shows that bone density became lower in the groups that received cadmium. In that wich received no cadmium with pH 5 occurred an lower level of bone mineral density (BMO) and bone mineral content (BMC). The bone rigidity proved increased in the pH 5 with no cadmium. As a general conclusion, cadmium reduced the bone density.

Keywords: Cadmium. Hydrogen-Ion Concentration. Bone density.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Gaiolas	23
Figura 4.2 - Biotério	23
Figura 4.3 - Remoção do fêmur esquerdo.....	25
Figura 4.4 - Densitômetro de dupla emissão de raios-x (DEXA)	26
Figura 4.5 - Disposição dos ossos para o DEXA.....	27
Figura 4.6 - Software LUNAR®	27
Figura 4.7 - Ensaio de flexão da CF	28
Figura 4.8 - Compressão da diáfise.....	28
Figura 4.9 - Disposição dos ossos para aquisição da imagem de TC	29
Figura 4.10 - Disposição do grupo F para aquisição da imagem de TC	30
Figura 4.11 - Análise HU da diáfise	30
Figura 4.12 - Análise HU da cabeça do fêmur.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Boxplot para TC da cabeça do femur (HU) segundo presença de cádmio e pH.	34
Gráfico 5.2 - Boxplot para TC da diáfise (HU) segundo presença de cádmio e pH....	36
Gráfico 5.3 - Boxplot para DEXA CMO (g) segundo presença de cádmio e pH.....	37
Gráfico 5.4 - Boxplot para DEXA área (cm ²) segundo presença de cádmio e pH.....	38
Gráfico 5.5 - Boxplot para DEXA DMO (g/cm ²) segundo presença de cádmio e pH.....	39
Gráfico 5.6 - Boxplot para EM D Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH.....	41
Gráfico 5.7 - Boxplot para EM D Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH.....	42
Gráfico 5.8 - Boxplot para EM CF Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH.....	43
Gráfico 5.9 - Boxplot para EM CF Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Média e desvio padrão medidas de densitometria por pH e presença de cádmio na água.....	33
Tabela 5.2. ANOVA para TC para cabeça do fêmur (HU) segundo presença de cádmio e pH	34
Tabela 5.3 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida TC da cabeça do fêmur (hu) segundo presença de cádmio e pH. Comparações múltiplas para presença de cádmio para cada pH.	35
Tabela 5.4 - ANOVA para TC da diáfise (HU) segundo presença de cádmio e pH. .	35
Tabela 5.5 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida TC da diáfise (HU) segundo presença de cádmio e pH.	36
Tabela 5.6 - ANOVA para DEXA CMO (g) segundo presença de cádmio e pH.	37
Tabela 5.7 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida DEXA CMO (g) segundo presença de cádmio e pH.	37
Tabela 5.8 - ANOVA para DEXA área (cm ²) segundo presença de cádmio e pH.....	38
Tabela 5.9 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida DEXA área (cm ²) segundo presença de cádmio e pH.	38
Tabela 5.10 - ANOVA para DEXA DMO (g/cm ²) segundo presença de cádmio e pH.....	39
Tabela 5.11 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida DEXA DMO (g/cm ²) segundo presença de cádmio e pH.	40
Tabela 5.12 - ANOVA para EM D Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH.....	40

Tabela 5.13 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida EM D Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH.	41
Tabela 5.14 - ANOVA para EM D Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH.....	42
Tabela 5.15 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida EM D Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH.....	42
Tabela 5.16 - ANOVA para EM CF Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH.....	43
Tabela 5.17 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida EM CF Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH.	43
Tabela 5.18 - ANOVA para EM CF Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH.....	44
Tabela 5.19 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida EM CF Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH.....	44

LISTA DE SIGLAS

Cd	Cádmio
CMO	conteúdo mineral ósseo
DEXA	dual-energy x-ray absorbsiometry
DMO	densidade mineral óssea
EM CF	Ensaio Biomecânico da cabeça do fêmur
EM D	Ensaio Biomecânico da Diáfise
EM	Ensaio biomecânico
HU	Unidade de medida da escala Hounsfield
MPa	Unidade de medida megapascal
N	Newton
TC	Tomografia Computadorizada
TC CF	Tomografia Computadorizada da cabeça do fêmur
TC D	Tomografia Computadorizada da diáfise

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 BIODISPONIBILIDADE DE CD NO SOLO E SUA TRANSFERÊNCIA PARA AS PLANTAS	18
2.2 CÁDMIO E LESÃO ÓSSEA	18
3 PROPOSIÇÃO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 ANIMAIS.....	23
4.1.1 Divisão dos grupos	24
4.1.2 Exposição ao Cd, Alcalinização e Acidificação da água	24
4.1.3 Eutanásia	25
4.2 DENSITOMETRIA ÓSSEA.....	26
4.3 ENSAIO BIOMECÂNICO	27
4.4 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA.....	28
4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS	31
5 RESULTADOS	33
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO A	52
ANEXO B	53

1 INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd) é considerado um elemento químico de alta toxicidade para humanos e animais, relatado pela primeira vez em 1942. No mundo, uma pessoa consome em média 8-25 mg Cd por dia, o que leva a uma preocupação quanto aos efeitos a longo prazo causados por este elemento (James; Meliker 2013).

Durante o século XX, a concentração de Cd nos ossos humanos aumentou 10 vezes na França. A população mundial tem ingestões de baixos níveis através de seu alimento, causando um efeito acumulativo relacionado com a carga corporal deste metal tóxico. Níveis de contaminação ambiental do Cd, ocorrem em áreas com contaminação industrial atual ou histórica, por exemplo: Bélgica, Suécia, Reino Unido, Japão e China. A exposição ao Cd ocorre de uma maneira interna e externa, através de ingestão de alimentos ou água contaminados e pela inalação do ar poluído. A exposição ocupacional acontece nas indústrias, tais como galvanoplastia, soldagem, fundição e refino, produção de pigmentos e fabricação de baterias. A inalação do Cd é uma maneira externa de se expor a esse elemento tóxico, mas de uma maneira reduzida se comparado a ingestão do Cd, exceto em alguns ambientes industriais, fumantes e ambientes com grande quantidade deste elemento químico. Os fumantes absorvem a mesma quantidade de Cd de quando ingeridos, cerca de 1-3 mg Cd por dia. Estudos relatam 1-2 µg de Cd no cigarro e cerca de 10% do teor de Cd é inalado quando o cigarro é fumado. Uma medida preventiva a este fator, é parar de fumar e evitar a exposição passiva à fumaça do cigarro. Já quando o solo é contaminado pelo Cd, o vento pode levar essas partículas, causando uma poeira poluída (Nawrot et al., 2010).

