

**GUSTAVO LIGERI PEREIRA DO PRADO**

**ESTUDO DA TEXTURA NUCLEAR EM RATOS WISTAR  
INTOXICADOS POR CHUMBO**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**GUSTAVO LIGERI PEREIRA DO PRADO**

**ESTUDO DA TEXTURA NUCLEAR EM RATOS WISTAR  
INTOXICADOS POR CHUMBO**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento.

**ORIENTADOR:** DR KONRADIN METZE

**CO-ORIENTADOR:** DR JOSÉ ANTONIO ROCHA GONTIJO

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P882e Prado, Gustavo Ligeri Pereira do  
Estudo da textura nuclear em ratos wistar intoxicados por chumbo.  
/ Gustavo Ligeri Pereira do Prado. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores : Konradin Metze; José Antonio Rocha Gontijo  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Análise de textura. 2. Chumbo. 3. Rim. I. Metze,  
Konradin. II. Gontijo, José Antonio Rocha. III. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Study of nuclear texture of wistar rats after lead poisoning**

**Keywords: • Texture analysis**

- Lead
- kidney

**Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica**

**Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento**

**Banca examinadora:**

**Profº. Drº. Konradin Metze**

**Profº. Drº. José Francisco Figueiredo**

**Profº. Drº. Lício Augusto Velloso**

**Data da defesa: 25 - 07 - 2008**

---

## **Banca examinadora de Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Koradin Metze**

---

<b>Membros:</b>
-----------------

Professor (a) Doutor (a) <b>José Francisco Figueiredo</b>
---

Professor (a) Doutor (a) <b>Lício Augusto Velloso</b>
---

Professor (a) Doutor (a) <b>Konradin Metze</b>
--

Curso de pós-graduação Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 25/07/2008**

---

***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais, Vivaldo e Maria Lúcia,  
as pessoas mais importantes da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus;

Aos meus pais Vivaldo e Maria Lúcia, pela vida, amor, presença constante, apoio, conselhos, tudo;

Ao Prof. Dr Konradin Metze, pela oportunidade, atenção, força, confiança, por acreditar nesse projeto;

A Profa. Dra. Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar e Profa. Dra. Patrícia Aline Boer, por me conduzirem em meus primeiros passos na pesquisa científica e na carreira acadêmica;

Ao Prof. Dr José Antonio Rocha Gontijo, pela co-orientação;

A Profa. Dra Luciana Meirelles, pela colaboração na microscopia eletrônica;

Ao Dr Randall Luis Adam e seus softwares, ajuda na segmentação, cálculos e explicações matemáticas;

Ao meu avô Roque;

Aos meus tios Jorge, Maria Helena, Ana Maria, Adenil, Carlos, Mercedes, Bêne e Antônio.

Às minhas irmãs, por opção, Aline, Kathy, Mariana, Mônica e Marcela;

Às amigas Carla e Mariana Souza;

À amiga Malu;

Aos amigos Mário, Gustavo, Ricardo e Leonardo;

À Amanda e Flávia, pela ajuda nos experimentos, amizade, risadas, apoio, companherismo, conversas, almoços, cafés;

À Beth, por sua indispensável ajuda nas dosagens bioquímicas;

Aos que me acolheram e ajudaram na FCM:

Sérgio, Mônica, Maria do Carmo, Beth, Luís, Rita, Vera, Claudinha, Priscila, Lucinha e Dona Gê;

Aos demais professores, residentes e funcionários do Núcleo de Pesquisa, Laboratório de Hematologia, FCM / Unicamp;

Ao Laboratório de Sistemas de Informação - Instituto de Computação / Unicamp;

<p>À Fapesp, que financiou esse projeto, através dos processos 0752015-0R e 06/58775-4</p>
--

*"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade, é o que devem tender os programas e os métodos de ensino."*

**Rui Barbosa**

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xv</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xvii</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1- O chumbo</b> .....	20
<b>1.2- Alterações na Atividade Enzimática</b> .....	22
<b>1.3- Manifestações Renais</b> .....	23
<b>1.4- Textura e Função Biológica de Núcleos</b> .....	23
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	25
<b>2.1- Objetivos Gerais do Estudo</b> .....	26
<b>2.2- Objetivos Específicos</b> .....	26
<b>2.3- Hipóteses</b> .....	26
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
<b>3.1- Animais</b> .....	28
<b>3.2- Administração dos Compostos Químicos nos Ratos Wistar</b> .....	28
<b>3.3- Estudo da Função Tubular Renal pelo Clearance de Lítio</b> .....	28
<b>3.4- Obtenção das Amostras de Tecido e Técnicas Citológicas</b> .....	29
<b>3.5- Análises Bioquímicas</b> .....	29
3.5.1- Determinação das Concentrações de Sódio, Lítio, Potássio e Ceatinina Plasmáticas e na Urina.....	29
3.5.2- Quantificação do Ácido Delta-Aminolevulínico Urinário.....	29
<b>3.6- Análise de Textura</b> .....	30
<b>3.7- Análises Estatísticas</b> .....	36

<b>4- RESULTADOS</b> .....	37
<b>4.1- Ácido Delta-Aminolevulínico Urinário</b> .....	38
<b>4.2- Função Renal</b> .....	39
4.2.1- Clearance de Lítio.....	39
4.2.2- Clearance de Creatinina.....	41
4.2.3- Aporte Proximal de Sódio.....	42
4.2.4- Aporte Pós-Proximal de Sódio.....	43
4.2.5- Delivery Distal de Sódio.....	44
4.2.6- Fração de Excreção Pós-Proximal de Sódio.....	45
<b>4.3- Morfologia</b> .....	46
4.3.1- Microscopia Ótica.....	46
4.3.2- Microscopia Eletrônica.....	51
<b>4.4- Análise de Textura</b> .....	59
<b>5- DISCUSSÃO</b> .....	68
<b>6- CONCLUSÃO</b> .....	76
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>ALA</b>	Ácido Delta-Aminolevulínico
<b>ALA-D</b>	Enzima Ácido Delta-Aminolevulínico Desitradase
<b>ALA-pirrol</b>	Ácido Delta-Aminolevulínico-pirrol
<b>ALA-S</b>	Enzima Ácido Delta-Aminolevulínico Sintase
<b>ALA-U</b>	Ácido Delta-Aminolevulínico Urinário
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>APPNa</b>	Aporte Pós-Proximal de Sódio
<b>C</b>	Clearances Renais
<b>CCI</b>	Centro de Controle de Intoxicação
<b>CCr</b>	Clearance de Creatinina
<b>CENa</b>	Carga Excretada de Sódio
<b>CK</b>	Clearance de Potássio
<b>CLi</b>	Clearance de Lítio
<b>CNa</b>	Clearance de Sódio
<b>DDNa</b>	Delivery Distal de Sódio
<b>FEK</b>	Fração de excreção de Potássio
<b>FENa</b>	Fração de Excreção de Sódio
<b>FEPNa</b>	Fração de Excreção Proximal de Sódio
<b>FEPPNa</b>	Fração de Excreção Pós-Proximal de Sódio
<b>FFT</b>	Transformada Rápida de Fourier – Fast Fourier Transform
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HC</b>	Hospital de Clínical

<b>i. p.</b>	Intraperitoneal
<b>LiCl</b>	Cloreto de Lítio
<b>LSD</b>	Diferença Mínima dos Quadrados – Least Square Difference
<b>P</b>	Níveis Plasmáticos de Creatinina ou Lítio, por período
<b>Pb</b>	Chumbo
<b>PNa</b>	Concentração Plasmática de Sódio
<b>R1</b>	Valor de Energia - Faixa de Frequência 1
<b>R11</b>	Valor de Energia - Faixa de Frequência 11
<b>R2</b>	Valor de Energia - Faixa de Frequência 2
<b>R3</b>	Valor de Energia - Faixa de Frequência 3
<b>RFG</b>	Taxa de Filtração Glomerular
<b>U</b>	Concentração Urinária
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>V</b>	Fluxo Urinário por minuto

## LISTA DE FIGURAS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1-</b> Software Limiar, disposição inicial do software antes do início da segmentação.....	32
<b>Figura 2-</b> Imagem em processo de segmentação no software Limiar. Os quadrados numerados indicam a ordem e quais núcleos já foram segmentados. ....	33
<b>Figura 3-</b> Imagem de núcleo segmentado (Thresholding Image).....	34
<b>Figura 4-</b> Faixas de frequências espaciais das imagens FFT.....	35
<b>Figura 5-</b> Concentração do Ácido Delta-Aminolevulínico na urina (ALAU) dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação).....	38
<b>Figura 6-</b> Valores do Clearance de Lítio (CLi) dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação).....	40
<b>Figura 7-</b> Valores do Clearance de Creatinina dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação).....	41
<b>Figura 8-</b> Valores do Aporte Proximal de Sódio dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação).....	42
<b>Figura 9-</b> Valores do Aporte Pós-Proximal de Sódio dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação).....	43
<b>Figura 10-</b> Valores do Delivery Distal de Sódio dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação).....	44
<b>Figura 11-</b> Valores da Fração de Excreção Proximal de Sódio dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação).....	45

<b>Figura 12-</b>	Aparência morfológica dos corpúsculos renais, de um rato controle. (H&E - Aumento 1000x).....	46
<b>Figura 13-</b>	Aparência morfológica dos corpúsculos renais, de um rato intoxicado por chumbo durante 30 dias. (H&E - Aumento 1000.....	47
<b>Figura 14-</b>	Aparência morfológica dos túbulos contorcidos proximais renais, de um rato controle. (H&E - 1000x).....	48
<b>Figura 15-</b>	Aparência morfológica dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 08 dias. (H&E - 1000x).....	49
<b>Figura 16-</b>	Aparência morfológica dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 15 dias. (H&E - 1000x).....	49
<b>Figura 17-</b>	Aparência morfológica dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 60 dias. (H&E - Aumento 1000x).....	50
<b>Figura 18-</b>	Ultraestrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato controle. (6.300X).....	51
<b>Figura 19-</b>	Ultraestrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 8 dias. (6.300X).....	52
<b>Figura 20-</b>	Ultraestrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 15 dias. (8.000X).....	53
<b>Figura 21-</b>	Ultraestrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 30 dias. (10.000X).....	54
<b>Figura 22-</b>	Ultraestrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 30 dias. (6.300X).....	55
<b>Figura 23-</b>	Ultraestrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 30 dias. (12.500X).....	56
<b>Figura 24-</b>	Ultraestrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 60 dias. (6.300X).....	57

<b>Figura 25-</b>	Ultraestrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 60 dias. (1.600X).....	58
<b>Figura 26-</b>	Área dos núcleos das células dos túbulos contorcidos proximais renais.....	60
<b>Figura 27-</b>	Segundo Momento Angular.....	61
<b>Figura 28-</b>	Entropia da matrix de co-ocorrência Haralick.....	62
<b>Figura 29</b>	Dimensão Fractal.....	63
<b>Figura 30-</b>	Energia das imagens FFT, faixa de frequência 1 (R1).....	64
<b>Figura 31-</b>	Energia das imagens FFT, faixa de frequência 2 (R2).....	65
<b>Figura 32-</b>	Energia das imagens FFT, faixa de frequência 3 (R3).....	66
<b>Figura 33-</b>	Energia das imagens FFT, faixa de frequência 11 (R11).....	67

## **RESUMO**

Chumbo (Pb) é um dos mais importantes metais pesados que ocorrem naturalmente, com efeitos tóxicos, após exposições agudas e crônicas, no fígado, sistema nervoso, hematopoese e especialmente os rins. O objetivo desse estudo foi analisar o transporte de sódio através dos túbulos proximais renais durante uma intoxicação crônica por chumbo comparando com as alterações morfológicas das células dos túbulos renais proximais. Ratos Wistar Hannover machos foram intoxicados cronicamente com injeções diárias de 2,5 ml/kg de uma solução de acetato de chumbo 1%, intra-peritoneal e sacrificados após 8, 15, 30, 45 e 60 dias. Amostras de tecido dos rins foram examinadas através da microscopia ótica e eletrônica, e também através da análise de textura computadorizada. Clearance renal, aporte proximal e pós-proximal de sódio foram estudados. A reabsorção de sódio no túbulo contorcido proximal renal decaiu após uma semana mas, se recuperou após uma mês e alcançou um nível maior que o dos animais controle antes do fim do experimento. A análise ultra estrutural demonstrou edema mitocondrial com degeneração e perda das microvilosidades (“brush border”). porém, nenhuma alteração significativa do núcleo das células dos túbulos contorcidos proximais renais foram observadas nas duas primeiras semanas. A cariometria revelou um aumento do tamanho do núcleo durante o experimento. A textura da cromatina mudou significativamente entre o décimo quinto e trigésimo dia concomitantemente com o aparecimento das inclusões nucleares. Os valores de Energia derivados das imagens geradas através da transformada rápida de Fourier foram mais eficientes em detectar diferenças entre os grupos em relação as variáveis derivadas da matrix de co-ocorrência dos níveis de cinza. Alterações nucleares ocorreram entre quinze e trinta dias da intoxicação crônica por chumbo, paralelo a normalização da capacidade fisiológica renal de reabsorção de íons. A formação das inclusões nucleares, regeneração mitocondrial e o aumento da produção de proteínas antioxidantes podem estar envolvidas em um mecanismo compensatório.

**ABSTRACT**

Lead (Pb) is one of the most important naturally occurring and ubiquitous heavy metals, with toxic effects after acute or chronic exposure on liver, the nervous system, hematopoiesis, and, especially the kidneys. The aim was to study the time course of the renal tubular sodium handling during chronic experimental lead poisoning in rats comparing it with the morphologic changes of epithelial cells of the proximal tubule. Male Wistar-Hannover rats were chronically intoxicated with daily i.p. injections of 2.5 ml/kg of 1% lead acetate solution and sacrificed after 8, 15, 30, 45 and 60 days. Kidney samples were examined by light and electron microscopy and by computerized texture analysis. Renal clearance as well as fractional proximal and postproximal renal sodium handling was studied. Sodium reabsorption at the proximal tubule decreased significantly after one week but recovered after one month and achieved a higher level than in controls until the end of the experiment. Ultrastructural examinations showed mitochondrial swelling with degeneration and loss of microvilli but no striking alterations of the epithelial cell nuclei in the first two weeks. Karyometry revealed an increase in nuclear size during the experiment. The chromatin texture changed significantly between the 15th and 30th day concomitantly with the appearance of inclusion bodies. Energy values derived from Fast-Fourier-transformed images were more efficient in detecting differences between the groups than variables derived from the gray value co-occurrence matrix. Significant nuclear alterations occur between 15 and 30 days of chronic lead intoxication, paralleled by a normalization of the physiological renal ion reabsorption capacity. The formation of inclusion bodies, mitochondrial regeneration as well as an increased production of antioxidant proteins may be involved in this compensatory mechanism.

# **1- INTRODUÇÃO**

## 1.1- O Chumbo

O chumbo é reconhecidamente um contaminante ambiental de grande importância, em consequência de seu emprego industrial, como por exemplo, na indústria extrativa, petrolífera, de acumuladores, de tintas e corantes, cerâmica, gráfica e bélica (Larini, 1997).

Ele é um metal dúctil, maleável, de cor prateada ou cinza-azulada, resistente à corrosão e pertence ao Grupo IV B da tabela periódica. Entre suas propriedades físicas e químicas, destacam-se peso atômico 207,2, densidade específica 11,35 a 20°C, ponto de fusão 327,5°C e ponto de ebulição 1740°C. Os complexos de  $Pb^{2+}$  são estáveis. Dentre os compostos inorgânicos de chumbo destacam-se o acetato de chumbo bivalente  $Pb(CH_3COO)_2$  (pode ser anidro, tri-hidratado ou decaidratado (Larini, 1997; Oga, 1996).

Nos últimos anos, a demanda de chumbo tem sofrido uma mudança quanto ao tipo de utilização. A contaminação de água pelo chumbo, em áreas urbanas e suburbanas, tem aumentado consideravelmente.

No setor industrial, além do chumbo metálico, são comuns os compostos de acetato de chumbo, cloreto de chumbo, cromato de chumbo, nitrato de chumbo, óxido de chumbo, fosfato de chumbo e sulfato de chumbo (Oga, 1996). A contaminação do solo pode advir de forma natural ou geológica, ou pode decorrer das atividades exercidas pelo homem, como mineração, indústria e transporte. O teor de chumbo nos solos varia conforme a região; em regiões próximas de vias de tráfego intenso, os teores são mais elevados que em áreas isoladas (Larini, 1997).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere que o limite aceitável de chumbo, na água potável, seja de 50µg/L (0,05 ppm) (Gidlow, 2004).

Em relação à quantidade de chumbo introduzida diariamente no organismo humano tem-se o valor de 300 a 460 µg, que correspondem fundamentalmente à ingestão de alimentos (220 a 400 µg), de água (10 a 100 µg) e inalação do ar urbano (20 a 80 µg). Estudos recentes revelam que, mesmo o indivíduo não exposto ocupacionalmente ao chumbo, pode absorver cerca de 28 a 38 µg desse metal por dia (Cezard e Maguenoer, 1992).

As intoxicações do homem ou trabalhador podem ocorrer por exposição intensa, moderada ou leve, a curto, médio ou longo prazo, dependendo do grau de contaminação e tempo de exposição no ambiente em que vive ou ainda em que trabalha. Como saturnismo ou plumbismo, se entende a moléstia decorrente da intoxicação pelo chumbo a longo prazo (Larini, 1997; Weil, 1975).

Cerca de 75% do chumbo absorvido em exposições agudas, é excretado pela via renal. Os mecanismos de excreção, quando de exposições agudas, são a filtração glomerular e a secreção tubular ativa. No caso de plumbemias normais, no entanto, o único mecanismo de excreção é a filtração glomerular. Os compostos de chumbo são excretados, geralmente, na forma de íons livres. Uma pequena parte destes compostos plúmbicos podem ser eliminados complexados com substâncias orgânicas de pequeno peso molecular. (Hsu e Yu, 2001).

A excreção urinária do chumbo é influenciada por alguns fatores, a saber (Onuki, 2000):

- a) Idade: a excreção urinária do chumbo aumenta com a idade;
- b) Sexo: segundo alguns autores, a plumbúria é mais elevada nos homens do que nas mulheres;
- c) Estado fisiológico dos rins: toda lesão renal favorece a retenção do chumbo nos tecidos, fazendo que, mesmo em casos de concentrações elevadas de chumbo no organismo, a plumbúria permaneça normal;
- d) Ciclo circadiano: a excreção renal do chumbo é menor durante a noite e pela manhã, quando comparada com a excreção do metal após o meio dia e à tarde. Acredita-se que esta diferença seja devido à menor filtração glomerular e maior reabsorção tubular observada para o chumbo no período da noite/manhã;
- e) Agentes quelantes que se complexam com o chumbo, formando compostos de peso molecular elevado e que não podem sofrer reabsorção.

Os compostos orgânicos de chumbo são excretados pela urina (cerca de 72%), geralmente sob a forma de metabólitos, especialmente como Pb inorgânico.

O chumbo provoca diversas alterações bioquímicas, todas elas deletérias, não existindo evidências de uma função essencial do mesmo no organismo humano. O chumbo pode provocar alterações nas estruturas terciárias de moléculas bioquímicas e, ao mesmo tempo, alterar ou destruir a função bioquímica normal (Larini, 1997; Lavicoli, 2002).

## **1.2- Alterações na Atividade Enzimática**

O chumbo interfere em várias fases da biossíntese do grupo heme, provocando a inibição da enzima ácido delta-aminolevulínico desidratase (ALA-D) e da hemessintetase está perfeitamente caracterizada. A enzima ácido delta-aminolevulínico sintetase (ALA-S), essencial na formação do ácido delta-aminolevulínico (ALA), a partir da glicina e succinil CoA, tem sua ação *in vitro* inibida pelo chumbo e por outro lado também foi observado um aumento na atividade dessa enzima durante a exposição *in vivo* ao chumbo (Cordeiro e Lima-filho, 1995).

Segundo estudos mais recentes, o aumento da atividade da ALA-S é induzido pela diminuição da síntese do heme e, portanto, por processo de retroalimentação que procura manter os níveis de formação do heme e, conseqüentemente, a elevação da atividade da ALA-S não ocorre por ação direta do chumbo. A combinação do aumento da atividade da -ALA-S e da inibição da atividade da ALA-D resulta no aumento acentuado dos níveis de ácido delta-aminolevulínico no sangue e na urina, conhecido como ácido delta-aminolevulínico urinário (ALA-U) (Cordeiro et al., 1996; Tomokuni et al., 1993).

