

**COMPARAÇÃO DO AMIANTO CRISOTILA  
CALIDRIA COM TREMOLITA PURA:  
BIOPERSISTÊNCIA DE INALAÇÃO E  
HISTOPATOLOGIA APÓS EXPOSIÇÃO  
DE CURTO PRAZO**

David N. Bernstein, Jörg Chevalier, Paul Smith

Toxicologia de Inalação, 15:1387-1419, 2003  
Direitos Autorais © Taylor & Francis Inc.  
ISSN: 0895-8378 impressão/1091-7691 online  
DOI: 10.1080/08958370390248888

Taylor & Francis  
healthsciences

Recebida em 10 de junho de 2003; aceita em 20 de julho de 2003.  
Esta pesquisa foi patrocinada por uma doação da Union Carbide Corporation.  
Endereçar correspondência ao Dr. David M. Bernstein, Consultor em Toxicologia,  
40 chemin de la Petite-Boissiere, 1208 Genebra, Suíça. E-mail: davidb@itox.ch

## **COMPARAÇÃO DO AMIANTO CRISOTILA CALIDRIA COM TREMOLITA PURA: BIOPERSISTÊNCIA DE INALAÇÃO E HISTOPATOLOGIA APÓS EXPOSIÇÃO DE CURTO PRAZO**

**David N. Bernstein**

Consultor em Toxicologia, Genebra, Suíça

**Jörg Chevalier**

EPS Experimental Pathology Services AG, Muttenz, Suíça

**Paul Smith**

Research and Consulting Company Ltd., Füllinsdorf, Suíça

*As diferenças entre o amianto crisotila, um mineral serpentina, e o amianto anfíbolio foram amplamente debatidas. Muitos estudos demonstraram que a crisotila é eliminada do pulmão mais rapidamente que o anfíbolio. Para quantificar a depuração comparativa da crisotila e da tremolita do amianto anfíbolio, ambas as fibras foram avaliadas em um estudo de biopersistência de inalação que seguiu as diretrizes recomendadas pela Comissão Européia. Além disto, a resposta histopatológica no pulmão foi avaliada após a exposição de curto prazo. Este artigo apresenta os resultados deste estudo em 90 dias após a interrupção da exposição. Após o término do estudo, um artigo posterior apresentará os resultados completos em 12 meses após a interrupção da exposição. Para quantificar a dinâmica e a taxa na qual estas fibras são removidas do pulmão, a biopersistência de uma amostra de crisotila grau comercial da mina Coalinga em New Idria, CA, do tipo Calidria RG144 e de uma tremolita de fibra longa foi estudada. Para fibras vítreas sintéticas, a biopersistência das fibras maiores que 20 µm foi considerada como diretamente relacionada ao seu potencial para causar doença. Este estudo foi projetado para determinar a depuração no pulmão*

*(biopersistência) e a resposta histopatológica. Como demonstrou-se que as fibras longas têm maior potencial para patogenicidade, a técnica de geração por aerossol foi destinada a maximizar o número de fibras respiráveis longas. As amostras de crisotila foram escolhidas especificamente para terem 200 fibras/cm<sup>3</sup> maiores que 20 µm de comprimento presentes no aerossol de exposição. Estas fibras mais longas foram consideradas amplamente compostas de múltiplas fibrilas mais curtas. As amostras de tremolita foram escolhidas para terem 100 fibras/cm<sup>3</sup> maiores que 20 µm de comprimento presentes no aerossol de exposição. As fibras de crisotila Calidria são depuradas do pulmão mais rapidamente ( $T_{1/2, \text{fibras } L > 20 \mu\text{m}} = 7 \text{ h}$ ) do que qualquer outra fibra comercial testada, incluindo fibras vítreas sintéticas. Com tais fibras de depuração rápida, a exposição de 5 dias não teria a expectativa de resultar em qualquer mudança patológica no pulmão, e os pulmões de animais que inalaram crisotila Calidria não apresentaram nenhum sinal de inflamação ou patologia e não eram diferentes dos pulmões dos animais que respiraram ar filtrado. Após esta exposição de 5 dias à tremolita, as fibras de tremolita depositadas no parênquima pulmonar não são depuradas e resultam quase que imediatamente em inflamação e em uma resposta patológica do pulmão. No primeiro momento examinado, um dia após a interrupção da exposição, a inflamação foi observada e granulomas já haviam sido formados. Em 14 dias após a exposição, estes microgranulomas haviam se tornado fibróticos e em 90 dias após a exposição, a gravidade dos depósitos de colágeno havia aumentado e foi observada fibrose intersticial em um dos ratos. Estas descobertas apresentam uma base importante para a comprovação tanto cineticamente quanto patologicamente das diferenças entre a crisotila e a tremolita anfibólia. Como a crisotila Calidria foi certificada como não tendo fibras de tremolita, os resultados do estudo atual, juntamente com os resultados dos estudos toxicológicos e epidemiológicos, indicam que esta fibra não está associada a doenças pulmonares.*

As diferenças entre o amianto crisotila, um mineral serpentina, e o amianto anfibólio foram amplamente debatidas. Muitos estudos demonstraram que a crisotila não tem a mesma potência que os anfibólios e é depurada do pulmão mais rapidamente que o anfibólio (Howard, 1984; Churg & DePaoli, 1988; Mossman e outros, 1990; Morgan, 1994; Churg, 1994; McDonald e outros, 1999, 2002, 2003; McDonald & McDonald, 1997; McDonald, 1998; Rodels-perger e

outros, 1999; Hodgson & Damton, 2000). Para quantificar a depuração comparativa da crisotila e da tremolita de amianto anfibólio, ambas as fibras foram avaliadas em um estudo de biopersistência de inalação que seguiu as diretrizes recomendadas pela Comissão Europeia (Bernstein & Riego-Sintes, 1999). A biopersistência das fibras minerais sintéticas foi demonstrada como sendo uma boa previsão dos efeitos patogênicos após os estudos de inalação crônica e injeção intraperitoneal em ratos (Bernstein e outros, 2001 a, 2001 b). Além disto, a resposta histopatológica no pulmão foi avaliada após a exposição de curto prazo. Este artigo apresenta os resultados deste estudo em 90 dias após a interrupção da exposição. Após o término do estudo, um artigo posterior apresentará os resultados completos em 12 meses após a interrupção da exposição.

A exposição e as fases *in vivo* do estudo foram realizados na Research and Consulting Company Ltd., Füllinsdorf, Suíça. A contagem e o dimensionamento das fibras foram realizados sob subcontrato com a RCC em Gesellschaft für Schadstoffmessung und Auftragsanalytik GmbH (GSA), Neuss, Alemanha.

## **MÉTODOS**

### **Características da Amostra de Crisotila e Tremolita**

A crisotila estudada foi obtida na mina Coalinga em New Idria, CA, do produto comercial Calidria tipo RG144, que era produzido pela Union Carbide. Este é o mesmo tipo de crisotila avaliada por Muhle e outros (1987) e Ilgren e Chatfield (1997, 1998 a, 1998 b; Ilgren, 2002) e que foi considerado como não produzindo tumores excessivos após inalação crônica em ratos. Amostras de crisotila da mesma mina foram analisadas quanto à pureza utilizando-se procedimentos de separação química para concentrar e extrair outras fibras que não a crisotila. Os resultados deste exame de amostras nas operações tanto de mineração quanto de processamento revelaram que o único mineral de amianto detectável foi a crisotila e que não havia a presença de tremolita no amianto desta mina (Pooley, 2003; Coleman, 1996).

