



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Efeito dos trihalometanos em parâmetros fisiológicos de *Mus musculus* da estirpe ICR

Dissertação de mestrado elaborada por

Clarisse Rodrigues de Sousa Diniz

Sob Orientação

Prof. Doutora Paula Oliveira e Prof. Doutora Aura Colaço

Vila Real, 2010



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Efeito dos trihalometanos em parâmetros fisiológicos de *Mus musculus* da estirpe ICR

Dissertação de mestrado em Biologia Clínica Laboratorial, submetida à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, para o cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Biologia, elaborada sob a orientação das Professoras Doutoras Paula A. Oliveira e Aura Colaço

Orientadores:

Prof. Doutora Paula A. Oliveira
Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Prof. Doutora Aura Colaço
Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Agradecimentos

A presente dissertação é o culminar de um ano de trabalho executado com dedicação e esforço. Este trabalho não teria sido possível sem a contribuição, directa ou indirecta, de várias pessoas e instituições. Assim sendo, expresso o meu profundo agradecimento:

Ao **Prof. Doutor António Fontainhas Fernandes** e à **Prof. Doutora Ana Sampaio**, na qualidade de anterior e actual director(a) do Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial.

À **Prof. Doutora Paula Oliveira**, orientadora desta dissertação, em primeiro lugar por ter aceite sê-lo. Agradeço os preciosos ensinamentos, a total disponibilidade, ajuda e encorajamento. Agradeço sobretudo o facto de me ter inculcido o seu espírito crítico, prático e optimista de encarar toda e qualquer contrariedade que, naturalmente, possa surgir em investigação, estimulando assim o meu interesse pelo conhecimento.

À **Prof. Doutora Aura Colaço**, co-orientadora desta dissertação por todo o apoio, ajuda e prontidão com que efectuou a revisão crítica deste trabalho.

Ao **Prof. Doutor Francisco Peixoto** por toda a ajuda, não só no desempenho das técnicas laboratoriais do estudo bioenergético mas também pela forma incansável e rigorosa com que me auxiliou na interpretação dos resultados obtidos. O meu sincero obrigado por todos os ensinamentos e recomendação bibliográfica.

À **Prof. Doutora Maria João Pires** pela ajuda na interpretação dos resultados bioquímicos e pela bibliografia fornecida.

À **Prof. Doutora Maria dos Anjos Pires**, na qualidade de responsável pelo Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica pela disponibilização do mesmo para execução das técnicas histológicas.

À **Técnica de Anatomia Patológica Lígia Bento** pela preciosa ajuda no processamento do material e na realização dos cortes histológicos e colorações histoquímicas.

Ao **Diogo Rodrigues** pela ajuda na manutenção dos animais durante todo o ensaio experimental.

À Mestre **Regina Arantes** pela partilha de experiências, pelos bons conselhos e pela amizade e paciência com que ouviu os meus desabafos. O meu sincero obrigado.

Ao **Sérgio** pelo incentivo, pela atenção incondicional e, principalmente, por me ter dado todas as condições para que me pudesse dedicar com mais afinco a este projecto em alturas de maior volume de trabalho, em detrimento do seu tempo de lazer.

Aos meus pais, **Delfina** e **Francisco** por tudo o que me deram e dão, sem eles não seria a pessoa que sou hoje e certamente, não chegaria até aqui.

À minha irmã **Mariana** por ouvir os meus desabafos passando ela pela mesma fase.

Índice

Agradecimentos	III
Índice	IV
Índice de figuras	VI
Índice de quadros	VII
Índice de abreviaturas	VIII
Resumo	IX
Abstract	X
1. Introdução	1
1.1. Origem dos trihalometanos	1
1.2. Bromodiclorometano	2
1.3. Dibromoclorometano	3
1.4. O Murganho como animal de laboratório	3
1.5. O fígado	6
1.6. A mitocôndria	7
1.6.1. A estrutura mitocondrial	7
1.6.2. As principais vias metabólicas da mitocôndria	8
1.6.3. A mitocôndria como modelo para o estudo da toxicidade	10
2. Objectivos	11
3. Materiais e métodos	12
3.1. Animais	12
3.2. Compostos químicos	12
3.3. Desenho experimental	13
3.4. Recolha de amostras biológicas	14
3.5. Estudo dos parâmetros bioquímicos	14
3.6. Estudo histopatológico	15
3.6.1. Metodologias comuns anteriores à coloração das amostras	16
3.6.2. Coloração pela hematoxilina-eosina	16
3.6.3. Coloração pela reticulina	16
3.6.4. Coloração pelo tricrómio de Masson	18
3.6.5. Classificação histológica	18
3.7. Estudo bioenergético	19
3.7.1. Isolamento das mitocôndrias do fígado	19

3.7.2. Quantificação da proteína – método do biureto	20
3.7.3. Determinação da actividade respiratória	20
3.7.4. Determinação do índice de controlo respiratório	21
3.7.5. Determinação do potencial transmembranar mitocondrial	21
3.7.6. Estudo do comportamento osmótico das mitocôndrias - permeabilidade aos protões	23
3.7.7. Análise de diversos mecanismos antioxidantes em fracções mitocondriais – determinação da actividade enzimática	23
3.7.7.1. Superóxido dismutase	23
3.7.7.2. Catalase	24
3.7.7.3. Glutatião <i>S</i> -transferase	25
3.7.8. Determinação da actividade enzimática e integridade da membrana mitocondrial	26
3.7.8.1. Succinato desidrogenase	26
3.7.8.2. Citocromo <i>c</i> oxidase	26
3.7.8.3. ATPsintetase	27
3.8 Análise estatística dos resultados	27
4. Resultados	28
4.1. Índice de perdas	28
4.2. Variação média da massa corporal	28
4.3. Consumo médio de água	29
4.4. Consumo médio de ração	30
4.5. Alterações comportamentais dos animais	31
4.6. Massa inicial e final dos animais e massa dos órgãos	31
4.7. Massa relativa dos órgãos	31
4.8. Aspecto macroscópico dos órgãos	31
4.9. Parâmetros bioquímicos	32
4.10. Estudo histopatológico	33
4.11. Bioenergética	37
4.11.1. Funcionamento mitocondrial	37
4.11.2. Determinação da actividade enzimática	38
4.11.3. Determinação da actividade das enzimas do stresse oxidativo	39
5. Discussão	40
6. Conclusão	46
7. Bibliografia	47