Em geral, o organismo dos indivíduos expostos ao chumbo sintetizam duas vezes mais ALA-S. A concentração urinária da ALA começa a se relacionar com a plumbemia a partir de valores de 40 µg de chumbo / 100 ml de sangue (Sithisarankul et al, 1998; Sem et al., 2002).

### **1.3- Manifestações Clínicas Renais**

A manifestação dos sinais e sintomas pode ocorrer quando a absorção do metal é aumentada ou após um longo período de exposição a baixas concentrações ou ainda, quando ocorre uma acidose, descalcificação ou outro fator que provoque a mobilização ao metal armazenado (Wedeen et al., 1975)

No sistema renal de adultos e crianças, o chumbo provoca dois efeitos distintos em nível renal: um dano no túbulo proximal e uma lenta e progressiva deficiência renal, envolvendo redução na função glomerular associada a danos vasculares e fibrose. A lesão tubular é caracterizada pela tríade de Falconi e nefropatia crônica, que é caracterizada por alterações arterioscleróticas e degeneração hialina dos vasos, com conseqüente alteração na excreção renal (Lin et al, 2003; Hsu e Yu, 2001).

### **1.4- Textura e Função Biológica de Núcleos**

A textura é uma característica que descreve a aparência de parte de uma imagem e é freqüentemente expressa como macia, arenosa, regular, grosseira, granular, etc (Haralick et al. 1973).

A textura da imagem histológica ou citológica dos tecidos está intimamente relacionada com o estado fisiológico e com o distúrbio fisiopatológico do organismo, o que é a base da análise microscópica.

A textura da cromatina dos núcleos está relacionada com fenômenos epigenéticos, tais como metilação ou modificação das histonas, que remodela profundamente a arquitetura nuclear característica de cada tipo de tecido. Mudanças fisiológicas ou patológicas podem ainda influenciar neste processo, explicando a grande variedade da estrutura da cromatina (Cremer et al., 2005; Gilbert 2005; Misteli, 2005; Orr et al., 2005).

Portanto, o estudo da textura nuclear tornou-se cada vez mais importante para a histopatologia e citopatologia. O tamanho, a forma e a textura dos núcleos são de fundamental importância na avaliação citológica (Bedin, 2004; Adam, 2002).

Tradicionalmente, a análise da textura microscópica histológicas e citológicas é feita pela opinião do “expert”, do especialista treinado. Esse tipo de avaliação, porém, contém um forte componente subjetivo, o que explica o considerável grau de discordância entre os especialistas em todos os campos da histopatologia ou citopatologia (Christopher e Hotz, 2004). Isso explica as tentativas de objetivar o processo diagnóstico, utilizando-se ferramentas matemáticas aplicadas, na análise de imagens microscópicas (Metze e Adam, 2005).

Descritores de textura nuclear demonstraram grande utilidade na diferenciação de tecidos com estruturas normais em comparação com o mesmo tipo de tecido, porém acometido por alguma alteração patológica, identificando alterações que não são perceptíveis ao observador (Metze et al., 2005a; Metze et al., 2005b; Metze et al., 2005c; Bedin, 2004; Adam et al., 2004a; Adam et al., 2004b; Adam et al., 2004c; Metze et al. 2004). Porém, não se encontrou, na literatura, análise de textura da cromatina de células dos rins de ratos Wistar intoxicados por chumbo, visando correlacionar aspectos fisiopatológicos e análise de textura.

## **2- OBJETIVOS**

## 2.1- Objetivos Gerais do Estudo

Detectar, através da análise de imagem, alterações nucleares das células dos túbulos proximais renais não perceptíveis ao observador e relacionar com alterações fisiopatológicas da função renal dos animais estudados.

## 2.2- Objetivos Específicos

- A) Avaliar alterações histopatológicas nos órgãos de ratos Wistar causadas pela intoxicação por chumbo em função do tempo;
- B) Avaliar a alteração da função renal no decorrer da intoxicação;
- C) Relacionar as alterações funcionais com as características histopatológicas;

## 2.3- Hipóteses

**H<sub>0</sub>:** Os dados morfométricos, da análise da textura nuclear das células dos túbulos proximais renais e da função renal, não mudaram durante a intoxicação por chumbo

**H<sub>1</sub>:** Os dados morfométricos, da análise da textura nuclear das células dos túbulos proximais renais e da função renal, mudaram durante a intoxicação por chumbo

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1- Animais**

Sessenta ratos Wistar, machos adultos, pesando entre 200 gramas, foram divididos em três grupos, com 20 ratos cada, sendo cinco animais controle, e os 15 restantes receberam uma dose do composto químico diariamente, por períodos que variaram de 8 a 60 dias.

Os animais tiveram acesso à água e ração sem restrições e ficaram expostos a ciclos claro-escuro de 12 horas, à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}, \pm 2^{\circ}\text{C}$ )

### **3.2- Administração dos Compostos Químicos nos Ratos Wistar**

Cada animal recebeu uma dose diária de 0,5 ml de solução de acetato de chumbo 1% e os controles 0,5 ml água destilada, via intraperitoneal

### **3.3- Estudo da Função Tubular Renal pelo Clearance de Lítio**

Os estudos foram realizados em gaiolas metabólicas individuais com início dos ensaios às 8:00 pm. Os animais receberam LiCl 0.06 mEq/100 g de peso corporal, administrados por gavagem 14 horas antes do início dos experimentos. A partir deste momento cada rato foi colocado em gaiolas metabólicas individuais, sem restrição de movimentos, em jejum para ração sólida, ingerindo água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a um período experimental de 120 minutos em estado vígil. Para a obtenção de um fluxo urinário regular e estável, neste intervalo de tempo, os animais receberam uma sobrecarga hídrica por gavagem de 5% do peso corporal 90 e 30 minutos antes do início experimental. Em seguida, foi feita a coleta de urina destes animais através de funis adequadamente adaptados sob as gaiolas metabólicas, em tubos cônicos graduados com divisões de 0.2 ml. As alíquotas de urina foram congeladas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) para a realização das dosagens posteriormente. Em seguida, o animal foi anestesiado com éter etílico e coletou-se uma amostra de 2,5 ml de sangue através de sua cauda. Estas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, o plasma foi alíquotado e armazenado juntamente com as amostras de urina, sob refrigeração ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) para posterior dosagem.

### **3.4- Obtenção das amostras de tecido e técnicas citológicas**

Os animais foram anestesiados com ketamina e xilasina (75mg/kg e 10mg/kg respectivamente, intraperitoneal.). Logo após, realizou-se laparotomia medial e os rins foram expostos rebatendo-se os intestinos e fígado. A artéria renal do rim esquerdo foi clampeada e o rim esquerdo retirado.

Através de laparotomia medial, rebatendo-se a arcada dorsal, foi possível visualizar o coração e, identificando-se a área cardíaca correspondente ao ventrículo esquerdo, introduziu-se uma agulha até o arco aórtico, conectada ao sistema de perfusão. A drenagem da solução foi obtida pela secção da aurícula direita. Deu-se então início à perfusão, inicialmente com 100 ml de líquido pré-perfusão constituído por salina heparinizada 2%. Em seguida perfundiu-se com paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7.4. Os tecidos foram retirados e seccionados sagitalmente na região mediana, sendo armazenados em cápsulas histológicas. As amostras de tecido foram mantidas na mesma solução fixadora e desidratados em série etanólica crescente, diafanizados e incluídos em parafina (Histosec-Merck/RJ). Cortes de 5 µm, obtidos através de mocrótomo, foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). Todoo os cortes hitológicos foram preparados, corados e cortados pelo mesmo técnico do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), a fim de minimizar a variação de qualidade dos reagentes e tempo de exposição das lâminas à luz.

### **3.5- Análises Bioquímicas**

#### **3.5.1- Determinação das Concentrações de Sódio, Lítio, Potássio e Creatinina Plasmáticas e na Urina**

A concentrações plasmáticas de sódio, lítio e potássio foram determinados por fotometria de chama (Micronal, B262, São Paulo, Brasil), enquanto as concentrações de creatinina foram determinadas espectrofotométricamente (Instruments Laboratory, Genesys V, USA).

### 3.5.2- Quantificação do Ácido Delta-Aminolevulínico Urinário

As dosagens do ácido delta-aminolevulínico urinário foram realizadas pelo laboratório do Centro de Controle de Intoxicações (CCI) do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foi utilizado o método de Tomokuni e Ogata. Adicionou-se a 1ml da urina coletada, uma alíquota 0,2 ml de acetato de etila, 1ml de tampão fosfato (pH 4,6) e 1ml de água destilada, colocou-se a amostra em banho-maria fervente durante 10 minutos. Após o aquecimento, adicionou-se 1ml de acetoacetado de etila à amostra, agitando-a no mixer durante um minuto e logo após centrifugou-se por cinco minutos a 2.000 rpm para acontecer a separação das fases orgânica e aquosa. Em seguida, retirou-se 1ml do sobrenadante (fase aquosa) e adicionou-se uma alíquota de 1ml do reativo de Erlich modificado, que induz a formação de um composto colorido, pela reação entre a Ácido delta-aminolevulínico-pirrol (ALA-pirrol) e o reativo de Erlich modificado, que teve sua absorvância resultante medida a 553 nm em espectrofotômetro. Os valores obtidos foram corrigidos através da concentração de creatinina na mesma amostra. A construção de uma curva padrão foi realizada utilizando-se alíquotas com concentrações previamente conhecidas de ácido delta-aminolevulínico.

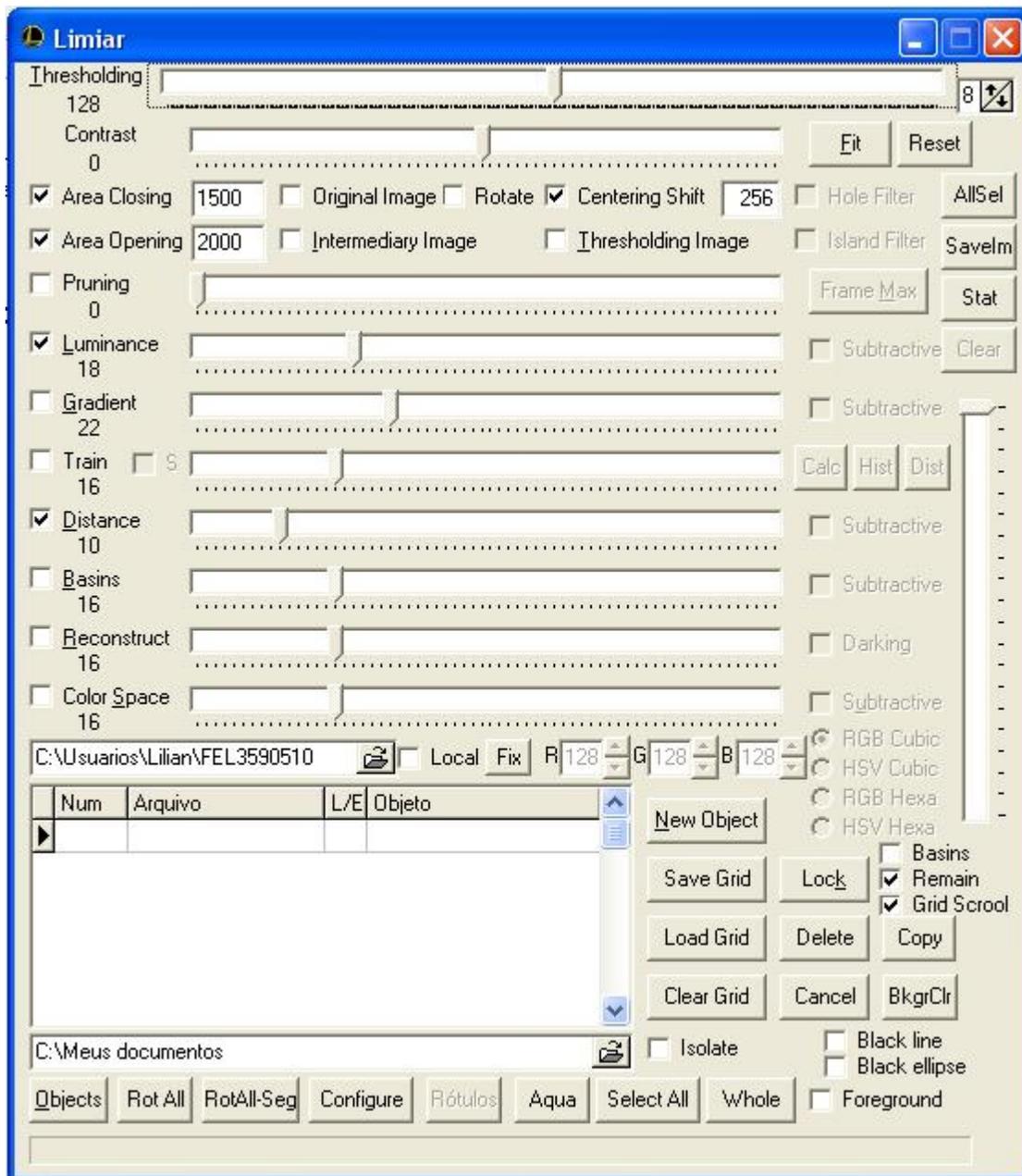
### 3.6- Análise da Textura

As lâminas foram selecionadas aleatoriamente adquirindo-se no mínimo 20 e no máximo 30 imagens digitalizadas dos túbulos proximais renais, de cada um dos animais. As aquisições das imagens foram feitas sem conhecimento do tempo de intoxicação para evitar viés de aquisição.

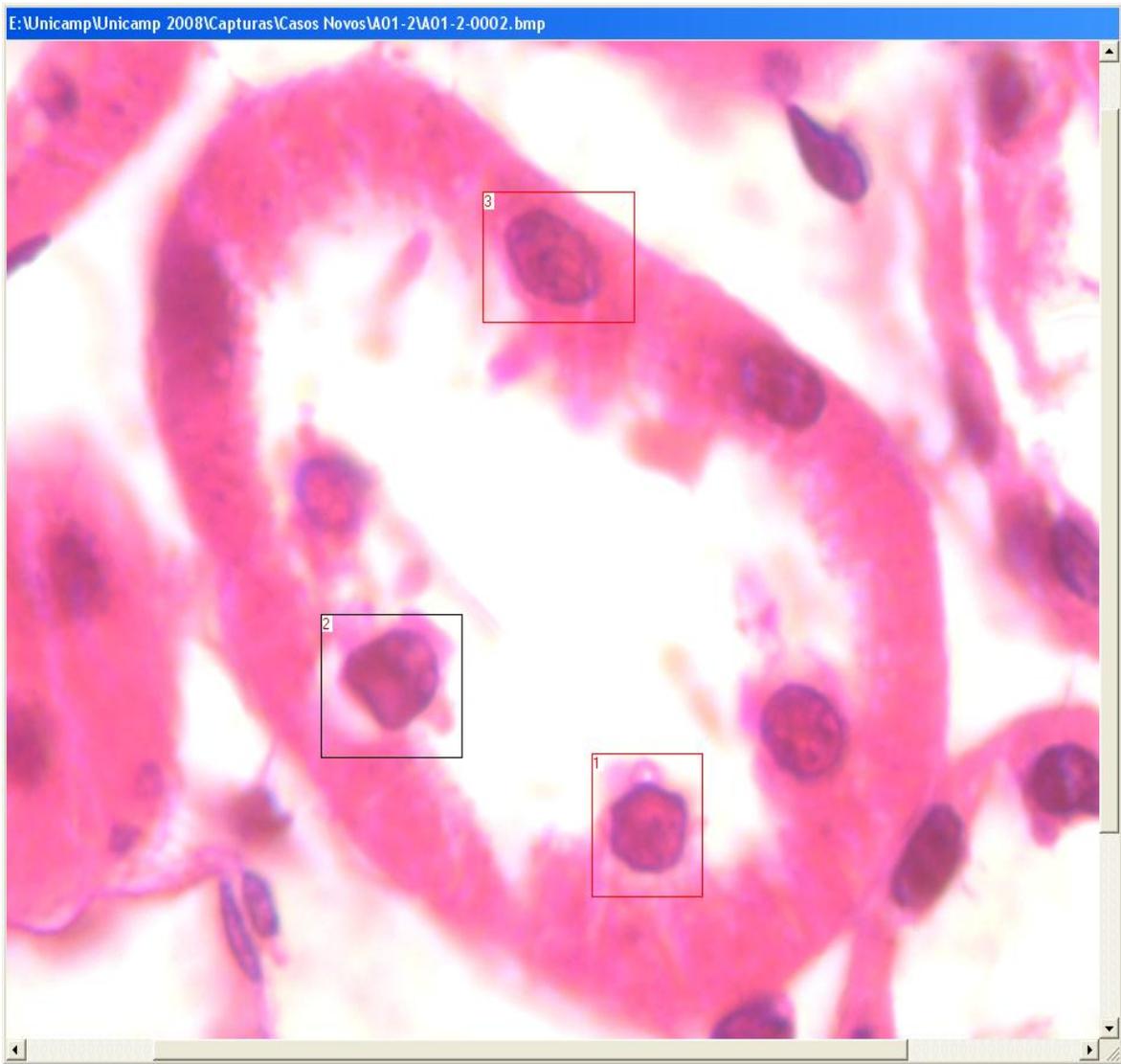
A aquisição das imagens foi realizada através do uso de câmara digital de alta resolução (12 megapixels), lente objetiva com aumento de 100 X e óleo de imersão; no sistema Leica DC 500 e software IrfanView, Microsoft®. As imagens foram salvas, sem compactação, no formato bitmap colorido de 8 bits (extensão BMP), com tamanho 1300 x 1030 pixels.

As imagens adquiridas foram segmentadas, totalizando 100 núcleos segmentados por animal, através do software Limiar (Figura 1, 2 e 3), transformadas em escala de cinza e analisadas através de programas de análise de imagem (Morph). A imagem de cada núcleo segmentado foi convertida para a escala de cinza com níveis de luminância entre 0 e 255, sendo 255 o mais claro (Adam et al, 2006)

Todas as imagens digitalizadas das lâminas e segmentadas foram nomeadas automaticamente pelo programa, eliminando a possibilidade de erro durante a tarefa.



**Figura 1-** Software Limiar, disposição inicial do software antes do início da segmentação..



**Figura 2-** Imagem em processo de segmentação no software Limiar. Os quadrados numerados indicam a ordem e quais núcleos já foram segmentados.



**Figura 3-** Imagem de núcleo segmentado (Thresholding Image).

Foram calculados os seguintes parâmetros:

1 – Variáveis derivadas da imagem original e da imagem transformadas através da Transformada Rápida de Forier (Fast Fourier Transform - FFT).

Após a suavização das bordas dos núcleos, foram criadas a partir dessas imagens suavizadas, novas imagens utilizando a FFT e calculados os valores de energia de 11 (onze) faixas de frequências.

Faixa de frequência espacial	Valor em $\mu\text{m}$
R1	Infinito – 4,80 $\mu\text{m}$
R2	4,80 $\mu\text{m}$ – 2,40 $\mu\text{m}$
R3	2,40 $\mu\text{m}$ – 1,60 $\mu\text{m}$
R4	1,60 $\mu\text{m}$ – 1,20 $\mu\text{m}$
R5	1,20 $\mu\text{m}$ – 0,96 $\mu\text{m}$
R6	0,96 $\mu\text{m}$ – 0,80 $\mu\text{m}$
R7	0,80 $\mu\text{m}$ – 0,68 $\mu\text{m}$
R8	0,68 $\mu\text{m}$ – 0,60 $\mu\text{m}$
R9	0,60 $\mu\text{m}$ – 0,53 $\mu\text{m}$
R10	0,53 $\mu\text{m}$ – 0,48 $\mu\text{m}$
R11	0,48 $\mu\text{m}$ – 0,44 $\mu\text{m}$

**Figura 4-** Faixas de frequências espaciais das imagens FFT.

O nível de cinza (luminância) de cada pixel (menor elemento que compõe a imagem) define a altura do eixo Z em uma representação tridimensional da imagem original, criando assim, uma paisagem que, no contexto da análise de Fourier, pode ser interpretada com o resultado do acúmulo de funções harmônicas. Deste modo, as imagens FFT fornecem uma informação precisa sobre as estruturas repetidas inerentes à imagem original. Padrões periódicos de textura são detectadas com regiões claras na imagem FFT alusivos à direção e periodicidade.

