

APLICAÇÃO DE UM CASO PRÁTICO DE DOENÇAS PROFISSIONAIS: RELEVÂNCIA MÉDICO-LEGAL METAIS PESADOS E CARCINOGENESE

Ana Leite¹, Ricardo Silva², Elisabete Cunha³

RESUMO

Os metais pesados são elementos quimicamente reativos, bio-acumulativos e que o organismo não é capaz de eliminar. Esta característica, aliada à sua potencial toxicidade, distingue-os de outros agentes tóxicos. O excesso de metais pesados que fazem naturalmente parte dos organismos, como o cobre (Cu) ou zinco (Zn), ou o contacto com metais pesados não intrínsecos ao Homem, pode provocar efeitos nocivos, nomeadamente neoplasias. A contaminação por metais pesados é silenciosa e à qual estamos expostos diariamente, seja pela ocupação laboral, ingestão de água contaminada ou inalação de vapores tóxicos. Alguns metais continuam a ser utilizados, inclusivamente em tratamentos médicos de foro oncológico, tratamentos dentários através de amálgamas e ainda em meios de diagnóstico, como na imagiologia.

O objetivo deste estudo visou determinar qualitativamente e semi-quantitativamente a presença de metais pesados em amostras de cabelo de uma população alvo. Para a realização deste estudo utilizou-se o método de Microscopia Eletrónica de Varrimento acoplado à Microanálise de Raios-X (SEM-XRM), que fornece informações sobre a morfologia e analisa qualitativa e semi-quantitativamente uma determinada amostra, sendo um instrumento versátil para a observação e análise de características micro-estruturais. Através desta técnica é possível detetar, desde que numa concentração superior a 0,1-0,3% em massa, a presença de metais pesados numa amostra.

Neste trabalho observou-se a presença de metais pesados e terras raras nas amostras em estudo, o que nos poderá indicar que a exposição crónica desta população a esses mesmos metais potencia processos inflamatórios e desse modo a carcinogénese, pelo stress oxidativo causado.

PALAVRAS-CHAVE: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO ACOPLADA A MICROANÁLISE POR RAIOS-X, METAIS PESADOS, DOENÇAS PROFISSIONAIS, CABELO

OCCUPATIONAL DISEASE. MEDICO LEGAL IMPORTANTE. A CASE REPORT

ABSTRACT

Heavy metals are chemically reactive and bio-accumulative elements which body is unable to eliminate. This feature, combined with its potential toxicity, distinguishes them from other toxic agents. The excess of heavy metals that are naturally part of organisms, such as copper (Cu) or zinc (Zn), or the contact with heavy metals not intrinsic to Man, can have harmful effects, including neoplasia. The contamination by heavy metals is silent and we are daily exposed to it, either by labor occupation, drinking contaminated water or inhalation of toxic fumes. Some metals continue to be used even in oncological medical treatment, dental treatment through amalgam and also in diagnostics, such as imaging.

This study aimed to determine both qualitatively and semi-quantitatively the presence of heavy metals in hair samples from a target population. For this study it was used the Scanning Electron Microscopy coupled with X-Ray elemental Microanalysis (SEM- XRM), which provides information on the morphology and analyzes qualitatively and semi-quantitatively a given sample. This methodology is a versatile tool for the observation and analysis of micro-structural features. It makes possible to detect, within a mass excess of 0.1-0.3 %, the presence of heavy metals in a sample.

In this work, the presence of heavy metals and rare earths was observed in samples, what may indicate that chronic exposure of this population to heavy metals favors inflammatory processes and corresponding oxidative stress, promoting carcinogenesis.