Índice de figuras

	2
Figura 1. Bromodiclorometano.	
Figura 2. Dibromoclorometano.	3
Figura 3. Desenho experimental.	13
Figura 4. Variação da massa corporal média dos animais.	29
Figura 5. Variação do consumo médio de água.	30
Figura 6. Variação do consumo médio de ração.	30
Figura 7. Fígado normal.	34
Figura 8. Degenerescência vacuolar do citoplasma dos hepatócitos, núcleo dos hepatócitos com cromatina dispersa e com vários nucléolos e célula em apoptose.	35
Figura 9. Fígado com zona de necrose de coagulação.	35
Figura 10. Fígado com zona de infiltrado inflamatório composto por neutrófilos.	36
Figura 11. Coloração pela reticulina de um fígado normal.	36
Figura 12. Coloração pelo tricrómio de Masson de um fígado normal.	37

Índice de quadros

	5
Quadro 1. Condições ambientais para manutenção dos Murganhos.	
Quadro 2. Significado e fórmula para o cálculo do índice de perdas.	14
Quadro 3. Índice de perdas.	28
Quadro 4. Massa corporal inicial e final e massa dos órgãos dos murganhos – valores médios por grupo experimental.	32
Quadro 5. Massa relativa dos diferentes órgãos.	32
Quadro 6. Parâmetros bioquímicos.	33
Quadro 7. Lesões histopatológicas encontradas no fígado dos animais pertencentes aos 4 grupos experimentais.	34
Quadro 8. Funcionamento mitocondrial.	38
Quadro 9. Actividade enzimática mitocondrial.	38
Quadro 10. Actividade das enzimas do stresse oxidativo.	39

Índice de abreviaturas

AD	Água destilada
ADP	Adenosina – 5'-difosfato
Alb	Albumina
ALT	Alanina-aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina -5'-trifosfato
BD	Bilirrubina directa
BDCM	Bromodictlorometano
BSA	Albumina de soro bovino
BT	Bilirrubina total
CAS	Chemical abstracts service
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
COX	Citocromo <i>c</i> oxidase
DBCM	Dibromoclorometano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DY	Potencial transmembranar mitocondrial
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
FA	Fosfatase alcalina
FADH₂	Dinucleótido de flavina e adenina (forma reduzida)
FCCP	Carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil hidrazona
GSH	Glutatião
GST	Glutatião <i>S</i> -transferase
H&E	Hematoxilina-eosina
Hepes	2-[4-(2-hidroxietil) 1-piperazinil]-etanosulfónico
IARC	Agência Internacional para a Investigação do Cancro
ICR	Índice de controlo respiratório
Ip	Índice de perdas
MeOH	Metanol
Min	Minuto
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADH₂	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NBT	Azul de nitrotetrazólio
m/v	Massa de soluto/volume de solução
Pi	Fostato inorgânico
PMS	Metassulfato de fenazina
PT	Proteínas totais
PVC	Cloreto de polivinilo
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SOD	Superóxido dismutase
SPD	Subprodutos de desinfecção
SQR	Succinato desidrogenase
THMs	Trihalometanos
TMPD	Tetrametilfenilenodiamina
TPP⁺	Catião lipofílico tetrafosfónio
TPPCI	Cloreto de tetrafenilfosfónio

Resumo

Os trihalometanos (THMs) são subprodutos da desinfecção da água resultantes da reacção lenta do cloro livre com a matéria orgânica e os iões brometo, presentes naturalmente na água.

O objectivo deste trabalho foi avaliar as alterações nos parâmetros bioquímicos, os efeitos histológicos hepáticos e os efeitos na bioenergética mitocondrial da exposição oral de machos Murganhos da estirpe ICR a baixas doses de dois THMs, o bromodiclorometano (BDCM) e o dibromoclorometano (DBCM). Os animais foram distribuídos aleatoriamente por quatro grupos experimentais, um grupo controlo e três grupos destinados a posterior administração de metanol, DBCM e BDCM. A administração dos compostos foi feita por *gavage* durante dois dias consecutivos, um dia de intervalo e, novamente, dois dias consecutivos. Quatro semanas depois os animais foram eutanaziados e recolhidos o sangue e os órgãos para avaliar as alterações bioquímicas, histopatológicas e da bioenergética mitocondrial. Para avaliar as alterações bioquímicas foram determinadas as actividades séricas da alanina aminotransferase, da aspartato aminotransferase e da fosfatase alcalina e as concentrações séricas da albumina, da bilirrubina total e directa, das proteínas totais, da ureia e da creatinina. Macroscopicamente não foram observadas alterações em nenhum dos órgãos recolhidos. Ambos os THMs administrados induziram um aumento da actividade sérica da alanina aminotransferase e o BDCM induziu um aumento da concentração sérica da bilirrubina total. Em termos histológicos, os THMs administrados causaram uma hepatite ligeira caracterizada pela presença de degenerescência vacuolar dos hepatócitos, existência de necrose de coagulação moderada e presença de infiltrado inflamatório. A bioenergética mitocondrial foi alterada negativamente, ambos os THMs provocaram diminuição da respiração dissociada da fosforilação oxidativa. O DBCM aumentou o estado 4 da respiração. A função enzimática mitocondrial foi também afectada. A administração de DBCM induziu uma diminuição da actividade das enzimas succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase e um aumento da actividade enzimática da glutatião *S*-transferase. A administração do BDCM induziu uma diminuição das actividades enzimáticas da succinato desidrogenase e da ATP sintetase e um aumento da actividade enzimática da glutatião *S*-transferase. Os resultados observados permitem concluir que não é seguro ingerir água que contenha BDCM e DBCM pois a exposição a estes compostos, mesmo em pequenas doses e por períodos de tempo curtos, causam diversas alterações no normal funcionamento do fígado.