### **Biopersistência de Crisotila Calidria e Tremolita**

A amostra de tremolita foi obtida com o Dr. Alan Jones do Instituto de Medicina Ocupacional de Edimburgo, Escócia. Davis e outros (1985) avaliaram uma amostra semelhante em um estudo de inalação

crônica em ratos e descobriram que os ratos tratados com tremolita desenvolveram níveis muito altos de fibrose pulmonar, bem como 16 carcinomas e 2 mesoteliomas em um grupo de 39 animais. A composição química e a estrutura da crisotila são claramente diferentes das de anfíbios como a tremolita (Tabela 1). Estudos de difração de raios-X de crisotila Calidria demonstram que ela consiste de uma camada semelhante à brucita com coordenação octaédrica de seus cátions ligada a uma camada de tridimita de tetraedro silicato e torcido em um cilindro oco típico das fibras de crisotila normais (Mumpton & Thompson, 1975; Campbell e outros, 1980; Wicks & O'Hanley, 1988). A química da crisotila é composta de uma lâmina de silicato de composição  $(\text{Si}_2\text{O}_5)_n^{2n-}$ , na qual três dos átomos O em cada tetraedro são compartilhados com os tetraedros adjacentes e uma lâmina de não silicato de composição  $[\text{Mg}_3\text{O}_2(\text{OH})_4]_n^{2n+}$ . Na crisotila, as distâncias entre os oxigênios apicais em uma camada de silicato regular (idealizada) são mais curtas (0,305 nm) que as distâncias O-O da camada contendo Mg ideal (0,342 nm) que pode ser responsável pela ondulação das camadas, o que resulta no enrolamento como um tapete para formar cilindros ocos concêntricos (Skinner e outros, 1988) como ilustrado na Figura 1. Uma micrografia eletrônica de transmissão mostrando a estrutura enrolada da crisotila é mostrada na Figura 2 (adaptada de Skinner e outros, 1988) juntamente com uma ilustração da natureza enrolada da fibra. A molécula de Mg está na parte externa da onda e portanto está exposta ao ambiente circundante do líquido do pulmão. Hume e Rimstidt (1992) descreveram a dissolução da crisotila (mina Thetford) como ocorrendo em duas etapas. Primeiro, a camada de hidróxido de magnésio que está mais próxima da superfície da fibra (Smith, 1974) é removida por lixiviamento rápido; então a camada de sílica se dissolve a uma taxa mais lenta. O pH ácido do vacúolo macrófago pode acelerar este processo e/ou desestabilizar a estrutura da crisotila, permitindo a separação em fragmentos de base menores ou quebra das fibras mais longas.

**TABELA 1. Composição química típica (percentual)**

Composto	Crisotila <sup>a</sup>	Tremolita <sup>b</sup>
SiO <sub>2</sub>	39,77	55,10
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,66	1,14
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2,02	0,32
FeO	ND	2,00

MnO	0,07	0,10
MgO	40,62	25,65
CaO	0,32	11,45
K <sub>2</sub> O	ND	0,29
Na <sub>2</sub> O	0,01	0,14
H <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	12,69	3,52
H <sub>2</sub>	1,54	0,16
CO <sub>2</sub>	0,78	0,06
Total	98,4	99,93

NOTA:

ND = não detectado

<sup>a</sup>Campbell e outros (1980)

<sup>b</sup>Hodgson (1979, páginas 80-81)

(Consta figura com a seguinte legenda:)

- Líquido pulmonar

**FIGURA 1. Representação esquemática da estrutura química da crisotila mostrando que a molécula de Mg está na parte externa da ondulação voltada para o líquido pulmonar (gotículas azuis claras). Adaptado de Skinner e outros, 1988.**

As fibras da crisotila Calidria foram documentadas como sendo muito curtas, tendo um pequeno diâmetro, portanto reduzindo suas propriedades de coesão e tendo uma área superficial específica que é de três a quatro vezes maior que a de outra crisotila de fibra curta comercial (Mumpton & Thompson, 1975).

Em contraste, com anfibólios como a tremolita, a estrutura básica tem uma forma de um feixe em "I" com tetraedros ligados nos cantos (SiO<sub>4</sub>)<sup>4-</sup> agrupados em uma cadeia tetraédrica dupla que faz um sanduíche de uma camada com Ca<sub>2</sub>Mg<sub>5</sub>. Em contraste com a crisotila, com a tremolita o Mg fica travado dentro da estrutura do feixe I. Isto é ilustrado na Figura 3.

(Consta figura)

**FIGURA 2. Micrografia eletrônica de transmissão da crisotila mostrando a forma semelhante a lâmina ondulada das fibras (Skinner e outros, 1988) próxima a uma ilustração da estrutura**

“tolled” da crisotila. Adaptado de <http://www.a-m.de/englisch/lexikon/mineral/schichtsilicate/chrysotil-kris1.htm>

(Consta figura)

**FIGURA 3. Representação esquemática da estrutura química da tremolita. A vista é descendente no eixo c, de modo que as cadeias duplas de tetraedros de sílica sejam orientadas na página. O grande buraco no meio é conhecido como local A, que fica vago na tremolita.**  
<http://geo.ucalgary.ca/~tmenard/crystal/trem/html>

### Projeto Experimental

O projeto experimental da análise *in vivo* e de biopersistência foi apresentado detalhadamente anteriormente (Bernstein e outros, 1994) e é resumido a seguir. Particularmente, os detalhes dos procedimentos de contagem e dimensionamento são reiterados, pois são considerados essenciais para a interpretação bem sucedida destes estudos.

**Exposição animal.** Grupos de 56 ratos machos recém-desmamados (aproximadamente 8 semanas de idade) foram expostos por exposição apenas nasal por passagem de fluxo a uma concentração de aerossol de fibra alvo para a crisotila Calidria de 200 fibras com comprimento maior que  $20 \mu\text{m}/\text{cm}^3$  e para tremolita de 100 fibra com comprimento maior que  $20 \mu\text{m}/\text{cm}^3$  por 6 horas/dia por um período de 5 dias consecutivos, uma concentração de crisotila duas vezes maior que a exigida pela CE. O Protocolo de Biopersistência foi utilizado para assegurar que não houve nenhuma questão de exposição à fibra suficientemente longa. Além disto, um grupo de controle negativo foi exposto de maneira semelhante ao ar filtrado. Para ser comparável com os estudos de inalação de fibras atuais e anteriores, ratos Wistar (HanBrl: WIST, livres de patógenos específicos) foram utilizados, que foram obtidos da RCC Ltd., Divisão de Biotecnologia e Criação Animal, Füllinsdorf, Suíça.

**Sistema de exposição.** O sistema de geração de aerossol de fibras foi projetado para aumentar as fibras a granel sem quebrar, moer ou contaminar as fibras (Bernstein e outros, 1994). Os animais foram expostos pelo sistema de exposição de inalação apenas por nariz/focinho de passagem de fluxo. Este sistema foi derivado de Cannon e outros (1983) e é diferente dos sistemas de exposição

apenas nasais convencionais pelo fato de que o aerossol de fibras frescas é fornecido a cada animal individualmente e o ar exalado sofre exaustão imediata.

**Depuração da fibra.** Em 0 dia (imediatamente após a interrupção da exposição), 1 dia, 2 dias, 7 dias, 2 semanas, 1 mês, 3 meses, 6 meses e 12 meses após a exposição, os pulmões dos subgrupos de animais foram pesados e então cozidos por pulverização de plasma em baixa temperatura e posteriormente analisados por microscopia eletrônica de transmissão (na GSA Corp.) quanto ao número total de fibras de crisotila nos pulmões e tamanho das fibras de crisotila (comprimento e diâmetro) distribuídas nos pulmões. Os pontos de tempo de 6 meses e 12 meses ainda serão completados e relatados posteriormente.

**Exame clínico e pesos corporais.** Todos os animais foram observados quanto à mortalidade/morbidade duas vezes ao dia, antes da e após a exposição e no mínimo uma vez ao dia durante o período de aclimatação e o período de observação de 12 meses. Sinais clínicos foram registrados durante o período de exposição de 5 dias duas vezes ao dia, antes da e após a exposição, e após a interrupção da exposição semanalmente após o primeiro mês e a cada segunda semana posteriormente. Todos os animais foram sacrificados por exsanguinação após anestesia profunda por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (300 mg/kg). Cada animal foi pesado no dia 1 (utilizado para aleatorização) e no dia 8 do período de aclimatação, nos dias 1, 3 e 5 do período de exposição, semanalmente durante o mês após o último dia de exposição e a cada segunda semana posteriormente.

**Histopatologia.** Nos dias 1, 2, 14 e 90 (e em 6 e 12 meses, que devem ser concluídos) subgrupos separados de animais foram pegos para exame histopatológico do trato respiratório. Na necrópsia, os pulmões foram pesados e então o lobo esquerdo do pulmão de cada animal foi inflado através de uma cânula brônquica com uma solução de formaldeído a 4% tamponada neutra (formalina). Os linfonodos mediastinais também foram fixados em formalina. Os nodos do pulmão e linfonodos foram processados, colocados em parafina, cortados a uma espessura nominal de 2-4  $\mu\text{m}$  e tingidos com hematoxilina e eosina para exame histopatológico. Além disto, as secções do pulmão também foram tingidas com iricromo de Masson para avaliação de colágeno. Todas as anormalidades foram descritas

e relatadas e as observações brutas foram, quando possível, correlacionadas com as descobertas microscópicas. Os lobos pulmonares restantes foram preservados pela Rogers Imaging Company (Needham, MA) para exame opcional por microscopia confocal.

No sistema de pontuação utilizado para diagnósticos patológicos individuais, as mudanças histológicas foram descritas de acordo com a distribuição, gravidade e característica morfológica. A gravidade foi pontuada como mínima, leve, moderada, significativa ou maciça (graus 1-5, respectivamente).