Os valores de energia das imagens FFT, que são equivalentes às amplitudes das ondas harmônicas que constrem a imagem microscópica, caracterizam a presença de padrões repetitivos na imagem original.

Mudanças das baixas faixas de frequências são equivalentes a grosseiras alterações na cromatina, enquanto que alterações nas altas faixas de frequência indicam alterações finas, sutis. Altos valores de energia nas baixas frequências (anéis 1, 2, 3, 4) indicam presença de estruturas contrastadas e relativamente grandes na cromatina enquanto alterações nas altas frequências (anéis 8, 9, 10, 11) são equivalente a um padrão de sal e pimenta ou branco e preto (Adam et al, 2008; Herreros et al, 2007; Auda et al, 2006)

2 – Dimensão Fractal de Fourier das imagens, que estima a complexidade da cromatina (Rocha et al 2008; Rocha et al, 2006; Adam et al, 2006);

3 – Segundo Momento Angular da Matriz de co-ocorrência Haralick que representa a suavidade da imagem (Theodridis e Koutroumbas, 2006);

4 – Entropia da Matriz de co-ocorrência Haralick, que mede o número de transições entre os diferentes graus de cinza na imagem. (Kayser et al, 2007).

### 3.7- Análises Estatísticas

Os clearances renais (C) foram calculados por fórmulas padrões ( $C=VU/P$ ), sendo V o fluxo urinário por minuto, U a concentração urinária e P os níveis plasmáticos de creatinina ou lítio para cada período. Calculou-se o clearance de creatinina (CCr) como estimativa da taxa de filtração glomerular (RFG) e o clearance de lítio ( $CLi^+$ ) usado para avaliar a manipulação tubular renal de sódio. Obteve-se os valores da excreção fracional de sódio ( $FENa^+$ ) e de potássio ( $FEK^+$ ) como  $CNa^+/CCr$  e  $CK^+/CCr$ , respectivamente, onde  $CNa^+$  e  $CK^+$  correspondem aos clearances de íons e CCr ao clearance de creatinina.

As frações de excreção proximal ( $FEPNa^+$ ) e pós-proximal ( $FEPPNa^+$ ) de sódio, foram calculadas como  $CLi^+/CCr \times 100$  e  $CNa^+/CLi \times 100$ , respectivamente. O aporte distal de sódio a partir dos túbulos proximais ( $DDNa^+$ ), foram determinados como  $CLi^+ \times PNa^+$  onde  $PNa^+$  é a concentração plasmática de sódio.

Todos os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Na análise de imagem a distribuição das variáveis foi avaliada com o teste de Kolmogorov –Smirnov. Dados obtidos estudando variáveis contínuas foram analisados usando Análise de Variância (ANOVA). Para comparações *post hoc* entre médias selecionadas utilizou-se o teste da Diferença Mínima dos Quadrados (Least Square Difference - LSD) quando a análise inicial pela ANOVA indicou diferença estatística entre os grupos experimentais. Um valor  $p < 0,05$  foi considerado indicativo de significância.

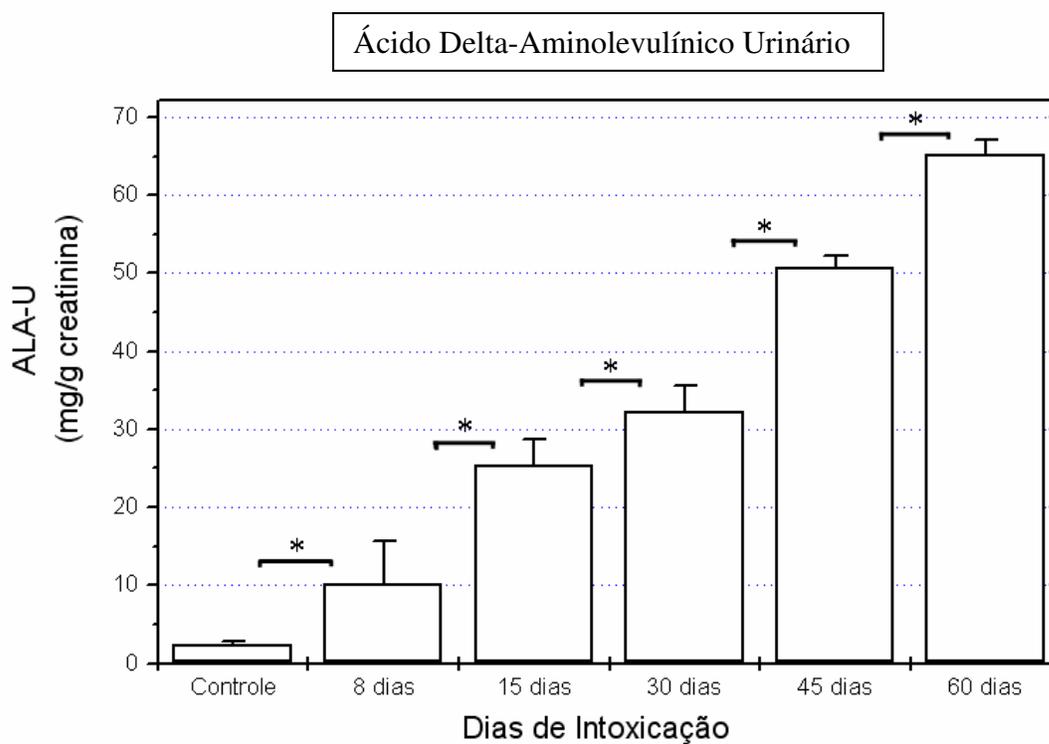
Em todas as análises realizadas utilizou-se os programas Winstat.

## **4- RESULTADOS**

Todos os ratos sobreviveram até o última dia de experimentação, cada qual em seu respectivo grupo e dias de intoxicação.

#### 4.1- Ácido Delta-Aminolevulínico Urinário

As concentrações do Ácido Delta-Aminolevulínico urinário (ALA-U) aumentaram constantemente durante o experimento atingindo valores muito elevados (Figura 5).



**Figura 5-** Concentração do Ácido Delta-Aminolevulínico na urina (ALAU) dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação). A diferença entre todos os grupos foi significativa. \* =  $p < 0,05$ .

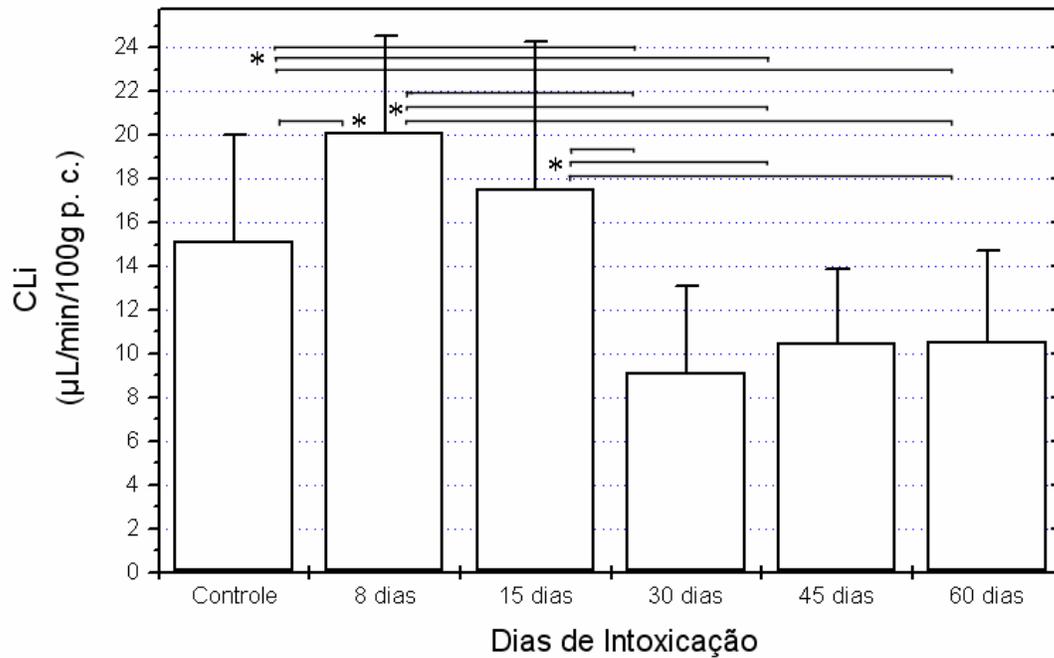
## 4.2- Função renal

A porcentagem de reabsorção de sódio nos túbulos contorcidos proximais renais caiu de 84% – valores normais – para 77% após uma semana mas então aumentaram para 89% após um mês. Sódio e Potássio plasmáticos permaneceram sem alterações durante o experimento.

### 4.2.1- Clearance de Lítio

A taxa de absorção do túbulo contorcido proximal renal, que é estimada pelo Clearance de Lítio (CLi), foi significativamente elevado aos oito dias de intoxicação, que foi seguida por um declínio também significativo. Após 45 dias de intoxicação, os valores se mantiveram constantemente abaixo dos valores dos ratos controle, sem intoxicação (Figura 6).

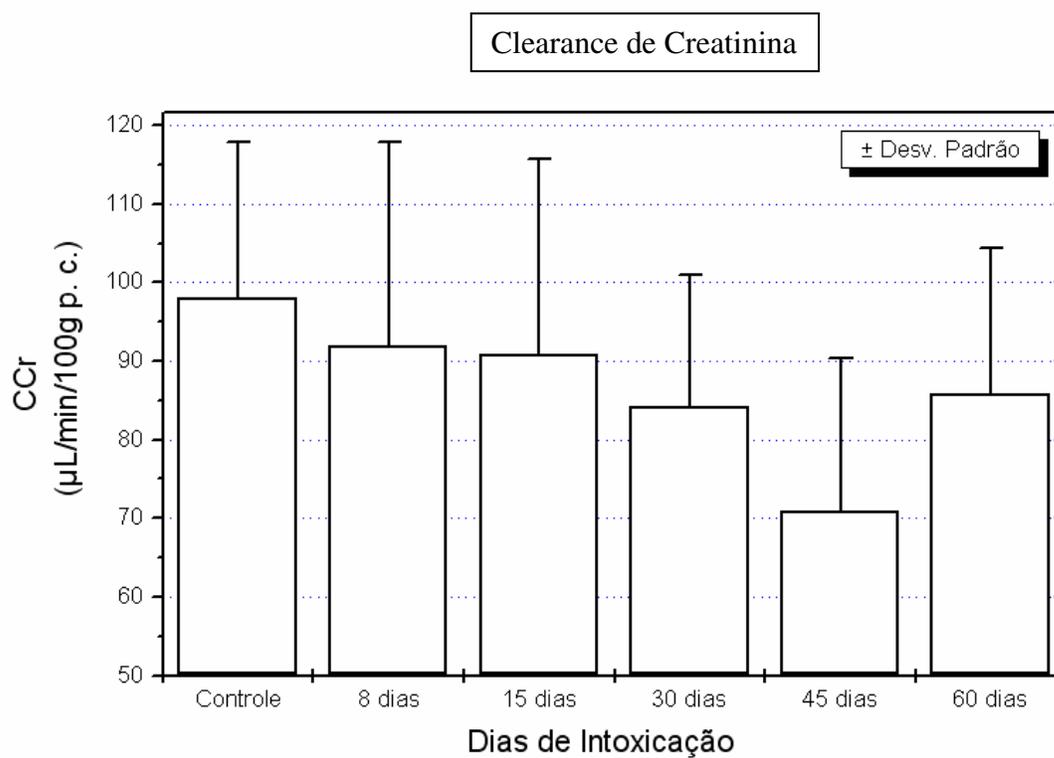
## Clearance de Lítio



**Figura 6-** Valores do Clearance de Lítio (CLi) dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação). O grupo de 8 e 15 dias de intoxicação tiveram um aumento significativo em relação ao grupo controle e os grupos de 30, 45 e 60 dias de intoxicação. \* =  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2- Clearance de Creatinina

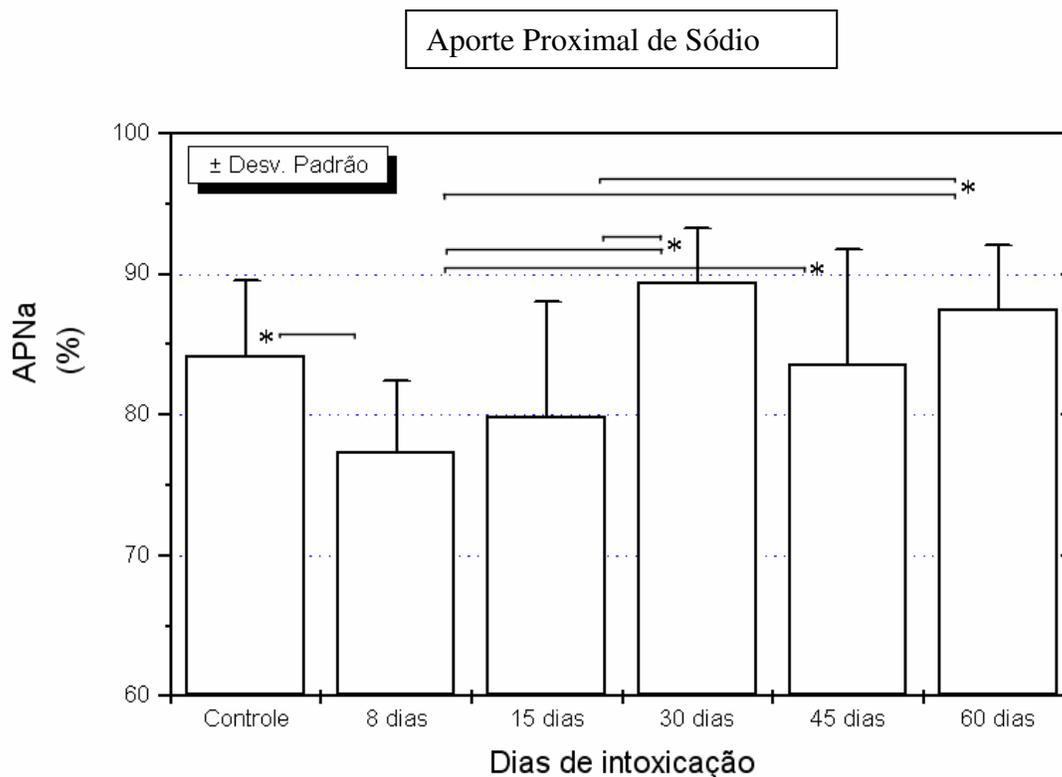
Diferenças significativas do Clearance de Creatinina (CCr) não foram detectadas durante o estudo.



**Figura 7-** Valores do Clearance de Creatinina dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação). Não houve diferenças significativas entre os grupos. ANOVA:  $p=0,09$ .

#### 4.2.3- Aporte Proximal de Sódio

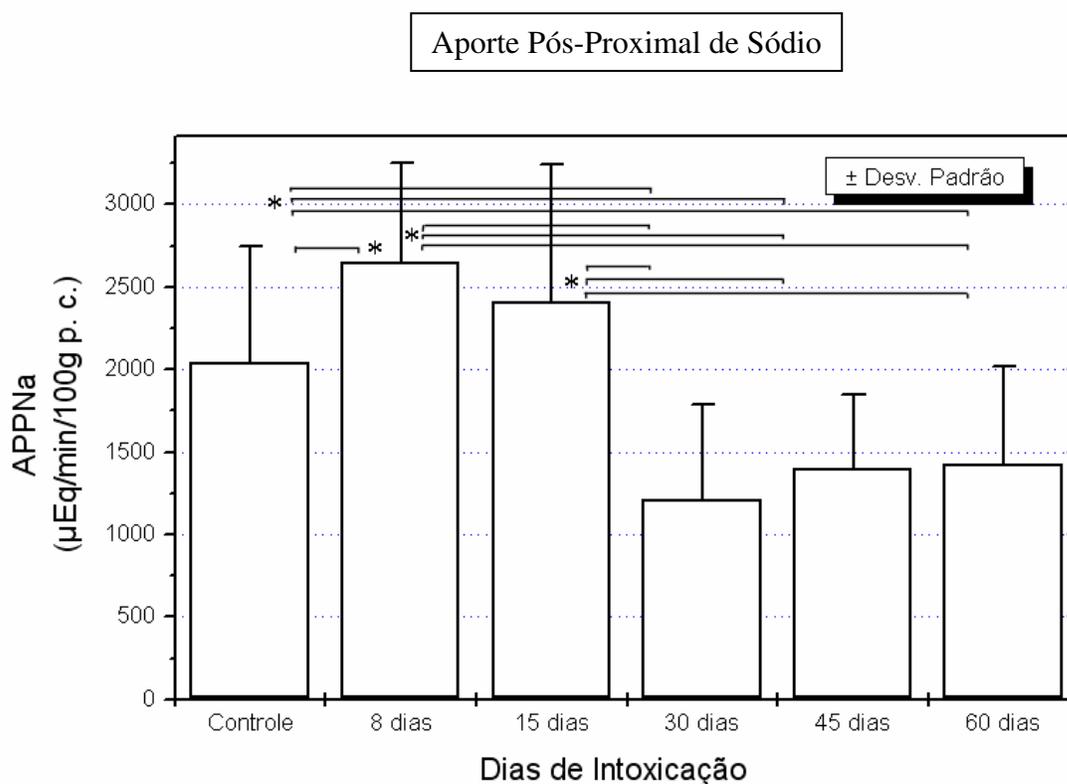
O Aporte Proximal de Sódio (APNa) revelou seu valor máximo após 30 dias de intoxicação e seu menor valor após oito dias de intoxicação. (Figura 8).



**Figura 8-** Valores do Aporte Proximal de Sódio dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação). Não há diferença significativa entre os grupos com 8 e 15 dias de intoxicação, mas há diferença entre esses grupos em comparação com o grupo controle e os demais grupos. \* =  $p < 0,05$ .

#### 4.2.4- Aporte Pós-Proximal de Sódio

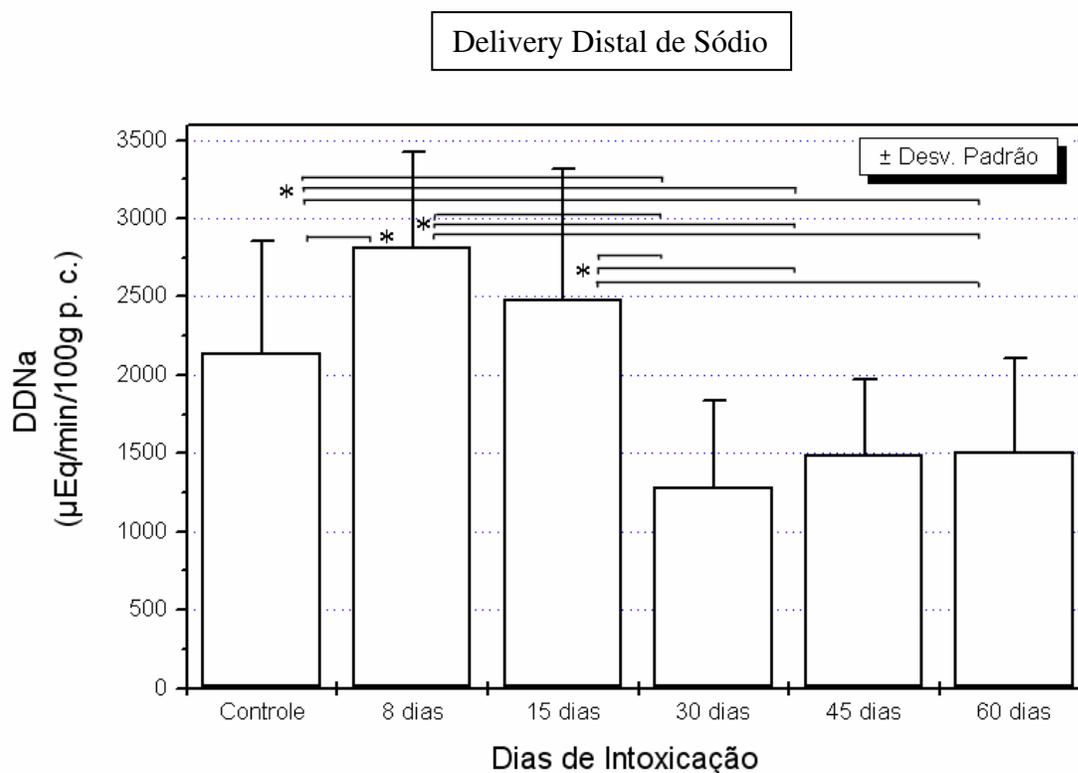
O Aporte Pós-Proximal de Sódio (APPNa) revelou seu valor máximo após oito dias de intoxicação e seu menor valor, abaixo nos ratos controle, após 30 dias de intoxicação. (Figura 9).