Abstract

Trihalomethanes (THMs) are water disinfection byproducts (DBP) resulting from the slow reaction of chlorine and naturally occurring organic precursors and bromide. The purpose of this study was to determine the effects of the oral exposure of male ICR Mice to low doses of two THMs, bromodichloromethane (BDCM) and dibromochloromethane (DBCM) in hepatic histology, biochemistry and mitochondrial bioenergetics. The animals were randomly assigned to four experimental groups, a control group and 3 groups for further administration of methanol, DBCM and BDCM. Administration was carried out daily for two days, off for one day and then daily again for two days, by oral gavage. Four weeks later the animals were sacrificed, blood and organs were collected for serum biochemical analysis, histological analysis and evaluation of mitochondrial bioenergetics. To evaluate biochemical changes, serum activities of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase and serum concentrations of albumin, total and direct bilirubine, ureia nitrogen and creatinine were determined. Macroscopically it was not observed any changing in all harvested organs. Both THMs administered induced an increase of alanine aminotransferase serum activity and BDCM induced an increase in total bilirubine serum concentration. Histologically, the administered THMs caused a mild hepatitis characterized by the presence of hepatocyte vacuolar degeneration, coagulative necrosis and inflammatory infiltrate. Mitochondrial bioenergetics was negatively altered by the THMs's administration, both THMs induced a decrease in respiration dissociated from the oxidative phosphorylation. DBCM increased the sate 4 respiration. Enzymatic function was also affected. Administration of DBCM induced a decrease in the enzymatic activities of succinate-coenzyme Q reductase and cytochrome *c* oxidase and an increase in the activity of glutathione *S*-transferase. BDCM induced a decrease in the activities of succinate-coenzyme Q reductase and ATP syntetase and an increase of the activity of glutathione *S*-transferase. These results lead to the conclusion that it is not safe to ingest water containing both BDCM and DBCM once the exposure to these THMs, even in small doses and for a short period of time, causes various changes in the normal hepatic function and bioenergetics.

1. Introdução

1.1. Origem dos trihalometanos

A característica mais importante da água destinada ao consumo humano é a sua qualidade microbiológica que pode ser eficazmente controlada com a adição de produtos químicos oxidantes à fonte de abastecimento. O processo de tratamento da água passa pela filtração, seguida de técnicas de precipitação e sedimentação com recurso a agentes químicos. No entanto, estes métodos não garantem, por si só, a segurança bacteriológica da água que posteriormente será bombeada para os sistemas de armazenamento, sendo por isso necessário proceder a uma desinfecção adequada. A correcta desinfecção da água destinada ao consumo humano impede o aparecimento de várias doenças como por exemplo a febre tifóide, a cólera, a disenteria amebiana, a gastroenterite bacteriana, a salmonelose, a enterite por *Campylobacter* spp e *Yersina* spp, as infecções por *Pseudomonas* spp e várias doenças virais como a hepatite A, entre outras (IARC, 1991).

Os agentes químicos mais comumente utilizados como desinfectantes são o cloro, o hipoclorito, a cloramina, o dióxido de cloro e o ozono. A cloração é o método mais comum de desinfecção da água destinada ao consumo humano usado em todo o mundo. É um método eficaz e pouco dispendioso para o tratamento da água que começou a ser utilizado no início do século XX, altura em que não se conheciam efeitos adversos da sua utilização (IARC, 1991; Stocker *et al.*, 1997; Komulainen, 2004). A grande reactividade do cloro e a sua grande eficácia em termos de desinfecção trazem, no entanto, problemas devido à formação de compostos organoclorados, nomeadamente os trihalometanos (THMs) que são subprodutos da desinfecção (SPD) da água. Após a adição do desinfectante à água, ocorre uma reacção lenta entre cloro livre e os constituintes naturais da mesma, nomeadamente os precursores orgânicos dos THMs como é o caso dos ácidos húmicos e fúlvicos resultantes da acção bacteriológica nas lenhites e nos taninos dos organismos vegetais, e os iões brometo. Os principais THMs formados são o clorofórmio (CHCl_3), o bromodiolorometano (CHCl_2Br), o dibromodiolorometano (CHClBr_2) e o bromofórmio (CHBr_3) e são encontrados na água de consumo humano em doses relativamente elevadas (Stocker *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 1999; Coffin *et al.*, 2000; Fawell, 2000; APHA, 2005).

1.2. Bromodiclorometano

O bromodiclorometano (BDCM) é um composto quaternário com estrutura similar à do metano (CH₄) com três dos iões hidrogénio substituídos por dois iões cloreto e por um ião brometo (figura 1).

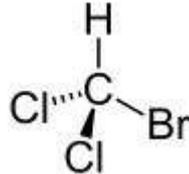


Figura 1. Estrutura do bromodiclorometano.

O BDCM é solúvel em água (4,5 g/L a 20°C), apresenta elevada volatilidade (50 mmHg a 20°C) e actualmente apenas é usado como solução padrão para análise de águas destinadas ao consumo humano. A sua ocorrência resulta, como já foi referido anteriormente, da reacção do cloro, utilizado como desinfectante, com a matéria orgânica e com os iões brometo presentes na água. O BDCM pode também surgir naturalmente visto que foram encontrados níveis médios de BDCM entre 7 e 22 ng/g nos tecidos de algumas algas marinhas que posteriormente o libertam na água do mar, de onde é libertado para a atmosfera (IARC, 1991). Juntamente com o clorofórmio, o BDCM é por norma o THM encontrado em maior quantidade na água de consumo humano desinfectada com cloro (Lilly *et al.*, 1996; Torti *et al.*, 2001).

Na última avaliação feita pela Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC) a evidência da actividade carcinogénica do BDCM foi considerada suficiente em animais e foi classificado como composto possivelmente carcinogénico para o Homem (IARC Group 2B, 1999).

1.3. Dibromoclorometano

O dibromoclorometano (DBCM) é um composto quaternário com estrutura similar à do metano (CH_4) com três dos iões hidrogénio substituídos por um ião cloreto e por dois iões brometo (figura 2).

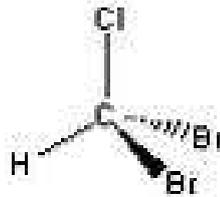


Figura 2. Estrutura do dibromoclorometano.