KEY-WORDS: SCANNING ELECTRON MICROSCOPY COUPLED WITH X-RAY MICROANALYSIS, SEM-XRM, HEAVY METALS, OCCUPATIONAL DISEASES, HAIR

DATA DE RECEPÇÃO / RECEPTION DATE: 28-05-2015 - DATA DE APROVAÇÃO / APPROVAL DATE: 10-07-2015

INTRODUÇÃO

Os metais pesados são contaminantes ambientais com propriedades tóxicas e ecotóxicas para os seres humanos e para a vida selvagem.^{1,2} Desde que iniciou a sua extração e processamento que o Homem se encontra exposto a estes metais.³ Atualmente, e com o aumento progressivo da poluição proveniente da industrialização, a população encontra-se diariamente exposta a estes poluentes através de diversas vias, incluindo a inalação de ar, consumo de água potável exposta a solos e consumo de alimentos contaminados, bem como resíduos industriais.¹

Em pequenas quantidades, alguns metais pesados são nutrientes essenciais para uma vida saudável, mas dependendo da sua concentração, podem tornar-se tóxicos. Estes elementos encontram-se naturalmente presentes em alguns alimentos específicos, designadamente nos frutos do mar, frutas e legumes.¹ O arsénio (As, berílio (Be), cádmio (Cd), crómio (Cr), chumbo (Pb), manganês (Mn), mercúrio (Hg), níquel (Ni) e selénio (Se) são denomina-

dos de metais pesados devido à sua elevada massa atómica, sendo que o chumbo, cádmio, mercúrio e arsénio são os que constituem as principais ameaças para a saúde humana.³ Estes compostos existem na natureza e mesmo em baixas concentrações podem influenciar de forma irreversível os processos fisiológicos e bioquímicos, podendo causar lesões ou até mesmo a morte em animais, plantas e seres humanos.³

Os metais pesados prejudicam a saúde humana pois podem provocar stress oxidativo celular (Cd, Cr, Pb e As), lesões neurológicas (Pb e Hg), lesões ao nível do DNA (As, Cr e Cb), alterações no metabolismo da glicose (As) ou do cálcio (Cd e Pb), e também podem interferir com alguns elementos essenciais (Cd e Hg).¹ Segundo alguns estudos epidemiológicos acerca da exposição ambiental e ocupacional aos metais, esta pode estar relacionada com o aparecimento de várias doenças a nível do sistema pulmonar, imunológico, neurológico, renal, endócrino, cardiovascular e reprodutor.^{1,4} Um dos fatores mais importantes na retenção de um

1. INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ABEL SALAZAR

2. UNIVERSIDADE DE VIGO

3. FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DO PORTO

metal no organismo é a sua semi-vida biológica, entendendo-se por esta o tempo que o organismo demora a excretar metade da quantidade tóxica acumulada, dependendo do órgão/tecido ao qual o metal se associou.⁵ A exposição sistemática a estes compostos potencia processos de inflamação crônica que consequentemente induzem o *stress* oxidativo e carcinogênese.

Alguns metais pesados são classificados como cancerígenos humanos, sabendo-se que a exposição crônica aumenta a incidência de cancro. Contudo, os mecanismos que envolvem a formação de tumores associados a estes metais não se encontram bem esclarecidos.⁶ A maior parte dos metais são pouco ou nada mutagênicos, no entanto são a forma mais resistente de poluentes ambientais devido à sua capacidade de se acumularem no ambiente.⁷ Dada a sua toxicidade, quando um indivíduo se encontra exposto a metais pesados, vão desenvolver-se processos de inflamação, que com a continuidade desta exposição originam uma inflamação crônica. Por sua vez, esta induz o *stress* oxidativo que está relacionado com o desenvolvimento tumoral.