É um elemento químico onipresente e poluente presente no planeta de forma generalizada, assim a população inteira é exposta a esse metal tóxico durante a vida, principalmente através de alimentos contaminados e do tabagismo. Naturalmente está junto aos minérios, como o zinco, chumbo e cobre. Para a população fumante, a média de Cd é 4-5 vezes maior que em um indivíduo não-fumante. Para indivíduos não fumantes a principal fonte de exposição é através dos alimentos contaminados. O Cd é encontrado em estabilizantes de produtos de PVC, pigmentos coloridos, vários tipos de ligas, e nas pilhas recarregáveis de níquel-

cádmio. Está presente também, como um poluente de fertilizantes a base de fosfatados. Produtos com Cd raramente são recicláveis, e frequentemente são despejados em lixo doméstico, contaminando o meio ambiente, especialmente quando os resíduos são incinerados. As fontes naturais, bem como antropogênicas de Cd, incluindo emissões industriais e a aplicação de fertilizantes em lamas de depuração em terras agrícolas levam a contaminação dos solos e aumento de cádmio absorvido pelas plantas e vegetais, cultivados para consumo humano e o processo de absorção do Cd pelas plantas, é favorecido quando existe um baixo pH do solo (Järup, 2003).

O osso é um órgão alvo importante para a toxicidade do Cd. Tem sido demonstrado que a exposição ao Cd pode resultar em uma baixa massa óssea e um elevado risco de osteoporose e fraturas ósseas em animais experimentais e seres humanos (Chen et al., 2011a). Os osteoclastos são células responsáveis por realizar reabsorções ósseas. Estudos mostraram que a exposição ao Cd afeta o metabolismo biomarcador das reabsorções ósseas e as estimula (Chen et al., 2013).

Os efeitos mais graves à saúde pela exposição crônica ao Cd são as doenças ósseas caracterizadas pela osteoporose, osteopenia e a osteomalácia causando uma maior fragilidade óssea. Em humanos e ratos, o fêmur, é um osso que suporta carga, assim, distúrbios no metabolismo do tecido ósseo podem resultar em deformidades e fraturas dele (Brzóska et al., 2010).

Não há estudos na literatura avaliando a influência do pH da água na gênese da lesão óssea por Cd.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os efeitos adversos à saúde são causados por exposições acidentais, espontâneas ou experimentais ao Cd, que levaram a uma preocupação à saúde pública (Martiniaková et al., 2011). Vários estudos têm mostrado que o Cd afeta a atividade e o metabolismo das células ósseas diretamente (Om; Shim, 2007), e ele tem sido considerado um dos fatores de riscos ambientais para a perda óssea (Chen et al., 2013).

Alguns estudos mostram perda de peso nos animais expostos a ingestão de Cd, provavelmente por alteração no metabolismo hormonal e por diminuir a absorção de metais essenciais ao organismo (Motta et al., 2004).

A literatura relata que as exposições crônicas ao Cd levam ao desenvolvimento de câncer em vários órgãos, como, pulmões, rins e alterações no fígado e osso (Motta et al., 2004, Khan et al., 2010).

O efeito negativo do Cd é conhecido há anos, mas somente estudos recentes, mostram que a baixa exposição crônica a este metal pode causar lesões renais e conduz a danos ósseos/alterações ósseas como efeito secundário. Essas alterações ósseas caracterizam-se por diminuição da massa óssea, osteoporose podendo levar a fraturas ósseas (Brzóska et al., 2005; Chen et al., 2009; Chen et al., 2011a).

2.1 BIODISPONIBILIDADE DE CD NO SOLO E SUA TRANSFERÊNCIA PARA AS PLANTAS

Para a população não fumante e que não vive em áreas contaminadas por Cd, a principal fonte de intoxicação é através da dieta. A maioria dos alimentos possuem baixas concentrações de Cd, exceto nos cogumelos, fígado, rim e mariscos. Cereais, especialmente produtos de trigo não refinados, arroz e vegetais, muitas vezes contêm elevados teores de Cd. Para os vegetarianos, acredita-se que há um aumento de consumo deste elemento químico. A capacidade de absorver e

acumular metais tóxicos difere entre as plantas e variados, por exemplo, a alface, espinafre, aipo e repolho (hortaliças) tendem a acumular grandes quantidades de Cd, enquanto o feijão acumula pequenas quantidades de Cd. Em duas áreas no norte da Bélgica, o cultivo caseiro de vegetais, excedia o limite de Cd permitido na Europa, com exceção de grãos e “frutas legumes”. Mesmo na área de referência, onde o Cd é averiguado (média de 0,9 mg/kg de solo), o aipo estava com teor de Cd 50% acima do permitido, e também nas faixas não-poluídas (níveis abaixo de 1 mg Cd/Kg de solo), a transferência do Cd para as plantas está relacionada com o pH do solo. Por isso, ao se realizar um plantio, é necessário conhecer a quantidade de Cd e o pH deste solo (Nawrot et al., 2010).

2.2 Cd e LESÃO ÓSSEA

O Cd é um contaminante muito tóxico que tem uma longa semi-vida biológica de 10 a 30 anos, em ambos os seres humanos e animais (Om; Shim, 2007 ; Nawrot et al., 2010).

Tem sido estabelecido que exposições excessivas ao Cd pode causar uma doença chamada itai-itai, que ocorre após a manifestação de danos renais e leva a osteomalacia e/ou osteoporose com fraturas múltiplas (Akesson et al., 2014).

Brzóska et al., 2005, avaliaram ratos Young machos, nas seguintes concentrações de Cd 0, 1, 5 e 50 mg Cd/l por 12 meses. O Cd era misturado em água bidestilada. A densitometria óssea através do DEXA, nos ossos fêmur esquerdo e coluna vertebral (L1-L5), encontrou os seguintes resultados: nas doses de 1 mg Cd/l e 5 mg Cd/l a CMO e a DMO estavam dentro dos valores comparados ao grupo controle até o 9º mês, no entanto após este tempo, 20% dos ratos apresentaram osteopenia com 1mg Cd/l e a dose de 5mg Cd/l houve redução de 6% da CMO e DMO. Na dose de 50 mg Cd/l resultou em uma diminuição da CMO e DMO em 8,5% e 5% respectivamente no 3º mês, 10% e 6,5% no 6ºmês, 11% e 8% no 9º mês e 14% e 8,5% no 12º mês. Ao final do tratamento os ossos apresentaram área mineral reduzida em 5,5%.