Tal como o DBCM, é um composto volátil (76 mmHg a 20°C) e é usado como intermediário na produção de agentes extintores de fogo, de aerossóis, de refrigerantes e de pesticidas. A sua ocorrência pode ser natural, foram encontrados níveis médios de DBCM entre 150 e 590 ng/g em tecidos de algumas algas marinhas que posteriormente o libertam na água do mar, de onde é libertado para a atmosfera (IARC, 1991).

Na última avaliação feita pela IARC a evidência de actividade carcinogénica do DBCM foi considerada limitada em animais e não foi classificado como composto carcinogénico para o Homem (IARC Group 2B, 1999).

1.4. O Murgancho como animal de laboratório

Para efectuar o estudo do efeito dos trihalometanos em parâmetros fisiológicos, poder-se-ia utilizar vários animais como o Cão, o Coelho, o Cobaio, o Rato ou o Murgancho. No entanto, pela facilidade de manipulação, pelas suas características biológicas e por questões económicas e éticas a maioria dos trabalhos experimentais são executados com Murganchos e/ou Ratos. O desenvolvimento, a fisiologia e a bioquímica são muito semelhantes entre o Murgancho e o Homem o que favorece a sua ampla utilização na pesquisa biomédica (Harkness e Wagner, 1995; Oliveira, 2006). O desenvolvimento dos modelos de investigação com Murganchos começou no início do século XX com os primórdios da investigação genética. Actualmente, o Murgancho é

utilizado nas mais variadas áreas de investigação médica. É um mamífero roedor pertencente à ordem Rodentia e à família Muridae, é do género *Mus* e da espécie *Mus musculus*. Os Murganhos podem ser de estirpes *Inbred* ou *Outbred*, sendo geneticamente idênticos ou diversificados, respectivamente. (Harkness e Wagner, 1995; Hillyer e Quesenberry, 1996; Suckow, *et al.*, 2001).

O Murganho não é um animal muito agressivo, em contacto com o manipulador é mais provável que tente fugir do que o confronto, podendo eventualmente tentar morder o manipulador quando este tenta contê-lo. Apesar de serem animais sociáveis, os Murganhos lutam entre si, especialmente se forem machos, para estabelecer uma hierarquia e/ou defender o seu território. Estas lutas entre os animais causam, com frequência, ferimentos relativamente graves devido a dentadas, na zona dorsal e genital, que podem conduzir à morte por septicemia (Suckow *et al.*, 2001).

O controlo do ambiente em que se realiza uma experiência que envolve a utilização de animais é de extrema importância não só para garantir o bem estar do animal durante o ensaio e para anular ou minimizar quaisquer factores que possam causar stresse, (Balls, 1994) mas também para que as respostas fisiológicas e comportamentais sejam constantes e previsíveis garantindo melhores resultados. No quadro 1 estão referidas as condições ambientais ideais para manutenção dos Murganhos.

Quadro 1. Condições ambientais para manutenção dos Murganhos (Suckow <i>et al.</i> , 2001).		
Temperatura	22 ± 4°C	É importante minimizar as variações da temperatura do local onde os Murganhos se encontram.
Humidade relativa	50±20%	Existem evidências de que os animais têm melhor desempenho quando se encontram em ambientes com 45-60% de humidade relativa. Para esses valores elevados de humidade relativa a temperatura deverá estar compreendida ente 20 e 20,5 °C.
Iluminação	12h	A intensidade da luz a que os Murganhos estão expostos deve ser suficiente para que o operador os consiga manipular, mas deve ser pouco intensa porque pode ferir a retina dos animais albinos. O fotoperíodo reveste-se de maior importância do que a intensidade da luz e deve ser de 12h. Alterações no fotoperíodo (como acender as luzes durante o período escuro) têm efeitos perturbadores nos animais.
Ventilação	10-15 mudanças de ar/h	A ventilação deve manter uma concentração adequada de oxigénio e minimizar as concentrações de contaminantes gasosos como o dióxido de carbono e o amoníaco, este último proveniente da urina. É importante minimizar odores e o pó resultante do movimento dos animais na cama das gaiolas.
Ruído	O mínimo possível; não exceder os 85 dB	O ruído excessivo é nefasto não só para os animais, mas também para o Homem que trabalha no biotério. Deve evitar-se ruídos repentinos como campainhas e os ruídos de outros animais, nomeadamente o ladrar de cães. Na impossibilidade de evitar esses ruídos convém minimizá-los/disfarçá-los com recurso ao chamado ruído branco que é, por exemplo, música calma com o volume baixo.
Limpeza	Semanalmente	É muito importante proceder à limpeza das gaiolas e à mudança da cama semanalmente a fim de evitar o odor e a acumulação de amoníaco. Deve limpar-se o local onde as gaiolas estão colocadas uma vez por semana.

1.5. O fígado

O fígado é o segundo maior órgão do corpo, é nele que os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para posterior utilização por outros órgãos, sendo, portanto, uma interface entre o sistema digestivo e o sangue. A sua situação no sistema circulatório é ideal para captar, transformar e acumular metabolitos e para neutralizar e eliminar as substâncias tóxicas. O fígado exerce também uma função crucial na síntese de proteínas plasmáticas como, por exemplo, a albumina (Kolb, 1987; Junqueira e Carneiro, 2008).

No Murganho, este órgão tem duas superfícies, a superfície parietal, convexa e a superfície visceral, côncava. Com recurso a três linhas auxiliares o fígado divide-se em quatro regiões principais, lóbulo lateral direito, lóbulo lateral esquerdo, lóbulo medial e processo papilar. Os lóbulos direito e esquerdo estão subdivididos em dois lóbulos, os lóbulos lateral e medial. Este último encontra-se ainda subdividido em lóbulo medial direito e lóbulo medial esquerdo. Na superfície visceral do fígado, junto ao lóbulo medial direito, localiza-se a vesícula biliar (Konig e Liebich, 2005).