### **Digestão Pulmonar para Análise de Fibra/Partícula**

De 5 ratos por grupo por ponto de tempo, os pulmões foram congelados na necrópsia a menos 20°C. Os pulmões congelados foram posteriormente desidratados por secagem por congelamento (secador por congelamento Edwards EF4 Modulyo) e secados para peso constante para determinar o peso seco do tecido. O tecido seco era o plasma pulverizado em um Plasma Systems 200 (Technics Plasma GmbH) por no mínimo 16 horas. Após a retirada da unidade de pulverização, a cinza de cada pulmão foi pesada e suspensa em 10 ml de metanol utilizando um banho ultra-sônico de baixa intensidade. A suspensão foi então transferida para uma garrafa de vidro com o enxágüe do cadinho de combustão e o volume completado para 20 ml. Uma alíquota foi então removida e filtrada para um filtro de polycarbonato revestido de ouro (tamanho de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ ).

### **Regra de Contagem para a Avaliação de Amostras de Ar e do Pulmão por Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Todas as fibras visíveis a um aumento de 10.000x foram levadas em consideração. Todos os objetos observados neste aumento foram dimensionados sem nenhum limite inferior ou superior imposto ao comprimento ou diâmetro. O comprimento e diâmetro bivariado foram registrados individualmente para cada objeto medido. Fibras foram definidas como qualquer objeto que tivesse um quociente de aspecto de no mínimo 3:1. O diâmetro foi determinado na maior largura do objeto. Todos os outros objetos foram considerados partículas não fibrosas.

As regras de interrupção de contagem de cada amostra foram definidas da seguinte maneira: para partículas não fibrosas, o registro das partículas foi interrompido quando um total de 30 partículas foi registrado. Para fibras, o registro foi interrompido quando 500 fibras com comprimento  $\geq 5 \mu\text{m}$ , diâmetro  $\leq 3 \mu\text{m}$  (frequentemente denominadas fibras OMS; OMS, 1985) ou um total de 1.000 fibras e partículas não fibrosas foi registrado. Se este número de fibras não tivesse sido atingido após a avaliação de  $0,15 \text{ mm}^2$  de superfície de filtro, campos de visão adicionais eram contados até que 500 fibras OMS fossem atingidas ou um total de  $5 \text{ mm}^3$  de superfície de filtro fosse avaliado, mesmo se um total de 500 fibras OMS contáveis não fosse atingido. A avaliação de objetos com comprimento  $< 5 \mu\text{m}$  foi interrompida quando 100 objetos eram contados.

### **Validação da Digestão Pulmonar e Procedimentos de Contagem**

Algo que é essencial para a validade deste tipo de estudo e que está ausente de quase todos os outros estudos de crisotila é a validação da digestão pulmonar e dos procedimentos de contagem em termos de recuperação de fibras e não alterar significativamente a distribuição do comprimento das fibras.

O único método adequado para validação da recuperação de fibra de crisotila seria uma análise paralela utilizando-se uma técnica de medição não invasiva tal como microscopia confocal (Bernstein e outros, 2003). Para validar os procedimentos, os pulmões de três ratos expostos ao mesmo tempo e sob as mesmas condições mencionadas e sacrificados um dia após a interrupção da exposição foram analisados.

Na necrópsia, os pulmões foram retirados e fixados em fixador de Karnovski por instilação suave sob uma pressão de 30 cm  $\text{H}_2\text{O}$  com imersão simultânea em fixador. A traquéia foi então ligada e os pulmões inflados foram armazenados no mesmo fixador. Após a fixação, os lobos apicais foram divididos em cinco pedaços ( $10 \text{ mm}^2 \times 5 \text{ mm}$  de espessura) cortados paralelos ao hilo, desidratados em série etanólica graduada para absoluto, tingidos com amarelo lúCIFER 0,005% e colocados em plástico Spurr para análise microscópica (Rogers e outros, 1999). As superfícies planas foram preparadas a partir de blocos plásticos endurecidos contendo pedaços de pulmão embutidos.

A microscopia confocal foi realizada em três animais aleatoriamente selecionados de cada ponto de tempo utilizando microscópios de varredura a laser Sarastro 2000 (Molecular Dynamics, Inc.) equipados com lasers de íons de argônio de 25 mW e um microscópio vertical (Optiphil-2; Nikon, Inc. ou Zeiss Axiophot) modificado para imagem de luz refletida. Estes microscópios confocais foram utilizados para registrar dados de imagem em canal duplo refletido e em modo de imagem fluorescente. Os ajustes de bancada óptica para os CLSMs Sarastro 2000 foram: excitação 488 nm (amarelo lúcido), emissão 488 nm de entalhe ( $\pm 2$  nm) e um filtro de passagem de extensão 510, poder de laser 12-15 mW, transmissão de 30%, ajuste de tensão do fotomultiplicador entre 500 e 800 V. Constituintes celulares rotulados fluorescentemente e fibras refletivas/refrativas (e partículas) tiveram sua imagem obtida simultaneamente com esta disposição. Cada “exposição” produziu duas imagens digitais em registro perfeito uma da outra.

Uma imagem registrada em qualquer modo foi um arranjo bidimensional (x, y) de 512 x 512 pixels, cada um com um valor de intensidade de 0 a 254 unidades de escala de cinza (o valor de 255 indicava saturação da escala de intensidade). As seções ópticas (x, y), individualmente e na série de profundidade, foram registradas em diversas posições ao longo do eixo z pelo ajuste da altura do estágio utilizando-se motores escalonadores sob controle de computador. As imagens e a série de imagens foram analisadas e preparadas para apresentação pelo emprego de software de computador especializado. As imagens foram gravadas através de objetivas de 40x. As dimensões de pixels no volume registrado foram (dimensões x, y e z, respectivamente) 0,13  $\mu\text{m}$ , 0,13  $\mu\text{m}$  e 0,3  $\mu\text{m}$ .

Nosso procedimento foi colocar a objetiva do microscópio aleatoriamente sobre a amostra de pulmão exposta na superfície do encaixe de epóxi, coletar uma série profunda de imagens, voltar à profundidade inicial, mover duas larguras de campo na direção x positiva e repetir o processo. 25 séries de profundidade por pedaço de pulmão (para um total de 100 campos de visão por animal) foram obtidas desta maneira (se o perímetro da secção pulmonar fosse encontrado, a objetiva era movida duas larguras de campo na direção y positiva, e o escalonamento continuava na direção x negativa).

O número e o comprimento de fibras em cada volume foi contado por um operador humano que tinha a capacidade de movimentação para

cima e para baixo através da série de profundidade de imagens enquanto observava os pontos brilhantes característicos ou linhas que indicavam uma partícula ou fibra refletiva ou refrativa.

## **RESULTADOS**

### **Validação do Procedimento de Digestão Pulmonar**

Para assegurar que os procedimentos de digestão pulmonar e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) utilizados neste estudo não afetaram o comprimento de fibra de crisotila presente no pulmão, três ratos adicionais sacrificados no dia 1 foram examinados quanto à distribuição do comprimento de fibra por microscopia confocal. Como mencionado anteriormente, a microscopia confocal permite a detecção das fibras presentes no pulmão em um cubo tridimensional do tecido pulmonar e não é invasiva. Portanto, se as fibras mais longas tivessem sido afetadas pelo procedimento de digestão pulmonar, isto ficaria evidente a partir das medições confocais.

Como o microscópio confocal tem um limite de detecção de aproximadamente 0,13  $\mu\text{m}$ , os dados da TEM foram examinados e mostraram que todas as fibras menores que 0,13  $\mu\text{m}$  de diâmetro eram menores que 10  $\mu\text{m}$  de comprimento. Portanto, todas as fibras mais longas poderiam ser detectadas pelo procedimento confocal.

Os resultados desta análise confirmaram que há uma correlação muito boa entre a distribuição do comprimento medido pelo procedimento de digestão pulmonar/TEM e a metodologia confocal com uma correlação  $r^2 = 0,9$  e que o procedimento TEM não reduz a distribuição de comprimento das fibras observadas na análise confocal.

### **Biopersistência de Inalação**

O Protocolo de Biopersistência de Inalação da CE especifica que a atmosfera de exposição à qual os animais são expostos deverá ter no mínimo 100 fibras/ $\text{cm}^3$  maiores que 20  $\mu\text{m}$ . Neste estudo, o número de fibras maiores que 20  $\mu\text{m}$  na atmosfera de exposição de crisotila foi intencionalmente aumentado para uma média de 200 fibras com comprimento maior que 20  $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ , para maximizar qualquer efeito potencial destas fibras longas sobre a depuração do pulmão. Para a tremolita, a concentração de exposição média foi mantida em 100 fibras com comprimento maior que 20  $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ . O número,

concentração e distribuição de tamanho dos grupos de exposição de controle de ar, crisotila e tremolita foram mostrados na Tabela 2.