Em 2008, Yokota e Tonami investigaram se a exposição crônica ao Cd afeta o metabolismo ósseo de ratos machos, na coluna lombar e no osso fêmur. Verificaram também o que ocorre com a DMO dos ossos. Foi administrado uma dose de 0,2 mg Cd/kg na dieta durante 12 meses, com o objetivo de produzir um envenenamento crônico. A DMO foi mensurada através do DEXA, e observou que houve sua diminuição.

Os efeitos do Cd sobre o osso podem ser através de forma direta ou indireta. Os mecanismos indiretos de toxicidade envolvem danos no fígado, rim e intestino, induzidas pelo Cd, sendo o impacto resultante no osso. Estudos demonstram efeitos adversos graves no osso em algumas populações ambientalmente expostas pelo Cd, com evidência de lesão no rim. Foi relatado que o Cd pode interagir com o cálcio, com a vitamina D, com o metabolismo do colágeno e reduz a mineralização óssea. Estudos recentes revelaram que o Cd pode agir diretamente sobre a atividade e o metabolismo das células ósseas, incluindo osteoblastos, osteoclastos e na formação de hidroxapatita. Mas o mecanismo está longe de ser totalmente compreendido (Chen et al., 2011b).

Um estudo feito com fêmur e tíbia de ratos machos, depois de expostos ao Cd, nas concentrações 1, 5 e 50 mg Cd/l na água de beber, por 12 meses, através da mensuração DEXA pode-se observar que os ratos expostos a 5 mg Cd/l apresentaram uma redução da DMO na região distal do fêmur. Com 50 mg Cd/l a DMO das extremidades proximal e distal do fêmur, assim como na diáfise, apresentaram diminuição da DMO em relação ao grupo controle e os grupos com concentrações de 1 e 5 mg Cd/l. Nos ensaios biomecânicos, apresentaram alterações nas propriedades mecânicas do fêmur e da tíbia. Com 1 mg Cd/l, há uma influência sutil sobre as propriedades mecânicas nos ossos, sendo que a força máxima e a rigidez foram afetadas. Nas concentrações de 5 mg Cd/l, o enfraquecimento dos ossos, sobre as propriedades biomecânicas foram claramente evidentes. No teste de fratura do colo do fêmur, com carga aplicada na cabeça, a deformação do pescoço no rendimento e sua força máxima diminuíram, mas a rigidez mostrou uma tendência crescente. Na concentração de 50 mg Cd/l, houve um enfraquecimento das propriedades mecânicas em todas as regiões estudadas, mas a rigidez na região distal do fêmur aumentou (Brzóska et al., 2010).

No entanto, o mecanismo de toxicidade do osso induzida pela exposição Cd, ainda não foi totalmente esclarecida. O Cd renal pode aumentar a excreção de cálcio e de reduzir a formação de vitamina D ativa no rim. Como resultado, absorção e reabsorção do cálcio no intestino gastrointestinal são diminuídas, e a formação óssea e a mineralização é inibida. O Cd prejudica o rim principalmente, seguido dos danos no osso como um efeito secundário (Chen et al., 2011b). Estudou os efeitos do Cd na microestrutura óssea e fosfatase ácida 5b resistente ao serun-tartarato em ratos machos Sprague-Dawley, onde receberam concentrações de Cd em 0, 0,1, 0,5 mg Cd/kg de peso corporal, durante 12 semanas. A coluna lombar (L1-L5) dos animais foram analisadas através do DEXA e observou-se que houve redução da DMO do grupo exposto a 0,5 mg/kg em 10% em relação ao grupo controle (Chen et al., 2011b).

Uma pesquisa feita com três grupos de ratos, sendo o grupo 1 controle, onde se injetou por via subcutânea cloreto de sódio, grupo 2 injetou-se Cloreto de Cádmio (Cd Cl₂) na dose de 0,5 mg Cd/kg de peso corporal durante 2 meses e o grupo 3, injetou-se 0,5 mg Cd/kg por 3 meses. Observou-se a DMO e a resistência óssea através do DEXA (para as vértebras da coluna lombar L1-L5) e do ensaio biomecânico flexão de três pontos (fêmur e L1-L5). Na análise da coluna lombar através do DEXA, observou-se que o nível de DMO dos grupos tratados com cádmio diminuiu comparado ao grupo controle. Postula-se que os metais pesados podem acelerar a desmineralização esquelética e diminuição óssea (Chen et al., 2012).

Em um estudo realizado na coluna vertebral de ratos (L1-L5), com as seguintes concentrações de cádmio 0, 2, 10, 50 mg/l, adicionados a água potável, observou-se que nos grupos que usaram Cd, houve uma diminuição da DMO após 12 semanas comparados ao grupo controle. O grupo exposto a 50mg/l apresentou uma redução de 10% comparado ao grupo controle (Chen et al., 2013).

Hongke Lu, et al., em 2014, estudaram os efeitos do chumbo (Pb) e do Cádmio (Cd), na toxicidade desses metais ao osso, no fêmur e na tíbia. Utilizando baixas doses para causar efeitos de exposição subcrônicos, examinaram o conteúdo do Cd e Pb, como também a densidade mineral óssea, através do DEXA e da análise histológica. Concluíram que a densidade mineral óssea dos grupos expostos ao Cd e ao Pb diminuiu comparada ao grupo controle.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito do pH da água de beber e do cádmio em altas doses, na gênese das alterações ósseas em ratos Wistar (*Ratus Norvegicus albinus*), utilizando as análises Tomografia Computadorizada Espiral, Ensaios Biomecânicos e Densidade Óssea através do DEXA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 90 ratos Wistar (*Ratus Norvegicus albinus*), adultos, machos, com peso entre 200 a 250g. Os ratos foram separados e agrupados em número de quatro em caixas grandes – GAIOLAS retangulares, medindo 49x34x16cm, preconizadas para alojamento de cinco ratos adultos. Os ratos foram colocados em biotério climatizado da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE - Campus II) em umidade e temperatura e equipado com ciclo de 12 horas de claro escuro (Figura 4.1 e Figura 4.2).

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE de Presidente Prudente-SP e da FOU SP sob o protocolo nº 1645 e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Anexo A e Anexo B).

Figura 4.1 -Gaiolas

Figura 4.2 - Biotério

4.1.1 Divisão dos grupos

Os animais foram divididos em 6 grupos:

- A. Composto por 15 ratos que receberam solução de cloreto de cádmio na água de beber com pH neutro (pH 7,0);
- B. Composto por 15 ratos que receberam solução de cloreto de cádmio na água de beber com pH ácido (pH 5,0);
- C. Composto por 15 ratos, os quais receberam solução de cloreto de cádmio na água com pH básico (pH 8,0).
- D. Composto por 15 ratos que receberam água de beber com pH ácido (pH 5,0);
- E. Composto por 15 ratos que receberam água de beber com pH básico (pH 8,0);
- F. Composto por 15 ratos que receberam água de beber com pH neutro (pH 7,0).