O fígado encontra-se recoberto pelo peritoneu, que cobre uma cápsula delgada de tecido conjuntivo designada por cápsula de Glisson. Esta cápsula é mais espessa no hilo, por onde a veia porta e a artéria hepática penetram no fígado e por onde saem os ductos hepáticos direito e esquerdo e os ductos linfáticos. O parênquima hepático é constituído por hepatócitos, células poliédricas com seis ou mais superfícies, de núcleo basófilo e citoplasma eosinófilo devido à abundância de mitocôndrias e retículo endoplasmático liso. A superfície de cada hepatócito está em contacto com a superfície de outros hepatócitos dispostos radialmente no lóbulo hepático formando placas de hepatócitos organizados como tijolos. Os espaços entre essas placas contêm capilares designados por sinusóides hepáticos. O espaço entre as placas de hepatócitos e a parede do capilar sinusóide é designado por espaço de Disse. A junção de dois hepatócitos delimita um espaço tubular denominado de canalículo biliar que constitui a primeira porção do sistema de ductos biliares. Em algumas regiões da periferia dos lóbulos hepáticos surge um espaço porta constituído por um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática, um ducto biliar e vasos linfáticos (Konig e Liebich, 2005; Greaves, 2007; Junqueira e Carneiro, 2008).

Os sinusóides contêm as células de Kupffer, macrófagos que desempenham um papel fundamental em processos imunitários nomeadamente na síntese de proteínas e

destruição de bactérias que eventualmente penetrem no sangue portal a partir do intestino. Além destas funções, as células de Kupffer fagocitam e metabolizam eritrócitos velhos e digerem a hemoglobina (Junqueira e Carneiro, 2008).

No espaço de Disse, também designado por espaço perissinusoidal, encontramos as células de Ito, células que têm como principal função armazenar a vitamina A. No fígado saudável, estas células desempenham várias funções como captação, armazenamento e libertação de retinóides, síntese e secreção de várias proteínas da matriz extracelular e proteoglicanos, secreção de factores de crescimento e citocinas e regulação do diâmetro do lúmen sinusoidal em resposta a diferentes factores reguladores como protaglandinas ou tromboxano A₂ (Junqueira e Carneiro, 2008).

1.6. A mitocôndria

1.6.1. Estrutura mitocondrial

As mitocôndrias ocupam 25% do citoplasma da quase totalidade das células eucarióticas e são os organelos celulares responsáveis pela produção de grande parte do ATP celular - cerca de 30 moléculas de ATP sintetizadas por cada molécula de glicose oxidada (Azevedo, 1994; Alberts *et al.*, 2006). Segundo a teoria da endossimbiose sequencial, as mitocôndrias têm origem em endossimbiontes bacterianos que se estabeleceram numa célula hospedeira contendo núcleo (Gray, 1999; Wallace, 1999).

A mitocôndria possui duas membranas, uma interior e uma exterior que diferem na sua composição e função (Smoly *et al.*, 1970). A membrana exterior é constituída por lípidos e proteínas em quantidades similares. Contém uma proteína (porina) que forma largos canais aquosos através da camada lipídica e que actua como poro específico para moléculas com massas moleculares reduzidas (<10Kda), sendo permeável a iões e outros metabolitos. A membrana interior, constituída por cerca de 20% de lípidos e 80% de proteínas é menos permeável. Por ela apenas penetram a água e pequenas moléculas sem carga eléctrica nomeadamente o fosfato, o ADP, o ATP e o piruvato. Moléculas de maiores dimensões (sacarose e glucose), catiões (K⁺, Mg²⁺ e Na⁺), aniões (Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻) e a maioria dos aminoácidos, requerem, em geral, um sistema de transporte especial para entrar na matriz mitocondrial. A área de superfície

da membrana interna é consideravelmente aumentada pelas invaginações que a membrana sofre no sentido da matriz mitocondrial, as cristas mitocondriais, que fornecem uma ampla superfície para a síntese do ATP. Numa célula hepática as membranas mitocondriais constituem cerca de um terço do total das membranas da célula. O espaço compreendido entre as duas membranas é denominado de espaço intermembranar. A matriz mitocondrial, espaço delimitado pela membrana mitocondrial interna, é constituído por uma grande variedade de enzimas, ribossomas, pequenas moléculas de DNA circular, RNA sob a forma de grânulos sensíveis à ribonuclease e pequenos grânulos que parecem ser depósitos de fosfato de cálcio. A concentração de cálcio no citoplasma pode ser regulada mediante armazenamento e libertação de iões Ca^{2+} pela mitocôndria. Uma célula hepática tem 1000 a 2000 mitocôndrias (Fernandes e Torres-Pereira, 1993; Azevedo, 1994; Alberts *et al.*, 2006). De um modo geral observa-se uma estreita relação entre o número de mitocôndrias e as necessidades energéticas da célula (Junqueira e Carneiro, 1973).

1.6.2. As principais vias metabólicas da mitocôndria

Dos constituintes mitocondriais, as enzimas desempenham um papel fundamental nas várias cadeias do metabolismo celular. As enzimas não se encontram distribuídas ao acaso na mitocôndria, pelo contrário, a mitocôndria é um organelo com uma estrutura altamente organizada, cujas enzimas se encontram distribuídas em compartimentos específicos. Do grande número de enzimas presentes na mitocôndria são de destacar as que asseguram as reacções de acetilação, do ciclo do ácido cítrico ou de Krebs, da cadeia de transporte de electrões e da síntese de ATP, da oxidação de ácidos gordos, da oxidação da colina e dos aminoácidos, de desaminação e de transaminação (Fernandes e Torres-Pereira, 1993).