O número médio de fibras OMS na atmosfera de exposição da crisotila foi de 11.053 fibras/cm<sup>3</sup>, o que foi mais que 100.000 vezes o limite de exposição ocupacional OSHA para crisotila, de 0,1 fibra/cm<sup>3</sup>. A atmosfera de exposição da tremolita tinha menos fibras mais curtas, resultando em uma média de 1.090 fibras OMS/cm<sup>3</sup>. O número total médio de fibras de todos os tamanhos presentes na atmosfera de exposição foi de 48.343 fibras/cm<sup>3</sup> para a crisotila e 3.128 fibras/cm<sup>3</sup> para a tremolita.

A distribuição bivariada do comprimento e diâmetro de cada fibra medida de acordo com as regras de contagem já descritas foi registrada. A técnica de geração de aerossol foi projetada para maximizar o número de fibras respiráveis longas. Como ilustrado nas Figuras 4 e 6 para crisotila e tremolita, respectivamente, 99% das fibras de crisotila na atmosfera de exposição tinham diâmetro menor que 0,4 µm, enquanto que 98% das fibras de tremolita tinham menos que 1,0 µm e, portanto, eram potencialmente respiráveis em ratos. Das fibras mais longas (comprimento maior que 20 µm), 99% das fibras de crisotila longas também tinham diâmetro menor que 0,4 µm, enquanto que 75% das fibra de tremolita longas tinham diâmetro menor que 1,0 µm.

As Figuras 5 e 7 mostram, para a crisotila e tremolita respectivamente, a distribuição bivariada de comprimento e diâmetro das fibras recuperadas do pulmão em 1 dia após a interrupção da exposição. As concentrações e dimensões de fibra médias são apresentadas nas Tabelas 4 e 5 para cada ponto de tempo.

É interessante observar que para as fibras de crisotila a distribuição de diâmetro no pulmão em 1 dia após a interrupção da exposição (GMD 0,11, faixa de 0,03 - 2,5 µm) tem um espalhamento maior em comparação com o observado no aerossol (GMD 0,07, faixa de 0,02 - 0,07 µm). Este é um efeito transitório para o qual a razão é desconhecida.

**TABELA 2. Número, concentração e distribuição de tamanho da atmosfera de exposição de crisotila, tremolita e controle de ar**

Grupo de exposição	Concentração gravimétrica (mg/m <sup>3</sup> ),	Número médio de fibras	Número médio de fibras totais/	Número médio de fibras	Percentual médio de fibras OMS	Número médio de fibras com
--------------------	---	------------------------	--------------------------------	------------------------	--------------------------------	----------------------------

	média ± desvio padrão	avaliadas	cm <sup>3</sup>	OMS/cm <sup>3</sup>	em relação às fibras totais	comprimento > 20 µm/cm <sup>3</sup>
Crisotila Calidria	1,69 ± 0,28	2016	48.343,2	11.052,8	22,22	190,5
Tremolita	11,47 ± 1,30	1627	3.128,1	1.090,3	34,9	106,2
Controle de ar	0,00	2	0,1	0	0	0

Nota -, não determinado

As diferenças entre as fibras de crisotila e tremolita também são observadas nas micrografias eletrônicas de transmissão (TEM) das amostras coletadas a partir da atmosfera de exposição para os animais. A Figura 8 mostra as fibras de crisotila Calidria coletadas do aerossol de exposição.

A Figura 9 é uma TEM semelhante das fibras de Calidria de uma amostra de ar coletada no moinho King City, onde a crisotila Calidria era minerada. Os furos (círculos) em ambas as imagens são inerentes aos filtros do tipo Nucleopore nos quais estas amostras foram analisadas e têm um diâmetro uniforme de 0,2 µm.

(Consta figura)

**FIGURA 4. Histograma bivariado de comprimento e diâmetro das fibras OMS de crisotila Calidria na atmosfera de exposição (medido por TEM)**

Percentual médio de fibras com comprimento > 20 µm em relação ao total de fibras	Faixa de diâmetro (µm)	Faixa de comprimento (µm)	GMD (µm ± desvio padrão)	GML (µm ± desvio padrão)	Diâmetro médio (µm ± desvio padrão)	Comprimento médio (µm ± desvio padrão)
0,4	0,02 - 0,7	0,07 - 37,6	0,07 ± 1,94	2,65 ± 3,10	0,08 ± 0,07	3,61 ± 7,37
3,4	0,1 - 3,7	0,9 - 75	0,27 ± 2,06	3,71 ± 3,52	0,32 ± 0,45	5,49 ± 13,97
-	-	-	-	-	-	-

Em ambas as imagens, pode-se observar que as fibras mais longa são compostas de fibrilas múltiplas de comprimento menor.

A Figura 10 mostra uma imagem em TEM das fibras do aerossol de tremolita, que são objetos cilíndricos uniformes, freqüentemente com bordas entalhadas no local onde elas foram quebradas de filamentos de fibras mais longas.

### Depuração da Fibra

As fibras de crisotila Calidria com comprimento maior que 20 µm que se depositam no pulmão “desaparecem” rapidamente do pulmão, como mostrado na Figura 11, com uma meia-vida de depuração das fibras maiores que 20 µm de 0,3 dias. No ponto de tempo do dia 0, entre 1 e 3 fibras com comprimento maior que 20 µm foram contadas no filtro. No dia 1, uma fibra com comprimento maior que 20 µm foi encontrada em um rato e nenhuma nos outros ratos. A partir do dia 2, nenhuma fibra com comprimento maior que 20 µm foi observada. Em comparação, 100 fibras com comprimento maior que 20 µm foram contadas nos animais expostos a tremolita, mesmo apesar deles terem sido expostos à metade das concentrações de aerossol de fibras longas.

(Consta figura)

**FIGURA 5. Histograma bivariado de comprimento e diâmetro das fibras OMS de crisotila Calidria recuperadas do pulmão dentro de 2 horas (dia 0) após a interrupção da exposição (medido por TEM)**

*(Consta figura)*

**FIGURA 6. Histograma bivariado de comprimento e diâmetro das fibras OMS de tremolita na atmosfera de exposição (medido por TEM)**

*(Consta figura)*

**FIGURA 7. Histograma bivariado de comprimento e diâmetro das fibras OMS de tremolita recuperadas do pulmão dentro de 2 horas (dia 0) após a interrupção da exposição (medido por TEM)**



**TABELA 4. Efeitos da exposição à tremolita**

Dias após a interrupção da exposição	0	1	2	7	14	30	90
Número total de fibras avaliadas	2022	1876	1923	1848	1868	687	1791
Número médio ( $\pm$ desvio padrão) de fibras totais por lobo pulmonar ( $\times 10^6$ )	68,46 $\pm$ 4,72	63,89 $\pm$ 7,05	68,06 $\pm$ 4,70	63,01 $\pm$ 1,98	59,55 $\pm$ 3,41	40,78 $\pm$ 4,35	32,71 $\pm$ 1,72
Número médio ( $\pm$ desvio padrão) de fibras OMS por lobo pulmonar ( $\times 10^6$ )	17,71 $\pm$ 3,36	12,83 $\pm$ 3,67	16,56 $\pm$ 3,49	13,45 $\pm$ 1,24	13,77 $\pm$ 1,38	9,56 $\pm$ 2,76	7,62 $\pm$ 0,53
Média de fibras OMS em relação às fibras totais (%)	25,7	19,8	24,2	21,3	23,2	24,9	23,4
Número médio ( $\pm$ desvio padrão) de fibras com comprimento > 20 $\mu\text{m}$ por lobo pulmonar ( $\times 10^6$ )	1,42 $\pm$ 0,26	0,82 $\pm$ 0,30	1,04 $\pm$ 3,37	0,74 $\pm$ 0,12	0,77 $\pm$ 0,04	0,57 $\pm$ 0,20	0,63 $\pm$ 0,08
Média de fibras com comprimento > 20 $\mu\text{m}$ em relação ao total de fibras (%)	2,1	1,3	1,5	1,2	1,3	1,4	1,9
Número médio ( $\pm$ desvio padrão) de fibras com comprimento de 5-20 $\mu\text{m}$ por lobo pulmonar ( $\times 10^6$ )	16,29 $\pm$ 3,15	12,01 $\pm$ 3,41	15,53 $\pm$ 3,15	12,71 $\pm$ 1,27	13,00 $\pm$ 1,37	8,99 $\pm$ 1,89	7,00 $\pm$ 0,48
Média de fibras com comprimento de 5-20 $\mu\text{m}$ em relação ao total de fibras (%)	23,7	18,6	22,7	20,1	21,9	21,7	21,5
Faixa de diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	0,056-2,5	0,05-2,2	0,06-2,2	0,044-1,8	0,049-2,1	0,046-2,0	0,032-2,5
Faixa de comprimento ( $\mu\text{m}$ )	0,7-58	0,65-60	0,7-58	0,62-52	0,54-54	0,51-50	0,54-54
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	0,32	0,28	0,32	0,28	0,27	0,25	0,23
Desvio padrão	0,38	0,38	0,35	0,32	0,35	0,33	0,34
Comprimento médio ( $\mu\text{m}$ )	4,46	3,99	4,31	3,83	4,06	4,12	4,47
Desvio padrão	12,40	11,78	12,08	10,44	10,86	10,27	10,78
GMD ( $\mu\text{m}$ )	0,26	0,23	0,27	0,23	0,23	0,21	0,18
Desvio padrão	2,14	2,27	2,09	2,13	2,17	2,18	2,36
GML ( $\mu\text{m}$ )	3,10	2,82	3,04	2,71	2,79	2,73	2,88
Desvio padrão	3,86	3,85	3,77	3,75	3,79	3,66	3,82
Quociente de aspecto médio	15,11	15,04	14,77	15,21	15,65	17,05	19,99
Número de partículas avaliadas	4,00	4,40	4,50	5,20	4,40	4,20	4,20
Número médio de partículas/lobo pulmonar ( $\times 10^6$ )	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05
Partículas $\leq 1 \mu\text{m}$ /lobo pulmonar ( $\times 10^6$ )	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Partículas $> 1 \mu\text{m} \leq 3 \mu\text{m}$ /lobo pulmonar ( $\times 10^6$ )	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02
Partículas $> 3 \mu\text{m}$ /lobo pulmonar ( $\times 10^6$ )	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00