Todos os grupos de animais receberam água e ração *ad libitum* e a eutanásia 6 meses após o início do experimento.

4.1.2 Exposição ao Cd, Alcalinização e Acidificação da água

A exposição ao cádmio foi feita com cloreto de cádmio (CdCl_2 - Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), com as seguintes especificações: hidrato mínimo de 98%, conteúdo de água de aproximadamente 2,5 mol. A solução de cloreto de cádmio (Vetec® São Paulo - Brasil) foi dada aos animais na água de beber, diariamente durante 6 meses, dissolvido na concentração de 400mg/L (Motta et al., 2004).

A água foi acidificada com ácido clorídrico e alcalinizada com hidróxido de sódio. A troca de água do bebedouro foi realizada três vezes por semana, para evitar alteração do pH. As soluções residuais de águas com Cd foram encaminhadas para

central de resíduos da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) e neutralizadas para posterior descarte. A água residual nos bebedouros foi medida a cada troca de solução, para se saber a ingestão média de cada animal.

4.1.3 Eutanásia

A eutanásia foi realizada com Pentobarbital sódico (Syntec, EUA), na dose de 100 mg/Kg administrado na cavidade peritoneal. Os indicativos de morte foram a ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos (Paiva et al., 2005). O fêmur esquerdo foi retirado e o tecido mole excedente cuidadosamente removido. As peças ósseas foram colocadas em uma solução de soro fisiológico a 7%, permanecendo armazenadas em frascos de vidros, separados de acordo com o grupo experimental, e congeladas -15°C em freezer (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Remoção do fêmur esquerdo

4.2 DENSITOMETRIA ÓSSEA

O fêmur foi submetido à análise de densitometria óssea, a DMO mensurada em grama/centímetros quadrados (g/cm^2), o CMO em g e a área em cm^2 . A análise foi feita em DEXA, modelo DPX-Alpha, LUNAR®, Laboratório de Biofísica do departamento de apoio, produção e saúde animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba- UNESP, com software especial para pequenos animais (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Densitômetro de dupla emissão de raios-x (DEXA)

Os ossos foram submersos em um recipiente de plástico contendo dois centímetros de profundidade de água para simular tecido mole. O terço médio do osso foi delimitado pelo aparelho o qual foi a área a ser percorrida pelo DEXA em um comprimento de cinco cm e uma largura de 4 cm (Figura 4.5).

O laser do densitômetro que serve como guia de posicionamento foi ajustado acima do centro do osso onde se iniciou a captura da imagem. O obturador que fica abaixo do braço do scanner se abre permitindo que os raios-x sejam emitidos. Durante o exame, o braço do scanner move-se até que a região delimitada seja avaliada pelo programa.

Após a captura das imagens, o osso foi analisado utilizando-se a ferramenta de análise manual. A área para a análise foi delimitada na região do terço médio da diáfise do fêmur e contornada para obtenção dos valores da DMO e do CMO. O programa para análise das imagens é do próprio equipamento (Figura 4.6).

Figura 4.5 - Disposição dos ossos para o DEXA

Figura 4.6 - Software LUNAR®

4.3 ENSAIO BIOMECÂNICO

Os ossos foram submetidos a ensaio mecânico, utilizando máquina universal de ensaio EMIC®, modelo DL 3000, pertencente ao Departamento de Materiais Dentários da FOA /UNESP-Araçatuba, com carga aplicada à velocidade de 5 mm/min. e célula de carga de 2000 N. Para análise biomecânica foi determinada a

força máxima admitida pelos ossos e sua rigidez, variáveis que expressam a resistência óssea. Foram realizados ensaio de flexão da cabeça do fêmur (CF) e compressão da parte cortical do fêmur (diáfise). No ensaio de compressão do osso cortical os ossos foram cortados em tubinhos em seu terço médio. Utilizando a máquina de ensaio mecânico os mesmos ficaram apoiados em superfície plana que os mantiveram na posição vertical, onde foi aplicada uma força vertical à velocidade de 5 mm/min. e célula de carga de 2000 N (Figura 4.7 e Figura 4.8).

Figura 4.7 - Ensaio de flexão da CF

Figura 4.8 – Compressão da diáfise

4.4 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA ESPIRAL

Para realizar as imagens tomográficas, os fêmures foram dispostos sobre uma plataforma de isopor (termocol) (Reddy; Lakshmana, 2005), um ao lado do outro, de acordo com a ordem dos grupos amostrais (Figura 4.9 e 4.10). Foram escaneados em um tomógrafo Toshiba®- modelo CGGT – 022 A, Activion-16 canais, Japão, com os seguintes parâmetros: Tubo de tensão 120kVp, corrente do tubo 75 mA, varredura das imagens realizadas em 42,94s, sendo adquiridas 2242 imagens.

O incremento de mesa foi 2mm a cada 1mm. O programa de armazenamento, manipulação e avaliação da densidade óssea das imagens é o K-pacs® e através da ferramenta de densidade óssea avaliou-se a qualidade óssea pela escala Hounsfield (HU), em um corte sagital mediano em dois pontos diferentes do fêmur (diáfise e CF) (Figura 4.11 e Figura 4.12).

Figura 4.9 - Disposição dos ossos para aquisição da imagem de TC

Figura 4.10 - Disposição do grupo F para aquisição da imagem de TC

Figura 4.11 - Análise HU da diáfise

Figura 4.12 - Análise HU da CF

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cinco animais morreram ao longo do estudo (um do grupo A, um do grupo C, um do grupo D e dois do grupo E). A causa da morte dos animais do grupo A e C foi edema agudo pulmonar, complicação esta associada à exposição ao cádmio (Järup, Åkesson, 2009). Nos animais do grupo D e E, não foi possível estabelecer a causa mortal após a autópsia.

Os dados foram apresentados por estatísticas descritivas de posição (mínimo, máximo, mediana e média) e escala (desvio padrão e intervalo interquartil) por Grupo e pH. Gráficos de caixa (*boxplot*) também foram construídos segundo Grupo e pH.

A comparação entre médias das medidas de densitometria óssea foram realizadas através de ajustes de modelos lineares, Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores. Testaram-se interações entre pH e Cádmio para avaliar se possíveis diferenças na densitometria na presença do cádmio são influenciadas também pelo pH da água. Nos casos onde há efeito de interação foram realizadas comparações múltiplas entre os Grupos para cada pH, ajustando o nível descritiva

(valor p) pelo método *single-step*.