O metabolismo aeróbio na mitocôndria começa com a produção de acetil-CoA a partir do piruvato, produto da degradação da glicose. A acetil-CoA é posteriormente metabolizada numa série de reacções sequenciais, catalizadas por enzimas, conhecidas como ciclo de Krebs. Os produtos principais deste ciclo são o NADH, FADH_2 e CO_2 . O CO_2 é libertado enquanto que as moléculas de NADH e FADH_2 vão funcionar como dadores de electrões de alta energia na cadeia respiratória. Estes electrões vão passar na cadeia respiratória e, finalmente, reduzir o oxigénio a água. A respiração mitocondrial

ocorre na membrana interna e é um processo gerador de ATP no qual um composto inorgânico é o último aceitador de electrões (Azevedo, 1994). A transferência de electrões processa-se por etapas sucessivas, através de uma série de transportadores que se encontram agrupados em vários complexos enzimáticos de múltiplas subunidades peptídicas (Complexos I a V) juntamente com a ubiquinona (coenzima Q) e o citocromo *c* (Fernandes e Torres-Pereira, 1993; Azevedo, 1994; Harris, 1995; Campos, 2002; Nicholls e Ferguson, 2002; Lodish *et al*, 2007):

- Complexo I – NADH desidrogenase: transfere os electrões do NADH até à ubiquinona.
- Complexo II – Succinato desidrogenase: transfere os electrões do succinato para a ubiquinona.
- Complexo III – Ubiquinol citocromo *c* redutase: transfere os electrões do ubiquinol para o citocromo *c*.
- Complexo IV – Citocromo *c* oxidase: transfere os electrões do citocromo *c* para o oxigénio.
- Complexo V – ATP sintetase: produção de ATP a partir de ADP + Pi – fosforilação oxidativa.

A produção de ATP pelo processo de fosforilação oxidativa depende de um mecanismo quimiosmótico. Segundo a teoria quimiosmótica, a energia libertada pela oxidação do NADH e do FADH₂ não é utilizada directamente para a síntese de ATP, mas sim para bombear protões (H⁺) da membrana interna mitocondrial para o espaço intermembranar, criando um gradiente de protões. A dissipação deste gradiente é utilizada por um complexo enzimático da membrana interna, a ATP sintetase para formar o ATP. A cadeia respiratória permite que a grande quantidade de energia libertada pela redução do oxigénio a água ocorra em pequenas reacções de oxidação/redução de forma a que possa ser armazenada em vez de se dissipar sob a forma de calor. A transferência de electrões através dos transportadores provoca um fluxo de electrões a partir da matriz mitocondrial, o qual gera um potencial de membrana (Azevedo, 1994; Campos, 2002). Mais de 90% da energia envolvida no metabolismo celular provém da respiração mitocondrial (Berg *et al.*, 2002).

1.6.3. A mitocôndria como modelo para o estudo da toxicidade

A partir do momento em que a desinfecção da água se tornou um procedimento comum e rotineiro, passou a ser necessária a avaliação da toxicidade dos SPD da água a médio e longo prazo. Sendo a mitocôndria o organelo celular onde ocorre a síntese de mais de 90% do ATP celular, torna-se claro que qualquer substância que interfira com o bom e normal funcionamento da mesma irá interferir com o metabolismo celular e, consequentemente, afectar o bom desenvolvimento do organismo.

As alterações na actividade mitocondrial podem ser avaliadas estudando a alteração de vários factores: permeabilidade iónica, aumento do volume, polarografia, medição do potencial transmembranar e actividade enzimática (Peixoto *et al.*, 2003a). O Murganho e o Rato são animais comumente utilizados em estudos de alteração na bioenergética mitocondrial (Mitchell e Moyle, 1969a; Mitchell e Moyle, 1969b; Wallace, 1999; Rolo *et al.*, 2000). As preparações obtidas a partir de mitocôndrias de fígado são um bom modelo para o estudo da toxicidade na bioenergética. São preparações relativamente fáceis de obter, com um elevado grau de pureza e integridade (Peixoto *et al.*, 2003b).

2. Objectivos

Foram objectivos deste trabalho:

- Avaliar as alterações histológicas hepáticas induzidas pela administração dos trihalometanos (BDCM e DBCM) por *gavage*;
- Avaliar as alterações induzidas pelos trihalometanos (BDCM e DBCM) nos parâmetros bioquímicos: alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, bilirrubina total, bilirrubina directa, albumina, proteínas totais, ureia e creatinina;
- Avaliar o efeito dos trihalometanos (BDCM e DBCM) na bioenergética das mitocôndrias hepáticas;

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Para a realização deste trabalho, foram adquiridos à empresa Harlan Interfauna (Barcelona, Espanha) 42 murganhos machos da espécie *Mus musculus*, da estirpe ICR, com aproximadamente 4 semanas de idade. Foram utilizados Murganhos da estirpe *Outbred* ICR, porque se pretendia estudar eventuais alterações nos parâmetros fisiológicos em animais com características genéticas distintas, após a exposição aos THMs. Os murganhos foram distribuídos aleatoriamente por quatro grupos, três grupos de onze animais e um grupo controlo com 9 animais. A manutenção dos animais foi realizada de acordo com a portaria que aprova as normas técnicas de protecção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos, Portaria N° 1005/92 de 23 de Outubro e com as directrizes comunitárias 2007/526/CE.

Os animais foram instalados gaiolas de policarbonato com superfícies lisas e cantos redondos, com cama de aparas duras de madeira, que foram colocadas numa câmara ventilada Tecniplast[®] (referência 9ARMV8124LR) com controlo de temperatura ($23\pm 2^\circ\text{C}$), luminosidade (12h de luz) e humidade relativa ($55\pm 5\%$). A ração Teklad Global Diet, fornecida pela empresa Harlan Interfauna, e a água foram disponibilizadas *ad libitum*. Para enriquecimento ambiental foram colocados, em cada gaiola, tubos de plástico duro e de cartão para garantir que o alojamento dos animais atendesse às suas necessidades específicas como, por exemplo, esconderem-se ou fazerem ninho.

3.2. Compostos Químicos

As soluções de BDCM (N° CAS:75-27-4) e de DBCM (N° CAS:67-56-1) foram adquiridos à firma Dr. Ehrenstorfer GmbH. O metanol (MeOH) (N° CAS: 67-56-1) foi adquirido à firma Sigma – Aldrich.