O processo de inflamação é um mecanismo de defesa essencial no nosso organismo, consistindo na resposta fisiológica que ocorre nos tecidos vascularizados na sequência de uma lesão. Quando a inflamação é de duração prolongada (semanas a anos), surge a inflamação crônica, caracterizada por diversas reações, nomeadamente infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e células plasmáticas), destruição tecidual por células inflamatórias, reparação com angiogénese e fibrose.⁸ A inflamação crônica pode surgir através de infeções persistentes por micróbios difíceis de erradicar, doenças inflamatórias imuno-moduladas (doenças de hipersensibilidade), exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos e, no caso de alguns cancros, promovem o desenvolvimento do tumor.⁸

A exposição a metais pesados está relacionada com a formação de radicais livres nos seres vivos.^{9,10} O *stress* oxidativo é a acumulação de radicais livres (tais como ROS e RNS) que provoca um desequilíbrio entre a produção destes radicais e a capacidade do sistema para desintoxicar intermediários reativos, o que pode originar carcinogénese.¹¹ Por possuírem propriedades semelhantes aos iões essenciais, os iões dos metais competem com os locais de ligação biológicos dos iões essenciais, o que provoca uma perturbação na estrutura, na função biomolecular e da homeostasia do metal.⁶ O mecanismo de ação da carcinogénese induzida pelos metais pode resumir-se em (1) indução de *stress* oxidativo e lesões nos componentes celulares, em específico no

DNA, (2) interferência nos sistemas de reparação de DNA, provocando uma instabilidade genómica, (3) interrupção do crescimento e proliferação celular através de vias de sinalização, e (4) desregulação de oncogenes ou genes supressores de tumores.⁶

Como supracitado, o fenómeno de *stress* oxidativo pode explicar a genotoxicidade e a mutagenicidade inferida pelos metais, que estimulam a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de nitrogénio (RNS) em seres vivos, provocando lesões oxidativas no DNA, proteínas e lípidos.⁶ O *stress* oxidativo não só facilita a iniciação do tumor através da mutagénese, como destrói atividades celulares de enzimas antioxidantes através da interação com os grupos tiol, que desregulam o crescimento e proliferação celular, levando à promoção do tumor.⁶ Apesar de não ser o único fator que contribui para que os metais pesados induzam carcinogénese, o *stress* oxidativo é considerado um elemento importante na transformação maligna.⁶

No caso dos metais capazes de provocar carcinogénese, estes interferem com o crescimento celular através de mecanismos específicos, tais como mudanças na expressão de fatores de crescimento e incapacidade de regular o crescimento celular.⁶ Alguns metais promovem diversas vias, como por exemplo as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*). Isto implica a ativação de fatores de transição nucleares, tais como AP-1 (*Activator Protein-1*), NF-κB, proteína p53, NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*), e HIF-1 (*Hypoxia-inducible Factor-1*), que regulam a expressão de genes citoprotetores importantes na reparação de DNA, resposta imune, paragem do ciclo celular e apoptose. Os metais pesados e ROS interagem com grupos tiol para formar pontes de dissulfureto¹², originando alterações na conformação de proteínas que regulam várias cascatas de sinalização e ativando determinados fatores de transcrição. O fator de transcrição nuclear AP-1 é fundamental no crescimento celular e na apoptose, sendo a sua atividade induzida pela proteína cinase c-Jun N-terminal (JNK) e p38 MAPK.⁶ Quanto ao fator nuclear NF-κB, desempenha uma função importante em diversos processos, nomeadamente na resposta inflamatória e na transformação e sobrevivência celular, estando a sua ativação associada à carcinogénese e podendo ser efetuada pelos metais pesados.¹³ A influência destes e dos ROS na ativação de NF-κB é apoiada por alguns antioxidantes que bloqueiam a ativação de diversos estímulos.¹⁴

Alguns metais podem causar mutações no gene p53, estando estas ligadas à maioria dos cancros

humanos. O fator nuclear de células T ativadas (NFAT) controla a produção de citocinas, crescimento e diferenciação muscular e angiogênese. Alguns metais podem ativar o NFAT através de uma via dependente de cálcio e através da formação de peróxido de hidrogénio.⁶ Os metais pesados também podem ativar o HIF-1⁶, que controla a homeostase do oxigénio através de vários genes relacionados com o cancro, tais como heme oxigenase I e o fator de crescimento endotelial vascular.⁵

Determinadas proteínas de zinco, designadas de zinc finger podem ser consideradas um biomarcador para avaliação de risco de exposição a metais cancerígenos. Estes metais têm a capacidade de inibir estas proteínas, provocando uma distorção dos seus domínios e conseqüentemente uma disfunção das mesmas.⁶

MÉTODOS

Neste trabalho foi utilizada a técnica de Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV) acoplada à Microanálise por Raios-X.