**Figura 9-** Valores do Aporte Pós-Proximal de Sódio dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação). Não há diferença significativa entre os grupos com 8 e 15 dias de intoxicação, mas há diferença entre esses grupos em comparação com o grupo controle e os demais grupos. \* =  $p < 0,05$ .

#### 4.2.5- Delivery Distal de Sódio

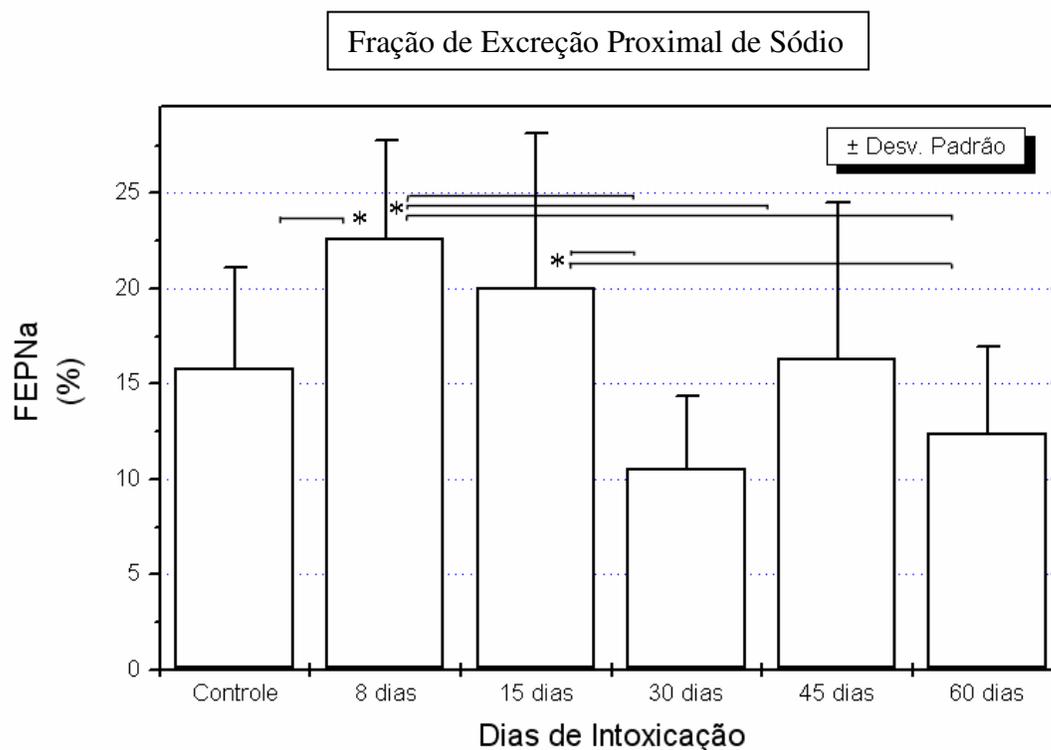
O Delivery Distal de Sódio (DDNa) aumentou consideravelmente durante as primeiras duas semanas de intoxicação, mas regressou aos valores normais após um mês ficando significativamente abaixo do DDNa dos ratos controle (Figura 10).



**Figura 10-** Valores do Delivery Distal de Sódio dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação). Não há diferença significativa entre os grupos com 8 e 15 dias de intoxicação, mas há diferença entre esses grupos em comparação com o grupo controle e os demais grupos. ANOVA:  $p=0,00001$ .

#### 4.2.6- Fração de Excreção Proximal de Sódio

Os valores da FEPNa dos ratos com oito e 15 dias de intoxicação tiveram aumentos significativos. (Figura 11).



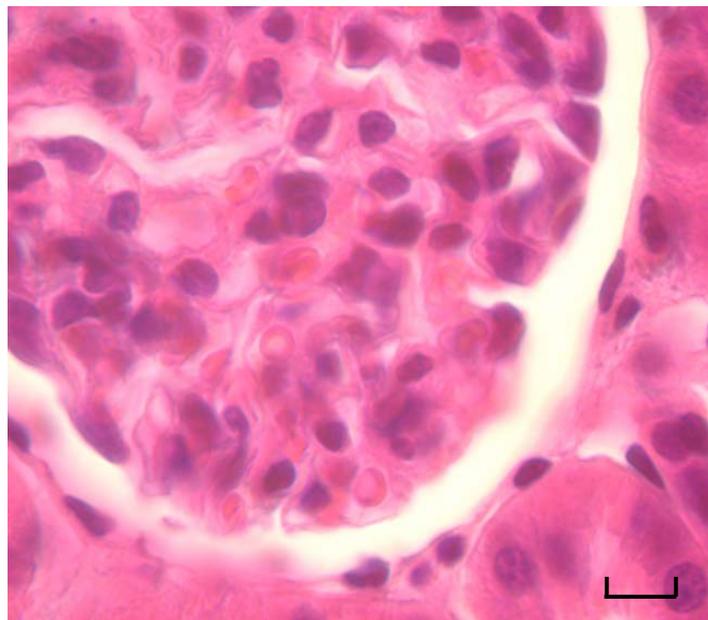
**Figura 11-** Valores da Fração de Excreção Proximal de Sódio, em porcentagem (%), dos ratos intoxicados por chumbo, comparados a um grupo controle (sem intoxicação). Não há diferença significativa entre os grupos com 8 e 15 dias de intoxicação, mas há diferença entre esses grupos em comparação com o grupo controle e os demais grupos. \* =  $p < 0,05$ .

### 4.3- Morfologia

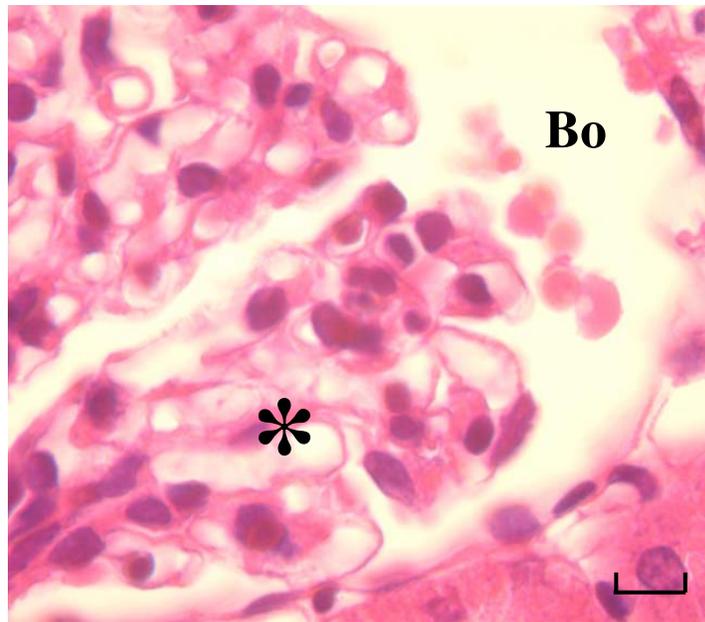
#### 4.3.1 Microscopia Ótica

Foram observadas alterações nos corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais renais. As alterações foram tempo dependentes em relação a intoxicação do rato.

A Figura 12 e Figura 13 mostram a morfologia normal e alterada, respectivamente, dos corpúsculos renais.

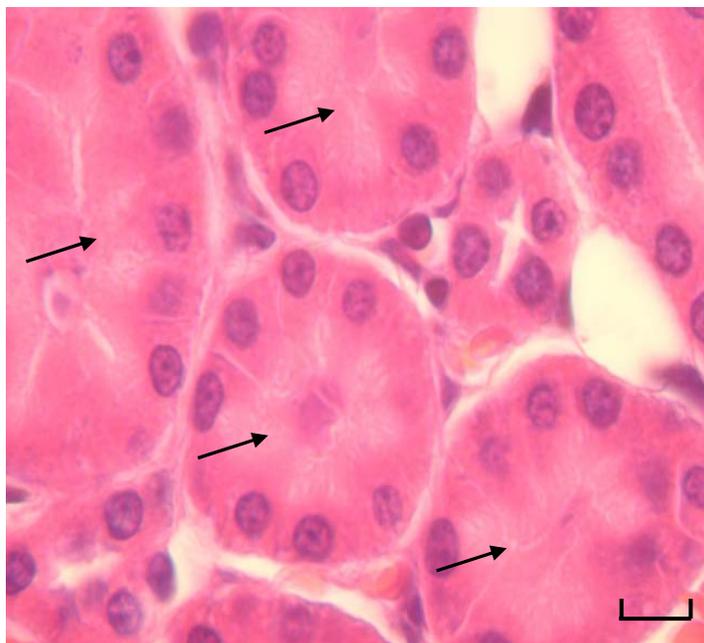


**Figura 12-** Aparência morfológica dos corpúsculos renais, de um rato controle. Pode-se ver a morfologia normal de um corpúsculo renal, sem alterações. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . (H&E - 1000x).



**Figura 13-** Aparência morfológica dos corpúsculos renais, de um rato intoxicado por chumbo durante 30 dias. Pode-se ver a morfologia do espaço de Bowman (Bo) que se apresenta dilatado e com lobulação do tufo de capilares (\*) e coloração rarefeita da matriz mesangial. Barra = 10  $\mu$ m. (H&E - 1000x).

Observa-se, na Figura 14, a aparência morfológica dos túbulos contorcidos proximais renais, preservados, sem nenhuma alteração.



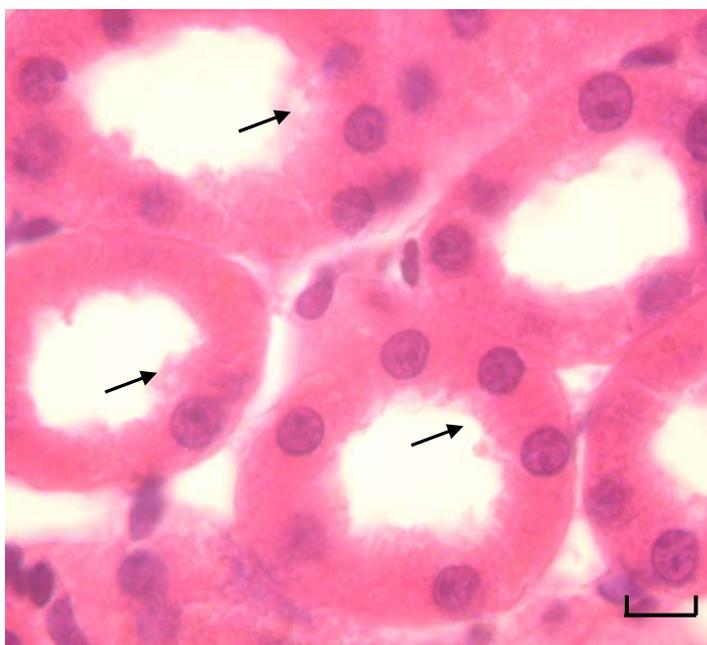
**Figura 14-** Aparência morfológica dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato controle. Nota-se a disposição periférica dos núcleos, alta organização e a bordadura em escova (setas) em perfeitas condições. Barra = 10  $\mu$ m. (H&E - 1000x).

Após o início da intoxicação, em oito dias pôde-se observar a perda da bordadura em escova do interior do túbulo contorcido proximal renal (Figura 15)

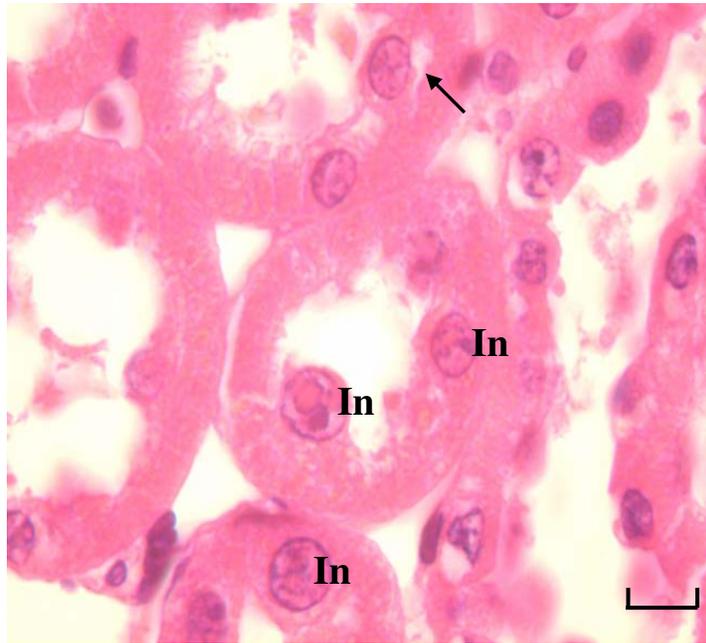
Após 15 dias de intoxicações por chumbo, observa-se que a perda da bordadura em escova persiste e há cariomegalia (Figura 16). As inclusões nucleares surgem a partir dos 30 dias de intoxicação e tendem a aumentar se a intoxicação persistir, apresentando-se como característica tempo dependente. Células do epitélio tubular são descamadas, localizando-se na luz tubular ou em processo de descamação (Figura 17).



**Figura 15-** Aparência morfológica dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante oito dias. Nota-se a perda parcial da bordadura em escova (setas). Barra = 10  $\mu$ m. (H&E - 1000x).



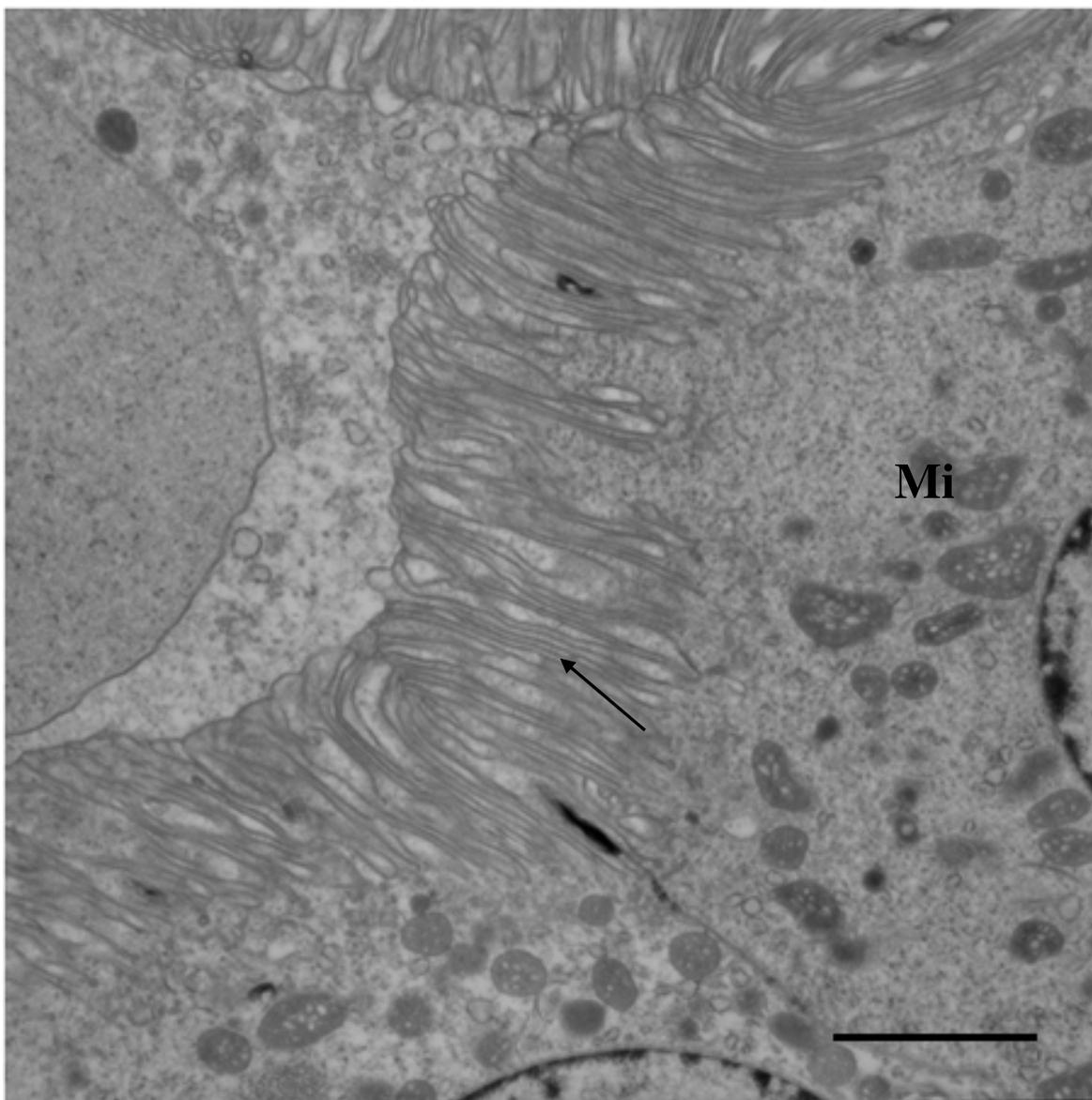
**Figura 16-** Aparência morfológica dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 15 dias. Nota-se a que a perda da bordadura em escova (setas) persiste e há cariomegalia. Barra = 10  $\mu$ m. (H&E - 1000x).



**Figura 17-** Aparência morfológica dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 60 dias. Presença de inclusões nucleares (In), dilatação tubular e descamação de células da membrana basal (seta). Barra = 10  $\mu$ m. (H&E - 1000x).