3.3. Desenho experimental

Os animais tiveram um período de quarentena de 5 semanas anterior ao início da administração dos compostos. O grupo 1 foi utilizado como grupo controlo sem administração de qualquer substância. Uma vez que os THMs são compostos extremamente voláteis, as soluções são comercializadas em solução alcoólica, neste caso em MeOH. Como tal, o grupo 2 foi utilizado como grupo controlo do veículo de administração dos compostos, sendo-lhe administrado MeOH. Aos animais do grupo 3 foi administrado DBCM e aos animais do grupo 4 foi administrado BDCM. As administrações foram feitas por *gavage* durante quatro dias, dois dias consecutivos, um dia de intervalo e, novamente, dois dias consecutivos (Figura 3). O volume de solução administrado diariamente a cada um dos animais foi de 0,25 mL o que, no caso dos animais dos grupos 3 e 4 correspondeu a 117 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ de DBCM e BDCM, respectivamente. Durante o ensaio experimental os animais foram monitorizados diariamente e, semanalmente, foi registada a massa corporal de cada grupo bem como os consumos de água e ração. As gaiolas foram substituídas e lavadas semanalmente assim como os biberões. As pesagens dos animais, da comida e da água foram efectuadas com recurso a uma balança METTLER PM 4000.

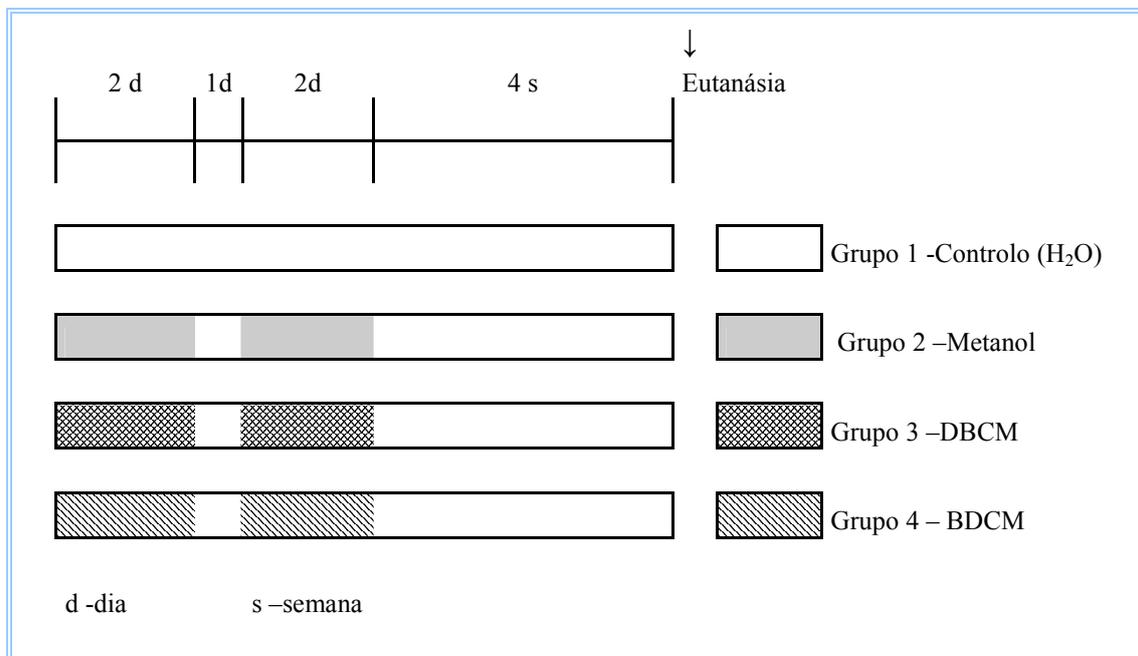


Figura 3. Desenho experimental

No final do ensaio todos os animais foram eutanaziados por *overdose* de pentobarbital de sódio a 0,4% administrado por via intraperitoneal. A dose de anestesia administrada (1 mL/Kg) foi calculada com base na massa individual de cada animal determinada imediatamente antes. No final do ensaio foi calculado, para cada grupo, o índice de perdas, cujo significado e fórmula para o cálculo se encontra no quadro 2.

Quadro 2. Significado e fórmula para o cálculo do índice de perdas.		
Índice de perdas (Ip)	Porcentagem de animais que morreram antes do final do ensaio (Nm) e não entraram no estudo relativamente ao número inicial de animais (Ni).	$Ip = Nm / Ni \times 100$

3.4. Recolha de amostras biológicas

Para a avaliação dos parâmetros bioquímicos foram colhidas, por punção cardíaca, amostras de sangue de cada um dos animais sacrificados para tubos sem anticoagulante.

Foi efectuada uma necrópsia a todos os animais sacrificados que consistiu no estudo e descrição do exterior do animal e observação macroscópica do seu interior. Foram recolhidos e pesados individualmente o fígado, o rim direito e esquerdo, o baço, o coração e os pulmões. O fígado foi fragmentado destinando-se uma parte ao estudo histopatológico e outra parte ao estudo bioenergético. A parte do fígado destinada ao estudo histopatológico bem como os restantes órgãos foram fixados em formol a 10%. A fixação é um processo que tem como finalidade evitar a digestão dos tecidos por enzimas presentes no interior das células (autólise), ou por bactérias, e preservar a estrutura molecular (Jones, 2002).

3.5. Estudo de parâmetros bioquímicos

Após a recolha das amostras de sangue e sua coagulação, as mesmas foram centrifugadas durante 15 minutos a 3000 rotações por minuto, seguidamente foi recolhido o soro que foi congelado a -20 °C até posterior análise. As análises foram

efectuadas no Laboratório de Análises Clínicas do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, em Vila Real, com recurso ao aparelho Synchron LX 20. Os parâmetros avaliados foram os seguintes:

- ♦ Alanina aminotransferase (ALT);
- ♦ Aspartato aminotransferase (AST);
- ♦ Fosfatase alcalina (FA);
- ♦ Bilirrubina total (BT);
- ♦ Bilirrubina directa (BD);
- ♦ Albumina (Alb);
- ♦ Proteínas totais (PT);
- ♦ Creatinina;
- ♦ Ureia;

3.6. Estudo histopatológico

Após fixação, os órgãos recolhidos foram seccionados e observados para identificação de lesões macroscópicas. De seguida cada órgão foi cortado e infiltrado em parafina líquida, que lhe confere uma consistência rígida. Este passo é precedido pela desidratação dos tecidos por banhos em soluções aquosas de etanol com concentrações crescentes, colocando de seguida os tecidos em xilol, solvente orgânico que substitui o etanol existente nos tecidos e que é solúvel em etanol e parafina. O calor da parafina líquida, onde são mergulhados de seguida, evapora o solvente e a parafina preenche os espaços existentes dentro dos tecidos. Dos blocos resultantes realizaram-se vários cortes com 2 μm de espessura num micrótomo de rotação Leica[®] 20035. Posteriormente as preparações foram montadas com recurso a meio de montagem Entellan[®] (Merck) para microscopia óptica. A preparação das amostras bem como a sua visualização ao microscópio óptico foram efectuadas no Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