**TABELA 5. Pesos de pulmão: média  $\pm$  desvio padrão (n = 7)**

Tempo pós-exposição (dias)	Grupo 1 Controle do ar	Grupo 2 Crisotila Calidria	Grupo 3 Tremolita	Diferenças médias estatisticamente significativas <sup>a</sup>
1	1,109 $\pm$ 0,102	1,134 $\pm$ 0,104	1,297 $\pm$ 0,120	Ar-tremolita p = 0,006 Calidria-tremolita p = 0,005
2	N.W.	0,971 $\pm$ 0,078	1,202 $\pm$ 0,139	Calidria-tremolita p = 0,002
7	N.W.	1,066 $\pm$ 0,056	1,237 $\pm$ 0,056	Calidria-tremolita p = 0,001
14	N.W.	1,138 $\pm$ 0,085	1,250 $\pm$ 0,086	Calidria-tremolita p = 0,013
30	1,144 $\pm$ 0,130	1,179 $\pm$ 0,049	1,340 $\pm$ 0,150	Ar-tremolita p = 0,014 Calidria-tremolita p = 0,019
90	N.W.	1,233 $\pm$ 0,159	1,381 $\pm$ 0,077	Calidria-tremolita p = 0,047

Nota:

N.W. = o grupo de controle não foi pesado nestes pontos de tempo

<sup>a</sup>Teste de Dunnett baseado em variação agrupada

*(Consta figura)*

**FIGURA 8. Micrografia eletrônica de transmissão da amostra de aerossol de crisotila Calidria retirada da atmosfera de exposição, aumento de 12.500x, mostrando que pode-se observar que as fibras de crisotila Calidria mais longas são compostas de fibrilas múltiplas de comprimento menor. A barra branca no fundo da foto tem comprimento de 0,5  $\mu$ m; os furos no filtro são do material de filtro Nucleopore e têm diâmetro de aproximadamente 0,2  $\mu$ m.**

*(Consta figura)*

**FIGURA 9. Micrografia eletrônica de transmissão da amostra de aerossol de crisotila Calidria retirada da amostra de ar do Moinho King City, mostrando que pode-se observar que as fibras de crisotila Calidria mais longas são compostas de fibrilas múltiplas de comprimento menor. Os furos no filtro são do material de filtro Nucleopore e têm diâmetro de aproximadamente 0,2  $\mu$ m. O moinho King City processava a crisotila Calidria.**

*(Consta figura)*

**FIGURA 10. Micrografia eletrônica de transmissão da amostra de aerossol de tremolita retirada da atmosfera de exposição, aumento de 25.500x, mostrando a densidade sólida e as bordas**

entalhadas das fibras de tremolita. A barra branca no fundo da foto tem comprimento de  $0,5 \mu\text{m}$ ; os furos no filtro são do material de filtro Nucleopore e têm diâmetro de aproximadamente  $0,2 \mu\text{m}$ .

### **Crisotila Calidria** **Depuração das fibras com comprimento maior que $20 \mu\text{m}$**

*(Consta gráfico com as seguintes legendas:)*

- *Crisotila Calidria*
- *Depuração de fibras com comprimento  $> 20 \mu\text{m}$*
- *Percentual restante (dia 0 = 100%)*
- *Tempo desde a interrupção da exposição (dias)*

*(Consta figura)*

**FIGURA 11.** Gráfico mostrando a depuração das fibras de crisotila Calidria maior que  $20 \mu\text{m}$  do pulmão após a interrupção do período de exposição de 5 dias. Os diamantes indicam o percentual restante dos pulmões individuais (média do dia 0 = 100%, pois praticamente todas as fibras foram eliminadas no dia 1). A linha sólida é a curva de depuração ajustada aos dados utilizando-se técnicas de regressão não lineares com exponencial único (StatSoft, Inc., 2003). Os coeficientes de regressão são apresentados em uma inserção na figura.

Em um claro contraste, as fibras de tremolita mais longas ( $L > 20 \mu\text{m}$ ) que se depositam no pulmão apresentam uma depuração de prazo mais curto inicial, provavelmente associado à depuração de fibras que se depositaram na árvore traqueal-brônquica, não seguida de depuração adicional. A partir da Figura 12, esta depuração de prazo mais curto parece ser encerrada em 7 dias após a interrupção da exposição. Após esta fase inicial, não ocorre nenhuma outra depuração das fibras de tremolita longas.

As fibras de crisotila mais curtas com comprimentos entre  $5$  e  $20 \mu\text{m}$  também são depuradas rapidamente com uma meia-vida de 7 dias (exponencial único ajustado aos dados). Os objetos com comprimento menor que  $5 \mu\text{m}$  são depurados com uma meia-vida de 59 dias (exponencial único ajustado aos dados); entretanto, como todo o pulmão foi digerido para estas medições, não foi possível determinar

em quais compartimentos estes objetos mais curtos permaneceram. Esta taxa de depuração está dentro da faixa relatada para a depuração de pós-incômodos insolúveis (Muhle e outros, 1990; Stöber e outros, 1990; Yu e outros, 1994; Oberdoerster, 1994).

### **Tremolita**

#### **Depuração das fibras com comprimento maior que 20 $\mu\text{m}$**

*(Consta gráfico com as seguintes legendas:)*

- Tremolita
- Depuração de fibras com comprimento  $> 20 \mu\text{m}$
- Percentual restante (dia 0 = 100%)
- Tempo desde a interrupção da exposição (dias)

*(Consta figura)*

**FIGURA 12.** Gráfico mostrando a depuração das fibras de tremolita maior que 20  $\mu\text{m}$  do pulmão após a interrupção do período de exposição de 5 dias. Os diamantes indicam o percentual restante dos pulmões individuais (média do dia 1 = 100%). A linha sólida é a curva de depuração ajustada aos dados utilizando-se técnicas de regressão não lineares com exponencial único (StatSoft, Inc., 2003). Os coeficientes de regressão são apresentados em uma inserção na figura.

Novamente, isto está em claro contraste com a depuração de fibra curta nos ratos expostos a tremolita para os quais todas as frações de comprimento não apresentaram depuração após os pontos de tempo iniciais. Para a fração de fibra com comprimento de 5-20  $\mu\text{m}$ , uma fase de depuração inicial ocorrem com uma meia-vida de 27 dias, nivelando-se em 40%, sem nenhuma depuração adicional. Uma cinética semelhante é observada para os objetos com comprimento menor que 5  $\mu\text{m}$ , onde a meia-vida de depuração de curto prazo é de 21 dias, novamente se nivelando posteriormente com mais que 50% restando em 90 dias.

### **Pesos Pulmonares**

Como mostrado na Tabela 5, os pesos pulmonares medidos na necrópsia mostram que, após a exposição de 5 dias, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos

de exposição de controle de ar e de crisotila Calidria a qualquer momento. Em contraste, mesmo no dia 1 após a exposição e continuando em cada ponto de tempo até 90 dias, há um aumento sistemático estatisticamente significativo nos pesos pulmonares médios dos animais expostos à tremolita em comparação com os animais de controle de ar e expostos a crisotila.