O MEV é um versátil instrumento utilizado para observar e analisar características microestruturais de materiais sólidos. Este microscópio fornece imagens na gama de ampliações da ordem de x10 a x500 000 e utiliza feixes de eletrões para a produção das mesmas. Neste microscópio é possível obterem-se imagens que fornecem informações acerca da topografia, composição química, estrutura cristalina e composição elementar, caso o microscópio esteja associado a um espectrómetro de raios-X. Para as realizar, o MEV utiliza detetores especializados que se encontram próximos da amostra e medem a intensidade de emissão da mesma. Estes detetores podem ser de dois tipos, detetores de eletrões secundários (ES) e detetores de eletrões retrodifundidos (ER), sendo a primeira a mais comum.¹⁵

Para uma melhor visualização e interpretação da informação acerca da topografia e composição elementar do material é necessário que o microscópio se encontre associado a um espectrómetro de raios-X. A microanálise por raios-X é efetuada por Espectrometria de Dispersão de Energia de Raios-X (EDS). O sistema EDS de deteção acoplado ao microscópio permite detetar, desde que numa concentração superior a 0,1-0,3% em massa a presença de metais pesados numa amostra. A microanálise por Raios-X é um processo de caracterização química de um microvolume de material que se fundamenta na análise do espectro de emissão local de raios-X, e utiliza um feixe

de eletrões como radiação primária ionizante.¹⁵

Para a elaboração deste trabalho foi utilizado o equipamento do Centro de Materiais da Universidade do Porto, um JEOL-6301F acoplado com Noren Voyager X-ray com sistema EDS de deteção, onde foi possível obter espectros de microanálise qualitativos e semi-quantitativos das zonas focadas através dos eletrões retrodifundidos; para além da visualização topográfica da superfície do cabelo recorrendo aos eletrões secundários.

RESULTADOS

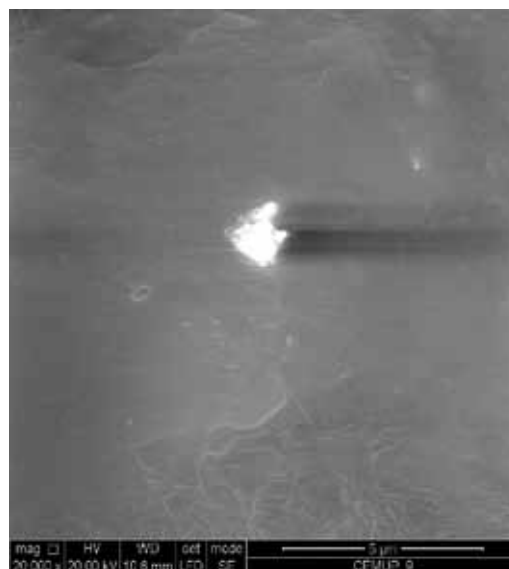


FIGURA 1.1
IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO, ACOPLADA À MICROANÁLISE POR RAIOS-X, ONDE É VISÍVEL UMA IMAGEM DE ELETRÕES SECUNDÁRIOS AMPLIADA 20000x CUJA IMAGEM REFERE-SE A UMA AMOSTRA DE CABELO.