Os modelos são apresentados com a apresentação do R^2 ajustado, que varia de 0 a 1. Quanto maior o valor dessa estatística, melhor as variáveis explicativas (pH e Cádmio) discriminam a variável resposta ajustada.

Os cálculos foram realizados com auxílio do software estatístico R 3.1.0 (R Core Team, 2014, Viena, Áustria). Para as comparações múltiplas utilizou-se o pacote *multcomp*. Os gráficos foram construídos com o pacote *ggplot2*. E os testes consideraram um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

A tabela 5.1 apresentam estatísticas das medidas de densitometria por pH e a presença de cádmio.

Tabela 5.1 - Média e desvio padrão medidas de densitometria por pH e presença de cádmio na água

Medida	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
	Sem cádmio					
	pH 5 (n=14)		pH 7 (n=15)		pH 8 (n=13)	
Tomo cabeça do femur (hu)	1872,66	260,87	1822,79	337,2	1731,13	203,54
Tomo diáfise (hu)	1129,58	302,51	1228,89	277,06	1159,08	193,23
DXA CMO (g)	0,35	0,06	0,43	0,1	0,42	0,05
DXA área (cm ²)	1,59	0,16	1,63	0,19	1,69	0,11
DXA DMO (g/cm ²)	0,22	0,02	0,26	0,04	0,25	0,02
EM D Força máxima (N)	612,68	51,42	605,22	71,27	663,3	43,75
EM D Rigidez (Mpa)	236,23	33,45	252,25	55,04	264,56	33,54
EM CF Força máxima (N)	155,88	18,73	161,78	32,75	174,72	23,05
EM CF Rigidez (Mpa)	173,44	22,5	138,09	13,55	160,69	35,91
Medida	Com cádmio					
	pH 5 (n=15)		pH 7 (n=14)		pH 8 (n=14)	
Tomo cabeça do femur (hu)	1599,02	171,91	1224,03	190,8	1678,51	214,48
Tomo diáfise (hu)	820,15	253,73	794,22	173,23	781,45	215,55
DXA CMO (g)	0,23	0,07	0,25	0,06	0,26	0,06
DXA área (cm ²)	1,37	0,14	1,36	0,14	1,45	0,17
DXA DMO (g/cm ²)	0,16	0,04	0,18	0,03	0,18	0,03
EM D Força máxima (N)	429,44	39,36	347,93	43,19	551,75	51,99
EM D Rigidez (Mpa)	184,75	23,98	161,27	20,76	223,35	29,6
EM CF Força máxima (N)	130,97	17,39	116,8	16,71	131,11	18,83
EM CF Rigidez (Mpa)	164,68	25,62	154,52	16,32	149,81	22,6

Foram ajustados modelos lineares para as variáveis descritas acima para testar o efeito do Cd, do pH e se há efeito conjunto entre esses fatores (interação). A tabela 5.2 apresenta a ANOVA para TC da cabeça do fêmur.

Tabela 5.2 - ANOVA para TC da CF (HU) segundo presença de cádmio e pH

Fator	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	Valor p
Cadmio	1	2018670	2018670	35,77	<0,01
pH	2	737823	368911	6,54	<0,01
Cadmio:pH	2	1059512	529756	9,39	<0,01
Residuals	79	4458677	56439

Gráfico 5.1 - Boxplot para TC da cabeça do fêmur (HU) segundo presença de cádmio e pH

Os coeficientes ajustados do modelo acima são representados na tabela 5.3. O R^2 do modelo foi de 46,1%.

Tabela 5.3 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida TC da CF (HU) segundo presença de cádmio e pH. Comparações múltiplas para presença de cádmio para cada pH

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	R² ajustado
(Intercept)	1822,79	61,34	29,72	<0,01	0,461
CadmioSim	-598,77	88,28	-6,78	<0,01	
Grupo D	49,87	88,28	0,57	0,57	
Grupo E	-91,66	90,02	-1,02	0,31	
Grupo B	325,12	124,85	2,60	0,01	
Grupo C	546,14	127,15	4,30	<0,01	
Comparações múltiplas para presença de cádmio para cada pH					
Grupo A	-598,76	88,28	-6,78	<0,01	
Grupo B	-223,77	86,75	-2,58	0,03	
Grupo C	-144,29	88,28	-1,63	0,25	

Tabela 5.4 - ANOVA para TC da diáfise (HU) segundo presença de cádmio e pH

Fator	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	Valor p
Cadmio	1	2988972	2988972	51,25	<0,01
pH	2	30122	15061	0,26	0,77
Cadmio:pH	2	56940	28470	0,49	0,62
Residuals	79	4607813	58327		
Cadmio	1	2988972	2988972	51,90	<0,01
pH	2	30122	15061	0,26	0,77
Residuals	81	4664753	57590

Gráfico 5.2 - Boxplot para TC da diáfise (HU) segundo presença de cádmio e pH

A tabela 5.5, então, apresenta os coeficientes desse modelo ajustado. O R^2 do modelo foi de 39%.

Tabela 5.5 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida TC da diáfise (HU) segundo presença de cádmio e pH

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	R^2 ajustado
(Intercept)	1199,52	51,17	23,44	<0,01	0,39
Grupos A, B e C	-373,82	52,09	-7,18	<0,01	
Grupo D	-36,63	63,05	-0,58	0,56	
Grupo E	-42,41	64,20	-0,66	0,51	

Os modelos das tabelas 5.6 a 5.11 e os gráficos 5.3 a 5.5 se referem às medidas do DEXA.

Tabela 5.6 - ANOVA para DEXA CMO (g) segundo presença de cádmio e pH

Fator	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	Valor p
Cadmio	1	0,49837	0,49837	103,00	<0,01
pH	2	0,04905	0,02453	5,07	0,01
Cadmio:pH	2	0,01207	0,00604	1,25	0,29
Residuals	79	0,38224	0,00484		
Cadmio	1	0,49837	0,49837	102,37	<0,01
pH	2	0,04905	0,02453	5,04	0,01
Residuals	81	0,39432	0,00487

Gráfico 5.3 - Boxplot para DEXA CMO (g) segundo presença de cádmio e pH

Tabela 5.7 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida DEXA CMO (g) segundo presença de cádmio e pH

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	R ² ajustado
(Intercept)	0,42	0,02	27,99	<0,01	0,581
Grupos A, B e C	-0,15	0,02	-10,06	<0,01	
Grupo D	-0,05	0,02	-2,76	0,01	
Grupo E	0,00	0,02	0,01	0,99	

Tabela 5.8 - ANOVA para DEXA área (cm²) segundo presença de cádmio e pH

Fator	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	Valor p
Cádmio	1	1,23791	1,23791	50,22	<0,01
pH	2	0,13143	0,06572	2,67	0,08
Cádmio:pH	2	0,01107	0,00554	0,22	0,80
Residuals	79	1,94718	0,02465		
Cádmio	1	1,23791	1,23791	51,20	<0,01
pH	2	0,13143	0,06572	2,72	0,07
Residuals	81	1,95826	0,02418

Gráfico 5.4 - Boxplot para DEXA área (cm²) segundo presença de cádmio e pH

O R² do modelo foi similar aos outros apresentados, 41,2%.