## **Resultado Histopatológico**

Apesar dos resultados de depuração de fibra diferenciarem claramente a retenção da fibra crisotila Calidria do da tremolita, as descobertas da histopatologia apresenta uma base patológica para avaliar a importância desta diferença.

A incidência resumida das descobertas histopatológicas no pulmão nos dias 1, 2, 14 e 90 após a interrupção da exposição são apresentadas no Anexo nas Tabelas A1 a A4. São mostradas as descobertas histológicas específicas observadas no pulmão, o número de animais por grupo de dose examinada e o número de animais com cada grau da descoberta. Para cada descoberta, o número total de animais afetados e a gravidade média também são mostrados.

Microscopicamente, não foram observadas descobertas relativas à exposição a crisotila Calidria em qualquer momento de sacrifício. Nos dias 2 e 14, alguns ratos foram observados com agregação de célula espumosa. Estas células espumocitas são histiócitos no lúmen alveolar. Elas têm um citoplasma microvesicular espumoso que são dispostos em pequenos agregados próximos às ramificações bronquiolares ou subpleuralmente. Estes agregados são comumente observados em ratos de controle (dados de controle histórico RCC) e não foram considerados como relativos à exposição.

Em contraste, nos ratos expostos à tremolita, foram observadas diversas lesões celulares principalmente na junção bronquiolar-alveolar em todos os momentos de sacrifício. Estas lesões celulares foram caracterizadas por agregação do macrófago alveolar e microgranulomas. Nos ratos sacrificados após os períodos de observação de 1 e 2 dias, foram observados hipertrofia/hiperplasia da célula de revestimento alveolar e bronquiolite. Em 14 dias e 90 dias após a interrupção da exposição, a deposição de colágeno (fibrose)

foi diagnosticada em microgranulomas em adição às lesões celulares. Em 90 dias após a interrupção da exposição, o colágeno nos granulomas aumentou em gravidade até o grau 3 e a deposição do colágeno intersticial foi observada já em um animal. Estas descobertas são resumidas na Tabela 6.

Estas lesões são mostradas nas fotomicrografias dos pulmões expostos à tremolita nas Figuras 13 a 16. A Figura 13 mostra a resposta granulomatosa que já é desenvolvida no dia 1 após a interrupção da exposição de 5 dias à tremolita.

**TABELA 6. Grau médio de lesões celulares e fibrose nos diferentes momentos de sacrifício em ratos expostos à tremolita**

Tempo (dias) após a interrupção da exposição	Figura	Macrófago alveolar	Granulomas	Granuloma de fibrose	Fibrose intersticial
1 dia	10	2,4	2,6	0	0
2 dias		3,0	3,0	0	0
14 dias	11	2,6	3,0	1,3	0
90 dias	12	2,0	2,8	2,8	003

No dia 14, a deposição de colágeno observada na Figura 14 já é muito aparente no granuloma no pulmão como indicado nas setas (o colágeno é tingido de azul nas fotomicrografias). Em 90 dias após a interrupção da exposição, a gravidade do colágeno nos granulomas aumentou como mostrado nas Figuras 15 e 16, nas quais o granuloma pode ser visto entrelaçado com o colágeno. Neste momento o colágeno progrediu para o interstício e fibrose intersticial é observada como ilustrado nas Figuras 15 e 16. Diversos agregados de macrófago também são observados, bem como célula gigante multi-nucleada.

Em comparação, as Figuras 17 e 18 mostram a resposta do pulmão à exposição à crisotila Calidria em 2 e 14 dias após a interrupção da exposição, respectivamente. Em contraste aos pulmões expostos à tremolita, não foram observados granulomas ou formação de colágeno nos pulmões expostos à crisotila Calidria. São observados alguns macrófagos, o que não é surpreendente considerando-se os 5 dias recentes de exposição a uma atmosfera de mais que 48.000 fibras/cm<sup>3</sup>. No geral, os pulmões dos animais expostos à crisotila foram notadamente semelhantes aos pulmões dos animais do grupo

de controle de ar, que receberam ar filtrado, cujo exemplo é mostrado na Figura 19.

## DISCUSSÃO

A mina Calidria tem sido uma fonte isenta de tremolita do amianto crisotila serpentina. Tem-se observado que o amianto crisotila produzido nesta mina é rapidamente removido após contato com a camada de revestimento líquido do pulmão.

*(Consta figura com a seguinte legenda:)*

- Colágeno (*Mancha azul*)
- Granuloma

**FIGURA 14.** Fotomicrografia de uma secção histopatológica de um pulmão exposto a tremolita 14 dias após a interrupção da exposição de 5 dias mostrando a deposição de colágeno no granuloma no pulmão, como indicado pelas setas (o colágeno é tingido de azul nas fotomicrografias).

*(Consta figura com a seguinte legenda:)*

- Granulomas (*Entrelaçados com colágeno*)

**FIGURA 15.** Fotomicrografia de uma secção histopatológica de um pulmão exposto a tremolita 90 dias após a interrupção da exposição de 5 dias. A gravidade do colágeno nos granulomas aumentou e o granuloma pode ser visto entrelaçado com o colágeno. Diversos agregados de macrófago também são observados, bem como célula gigante multi-nucleada.

*(Consta figura com a seguinte legenda:)*

- Fibrose intersticial
- Granulomas com colágeno

**FIGURA 16.** Fotomicrografia de uma secção histopatológica de um pulmão exposto a tremolita 90 dias após a interrupção da exposição de 5 dias. A gravidade do colágeno nos granulomas aumentou e o granuloma pode ser visto entrelaçado com o colágeno. Neste momento, o colágeno progrediu para o interstício, e também é observada fibrose intersticial. Diversos agregados de macrófago também são observados, bem como célula gigante multi-nucleada.

Smith (1973) relatou que o hidróxido de magnésio na crisotila fica mais próximo da superfície da fibra, enquanto que a sílica tetraédrica fica dentro da estrutura. Ele relatou também que a dissolução da crisotila é afetada pela capacidade de tamponamento da solução de lixívia que a quantidade de MG e SiO<sub>2</sub> extraível da crisotila aumenta com o crescimento da potência de tamponamento. A dissolução da crisotila foi determinada *in vitro* como sendo controlada por difusão através de uma camada de água próxima à superfície do mineral (Swenters e outros, 1985). A grande capacidade de tamponamento do pulmão (Matson, 1994) e a maior solubilidade da crisotila no ambiente ácido do macrófago teria a expectativa de melhorar ainda mais a dissolução, além do que havia sido relatado nestes estudos *in vitro* (Nagy & Bates, 1952; Hume & Rimstidt, 1992).

A estrutura em formato de concha impermeável a SiO<sub>2</sub> da tremolita não se separa ou dissolve ao contato com a camada de revestimento líquido do pulmão e permanece como uma fibra em formato de bastão após a inalação.

O fato da crisotila poder se depurar rapidamente já havia sido relatado anteriormente (Bernstein e outros, 2000, 2003); entretanto os resultados deste estudo sugerem que a crisotila Calidria parece se desintegrar em pequenas fibras/partículas muito rapidamente em contato com a superfície do pulmão. As diretrizes do protocolo de Biopersistência de Inalação CE padrão recomendam que o primeiro momento após a exposição seja 1 dia após a interrupção da exposição. Neste estudo, o momento 0 imediatamente após a interrupção da exposição foi adicionado para proporcionar uma maior definição da cinética de depuração inicial. Felizmente o momento do dia 0 foi incluído e isto possibilitou que a meia-vida de depuração das fibras maiores que 20 µm fosse determinada como sendo de 7 h (0,3 dias). Em 1 dia após a exposição, apenas 1 fibra com comprimento maior que 20 µm foi observada no filtro de contagem em apenas 1 dos 5 animais analisados. De acordo com nosso conhecimento, esta taxa de depuração da crisotila Calidria é mais rápida do que para qualquer outro tipo de fibra relatado (seja sintética ou natural). É interessante observar que a Diretriz de Fibra CE, para a qual as diretrizes do protocolo de Biopersistência de Inalação foram desenvolvidas, declara que fibras vítreas sintéticas que têm uma meia-vida de depuração para fibras com comprimento maior que 20 µm de menos que 10 dias

são liberadas da classificação como carcinógenas (Comissão Europeia, 1997).

As fibras de crisotila com faixas de comprimento entre 5 e 20  $\mu\text{m}$  também são depuradas rapidamente com uma meia-vida de 7 dias. Seria razoável esperar que conforme as fibras mais longas se desintegram, elas contribuem com pedaços mais curtos para isto e com frações de comprimento menor. A meia-vida de depuração de 7 dias para as fibras com comprimento de 5-20  $\mu\text{m}$  é consideravelmente mais rápida que aquela relatada por Hesterberg e outros (1998) para fibras minerais sintéticas solúveis uniformes.