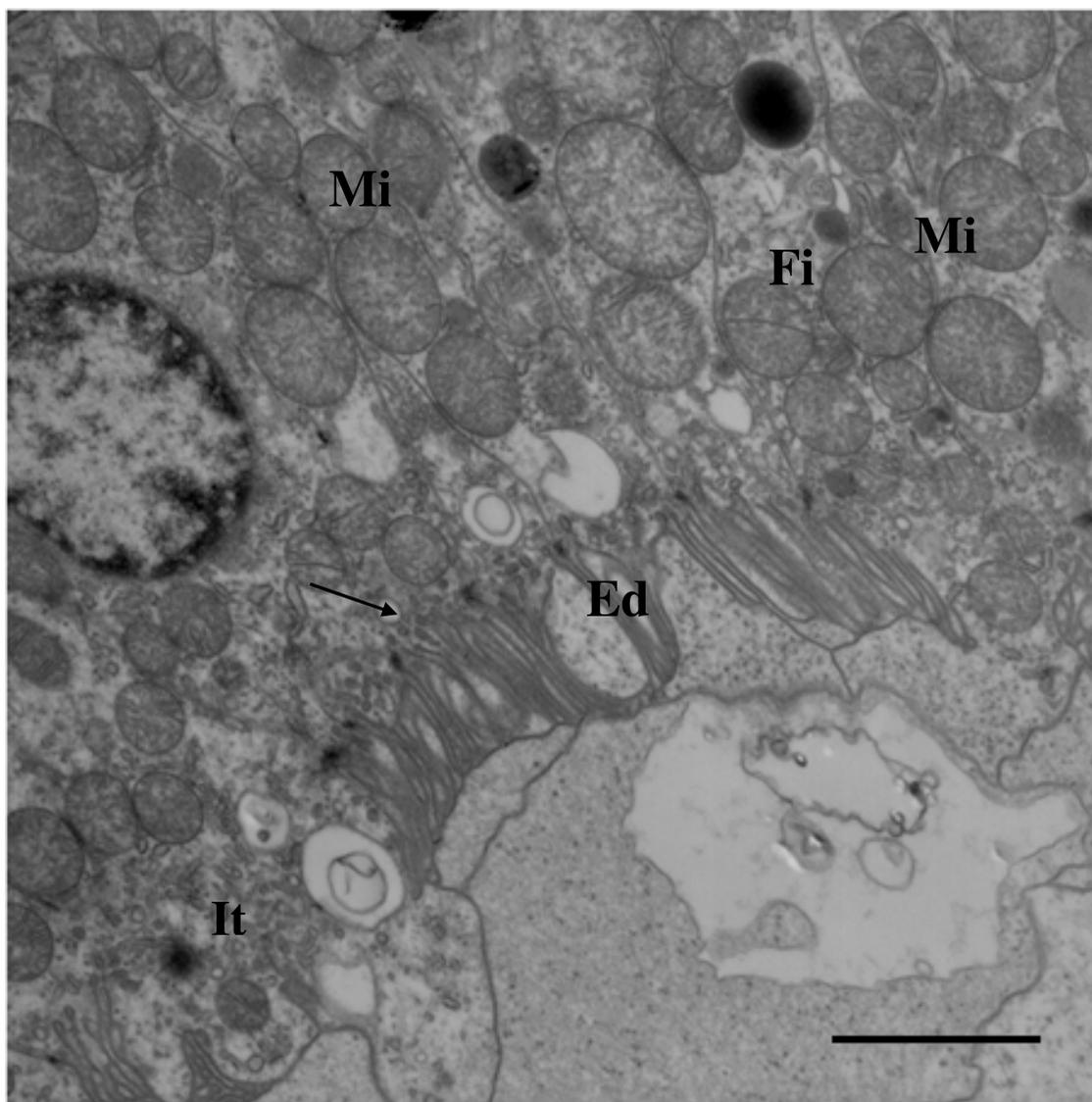
#### 4.3.2- Microscopia Eletrônica

Bordadura em escova sem alterações e mitocôndrias integras foram observadas nas imagens da ultra estrutura dos ratos controle (Figura 18)

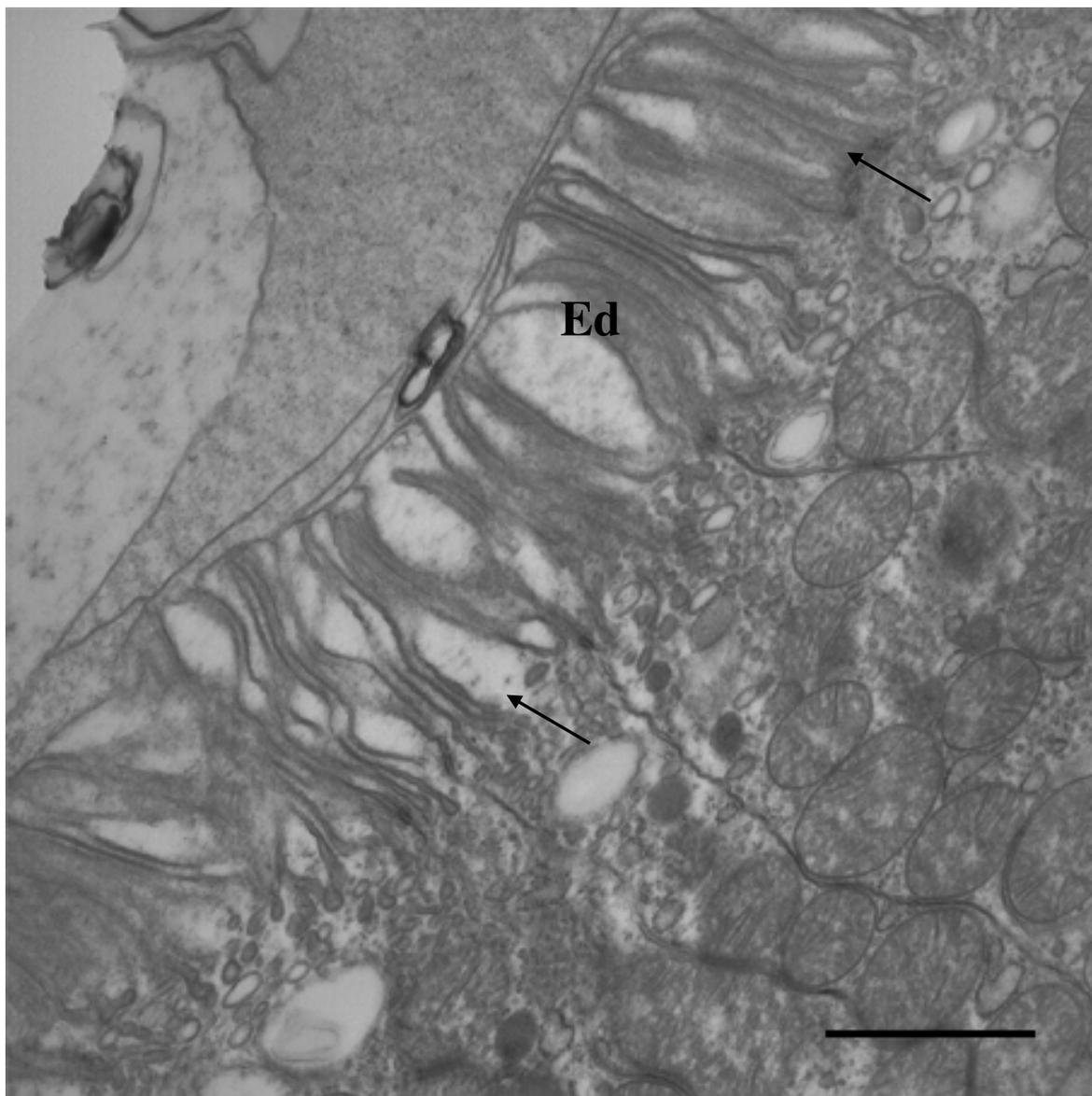


**Figura 18-** Ultra estrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato controle. Presença de bordadura em escova, sem alterações (seta) e mitocôndrias integras, com formato ovalado (Mi). Barra = 1,98  $\mu\text{m}$ . (6.300X)

Aos oito dias de intoxicação (Figura 19) houve uma presença marcante de edema mitocondrial com perda de cristas centrais, também presente aos 15 dias de intoxicação (Figura 20). Concomitantemente, houve edema e vacuolização da bordadura em escova com perda de microvilosidades. O núcleo não apresentou alterações. Células epiteliais descamadas puderam ser encontradas na luz dos túbulos contorcidos proximais renais, mas eram pouco freqüentes.

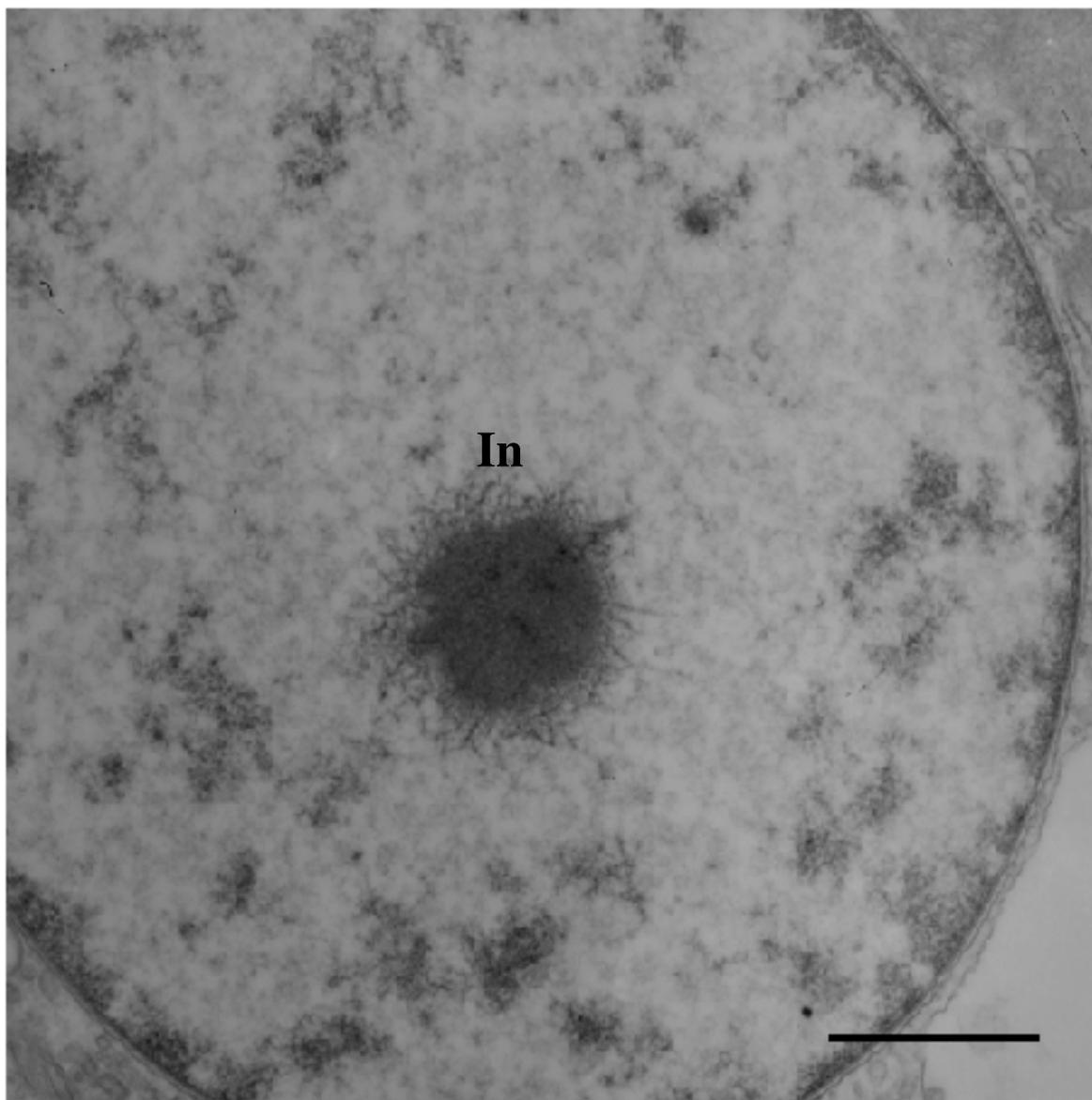


**Figura 19-** Ultra estrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante oito dias. Presença edema (Ed) e diminuição da bordadura em escova (seta), com locais de interrupção (It), mitocôndrias edemaciadas (Mi) com fissão mitocondrial (Fi). Barra = 1,98  $\mu$ m. (6.300X)

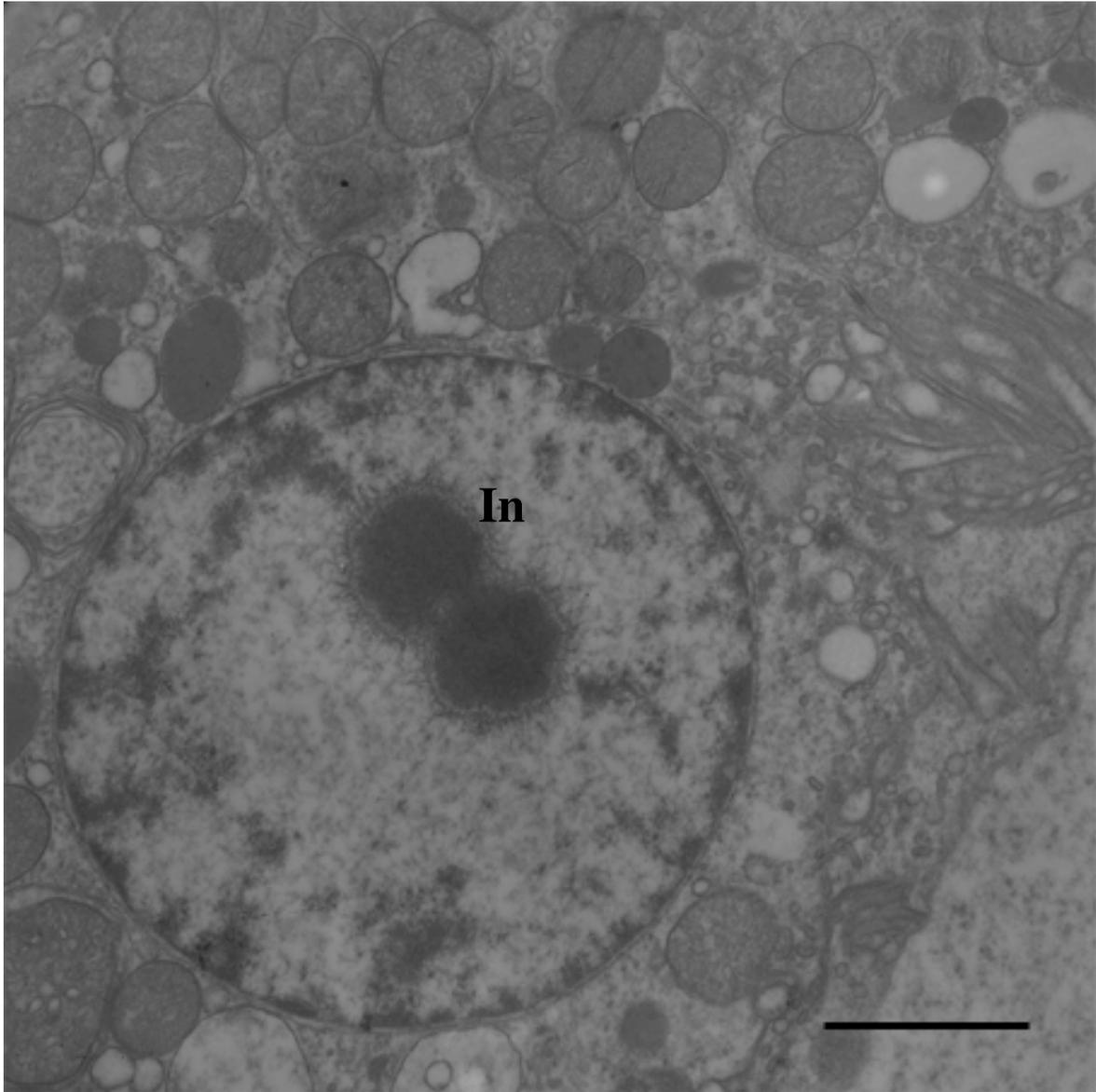


**Figura 20-** Ultra estrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 15 dias. Presença edema (Ed) e diminuição da bordadura em escova (setas). Barra = 1,6  $\mu$ m. (8.000X)

As primeiras inclusões nucleares puderam ser observadas aos 30 (trinta) dias de intoxicação, podendo ser uma inclusão ou mais. As inclusões nucleares puderam ser vistas no núcleo na forma de corpos esféricos muito eletrondensos com um núcleo denso e uma região fibrilar como um sol radiante ou como uma estrutura granular compactada em contato com a heterocromatina (Figura 21 e Figura 22).

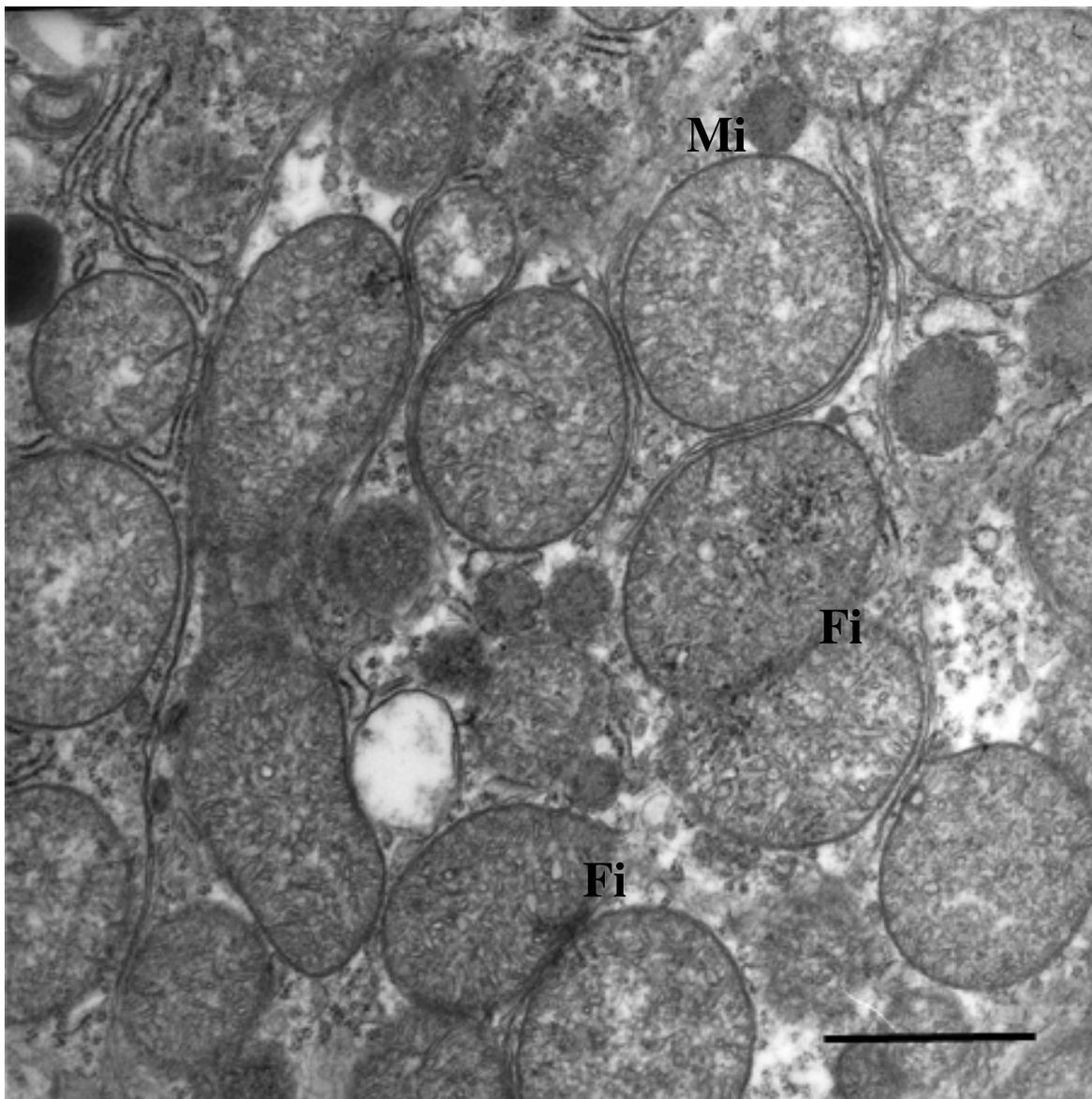


**Figura 21-** Ultra estrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 30 dias. Presença de inclusão nuclear, bem definidas com aspecto de sol radiante (In). Barra = 1,25  $\mu\text{m}$ . (10.000X)



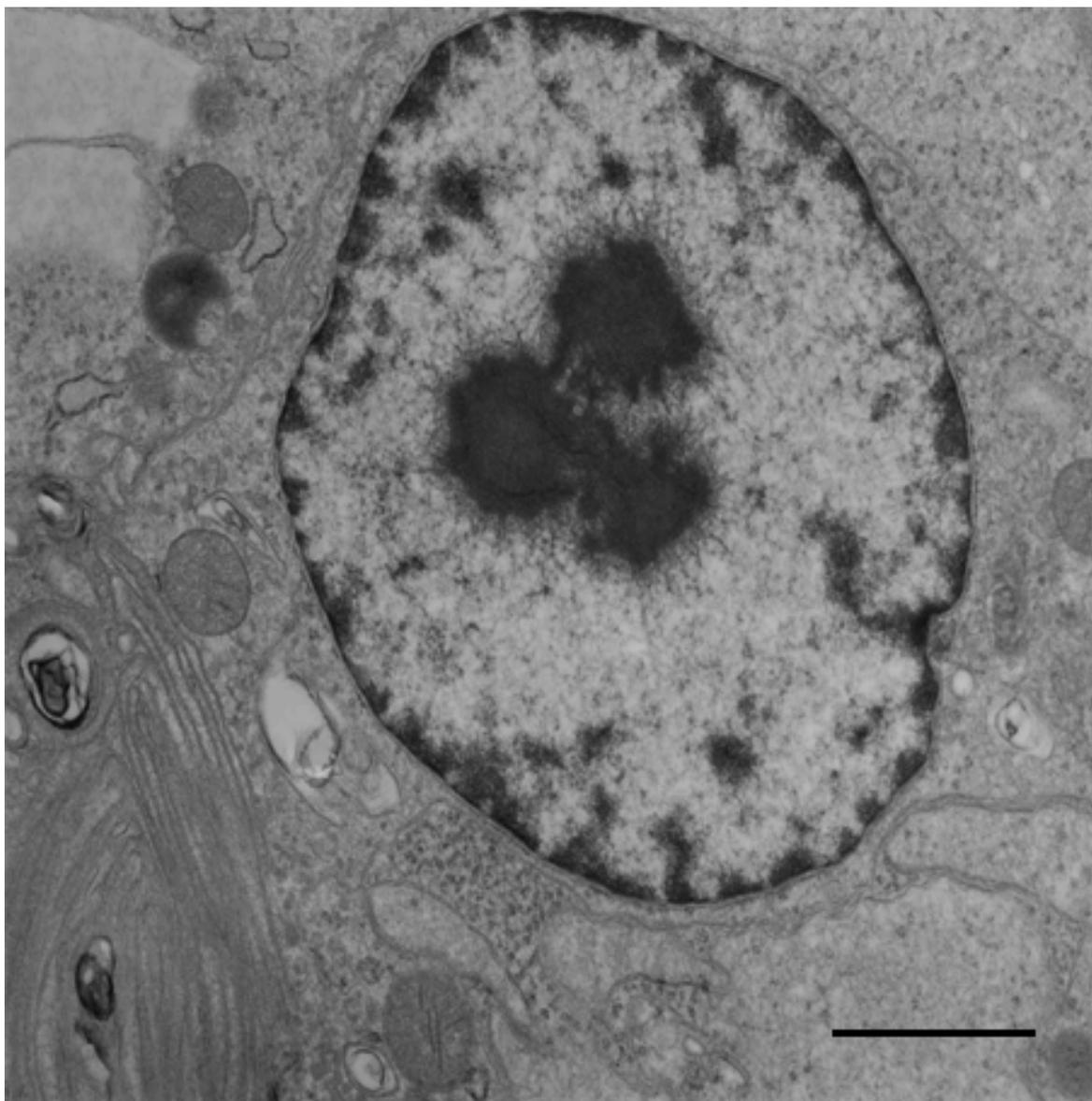
**Figura 22-** Ultra estrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 30 dias. Presença de inclusão nuclear dupla (In). Barra = 1,98  $\mu\text{m}$ . (6.300X)

Aumento do volume das mitocôndrias com perda de cristas centrais são aspectos morfológicos marcantes durante a intoxicação por chumbo, assim como freqüentes mitocôndrias em processa de fissão (Figura 23).