Tabela 5.9 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida DEXA área (cm²) segundo presença de cádmio e pH

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	R ² ajustado
(Intercept)	1,62	0,03	48,83	<0,01	0,412
Grupos A, B e C	-0,24	0,03	-7,18	<0,01	
Grupo D	-0,02	0,04	-0,50	0,62	
Grupo E	0,07	0,04	1,74	0,09	

Tabela 5.10- ANOVA para DEXA DMO (g/cm²) segundo presença de cádmio e pH

Fator	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	Valor p
Cadmio	1	0,095931	0,095931	93,86	<0,01
pH	2	0,012298	0,006149	6,02	<0,01
Cadmio:pH	2	0,001661	0,00083	0,81	0,45
Residuals	79	0,080742	0,001022		
Cadmio	1	0,095931	0,095931	94,30	<0,01
pH	2	0,012298	0,006149	6,04	<0,01
Residuals	81	0,082402	0,001017

Gráfico 5.5 - Boxplot para DEXA DMO (g/cm²) segundo presença de cádmio e pH

Tabela 5.11 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida DEXA DMO (g/cm²) segundo presença de cádmio e pH

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	R ² ajustado
(Intercept)	0,25	0,01	37,26	<0,01	0,568
Grupos A, B e C	-0,07	0,01	-9,63	<0,01	
Grupo D	-0,03	0,01	-3,31	<0,01	
Grupo E	-0,01	0,01	-0,70	0,49	

As tabelas 5.12 até 5.19 se referem, enfim, às medidas do ensaio biomecânico (EM).

Tabela 5.12 - ANOVA para EM D Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH

Fator	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	Valor p
Cadmio	1	674978	674978	262,00	<0,01
pH	2	239297	119649	46,44	<0,01
Cadmio:pH	2	67454	33727	13,09	<0,01
Residuals	72	185493	2576

Gráfico 5.6 - Boxplot para EM D Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH

A tabela 5.13 apresenta as estimativas dos coeficientes. Esse modelo apresentou o maior R^2 , 84,1.

Tabela 5.13 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida EM D Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	R² ajustado
(Intercept)	605,22	14,65	41,31	<0,01	0,841
CadmioSim	-257,30	19,97	-12,89	<0,01	
Grupo D	7,46	20,32	0,37	0,72	
Grupo E	58,08	20,72	2,80	0,01	
Grupo B	74,05	27,95	2,65	0,01	
Grupo C	145,74	28,49	5,12	<0,01	
Comparações múltiplas para presença de cádmio para cada pH					
Grupo A	-257,30	19,97	-12,89	<0,01	
Grupo B	-175,79	19,97	-8,80	<0,01	
Grupo C	-53,47	20,32	-2,63	0,03	

O ajuste para a Rigidez segundo o EM na diáfise segue o mesmo padrão da Força máxima apresentada acima, embora a discriminação não seja tão forte, R^2 =56%.

Tabela 5.14 - ANOVA para EM D Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH

Fator	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	Valor p
Cadmio	1	73903	73903	64,33	<0,01
pH	2	22552	11276	9,82	<0,01
Cadmio:pH	2	8861	4430	3,86	0,03
Residuals	72	82716	1149

Gráfico 5.7 - Boxplot para EM D Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH

Tabela 5.15 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida EM D Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	R² ajustado
(Intercept)	252,25	9,78	25,78	<0,01	0,56
CadmioSim	-90,98	13,33	-6,82	<0,01	
Grupo D	-16,02	13,57	-1,18	0,24	
Grupo E	12,31	13,84	0,89	0,38	
Grupo B	39,50	18,66	2,12	0,04	
Grupo C	49,77	19,02	2,62	0,01	
Comparações múltiplas para presença de cádmio para cada pH					
Grupo A	-90,98	13,33	-6,82	<0,01	
Grupo B	-67,50	13,33	-5,06	<0,01	
Grupo C	-28,90	13,57	-2,13	0,09	

Tabela 5.16 - ANOVA para EM CF Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH

Fator	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	Valor p
Cádmio	1	28364	28364	60,29	<0,01
pH	2	2510	1255	2,67	0,08
Cádmio:pH	2	1767	883	1,88	0,16
Residuals	76	35754	470		
Cádmio	1	28364	28364	58,97	<0,01
pH	2	2510	1255	2,61	0,08
Residuals	78	37521	481

Gráfico 5.8 - Boxplot para EM CF Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH

Tabela 5.17 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida EM CF Força máxima (N) segundo presença de cádmio e pH

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	R ² ajustado
(Intercept)	157,87	4,91	32,13	<0,01	0,451
Grupos A, B e C	-37,44	4,85	-7,72	<0,01	
Grupo D	4,49	5,87	0,77	0,45	
Grupo E	13,53	6,03	2,25	0,03	

Tabela 5.18 - ANOVA para EM CF Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH

Fator	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	Valor p
Cádmio	1	30	30	0,05	0,82
pH	2	7146	3573	6,42	<0,01
Cádmio:pH	2	3114	1557	2,80	0,07
Residuals	76	42267	556		
Cádmio	1	30	30	0,05	0,82
pH	2	7146	3573	6,14	<0,01
Residuals	78	45381	582

Gráfico 5.9 Boxplot para EM CF Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH

Os ratos que tomaram água com pH 5, apresentou pior R^2 , 13,7%, indicando que efeito do experimento foi menor nessa medida.

Tabela 5.19 - Coeficientes estimados para o modelo de regressão da medida EM CF Rigidez (Mpa) segundo presença de cádmio e pH

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	R^2 ajustado
(Intercept)	147,20	5,40	27,24	<0,01	0,137
Grupos A, B e C	-1,13	5,34	-0,21	0,83	
Grupo D	22,30	6,45	3,46	0,00	
Grupo E	8,24	6,63	1,24	0,22	

6 DISCUSSÃO

A Organização Mundial de Saúde, em 1992, considera tolerável uma ingestão diária de Cd de até 1µg/Kg. Neste experimento os animais foram expostos a 400 mg de Cd por litro de água ingerida.