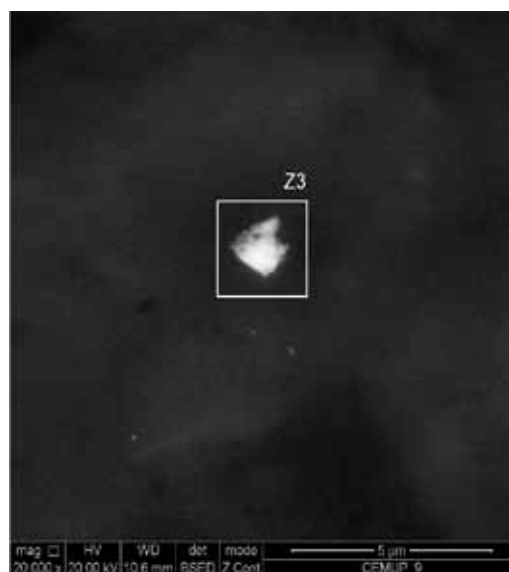


FIGURA 1.2
IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO, ACOPLADA À MICROANÁLISE POR RAIOS-X, NA VERSÃO DE ELETRÕES RETRODIFUNDIDOS ONDE OS PONTOS BRILHANTES SÃO CARACTERÍSTICOS DA PRESENÇA DE METAL PESADO.

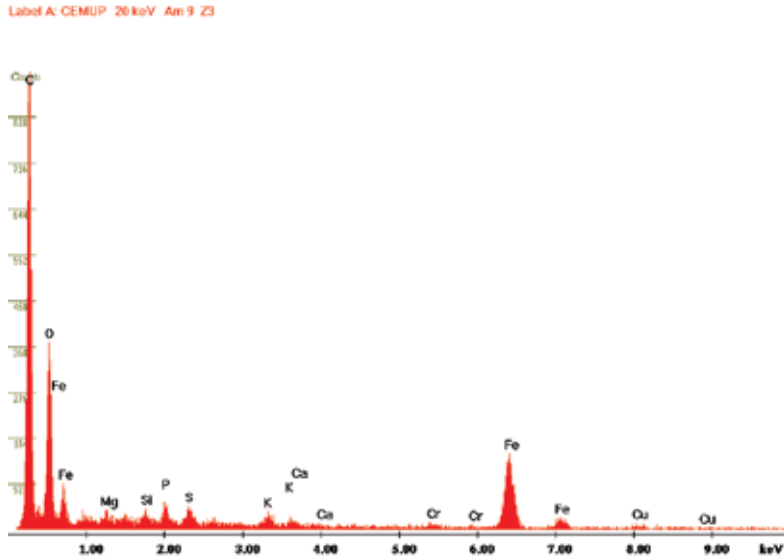


FIGURA 1.3
ESPECTRO DE MICROANÁLISE DE RAIOS-X, QUE EVIDENCIA A ANÁLISE DE Z3, ONDE É POSSÍVEL IDENTIFICAR A PRESENÇA DO METAL PESADO CRÔMIO (Cr) E FERRO (Fe).

DISCUSSÃO

Os metais pesados são contaminantes ambientais com propriedades tóxicas para os seres vivos. O Homem encontra-se exposto a estes compostos há mais de 5000 anos e devido ao aumento gradual da poluição, esta situação tende a piorar. Esta exposição é responsável pelo aparecimento de algumas doenças, nomeadamente, no sistema pulmonar, imunológico, neurológico, renal, endócrino, cardiovascular e reprodutor. Atualmente, o Homem encontra-se perante uma poluição silenciosa, o que coloca em risco a Saúde Pública.

O objetivo deste trabalho prendeu-se com o estudo da possível relação entre a exposição crónica a metais pesados e terras raras com o possível aparecimento de carcinogénese (através dos processos clínicos) em indivíduos que, pela sua atividade profissional, estiveram em contato com estes materiais. Para a concretização deste objetivo foi utilizada a SEM-XRM. Com esta técnica, foi possível qualificar e semi-quantificar os metais e terras raras presentes nas amostras em estudo, neste caso de cabelo. Uma vez que os metais pesados e terras raras possuem um elevado número atómico, foi possível identificar “in situ” a presença destes compostos em imagens fornecidas pelo microscópio eletrónico. Nas imagens de eletrões retro-

difundidos foi possível observar os metais pesados e terras raras, pois estes aparecem representados pelas áreas brancas. A identificação do composto é realizada pela microanálise de raios-X que fornece um espectro com a respetiva identificação.