Os objetos com comprimento menor que 5  $\mu\text{m}$  remanescentes no pulmão são depurados com uma meia-vida de 59 dias. Isto, como descrito anteriormente, está dentro da extremidade inferior da depuração relatada para partículas inertes insolúveis após inalação. Suquet (1989) relatou que remoção através de lixiviação ácida das camadas de óxido de magnésio resulta na transformação da fibra em fibras ou partículas curtas. Estas fibras e partículas mais curtas são freqüentemente transferidas para as linfáticas, onde as condições de dissolução são provavelmente diferentes; entretanto, a metodologia de digestão pulmonar não pode distinguir entre estes compartimentos diferentes. Além disso, um Relatório recente no Painel Especializado sobre os Efeitos à Saúde das Fibras de Amianto e Fibras Vítreas Sintéticas: A Influência do Comprimento da Fibra, emitido pela Agência para Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças declarou que “Devido às descobertas de estudos epidemiológicos, estudos em animais de laboratório e estudos de genotoxicidade *in vitro*, combinados com a capacidade do pulmão de depurar fibras curtas, os membros do painel concordaram que há fortes evidências de que é improvável que o amianto e as SVFs (fibras vítreas sintéticas) menores que 5  $\mu\text{m}$  provoquem câncer em humanos” (ATSDR, 2003; EPA, 2003).

(Consta figura com a seguinte legenda:)

– Junção bronco-alveolar

**FIGURA 17.** Fotomicrografia de uma secção histopatológica de um pulmão exposto a crisotila Calidria 2 dias após a interrupção da exposição de 5 dias. Alguns macrófagos são observados, o que não é surpreendente considerando-se os 5 dias recentes de exposição a

uma atmosfera de mais que 48.000 fibras/cm<sup>3</sup>. No geral, os pulmões dos animais expostos à crisotila foram notadamente semelhantes aos pulmões dos animais do grupo de controle de ar, que receberam ar filtrado, cujo exemplo é mostrado na Figura 19.

*(Consta figura com a seguinte legenda:)*

– *Junção bronco-alveolar*

**FIGURA 18.** Fotomicrografia de uma secção histopatológica de um pulmão exposto a crisotila Calidria 14 dias após a interrupção da exposição de 5 dias. Alguns macrófagos são observados, o que não é surpreendente considerando-se os 5 dias recentes de exposição a uma atmosfera de mais que 48.000 fibras/cm<sup>3</sup>. No geral, os pulmões dos animais expostos à crisotila foram notadamente semelhantes aos pulmões dos animais do grupo de controle de ar, que receberam ar filtrado, cujo exemplo é mostrado na Figura 19.

*(Consta figura com a seguinte legenda:)*

– *Junção bronco-alveolar*

**FIGURA 19.** Fotomicrografia de uma secção histopatológica de um pulmão de controle de ar filtrado 1 dia após a interrupção da exposição de 5 dias ao ar filtrado.

*(Consta figura com a seguinte legenda:)*

- *Número de fibras de crisotila Calidria e tremolita com comprimento > 20 μm remanescentes no pulmão após a interrupção da exposição.*
- *(NOTA: no aerossol de exposição da Calidria havia 1,8 vezes mais fibras com comprimento > 20 μm do que no aerossol de exposição à tremolita.)*
- *N° de fibras de tremolita com comprimento > 20 μm por pulmão (milhões)*
- *N° de fibras de Calidria com comprimento > 20 μm por pulmão (milhões)*
- *N° de fibras de com comprimento > 20 μm por pulmão (milhões)*
- *Tempo desde a interrupção da exposição (dias)*

**FIGURA 20.** Gráfico mostrando o número (em milhões) de fibras de crisotila Calidria e tremolita maiores que 20 μm remanescentes no pulmão após a interrupção do período de exposição de 5 dias. A

crisotila Calidria se dissolve/desintegra tão rapidamente que imediatamente após a interrupção da exposição (dia 0), já há 100 vezes menos crisotila longa presente no pulmão em comparação com a tremolita, mesmo apesar da atmosfera de exposição à crisotila ter tido quase o dobro da concentração de fibras com comprimento > 20  $\mu\text{m}$  que a atmosfera de exposição à tremolita.

A rápida depuração da crisotila Calidria é refletida na ausência de qualquer resposta patológica a esta fibra, com os pulmões de ratos expostos à crisotila Calidria tendo aparência semelhante aos dos ratos de controle de ar.

Com as fibras de tremolita com comprimento > 20  $\mu\text{m}$ , no dia 1 (o que é recomendado pelo protocolo da CE como o ponto inicial para calcular a cinética da depuração para permitir a remoção de fibras que se depositam na árvore traqueal-brônquica), uma média de  $0,8 \times 10^6$  fibras de tremolita com comprimento > 20  $\mu\text{m}$  é encontrada no pulmão. Com a conclusão desta fase, não há depuração adicional com aproximadamente  $0,6 \times 10^6$  fibras com comprimento > 20  $\mu\text{m}$  remanescentes no pulmão em 90 dias. Esta diferença é melhor ilustrada como mostrado na Figura 20, pelo exame do número de fibras com comprimento > 20  $\mu\text{m}$  remanescentes no pulmão para tremolita e em comparação com a crisotila. A crisotila Calidria se dissolve/desintegra tão rapidamente que imediatamente após a interrupção da exposição (dia 0), já há 100 vezes menos crisotila longa presente no pulmão em comparação com a tremolita, mesmo apesar da atmosfera de exposição à crisotila ter tido quase o dobro da concentração de fibras com comprimento > 20  $\mu\text{m}$  que a atmosfera de exposição à tremolita. A crisotila Calidria está se depurando com uma meia-vida de 7 h, enquanto que a tremolita, após os primeiros dias, não se depura mais.

Em 1 dia após a interrupção do período de exposição de 5 dias, os ratos expostos à tremolita tinham elevado estatisticamente significativamente os pesos médios do pulmão em comparação com os ratos do controle de ar ou expostos à crisotila Calidria. Isto é mais provavelmente resultado de uma grande reação inflamatória às fibras de tremolita nos pulmões mesmo durante os dias iniciais de exposição. A reação inflamatória é refletida no exame histopatológico no dia 1 após a interrupção da exposição com lesões celulares que foram caracterizadas por agregação de macrófago alveolar e

microgranulomas. Em 14 dias após a interrupção da exposição, estes microgranulomas apresentaram deposição de colágeno. No próximo momento analisado, em 90 dias após a exposição, a gravidade dos depósitos de colágeno havia aumentado e foi observada fibrose intersticial em um dos ratos.

Reações tanto fibrótica quanto tumorigênica aos anfibólios como a crocidolita (McConnell e outros, 1994) foram relatadas após 90 dias de exposição; entretanto, o fato de tal exposição curta à tremolita produzir esta reação é uma forte indicação da reatividade da tremolita.

### **Comparação com Outros Estudos**

As diferenças observadas na persistência e na patologia neste estudo também são refletidas nos resultados relatados sobre a crisotila Calidria e sobre a tremolita em estudos de toxicologia crônica.

Ilgren e Chatfield (1997, 1998a, 1998b) apresentaram relatórios sobre estudos de toxicologia de inalação realizados conjuntamente pelo Instituto Nacional de Ciências da Saúde Ambiental (NIEHS) do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos e da Unidade de Pneumoconiose do Conselho de Pesquisa Médica (MRC) no Reino Unido para comparar os resultados de estudos de inalação similares realizados em dois locais diferentes sob condições quase idênticas. Como parte destes estudos, ratos foram expostos 7 h/dia, 5 dias/semana por 12 meses a uma concentração de exposição média ( $\pm$  desvio padrão) de  $7,8 \pm 1,46$  mg/m<sup>3</sup> de crisotila Coalinga. A crisotila Coalinga foi relatada como sendo relativamente curta com a maioria das fibras com comprimento menor que 5  $\mu$ m, como observado no presente estudo. Não foi observada nenhuma resposta fibrótica ou tumorigênica após exposição à fibra de crisotila Calidria.

Os resultados relatados por Ilgren e Chatfield indicam que a carga pulmonar total (baseada na medição de sílica, que é uma medição de todos os tamanhos e partículas de fibras, inclusive dos que têm comprimento menor que 5  $\mu$ m) para a crisotila Calidria aumenta inicialmente durante o período de exposição de 1 ano, se estabiliza e então, após a interrupção da exposição, diminui uniformemente com aproximadamente 95% de todos os tamanhos de partículas e fibras de Calidria sendo depurados dentro de 1 ano após a exposição. Devido à

metodologia, não foi feita nenhuma diferenciação de comprimento de fibra neste estudo.