Avaliou-se a variação do pH da água de beber com e sem Cd causa efeito no osso. A portaria nº2.914 em 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, que tem como objetivo determinar parâmetros para a água potável para consumo humano, determinou que o pH ideal para ingestão seja de 6,0 a 9,5.

Para a TC da cabeça do fêmur (CF), houve efeito de interação entre o Cd:pH, observado na tabela 5.2. Este estudo encontrou que os valores de p 0,57 (grupo D) e 0,31 (grupo E) indicam que não há diferença do valor médio do pH sem a presença do Cd, diferente dos grupos água com Cd, onde o grupo A ($p<0,01$) apresentou uma redução média de quase 600 HU. Já o grupo B, a média também é significativa ($p=0,03$), mas estimada em cerca de 220 HU. Por fim, não há evidências suficientes para dizer que as médias da medida em questão sejam diferentes para o grupo C ($p=0,25$) (Tabela 5.3 e Gráfico 5.1). Para a tomografia computadorizada da diáfise do fêmur, o efeito de interação não foi significativo (Tabela 5.4), portanto, conclui-se que os ratos dos grupos A, B e C apresentaram média de -373, 82 HU inferior aos grupos D, E e F. Para os grupos D e E, houve uma pequena redução, porém não significativa como mostram a tabela 5.5 e o gráfico 5.2. Na análise da literatura não foi possível obter dados relativos à escala de HU referentes ao uso do Cd. Pode-se observar que a presença do Cd na água resultou em diminuição da densidade óssea observados através da escala de HU na CF nos grupos A e B, nos grupos C, D, E não houve efeito significativo (Tabela 5.3), na diáfise pudemos observar uma redução da densidade óssea dos grupos A, B e C (Tabela 5.5).

As medidas DEXA não apresentaram efeito de interação, apenas do grupo com Cd e grupo pH (Tabela 5.6 e Gráfico 5.3). A CMO estimou uma redução significativa média de 0,15 g para os grupos A, B e C. Esta média é 0,05 g menor para os ratos do grupo D. Já as medidas para o grupo E não apresentaram redução da DMO ($p=0,99$) (Tabela 5.7). A variável área (Tabela 5.8 e Gráfico 5.4) não apresentou efeito nem de interação, nem de pH ($p=0,07$), apenas para os grupos

A, B e C ($p < 0,01$), concluindo que eles apresentam tamanho da área menor. Estima-se que a média da área reduza $0,24 \text{ cm}^2$ dentre os ratos que tomaram água com Cd (grupos A, B e C) (Tabela 5.9), concordando com Brzóska 2005. Já a relação DMO segue o padrão da CMO, há efeito do grupo pH e grupo Cd ($p < 0,01$) (Tabela 5.10 e Gráfico 5.5). A média da DMO reduz $0,07 \text{ g/cm}^2$ nos grupos A, B e C (Tabela 5.11), concordando com os estudos de Brzóska et al., 2005, Hyokota e Tonami 2008, Brzóska et al., 2010, Chen et al., 2011b, Chen et al., 2012, Chen et al., 2013 e Hongke Lu et al., 2014, onde a DMO também diminuiu com a ação do Cd e o pH 5 influencia numa redução média de $0,03 \text{ g/cm}^2$, independente da ingestão da substância (Tabela 5.11). Não foi encontrado nenhum estudo referente ao pH da água. As menções foram ao pH do solo (Nawrot et al., 2010).

As amostras foram submetidas a ensaios biomecânicos. A referida análise apresentou-se como subsídio importante devido à escassez de informações na literatura pesquisada.

No ensaio biomecânico (EM) quando empregada à força máxima na diáfise ocorre o efeito de interação (Tabela 5.12). O gráfico 5.6 e a tabela 5.13 indicam que a redução causada pelo Cd não seja tão elevada ao utilizar pH 8 (grupo C). A força máxima observada no grupo A, B e C apresentam uma redução de $257,3 \text{ N}$ ($p < 0,01$) em média, quando comparados aos grupos D, E e F. Essa redução é de $175,8 \text{ N}$ ($p < 0,01$) para o grupo B e de apenas 53 N para o grupo C, embora ainda significativo ($p = 0,03$)), conclui-se que no grupo A, a resistência óssea é menor quando comparados aos outros grupos. Para EM da diáfise a rigidez, segundo a presença de Cd e pH (Tabela 5.14 e Gráfico 5.7) houve efeito de interação, mas, não é possível detectar efeito do Cádmio para o grupo C, ao nível de significância estipulado. Para o grupo A houve uma redução de 91 MPa e para o grupo B, uma redução de $67,5 \text{ MPa}$ (Tabela 5.15), concordando com os achados de Chen et al. (2012), o qual utilizou três pontos de flexão. Neste ensaio foi utilizado o método de compressão, por entender-se que o mesmo simulava uma condição semelhante a real nos movimentos fisiológicos. Na CF a força máxima não apresentou efeito de interação (Tabela 5.16). Os grupos A, B e C apresentaram uma redução de $37,44 \text{ N}$ (Tabela 5.17 e Gráfico 5.8). A rigidez da CF foi a única medida que não apresentou efeito de interação e do grupo que ingeriu Cd, mas por sua vez, apresentou efeito do grupo com variação de pH somente, sendo a rigidez do grupo D, superior em $22,3$

MPa (Tabela 5.18, Tabela 5.19 e Gráfico 5.9, concordando com Brzóška et al. (2010). Não encontramos na literatura nenhum trabalho avaliando o efeito da variação do pH da água no osso.

7 CONCLUSÕES

- 1- Pela escala de HU ocorreu a diminuição da densidade óssea através da TC espiral, para os grupos A e B, exceto para o grupo C na cabeça do fêmur.
- 2- Na análise pela DEXA o CMO e a DMO diminuíram nos grupos A, B, C e D. A área foi menor nos grupos A, B e C, mas nos grupos D, E e F não pode-se observar nenhum efeito.
- 3- No EM os grupos A, B e C apresentaram uma redução da resistência óssea. A rigidez da diáfise diminuiu nos grupos A, B e C. O grupo E, não apresentou efeito significativo, assim como o grupo D, mas na cabeça do fêmur a rigidez para o grupo D a rigidez foi superior.