No estudo deste grupo, os resultados indicam a presença de metais pesados e terras raras nas amostras analisadas, o que revela uma exposição crónica que poderá potenciar processos inflamatórios (já descritos na bibliografia) e, desse modo, desenvolver mecanismos de carcinogénese, através de mecanismos também já largamente estudados e postulados. Assim, complementam-se as conclusões previamente publicadas por Koedrich et al, em 2011. Estes autores classificam alguns metais pesados (por exemplo, arsénio, cádmio, chumbo, mercúrio, etc.), como cancerígenos e passíveis de afetar a saúde do Homem através da exposição ambiental e ocupacional aos mesmos. Estudaram também de que forma o stress oxidativo resultante da exposição a metais pesados, pode originar um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade de um sistema para desintoxicar intermediários reativos. Deste desequilíbrio podem resultar diversas lesões, nomeadamente o cancro.

Um outro estudo, publicado em 2006 por Valko et al., demonstrou que o stress oxidativo induz um desequilíbrio celular, que se encontra presente em diversas células cancerígenas, podendo estar relacionado com a estimulação oncogénica. Foi igualmente estudado por Jomova et al. em 2011, que uma vez que os metais induzem a formação de radicais livres e outras espécies reativas, este torna-se um fator comum na determinação da toxicidade e carcinogénese induzida por estas substâncias.

Os resultados apresentados neste trabalho vão de encontro ao já descrito na bibliografia internacional, mostrando, pela aplicação desta técnica inovadora, que um processo inflamatório crónico origina um estado de stress oxidativo celular e consequente carcinogénese. Os nossos resultados vieram assim confirmar o já anteriormente descrito, contribuindo com informação original acerca da possível oncogénese/carcinogénese induzida pelos metais pesados, num grupo específico de grande relevância para a população portuguesa.

REFERÊNCIAS

1. Caserta D, Graziano A, Lo Monte G, Bordi G, Moscarini M. Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2013; 17:2198-2206.
 2. Duffus JH. "Heavy metals"- A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem* 2002; 74(5):793-807.
 3. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 2003; 68:167-182.
 4. Lee DH, Lim JS, Song K, Boo Y, Jacobs Jr. DR. Graded Associations of Blood Lead and Urinary Cadmium Concentrations with Oxidative-Stress-Related Markers in the U.S. Population: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114(3):350-354.
 5. Carvalho G. Toxicologia Forense. Resumos da unidade curricular de Toxicologia Forense. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto; 2007.
 6. Koedrith P, Seo YR. Advances in Carcinogenic Metal Toxicity and Potential Molecular Markers. *International Journal of Molecular Sciences* 2011; 12:9576-9595.
 7. Martinez-Zamudio R, Ha HC. Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics* 2011; 6(7):820-827.
 8. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Basic Pathology*. 9th edition. Ed. Elsevier Health Sciences; 2011.
 9. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011; 283:65-87.
 10. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* 2007; 2(2):219-236.
 11. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160(1):1-40.
 12. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol* 2010; 279(6):L1005-L1028.
 13. Amiri KI, Richmond A. Role of nuclear factor- κ B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24(3):301-313.
 14. Hughes G, Murphy MP, Ledgerwood EC. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor κ B to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochemical Journal* 2005; 389:83-89.
 15. Sá CP. Caracterização Morfológica Microestrutural e Microanalítica de Materiais: Microscopia Eletrónica de Varrimento - SEM; Microanálise por Raios-X - EPMA: EDS/WDS. Centro de Materiais da Universidade do Porto; 2008.
-

CORRESPONDÊNCIA:

TÂNIA MARISA BRAZ NOGUEIRA
UNIVERSIDADE DE VIGO
RUA FIEIS DE DEUS, Nº64, RECUADO, 4820-251 FAFE
TANIAMBNOG@GMAIL.COM