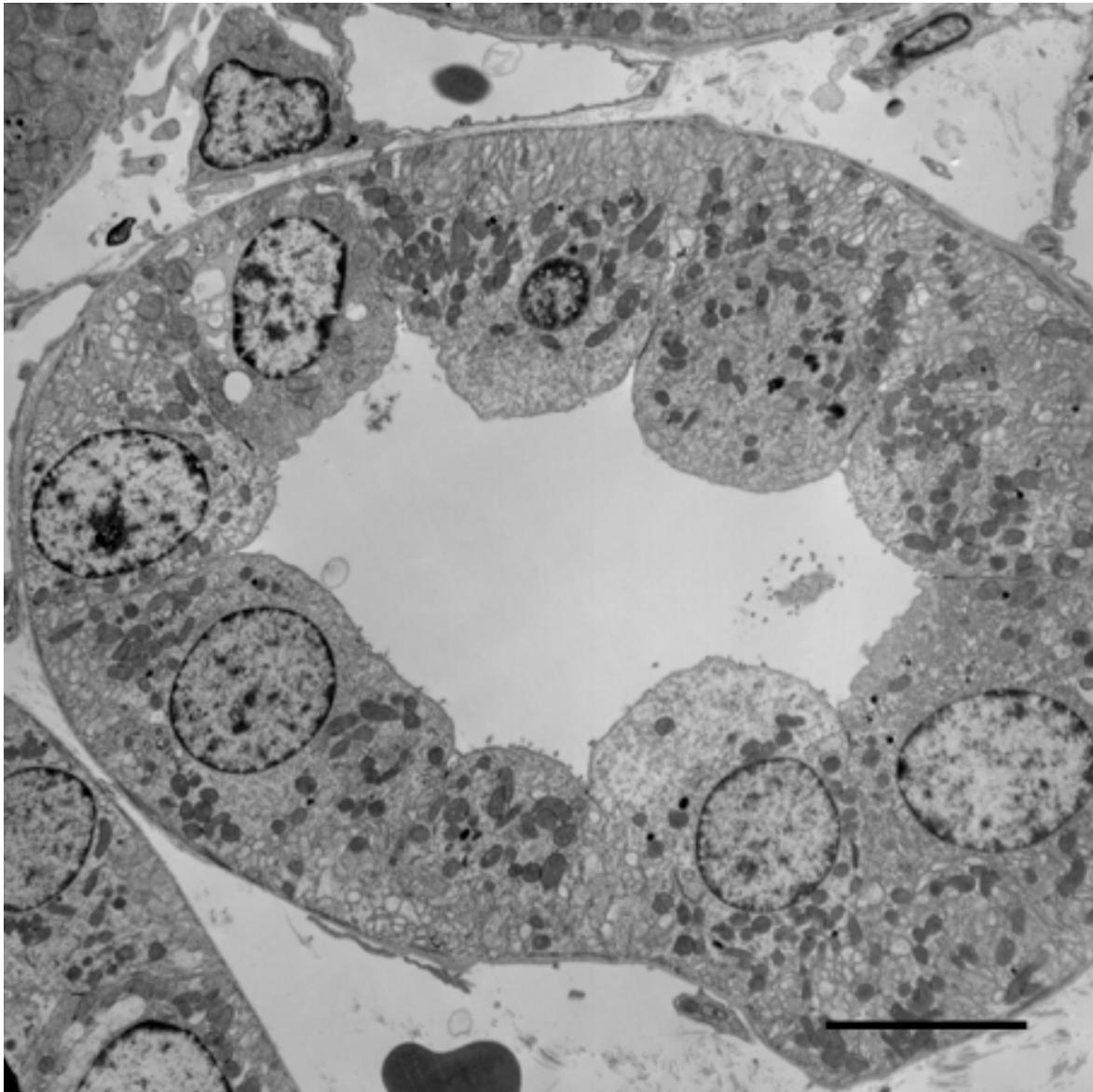


**Figura 23-** Ultra estrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 30 dias. Presença de mitocôndrias edemacias (Mi) e fatura mitocondrial (Fi). Barra = 1,0 µm. (12.500X)

Finalmente, aos 60 dias de intoxicação, observou-se grandes inclusões nucleares, devido ao longo tempo de exposição ao metal (Figura 24). Em muitos túbulos contorcidos proximais renais, a bordadura em escova quase não estava mais presente, apresentando-se muito diminuída (Figura 25).



**Figura 24-** Ultra estrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 60 dias. Presença de grandes inclusões nucleares (In). Barra = 1,98  $\mu\text{m}$ . (6.300X)



**Figura 25-** Ultra estrutura dos túbulos contorcidos proximais renais de um rato intoxicado por chumbo durante 60 dias. Nota-se a grande diminuição da bordadura em escova (Bd). Barra = 7,8  $\mu\text{m}$ . (1.600X)

#### 4.4 Análise de Textura

A área dos núcleos dos túbulos contorcidos proximais renais aumentou durante a intoxicação por chumbo (Figura 26)

ANOVA revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação ao segundo momento angular dos graus de cinza da matrix de co-ocorrência Haralik ( $p=0,00562$ ). Não houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos de 8 e 15 dias de intoxicação. Entre os grupos de 15 e 30 dias de intoxicação observou-se uma diminuição dessa variável. A partir dos 30 dias de intoxicação não houve mudanças significativas (Figura 27)

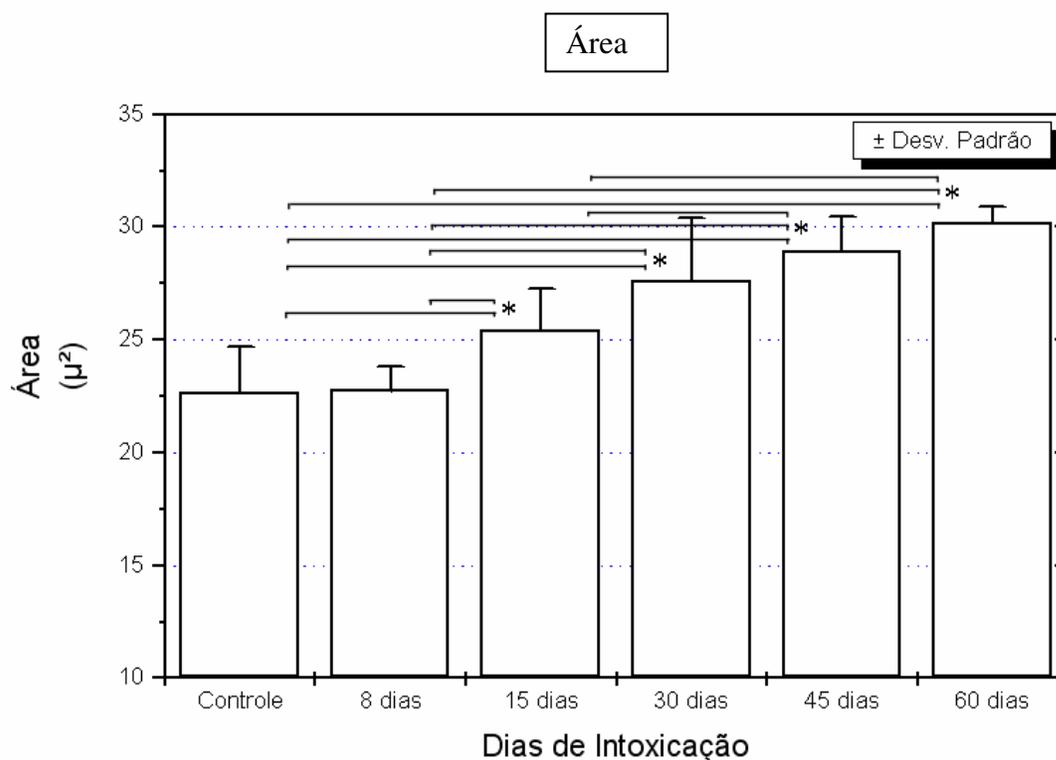
Analisando-se os valores para a variável entropia, observou-se alterações significativas entre os grupos. Um aumento foi detectado entre os grupos com 15 e 30 dias de intoxicação. Antes e depois desses períodos de intoxicação não houve alterações significativas (Figura 28).

ANOVA mostrou diferenças significativas na dimensão fractal ( $p=0,00234$ ). Não houve alterações significativas entre o grupo controle, oito e 15 dias de intoxicação, mas entre os grupos de 15 e 30 dias de intoxicação, a dimensão fractal mostrou-se muito elevada, mas sem alterações significativas entre o segundo grupo citado (Figura 29).

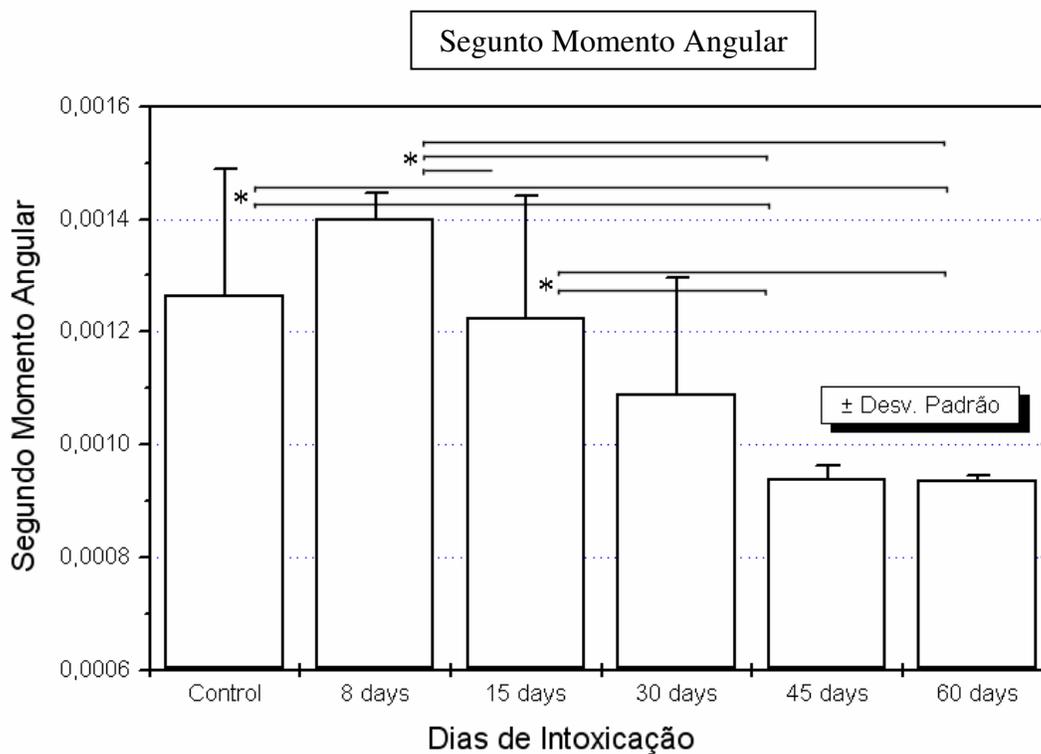
Foi demonstrado, usando ANOVA, que há diferenças significativas entre os grupos para os valores de energia em todas as faixas de frequência examinadas. No estudo em questão, os valores de energia indicaram um padrão mais contrastado e repetitivo nas imagens microscópicas. Para a faixa de frequência 1 (Range 1), houve perda de energia considerável no grupo de 45 dias de intoxicação e 60 dias de intoxicação. Entre os grupos com oito, 15 e 30 dias de intoxicação não foram encontrados diferenças significativas (Figura 30).

Valores de energia na faixa de frequência 2 (Range 2) demonstraram uma tendência oposta: aumentaram com o tempo de intoxicação. O primeiro aumento significativo foi visto no grupo de 15 dias de intoxicação e o segundo depois de 45 dias de intoxicação (Figura 31).

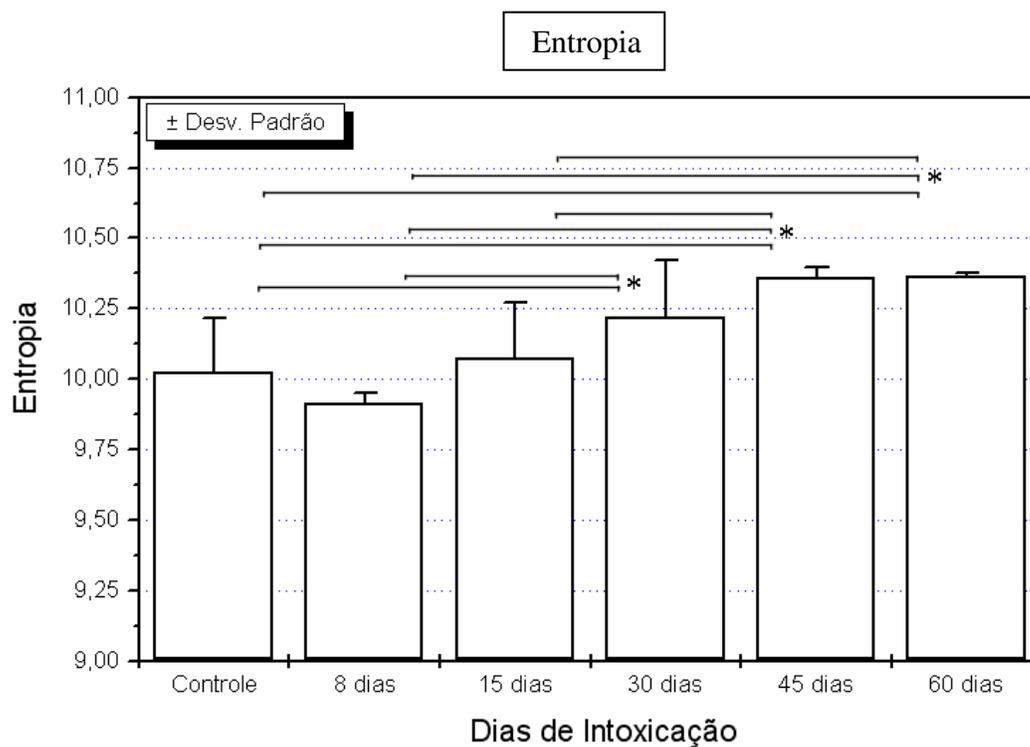
Uma tendência similar foi observada para os valores de energia nas faixas de frequência 3 (Range 3) (Figura 32) até a faixa de frequência 11 (Range 11) (Figura 33). O grupo controle, oito e 15 dias de intoxicação demonstraram baixos valores de energia sem diferenças significativas detectáveis entre eles, então, após 30 dias de intoxicação, os valores de energia tiveram um aumento significativo e se mantiveram em um nível elevado.



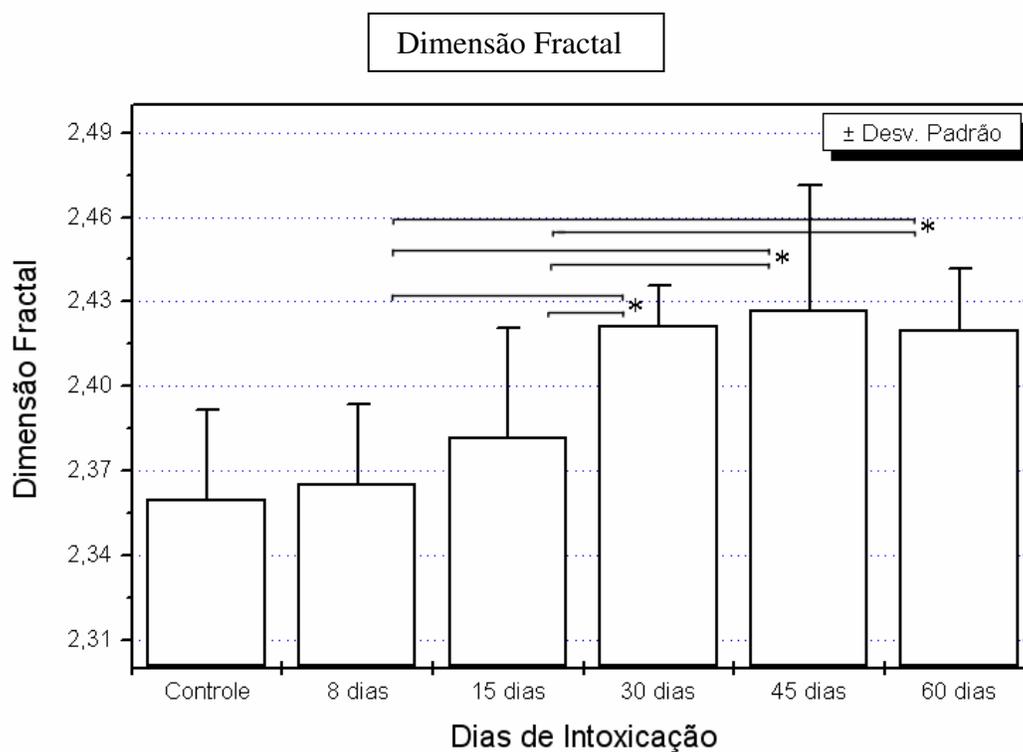
**Figura 26-** Área dos núcleos das células dos túbulos contorcidos proximais renais. Há diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação à área. Houve um aumento significativo dessa variável entre os grupos. \* =  $p < 0,05$ .