Resultados similares foram relatados em um outro estudo de toxicologia de inalação crônica de crisotila Calidria feito por Muhle e outros (1987), no qual ratos foram expostos a uma concentração de 6 mg/m<sup>3</sup> de crisotila Calidria por 5 horas, 4 vezes/semana por 1 ano com subgrupos de ratos mantidos por um período adicional de 1 ano após a exposição. Os autores relataram que não ocorreu nenhum aumento significativo nos tumores a partir da exposição à crisotila Calidria. A fibra de crisotila Calidria também foi testada em quatro estudos de injeção intraperitoneal (ip) em doses de até 3 mg com níveis de tumor na faixa de retaguarda relatada de até 10% (Muhle e outros, 1987; Pott e outros, 1987; Rittinghausen e outros, 1992). Estes estudos sustentam que a crisotila Calidria não é carcinogênica após tanto inalação quanto exposição ip em concentrações relativamente altas.

A resposta à exposição de inalação crônica da fibra de tremolita semelhante à utilizada no estudo atual foi relatada por Davis e outros (1985). Ratos foram expostos por 7h/dia, 5 dias/semana por 12 meses a uma concentração de aerossol de tremolita coreana de 10 mg/m<sup>3</sup>, que foi documentada como tendo 1.600 fibras com comprimento > 5 µm/cm<sup>3</sup>, medidas por microscopia óptica de fase-contraste (PCOM). Grupos de ratos foram examinados histopatologicamente em 12, 18 e 27-29 meses. A partir da Figura 1 na publicação de Davis e outros, havia aproximadamente 270 fibras com comprimento > 20 µm/cm<sup>3</sup> na atmosfera de exposição medida por PCOM. Quando utilizando microscopia eletrônica de varredura, havia aproximadamente 3% das fibras com comprimento > 20 µm, o que corresponde bastante com os resultados do estudo atual de 3,4% por TEM. Os ratos tratados com tremolita desenvolveram níveis muito altos de fibrose pulmonar, bem como 16 carcinomas e 2 mesoteliomas em um grupo de 39 animais. Os autores relataram que “portanto, a tremolita provou ser o mineral mais perigoso que nós já estudamos”.

## **CONCLUSÕES**

Estas descobertas proporcionam uma base importante para comprovar tanto cineticamente quanto patologicamente as diferenças entre a crisotila e a tremolita anfibólia.

Após esta exposição de 5 dias à tremolita, as fibras de tremolita, uma vez depositadas no parênquima pulmonar, não são depuradas e resultam quase que imediatamente em inflamação e em uma resposta patológica no pulmão. No primeiro momento examinado, 1 dia após a interrupção da exposição, mudança celular e granulomas já haviam se formado. Em 14 dias após a exposição, estas lesões haviam se tornado fibróticas e em 90 dias após a exposição haviam se desenvolvido em fibrose intersticial. Como as fibras de tremolita não são depuradas do pulmão e permanecem como uma fonte persistente para estímulo patológico, será mais interessante acompanhar a evolução posterior das lesões patológicas em 6 e 12 meses após a exposição.

Apesar de ter sido anteriormente demonstrado que a crisotila se depura rapidamente (Bernstein e outros, 2000, 2003), as fibras de crisotila Calidria se depuram do pulmão mais rapidamente ( $T_{1/2}$ , fibras com comprimento > 20  $\mu\text{m}$  = 7h) que qualquer outra fibra comercial testada, incluindo fibras minerais sintéticas. Com tais fibras de liberação rápida, não se espera que a exposição de 5 dias resulte em alguma mudança patológica no pulmão e, como relatado anteriormente, os pulmões dos animais que inalaram a crisotila Calidria não apresentaram sinais de inflamação ou patologia e não eram diferentes dos pulmões dos animais que respiraram ar filtrado.

Este estudo apresenta uma base mecanística forte para as diferenças epidemiológicas relatadas entre a crisotila e o anfíbio. McDonald e outros (2003; McDonald e McDonald, 1997) relatou que os riscos ocupacionais tanto de mesotelioma quanto de câncer de pulmão são relativos aos níveis estimados de tremolita nas minas onde os homens haviam trabalhado e o estudo atual dá suporte adicional para esta diferenciação. Como a crisotila Calidria havia sido certificada como não tendo fibra de tremolita, os resultados do estudo atual, juntamente com os resultados dos estudos toxicológicos e epidemiológicos, indicam que esta fibra não está associada a doença pulmonar.

## **ANEXO**

**TABELA A1.** Resumo da incidência de descobertas histopatológicas (1 dia após a interrupção da exposição)

	Controle de Ar	Crisotila Calidria	Tremolita
Número de animais por grupo de dose examinado	3	5	5
<b>Pulmão</b>			
Histiocitose alveolar: reativa; focal/multifocal			
Grau 2	-	-	3
Grau 3	-	-	2
Total afetado	-	-	5
Gravidade média	-	-	2,4
Granuloma: junção bronquíolo-alveolar			
Grau 2	-	-	2
Grau 3	-	-	3
Total afetado	-	-	5
Gravidade média	-	-	2,6
Hipertrofia/hiperplasia de célula de revestimento alveolar			
Grau 2	-	-	1
Grau 3	-	-	1
Total afetado	-	-	2
Gravidade média	-	-	2,5
Bronquiolite			
Grau 1	-	-	1
Grau 2	-	-	3
Total afetado	-	-	4
Gravidade média	-	-	1,8

**TABELA A2.** Resumo da incidência de descobertas histopatológicas (2 dias após a interrupção da exposição)

	Controle de Ar	Crisotila Calidria	Tremolita
Número de animais por grupo de dose examinado	3	5	5
<b>Pulmão</b>			
Histiocitose alveolar: reativa; focal/multifocal			
Grau 3	-	-	5
Total afetado	-	-	5
Gravidade média	-	-	3,0
Granuloma: junção bronquíolo-alveolar			
Grau 3	-	-	5
Total afetado	-	-	5
Gravidade média	-	-	3,0
Hipertrofia/hiperplasia de célula de revestimento alveolar			
Grau 2	-	-	5

Total afetado	-	-	5
Gravidade média	-	-	2,0
Bronquiolite			
Grau 2	-	-	4
Grau 3	-	-	1
Total afetado	-	-	5
Gravidade média	-	-	2,2
Hemorragia alveolar			
Grau 2	-	1	-
Total afetado	-	1	-
Gravidade média	-	2,0	-

**TABELA A3.** Resumo da incidência de descobertas histopatológicas (14 dias após a interrupção da exposição)

	Controle de Ar	Crisotila Calidria	Tremolita
Número de animais por grupo de dose examinado	3	5	5
Pulmão			
Histiocitose alveolar: reativa; focal/multifocal			
Grau 2	-	-	2
Grau 3	-	-	3
Total afetado	-	-	5
Gravidade média	-	-	2,6
Agregação de célula espumosa: focal/multifocal			
Grau 2	-	1	-
Grau 3	-	1	-
Total afetado	-	2	-
Gravidade média	-	2,5	-
Granuloma: junção bronquíolo-alveolar			
Grau 3	-	-	5
Total afetado	-	-	5
Gravidade média	-	-	3,0
Células gigantes multi-nucleadas em granulomas			
Grau 2	-	-	2
Total afetado	-	-	2
Gravidade média	-	-	2,0
Pulmões, tricromo			
Colágeno em granulomas			
Grau 1	-	-	3
Grau 2	-	-	1
Total afetado	-	-	4
Gravidade média	-	-	1,3

**TABELA A4.** Resumo da incidência de descobertas histopatológicas (90 dias após a interrupção da exposição)

	Controle de Ar	Crisotila Calidria	Tremolita
Número de animais por grupo de dose examinado	3	4	4
<b>Pulmão</b>			
Histiocitose alveolar: reativa; focal/multifocal			
Grau 2	-	-	1
Total afetado	-	-	1
Gravidade média	-	-	2,0
Agregação de célula espumosa: focal/multifocal			
Grau 2	-	2	-
Total afetado	-	2	-
Gravidade média	-	2,0	-
Granuloma: junção bronquíolo-alveolar			
Grau 2	-	-	1
Grau 3	-	-	3
Total afetado	-	-	4
Gravidade média	-	-	2,8
<b>Pulmões, tricromo</b>			
Colágeno em granulomas			
Grau 2	-	-	1
Grau 3	-	-	3
Total afetado	-	-	4
Gravidade média	-	-	2,8
Deposição de colágeno intersticial			
Grau 2	-	-	1
Total afetado	-	-	1
Gravidade média	-	-	2,0
<b>Linfonodo do mediastino</b>			
Histiocitose			
Grau 3	-	-	1
Total afetado	-	-	1
Gravidade média	-	-	3,0
Eritrofagocitose			
Grau 2	-	-	1
Total afetado	-	-	1
Gravidade média	-	-	2,0

## REFERÊNCIAS

(Constam referências bibliográficas.)