REFERÊNCIAS¹

- Åkesson A, Barregard L, Bergdahl IA, Nordberg GF, Nordberg M, Skerfving S. 2014. Non-renal effects and the risk assessment of environmental cadmium exposure. *Environ Health Perspect.* 2014; 122:431–438; <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1307110>.
- Brzóska MM, Majewska K, Kupraszewicz E. Effects of low, moderate and relatively high chronic exposure to cadmium on long bones susceptibility to fractures in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010 May;29(3):235-45. Epub 2010 Feb 1.
- Brzóska MM, Majewska K, Moniuszko-Jakoniuk J. Bone mineral density, chemical composition and biomechanical properties of the tibia of female rats exposed to cadmium since weaning up to skeletal maturity. *Food Chem Toxicol.* 2005 Oct;43(10):1507-19.
- Brzóska MM, Roszczenko A, Galażyn-Sidorczuk M, Majewska K. Zinc supplementation can protect from enhanced risk of femoral neck fracture in male rats chronically exposed to cadmium. *Exp Toxicol Pathol.* 2011 Jul;63(5):491-8. Epub 2010 Apr 10.
- Chakraborty S, Dutta AR, Sural S, Gupta D, Sen S. Ailing bones and failing kidneys: a case of chronic cadmium toxicity. *Ann Clin Biochem.* 2013 Sep;50(Pt 5):492-5. doi: 10.1177/0004563213481207
- Chen X, Zhu G, Gu S, Jin T, Shao C. Effects of cadmium on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009 Sep;28(2):232-6.
- Chen X, Zhu G, Jin T, Qin B, Zhou W, Gu S. Cadmium is more toxic on volume bone mineral density than tissue bone mineral density. *Biol Trace Elem Res.* 2011a Dec;144(1-3):380-7. Epub 2011 Jun 9.
- Chen X, Zhu G, Jin T, Shao C, Gu S, Tan M, Zhang Y, Xiao H, Hu H, Yu Y. Bone-prognostic status after cessation of cadmium exposure for one month in male rats. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2012 Jan;62(1):165-75.
- Chen X, Zhu G, Shao C, Jin T, Tan M, Gu S, Zhang Y, Xiao H. Effects of cadmium on bone microstructure and serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in male rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011b Nov;236(11):1298-305.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Chen X, Wang G, Li X, Gan C, Zhu G, Jin T, Wang Z. Environmental level of cadmium exposure stimulates osteoclasts formation in male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2013.

Hongke Lu, Guiping Yuan, Zhongqiong Yin, Shujun Dai, Renyong Jia, Jiao Xu, Xu Song, Li Li, Cheng Lu. Effects of subchronic exposure to lead acetate and cadmium chloride on rat's bone: Ca and Pu contents, bone density, and histopathological evolution. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7 (2): 640-647.

James KA, Meliker JR. Environmental cadmium exposure and osteoporosis: a review. *Int J Public Health*. 2013; 58:737-45.

Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*. 2003;68:167-82.

Khan SI, Ahmed AK, Yunus M, Rahman M, Hore SK, Vahter M, and Wahed MA. Arsenic and Cadmium in Food-chain in Bangladesh—an exploratory study. *J Healtha Popul Nutr*. 2010 Dec;28(6):578-84.

Martiniaková M, Chovancová H, Omelka R, Grosskopf B, Toman R. Effects of a single intraperitoneal administration of cadmium on femoral bone structure in male rats. *Acta Vet Scand*. 2011 Aug 31;53:49.

Motta ACF, Migliari DA, Gioso MA, Komesu MC, Sala MA, Lopes RA. The carcinogenic potential of cadmium in the palatal and gingival epithelium of rats. A morphologic and morphometric analysis. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2004 May-June;41(3):183-8.

Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Munters E, Cuypers A, Richart T, Ruttens A, Smeets K, Clijsters H, Vangronsveld J. Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals*. 2010 Oct;23(5):769-82. doi: 10.1007/s10534-010-9343-z.

Om AS, Shim JY. Effect of daidzein, a soy isoflavone, on bone metabolism in Cd-treated ovariectomized rats. *Acta Biochim Pol*. 2007;54(3):641-6. Epub 2007 Aug 24.

Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS. Curso de manipulação de animais de laboratório. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz. 2005 [citado 22 mar. 2011]. Disponível em: http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulação.pdf.

Reddy Nagareddy P, Lakshmana M. Assessment of experimental osteoporosis using CT-scanning, quantitative X-ray analysis and impact test in calcium deficient ovariectomized rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005 Nov-Dec;52(3):350-5.

World Health Organization. Environmental Health Criteria, cádmium. Geneva: World Health Organization; 1992.

Yokota H, Tonami H. Experimental studies on the bone metabolism of male rats chronically exposed to cadmium intoxication using dual-energy X-ray absorptiometry. *Toxicol Ind Health*. 2008 Apr;24(3):161-70. doi: 10.1177/0748233707078229.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética (UNOESTE)

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

PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA DE BEBER NA GÊNESE DA LESÃO ÓSSEA POR INTOXICAÇÃO POR CÁDMIO PARA ANÁLISE DA DENSIDADE RADIOGRÁFICA: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq), sob o número nº 1645, tendo como pesquisador responsável a Profa. CYNTHIA DER TOROSSIAN TORRES NEVES e os docentes participantes GISELE ALBORGHETTI NAI e HERMANN BREMER NETO e os acadêmicos KAREN KANADA e YNGRID COLLETE LUZ e participante externo JEFFERSON XAVIER DE OLIVEIRA, foi avaliado e **APROVADO** nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente-SP.

Presidente Prudente, 20 de setembro de 2013.

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

Profa. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA-UNOESTE

Cláudio D. S. Soares

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética (FOUSP)

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7863

São Paulo, 28 de novembro de 2013.

CEUA/FOUSP/Of.39

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos a Vossa Senhoria, que diante de Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE de Presidente Prudente-SP, parecer final emitido após reunião realizada em 20 de setembro de 2013 sob o nº 1645, estamos cientes da aprovação do projeto de pesquisa intitulado "**Influência do PH da água de beber na gênese da alteração óssea por Cádmio: estudo experimental em ratos**" de responsabilidade dos Pesquisadores: Cynthia Der Torossian Torres Neves, Gisele Alborghetti Nai e Hermann Bremer Neto, Karen Kanada e Ynggrid Collete Luz sob orientação do Prof. Dr. Jefferson Xavier de Oliveira, não havendo nenhuma oposição por parte deste CEUA, com relação a sua realização.

Sendo o que se nos apresentava, valemo-nos da oportunidade para reiterar-lhe os nossos protestos de elevada estima e distinta consideração.

Cordialmente.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Presidente do CEUA-FOUSP