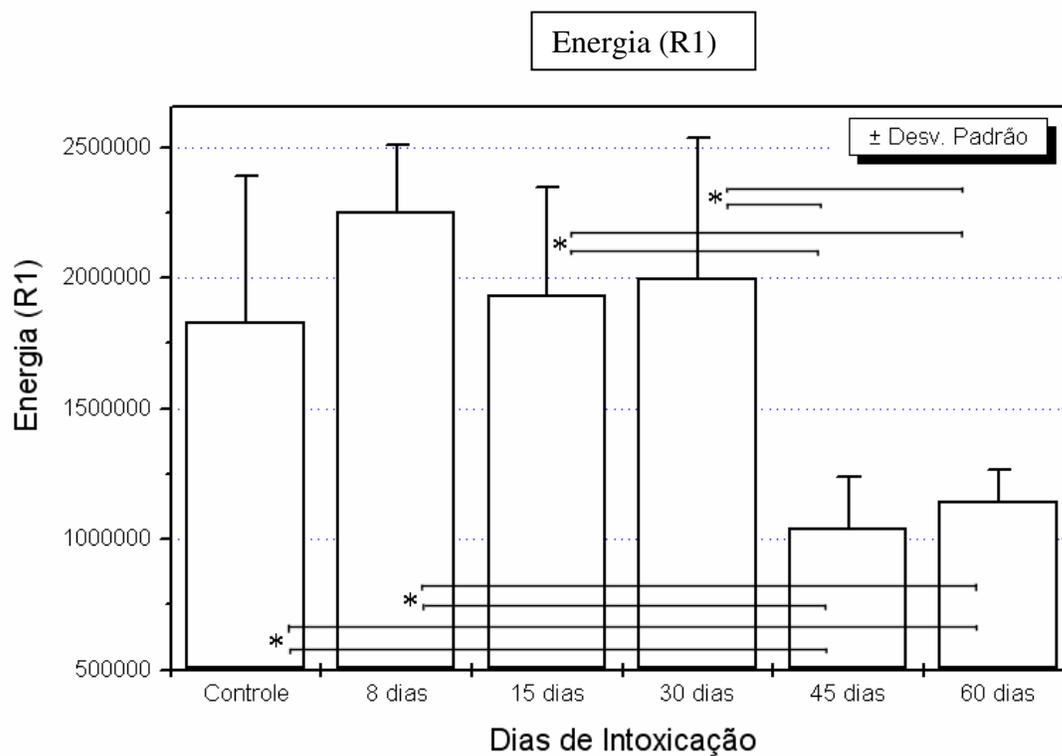
**Figura 27-** Segundo Momento Angular. Há diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação ao segundo momento angular dos graus de cinza da matrix de co-ocorrência Haralik. Não houve diferenças significativa entre o grupo controle e os grupos com oito e 15 dias de intoxicação. Houve uma diminuição significativa dessa variável entre os grupos com 15 e 30 dias de intoxicação. \* =  $p < 0,05$ .



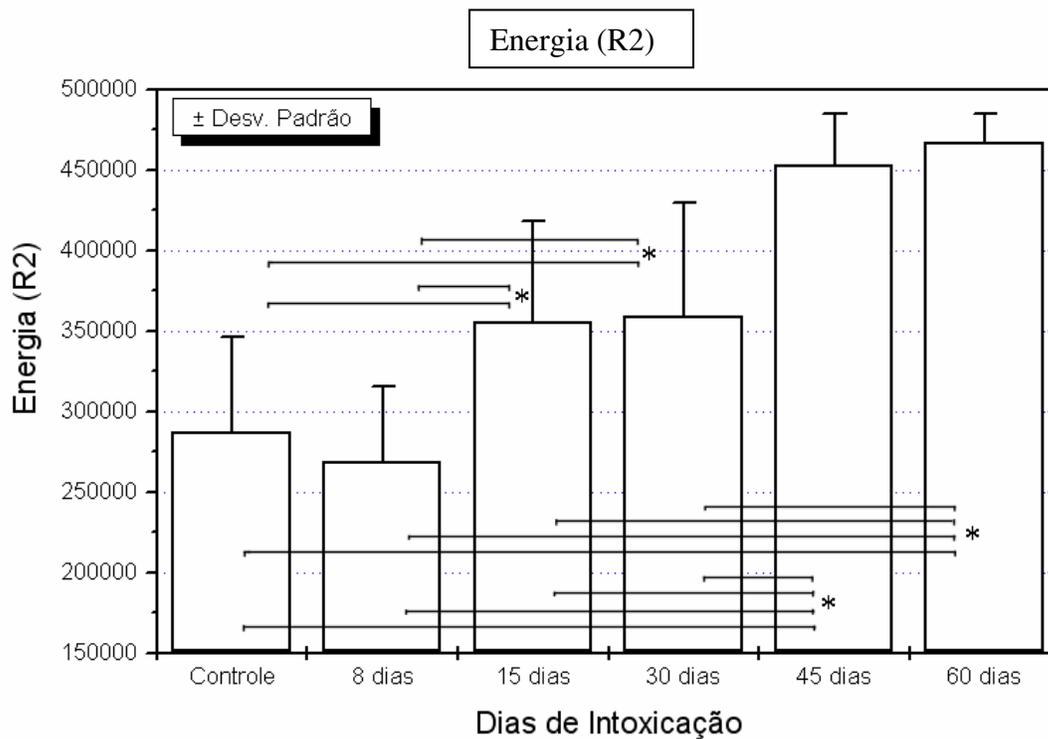
**Figura 28-** Entropia da matrix de co-ocorrência Haralick Há um aumento significativo da entropia entre os grupos com 15 e 30 dias de intoxicação. Não houve diferença entre o grupo controle e os grupos com oito e 15 dias de intoxicação ou entre os grupos com 30, 45 e 60 dias de intoxicação. \* =  $p < 0,05$ .



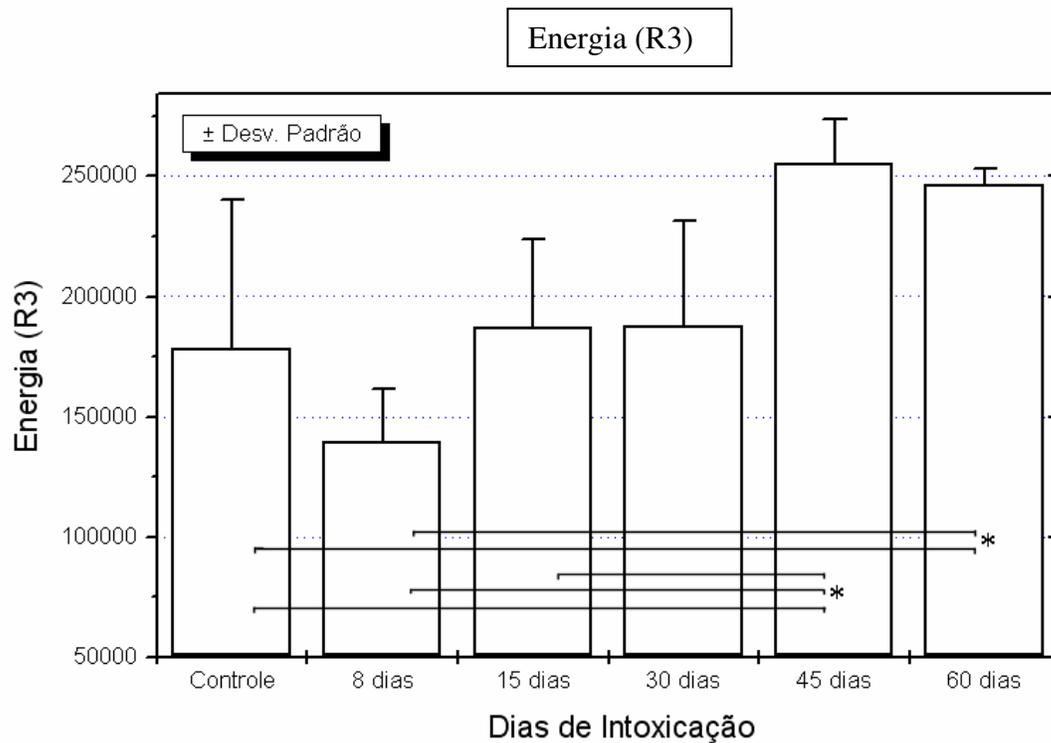
**Figura 29-** Dimensão Fractal. Há um aumento significativo na dimensão fractal entre os grupos com 15 e 30 dias de intoxicação. Não há diferença entre os grupos controle, oito e 15 dias de intoxicação ou entre os casos dos grupos com 30, 45 e 60 dias de intoxicação. \* =  $p < 0,05$ .



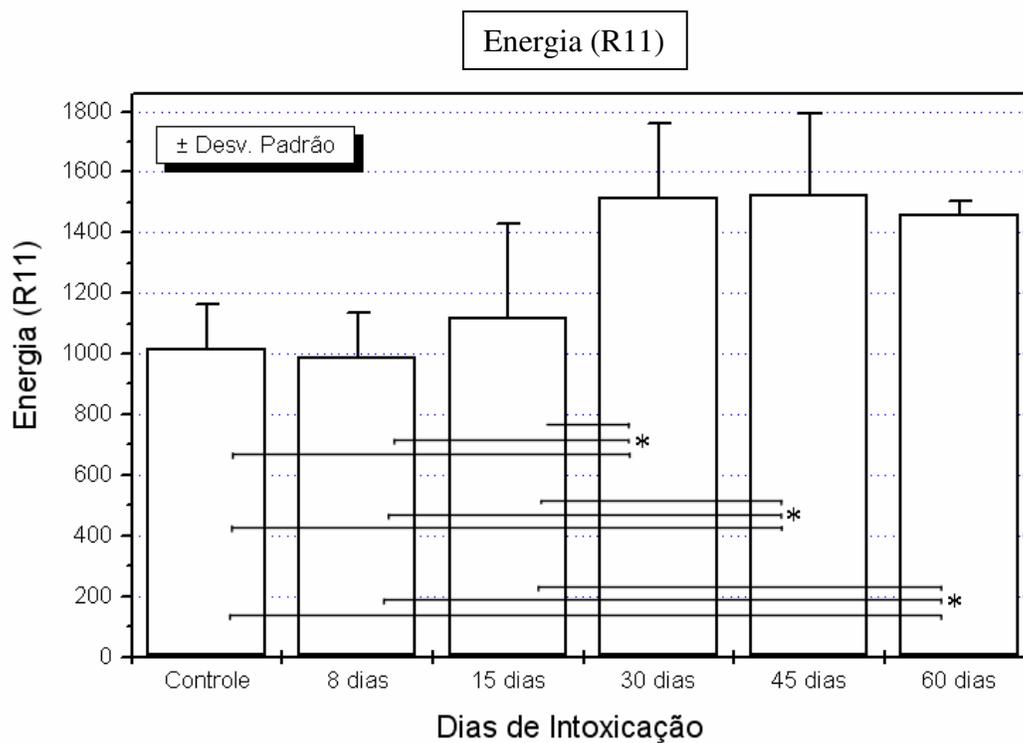
**Figura 30-** Energia das imagens FFT, faixa de frequência 1 (R1). Há uma diminuição significativa de energia entre os grupos com 30 e 45 dias de intoxicação. Não houve diferenças entre os grupos controle e os grupos com oito e 15 ou 30 dias de intoxicação ou entre os casos dos grupos com 45 e 60 dias de intoxicação. \* =  $p < 0,05$ .



**Figura 31-** Energia das imagens FFT, faixa de frequência 2 (R2). Há aumento significativo de energia entre os grupos com oito e 15 e entre 30 e 45 dias de intoxicação. Não houve diferenças entre o grupo controle e os grupos com oito, 15 e 30 dias de intoxicação ou entre os grupos com 45 e 60 dias de intoxicação. \* =  $p < 0,05$ .



**Figura 32-** Energia das imagens FFT, faixa de frequência Range 3. Há aumento significativo de energia entre os grupos com 30 e 40 dias de intoxicação. Não houve diferenças entre o grupo controle e os grupos com oito, 15 e 30 dias de intoxicação ou entre os grupos com 45 e 60 dias de intoxicação. \* =  $p < 0,05$ .



**Figura 33-** Energia das imagens FFT, faixa de frequência Range 11. Há aumento significativo de energia entre os grupos com 15 e 30 dias de intoxicação. Não houve diferenças entre o grupo controle e os grupos com oito, 15 dias de intoxicações ou entre os grupos com 30, 45 e 60 dias de intoxicação. \* =  $p < 0,05$ .

## **5- DISCUSSÃO**

Segundo Cranfield (2003), o chumbo existente no ambiente pode ser introduzido no organismo através de inalação (ar atmosférico), ingestão (contaminação da água, alimentos e solo), bem como por via cutânea (compostos chumbo lipossolúveis).

A absorção do chumbo pelas vias citadas não depende unicamente de sua concentração e tempo de exposição mas, também, de fatores relacionados às propriedades físico-químicas do composto considerado e, ainda, de fatores intrínsecos ao indivíduo - idade, estado fisiológico, dos níveis de cálcio, magnésio, ferro, fósforo e vitamina D presentes na dieta (Lauwerys e Hoet 1993).

Após ser absorvido, o chumbo é distribuído pelo sangue aos diversos órgãos e sistemas. No sangue liga-se aos eritrócitos numa proporção superior a 90% e o mecanismo desta ligação não está perfeitamente definido, o mesmo ocorrendo em relação à sua transferência do sangue aos diversos tecidos

Na distribuição do chumbo no organismo, dois compartimentos são de fundamental importância: o chamado compartimento de permuta constituído pelo sangue e tecidos moles e o chamado compartimento de armazenamento, constituído principalmente pelos ossos. O teor total de chumbo no organismo humano normal oscila de 100 a 400 mg e aumenta com a idade (Larini, 1987).

O chumbo segue o movimento do cálcio no organismo, depositando-se nos ossos como fosfato de chumbo, sendo que até 94% do chumbo absorvido podem ser armazenados nesse local. A concentração do chumbo nos ossos varia de acordo com a idade e o tipo de osso. Este armazenamento ocorre na superfície inorgânica dos ossos, basicamente na matriz inorgânica óssea, formada pelos cristais de hidroxiapatita  $[Ca_3(PO_4)_2CaOH]$  (Mitchell et al., 1977).

O chumbo absorvido é excretado principalmente através da urina e fezes. A eliminação renal envolve um processo de filtração glomerular e transporte transtubular. É importante ressaltar que o teor de chumbo na urina não representa com fidelidade o grau de absorção e este fato é explicado em função de variações individuais tais como, por exemplo, alterações da função renal, quantidade de líquido ingerido e gravidade específica

da urina. Os rins excretam quantidades elevadas de chumbo somente quando a concentração sanguínea é elevada e uma correspondência entre o chumbo urinário e absorvido é encontrada somente para os compostos orgânicos. Todavia, a determinação do teor urinário de chumbo pode ser útil na indicação de exposição quando acompanhada de outros parâmetros mensuráveis (Costa, 1997; Lin et al., 2003).

A determinação do ALA-U tem sido proposta para o monitoramento da intoxicação por chumbo quando não se pode dosar diretamente o metal no sangue (Pb-S).

Caldeira et al. (2000), demonstraram que há uma boa correlação entre os valores de ALA-U e o de Pb-S e que concentração da ALA-U pode ser utilizada principalmente em indivíduos expostos ao metal, os quais que ainda não possuem Pb-S acima dos valores de referência e podem fornecer um diagnóstico precoce da intoxicação.

A toxicidade do chumbo se manifesta principalmente em quatro sistemas: gastrointestinal, renal, nervoso e hematopoiético, sendo esse último de grande importância no monitoramento biológico à exposição a este metal. O principal efeito do chumbo nesse sistema é a redução dos níveis do grupo prostético Heme, causado pela inibição de algumas enzimas utilizadas na síntese da hemoglobina, devido à ligação do chumbo à enzima ALA-D, causando o acúmulo do ALA no sangue e urina (Alessio e Foá, 1983; Atsdr, 1990; Landrigan, 1989; Paoliello et al., 1993).

Então, um fator importante é, talvez, o aumento contínuo do ácido delta-aminolevulínico (ALA), um precursor do grupamento Heme que se acumula durante a intoxicação por chumbo. A autooxidação do ácido delta-aminolevulínico gera espécies reativas de oxigênio, os quais contribuem para com os mecanismos mencionados acima (Hermes-lima et al., 1991).

A bordadura em escova das células do túbulo contorcido proximal renal é considerada o caminho pelo qual o chumbo chega ao interior celular, bem como a partir do lado basolateral através de transporte ativo com um íon livre. Esse processo pode envolver uma ligação à sítios de ligação não específicos na membrana, seguidos por internalização através de endocitose (Sivaprasad et al., 2004).

Uma vez que o chumbo tem uma forte afinidade com o grupo sulfidril, amino, carboxyl e grupos hidroxil de amino ácidos, é mais provável que todas as enzimas possam ser inativada pelo chumbo (Piomelli, 2002).

Especialmente enzimas ricas em grupos SH são muito sensíveis a essa toxina e, portanto, talvez essas enzimas que transportam íons com o  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e anidrase carbônica também são inibidas no rim (Patel et al., 2006)

Há evidência que a intoxicação por chumbo causa estresse oxidativo, o qual poderia aumentar a peroxidação de membranas lipídicas e diminuir a capacidade antioxidante (Sivaprasad et al., 2004)

Todos esses mecanismos explicam as importantes alterações morfológicas do citoplasma das células tubulares proximais renais, o encurtamento e a perda das microvilosidades e as invaginações basolaterais, bem como a perda da integridade de vesículas, edema mitocondrial e cristolise (Herak-Kramberger e Sabolic, 2001).

O dano morfológico ocorreu paralelamente à diminuição da capacidade da reabsorção de sódio e potássio, dos túbulos contorcidos proximais renais, nas primeiras 2 semanas de intoxicação.

Mudanças na fisiologia celular são freqüentemente acompanhadas por subitas alterações da arquitetura nuclear. Portanto incluiu-se métodos cariométricos neste estudo.

A quantificação das alterações dos núcleos podem ser feitas através de diferentes métodos como o simples procedimento de contagem de características nucleares ou das subestruturas dos mesmos e análise computadorizada da textura (Cia et al., 1999; Irazusta et al., 1998; Metze et al., 1999; Metze et al., 1999; Lorand-metze et al., 1998; Oliveira et al., 2001; Mello et al., 2008; Adam et al., 2008; Herreros et al., 2007; Auada et al., 2006; Rocha et al., 2008; Rocha et al., 2006; Adam et al., 2006; Kayser et al., 2007)

Esse último pode revelar mudanças da arquitetura nuclear as quais não podem ser vistas ou objetivadas por um observados humano. Uma vez que ainda não há um conceito unificador de textura, vários métodos para sua avaliação tem sido descritos como a mensuração das características obtidas a partir da matriz de co-ocorrências dos valores de

cinza (Mello et al., 2008; Adam et al., 2008; Herreros et al., 2007; Auada et al., 2006; Rocha et al., 2008; Rocha et al., 2006; Adam et al., 2006).

Toda essa variedade de técnicas produziram resultados semelhantes nesta investigação. Uma das principais constatações foi que mudanças na cromatina não puderam ser detectadas entre o grupo controle e o grupo após 8 dias de intoxicação o que, está de acordo com a microscopia eletrônica analisada. Por outro lado, alterações ultraestruturais do citoplasma, como perda da bordura em escova, e importantes alterações fisiopatológicas com a diminuição da reabsorção de sódio foram proeminentes.

Essas mudanças estavam presentes no 8º dia de intoxicação, mas nesse período experimental somente uma variável indicou mudanças na textura nuclear. Os valores de energia da faixa de frequência 2 (R2) das imagens FFT aumentaram, o que equivale a uma arquitetura da cromatina ligeiramente mais contrastada e grosseira. Esse achado não é uma surpresa, uma vez que foi recentemente demonstrado que os valores de energia para baixas faixas de frequência de imagens FFT podem ser mais sensíveis que variáveis derivadas da matriz de co-ocorrência dos níveis de cinza (Auada et al., 2006).

Analisando os achados morfológicos e patofisiológicos juntos pode-se postular que a intoxicação por chumbo afeta inicial e predominantemente as arquiteturas citoplasmáticas.

No 30º dia de intoxicação, os parâmetros fisiológicos em relação ao transporte de sódio se normalizaram.

A análise ultraestrutural revelou que a partir do 30º dia há danos persistentes na bordadura em escova. No entanto, vacuolização citoplasmática e o grau de alterações estruturais mitocondriais parecem ter diminuído progressivamente com o tempo. Duplicação mitocondrial através de fissão puderam ser vistas.

Neste estudo, inclusões intranucleares típicas, uma marca da intoxicação por chumbo, foi detectada pela primeira vez no 30º dia de intoxicação.

É evidente que a grande maioria as variáveis da textura nuclear tiveram mudanças significativas entre o 15º e o 30º dia de intoxicação. Uma diminuição do segundo momento angular e o aumento da entropia indicam um citoplasma mais irregular e mais contrastado (com mais áreas de alto contraste) devido a presença das inclusões nucleares com centro claro e periferia escura. Isso é confirmado pelo aumento dos valores de energia na faixa de frequência 3 (R3) até 11 (R11), que são equivalentes granularidades de tamanho pequeno e médio na cromatina. A partir do 30º dia até o fim do experimento, nenhuma outra mudança importante na textura nuclear foi observada.

No 45º e 60º dia de intoxicação, a reabsorção de sódio e potássio demonstraram um ligeiro aumento significativo quando comparado com os valores do grupo controle.

Esse achado foi inesperado, pois muitas células, do túbulo contorcido proximal renal, mostraram uma diminuição ou ausência da bordadura em escova nesse período experimental e alterações mitocondriais moderadas ainda eram presentes.

Assim, a questão se coloca: como pode a capacidade de reabsorção fisiológica de íons ser restaurada no 30º dia e até ser mais eficiente que no grupo com 45 e 60 dias de intoxicação?

As inclusões nucleares são compostas por um complexo chumbo-proteína e há uma forte evidência que essa formação atenua a toxicidade do chumbo, pois a inabilidade de sua formação aumenta demasiadamente a toxicidade renal do chumbo (Qu et al., 2002).

A primeira vista, este estudo parece estar de acordo com essa teoria, já que as inclusões nucleares puderam ser vistas a partir do 30º dia de intoxicação, justamente quando a capacidade de reabsorção proximal foi normalizada.

É difícil, no momento, explicações mais detalhadas sem ser de caráter especulativo. A fim de garantir a capacidade de transporte de íons, tem-se que, no mínimo, normalizar a suprimento de energia e o número de transportadores de íons nas túbulos contorcidos proximais renais.

Hipertrofia tubular e hiperplasia têm sido descritas como consequência dos danos ao túbulo contorcido proximal renais (Wolf, 1999; Wolf, 1995; Jarrar, 2003).

Grandes áreas com necrose tubular aguda não foram observadas após o 8º ou 15º dia de intoxicação, nem a excreção de sódio foi compatível com essa situação fisiopatológica.

Contudo, perda de células individuais no interior da luz tubular indica necrose celular isolada. Então pode-se esperar que haja uma hipertrofia regenerativa tubular compensatória, no mínimo focal. Mas esse fenômeno não explicaria a normalização da manipulação de sódio depois de 30 dias de intoxicação por chumbo e o aumento da reabsorção de sódio a partir do 45º dia. Com a continuidade da intoxicação durante o experimento, estas células recém-formadas devem ser mais resistentes à intoxicação por chumbo.

Há evidência de uma relação recíproca entre o nível de eficiência da atividade renal mitocondrial e manipulação tubular do íon sódio (Bento et al., 2007).

Essas mitocôndrias poderiam, talvez, ser mais resistentes à intoxicação por chumbo, acompanhada pelo aumento dos níveis de ALA.

Assim, o comprometimento da função mitocondrial pode ter contribuído para a diminuição da reabsorção de sódio durante as 2 primeiras semanas de intoxicação por chumbo em nosso experimento, mas ao final do mesmo, o suprimento de energia mitocondrial deve ter sido suficiente para manter o aumento da reabsorção de sódio.

Análises ultraestruturais revelaram duplicação mitocondrial a partir do 8º dia de intoxicação. Esse achado é indicativo da geração de novas mitocôndrias, um fenômeno o qual tem sido descrito em outros tipos de intoxicação, como por exemplo, no excesso de íons de cobre (Kaduk et al., 1980).

Dois grupos de pesquisa demonstraram que uma única dose de chumbo provoca, dentro de 24 horas, redução da excreção de sódio que dure no mínimo 24 horas e então volta para o nível basal depois de 72 horas (Huguet et al., 1982; Vargas et al., 2003).

Vargas et al. (2003) demonstraram que uma única injeção de chumbo produz um aumento na atividade da heme oxigenase (HO-1) nos rins de ratos, aumentando em 12 vezes sua atividade. HO-1 é considerada uma proteína de estresse do tipo das proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins - HSPs). Ela é ativada por estresse oxidativo como parte de um mecanismo agudo de defesa como diferentes estímulos de estresse. Sua ação não é muito bem conhecida, mas pode causar uma produção aumentada de biliverdinas e bilirrubina, que atuam como metabólitos antioxidantes, neutralizando os radicais reativos de oxigênio e inibindo a peroxidação lipídica.

Por isso, podemos hipotetizar que os efeitos renais na intoxicação por chumbo sejam mediados através da indução de HO-1 ou outros antioxidantes.

Embora este experimento tenha se baseado em intoxicação crônica por chumbo e embora a diminuição da excreção de sódio foi notada pela primeira vez após seis semanas, não é possível excluir que um mecanismo patofisiológico similar tenha participado, desde que altos níveis de enzimas antioxidantes eritrocitárias tenham sido descritas em pacientes com intoxicação crônica por chumbo (Hermes-lima et al., 1991).

O aumento da capacidade de reabsorção de sódio no túbulo contorcido proximal renal após seis semanas de intoxicação crônica por chumbo não é totalmente compreendido até o momento e requer investigação mais aprofundada.

## **6- CONCLUSÃO**

Pode-se concluir a partir dos resultados obtidos no presente estudo:

- 1- O transporte de sódio sofre alterações no início da intoxicação por chumbo que ocorrem em paralelo com alterações ultraestruturais no citoplasma dos túbulos contorcidos proximais renais. Os núcleos parecem inicialmente inalterados, mesmo com alterações citoplasmáticas evidentes.
- 2- Inclusões nucleares parecem exercer um efeito protetor nos túbulos contorcidos proximais renais, já que com o início de sua formação, aos 30 dias de intoxicação, houve uma recuperação da fisiologia renal normal dos ratos mesmo com alterações citoplasmáticas ainda persistentes.
- 3- Assim como as inclusões nucleares de chumbo, regeneração mitocondrial, o aumento de produção de proteínas anti-oxidantes podem estar envolvidas no mecanismo de recuperação da fisiologia renal, durante a intoxicação por chumbo.

## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adam, RL; Leite, NJ; Metze, K. Spectral analysis using discrete Fourier Transformation for the study of nuclei: software design and application on cardiomyocytes during physiological development. *Analytical Cellular Pathology* 2001;22: 64 – 5.

Adam, RL Análise espectral usando a Transformada de Fourier Discreta para o estudo de núcleos celulares: Elaboração de Programa e aplicação no desenvolvimento do coração. (Dissertação – Mestrado) Campinas, SP – Universidade Estadual de Campinas, 2002.

Adam, RL; Ribeiro, E; Metze, K; Leite, NJ; Lorand-metze, I. Morphometric and granulometric features of erythroblasts as a diagnostic tool of hematologic diseases. *Cytometry* 2004a; 59 (1): 46.

Adam, RL; Leite, NJ; Carvalho, RB; Silva, PV; Metze, K. Granulometric Residues as a diagnostic tool in cytology. *Cytometry* 2004b;59 (1): 63.

Adam, RL; Corsini, TCG; Silva, PV; Cintra, ML; Leite, NJ; Metze, K. Fractal dimensions applied to thick contour detection and residues – comparison of keloids and hypertrophic scars. *Cytometry* 2004c;59 (1): 63-4.

Adam, RL; Silva, RC; Pereira, FG; Leite NJ; Lorande-metze I; Metze K. The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Cell Oncol* 2006; 28: 55-59.

Alessio, L; FOá, V. Lead. *In: Human Biological Monitoring of Industrial Series*. Bruxelas: Comission of European Community, 1983. pp. 15-54.

Auada, MP; Adam, RL; Leite, NJ; Puzzi, MB; Cintra, ML; Rizzo, WB et al Texture analysis of the epidermis based on fast Fourier transformation in Sjögren-Larsson syndrome. *Anal Quant Cytol Histol* 2006;28: 219-227.

Adam, RL; Leite, NJ; Metze, K. Image Preprocessing Improves Fourier-Based Texture Analysis of Nuclear Chromatin. *Anal Quant Cytol Histol* 2008;30: 175 – 184.

Bedin, V. Parâmetros de textura de cromatina como fator prognóstico em carcinoma basocelular. (Dissertação – Mestrado) Campinas, SP – Universidade Estadual de Campinas, 2004.

Bento, LMA; Fagian, MM; Vercesi, AE; Gontijo, JA. Effects of NH<sub>4</sub>Cl-induced systemic metabolic acidosis on kidney mitochondrial coupling and calcium transport in rats Nephrol Dial Transplant 2007;22: 2817–2823.

Boer, PA; Morelli, J; Figueiredo, JF; Gontijo, JAR. Altered renal sodium handling in young spontaneously hypertensive rats (SHR): Role of renal nerves. Life Sciences 2005;76: 1805-1815.

Caldeira, C; Mattos, RCOC; Meyer, A; Moreira, JC. Limites de aplicabilidade da determinação do ácido delta-aminolevulínico urinário como teste screening na avaliação da intoxicação profissional pelo chumbo. Cad Saúde Pública 2000;16: 225-230.

Cezard, C; Maguenoer, JM. Toxicologie du plomb chez l'homme. Paris: Lavoisier Tec. & Doc; 1992. 331 p.

Christopher, MM; HOTZ, CS. Cytologic diagnosis: expression of probability by clinical pathologists. Vet Clin Pathology 2004;33(2): 84-95.

Cia, EMM; Trevisan, M; Metze, K. Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) technique: a helpful tool for differential diagnosis in urinary cytology. Cytopathology 1999;10: 30-39.

Cordeiro, R; Lima-Filho, EC. A inadequação dos valores dos limites de tolerância biológica para a prevenção da intoxicação profissional pelo chumbo no Brasil. Cad Saúde Pública 1995;11(2): 177-186.

Cordeiro, R; Lima-Filho, EC; Salgado, PET. Readjustment of the biological exposure limit applied to blood lead levels in Brazil. Cad Saúde Pública 1996;12(4): 455-463.

Costa, CA. Envolvimento do ácido 5-aminolevulínico como espécie pro-oxidante no plumbismo e envelhecimento. (Dissertação (Doutorado) São Paulo, SP – Universidade de São Paulo. São Paulo, 1997.

Cranfield 2003. Ipcs environmental health criteria 165: inorganic lead. 2003. 152-191 p.

Cremer, T; Albiez, H; Bolzer, A; Kohler, D; Kupper, K; Stefan, M. et al. From chromosome territories to a functional nuclear architecture. *Cellular Oncology* 2005;27: 105–6.

Cross, EM; Chaffin, WW. Use of the Binomial Theorem in interpreting results of multiple tests of significance. *Educational and Psychological Measurements* 1982;42(1): 25-34.

Gidlow, DA. Lead Toxicity. *Occup Med* 2004;54: 76-81.

Gilbert, N. Chromatin architecture of the human genome. *Cellular Oncology* 2005;27: 106–7.

Haralick, RM; Shanmugan, K; Dinstein, I. Texture features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 1973;3: 610-21.

Herak-Kramberger, CM; Sabolic, I. The integrity of renal cortical brush-border and basolateral membrane vesicles is damaged in vitro by nephrotoxic heavy metals. *Toxicology* 2001;156: 139–147.

Hermes-Lima, M; Valle, VG; Vercesi, AE, Bechara, EJ. Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim Biophys Acta* 1991;1056 :57-63.

Herreros, FO; Cintra, ML; Adam, RL, de Moraes, AM; Metze, K. Remodeling of the human dermis after application of salicylate silanol. *Arch Dermatol Res* 2007;299: 41-45.

Hoffman, DJ et al. *Handbook of Ecotoxicology*. London: Lewis Publishers. 1995. 755 p.

Hsu, KH; Yu, CC. Environmental lead exposure and progressive renal insufficiency. *Arch Int Med* 2001;161: 264-271.

Huguet, JM; Braun, JP; Burgat-Sacaze, V; Bernard, P; Rico, AG. Acute kidney disturbances by lead acetate in the rat. *Toxicol Lett* 1982;10(4):395-398.

Irazusta, SP; Vassalo, J; Magna, LA; Metze K; Trevisan, M. The value of PCNA and AgNOR staining in endoscopic biopsies of gastric mucosa. *Pathology Research and Practice* 1998;194: 33-39.

Jarrar, BM. Histological and histochemical alterations in the kidney induced by lead. *Ann Saudi Med* 2003;23:10-15.

Kaduk, B; Metze, K; Schmidt, PF; Brandt, G. Secondary atrophic cardiomyopathy--heart damage due to Wilson's disease. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1980;387:67-80.

Kayser, K; Kayser, G; Metze, K. The concept of structural entropy in tissue-based diagnosis. *Anal Quant Cytol Histol* 2007;29: 296-308.

Landrigan, PJ. Toxicity of lead at low dose. *Br J Ind Med* 1989;46(9):593-596.

Larini, L. *Toxicologia*. 3. ed. São Paulo: Editora Manole, 1997. 301 p.

Lauwerys, R; Hoet, P. *Industrial Chemical Exposure-Guidelines for Biological Monitoring*, 2. ed. Boca Raton: Davis - Biochemical Publications, 1993. 323 p.

Lavicoli, L; Carelli, G; Stanek, EJ; Castellino, N; Calabrese, EJ. Effects of lead acetate administration on mouse hepatocyte survival. *Toxicology Lett* 2002;129 (1-2): 143-149.

Lin, JL; Tan, DT; Hsu, KH; Yu, CC. Environmental lead exposure and progression of chronic renal diseases in patients without diabetes. *N Engl J Med* 2003;348:277-286.

Lorand-Metze, I; Carvalho, MA; Metze, K., Relationship between morphometric analysis of nucleolar organizer regions and cell proliferation in acute leukemias. *Cytometry* 1998;32: 51-56.

Lovenber, W. Animal models for hypertension research. *Prog Clin Biol Res* 1967;229: 225-240.

Mello, MRB; Metze, K; ADAM, RL; Pereira, FG; Magalhães, MG; Machado, CG et al. Phenotypic Subtypes of Acute Lymphoblastic Leukemia Associated with Different Nuclear Chromatin. Texture. *Anal Quant Cytol Histol* 2008;30: 92-98.

Metze, K; Chiari, AC; Andrade, FL; Lorand-Metze, I. . Changes in AgNOR configurations during the evolution and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hemato Cell Ther* 1999;41: 205-210.

Metze, K; Lobo, AM; Lorand-Metze, I. Nucleolus organizer regions (AgNORs) and total tumor mass are independent prognostic parameters for treatment-free period in chronic lymphocytic leukemia. *International Journal of Cancer* 2000;89: 440-443.

Metze, K; Adam, RL; Leite, NJ. Are higher order estimates of Shannon's entropy important for image analysis? *Analytical Cellular Pathology* 2002a;24:194.

Metze, K; Gomes Neto, A; Adam, RL; Gomes, AA; Leite, NJ; Souza, EM et al. Texture of dermal elastotic tissue in patients with different phototypes. *Analytical Cellular Pathology* 2002b;24: 196.

Metze, K; Adam, RL; Silva, PV; Carvalho, RB; Leite, NJ. Analysis of chromatin texture by pinkus' approximate entropy. *Cytometry* 2004;59(1): 63.

Metze, K; Adam, RL. Quantification in histopathology - some pitfalls. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2005;38: 141-3.

Metze, K; Bedin, V; Adam, RL, Cintra, ML; Souza, EM; Leite, NJ. Parameters derived from the Fast Fourier Transform are predictive for the recurrence of basal cell carcinoma. *Cellular Oncology* 2005a; 27: 137.

Metze, K; Piazza, AC; Iaza, AA; Adam, RL, Leite, NJ. Texture analysis of AgNOR stained nuclei in lung cancer. *Cellular Oncology* 2005b;27: 137-8.

Metze, K; Silva, RC; Adam, RL; Leite, NJ; Pereira, FG; Lorand-Metze, I. Relation between chromatin texture and phenotype in acute leukemias. *Cellular Oncology* 2005c;27: 112-3.

Misteli, T. Fundamental principles of nuclear architecture in cancer. *Cellular Oncology* 2005;27: 107.

Mitchell, RA; Drake, JE; Wittlin, LA; Rejent, T. A. Erythrocyte porphobilinogen synthase (Delta-aminolaevulinic dehydratase) activity: a reliable and quantitative indicator of lead exposure in humans. *Clin Chem* 1977;23: 105-111.

Oga S. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu. 1996.

Oliveira, GB; Pereira, FG; Metze, K; Lorand-Metze, I. Spontaneous apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and its relationship to clinical and cell kinetic parameters. *Cytometry* 2001;46: 329-335.

ONUKEI, J. Lesões em DNA promovidas por ácido 5-aminolevulínico: uma proposta de bases moleculares para hepatomas associados a porfirinopatias. (Dissertação - Doutorado) São Paulo, SP - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.

Orr, JA; Maxwell, P; Diamond, J; Hamilton, PW. Histone acetylation induces chromatin reorganization and altered gene expression in prostate neoplasia. *Cellular Oncology* 2005;27:107-8.

Patel, M; Rogers, JT; Pane, EF; Wood, CM. Wood Renal responses to acute lead waterborne exposure in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquatic Toxicology* 2006;80: 362-371.

Piomelli, S. Childhood lead poisoning. *Pediatr Clin N Am* 2002;49: 1285-1304.

Qu, W; Diwan, W; Liu, J; Goyer, RA; Dawson, T; Horton, JL et al. The Metallothionein-Null Phenotype Is Associated with Heightened Sensitivity to Lead Toxicity and an Inability to form Inclusion Bodies. *Am J Pathol* 2002;160:1047-1056.

Rocha, LB; Adam, RL; Leite, NJ; Metze, K; Rossi, MA. Biomineralization of polyanionic collagen-elastin matrices during calvarial bone repair. *J Biomed Mater Res A* 2006;79: 237-245.

Rocha, LB; Adam, RL; Leite, NJ; Metze, K; Rossi, MA. Shannon's entropy and fractal dimension provide an objective account of bone tissue organization during calvarial bone regeneration. *Microsc Res Tech*, 2008.

Sen, D; Wolfson, H; Dilworth, M. Lead exposure scaffolders during refurbishment construction activity – an observational study. *Occup Med (London)* 2002;52: 49-54.

Sithisarankul, P; Schwarts, BS; Lee, BK; Strickland, PT. Urinary 5-aminolevulinic acid (ALA) adjusted by creatinine: a surrogate for plasma ALA? *Occupational Environment Medicine* 1998;10 (40):901-906.

Sivaprasad, TR; Malarkordi, SP; Varalakshmi, MP. Therapeutic efficacy of lipoic acid in combination with dimercaptosuccinic acid against lead-induced renal tubular defects and on isolated brush-border enzyme activities. *Chem Biol Interact* 2004;147: 259-271.

Theodridis, S; Koutroumbas, K. *Pattern Recognition*. 3. ed. USA: Elsevier, 2006. 837 p.

Tomokuni, K; Ogata, M. Simple method for determination of urinary d-aminolevulinic acid as an index of lead exposure. *Clin Chem* 1972;18:1531-1536.

Tomokuni, K; Ichiba, M; Fujishiro, K. Interrelation between urinary delta-aminolevulinic acid (ALA), serum ALA, and blood lead in workers exposed to lead. *Ind Health* 1993;31(2):51-57.

Vargas, H; Castilho, C; Posadas, F; Escalante, B. Acute lead exposure induces renal haeme oxygenase-1 and decreases urinary  $\text{Na}^+$  excretion. *Hum Exp Toxicol* 2003;22(5):237-244.

Vyskocil, A; Fiala, Z; Ettlerova, E; Tejnorova, I. Influence of chronic lead exposure on hormone levels and organ weights in developing rats. *Sb Ved Pr Lek Fak* 1991;34(3): 275-285.

Vyskocil, A; Semecky, V; Fiala, Z; Cizkova, M; Viau, C. Renal alterations in female rats following subchronic lead exposure. *Appl Toxicology* 1995;15(4):257-262.

Wedeen, RP; Maesaka, JK; Weiner, B; Lipat, GA; Lyons, MM; Vitale, LF et al. Occupational lead nephropathy. *Am J Med* 1975;59:630-641.

Weil, E. *Éléments de Toxicologie Industrielle*. Paris: Masson et Cie, 1975.

Wolf, G. Cellular mechanisms of tubule hypertrophy and hyperplasia in renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 1995;21: 303-316.

Wolf, G. Molecular mechanisms of renal hypertrophy: role of p27Kip1. *Kidney Int* 1999;56:1262-1265.