3.6.1. Metodologias comuns anteriores à coloração das amostras

As diferentes técnicas de coloração utilizadas nesta dissertação têm vários passos iniciais comuns que incluem a desparafinação pelo xilol, a hidratação em soluções aquosas de etanol com concentrações decrescentes e, por fim, a colocação das lâminas em água. No final da coloração, os passos a seguir são também comuns e consistem em desidratar, diafinizar e, finalmente, montar com Entellan[®] (Merck).

3.6.2. Coloração pela hematoxilina-eosina

Das colorações utilizadas em histologia a combinação da hematoxilina-eosina (H&E) é a mais comumente utilizada (Junqueira e Carneiro, 2008). A hematoxilina comporta-se como um corante básico corando de azul o núcleo das células e outras estruturas ácidas. A eosina comporta-se como um corante ácido corando o citoplasma e o colagénio de cor-de-rosa. Para a coloração da hematoxilina-eosina seguiu-se o seguinte protocolo:

- ♦ Seguir os passos descritos em 3.6.1.
- ♦ Corar com hematoxilina durante 2 minutos;
- ♦ Lavar com água da torneira até adquirir tonalidade azul (aproximadamente 10 minutos);
- ♦ Passar por água destilada (AD);
- ♦ Passar, rapidamente, por álcool a 70%;
- ♦ Corar com eosina durante 2 minutos;
- ♦ Desidratar, diafanizar e montar em Entellan[®];

3.6.3. Coloração pela reticulina

A técnica de coloração pela reticulina marca as fibras de colagénio do tipo III. As fibras reticulares, pouco evidenciadas pela H&E, tornam-se nítidas pelo método de impregnação argêntica. Esta coloração baseia-se na utilização de um sal de prata instável (nitrito de prata amoniacal) e de um redutor (formol) que reduz o primeiro a

prata metálica, que se vai depositar sobre as fibras reticulares. A técnica de coloração pela reticulina efectua-se da seguinte forma:

- ♦ Seguir os passos descritos em 3.6.1.
- ♦ Oxidar o corte mergulhando-o numa solução de permanganato de potássio a 0,75% durante 3 minutos;
- ♦ Lavar com água corrente;
- ♦ Descorar mergulhando o corte numa solução aquosa de metabissulfito de potássio a 2% durante 1 minuto;
- ♦ Lavar com água corrente durante 10 minutos;
- ♦ Lavar 2 vezes com AD;
- ♦ Tratar numa solução aquosa de alúmen de ferro a 2% durante 1 minuto;
- ♦ Lavar com água corrente durante 3 minutos;
- ♦ Impregnar durante um minuto com uma solução amoniacal de prata preparada da seguinte forma: adicionar 2 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio a 10% a 10 mL de solução aquosa de nitrato de prata. A junção destas soluções dá origem a um precipitado castanho que se dissolve adicionado, gota a gota e sob agitação, amoníaco puro. Sucessivamente adiciona-se solução aquosa de nitrato de potássio a 10% até que o precipitado que se forma desapareça com agitação ligeira;
- ♦ Lavar com AD durante 10 segundos;
- ♦ Redução por imersão em solução de formalina a 15% durante 3 minutos;
- ♦ Lavar com água corrente durante 3 minutos;
- ♦ Viragem em solução aquosa de cloreto de ouro a 0,20% durante 8 minutos;
- ♦ Lavar com AD;
- ♦ Mergulhar numa solução de metabissulfito de potássio a 2% durante 1 minuto;
- ♦ Passar para uma solução aquosa de tiosulfato de sódio a 1% durante 1 a 2 minutos;
- ♦ Lavar com água corrente;

- ♦ Lavar com AD;
- ♦ Colocar as lâminas em solução alcoólica de eosina a 1% durante 2 minutos;
- ♦ Desidratar, diafanizar e montar em Entellan[®];

3.6.4. Coloração pelo tricrómio de Masson

A técnica histoquímica do tricrómio de Masson é utilizada habitualmente para evidenciar as fibras de colagénio e diferencia 3 estruturas, o núcleo, o citoplasma e o tecido conjuntivo por acção de três corantes diferentes. A coloração efectua-se da seguinte forma:

- ♦ Seguir os passos descritos em 3.6.1.
- ♦ Passar por água corrente e, de seguida, por AD;
- ♦ Corar com hematoxilina de Gill durante 2 minutos;
- ♦ Lavar com água corrente até adquirir tonalidade azul durante 10 minutos;
- ♦ Corar com fucsina ácida durante 5 minutos;
- ♦ Lavar bem com AD;
- ♦ Tratar com ácido fosfomolibdico durante 5 minutos;
- ♦ Escorrer;
- ♦ Corar com verde brilhante durante 2 a 5 minutos;
- ♦ Lavar com AD;
- ♦ Tratar com solução aquosa de ácido acético a 1% durante 2 minutos;
- ♦ Desidratar, diafanizar e montar;

3.6.5. Classificação histopatológica

De forma a avaliar e classificar as lesões encontradas foram avaliadas as seguintes estruturas:

- ♦ Arquitectura hepática (normal ou alterada);

- ♦ Alterações no citoplasma dos hepatócitos;
- ♦ Alterações no núcleo dos hepatócitos;
- ♦ Necrose (presença ou ausência);
- ♦ Fibrose (presença ou ausência);
- ♦ Presença de células inflamatórias;
- ♦ Padrão do infiltrado inflamatório;
- ♦ Mitoses (presença ou ausência);
- ♦ Células em apoptose (presença ou ausência)

3.7. Estudo bioenergético

O estudo bioenergético foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia do Departamento de Química da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro em Vila Real.

3.7.1. Isolamento das mitocôndrias do fígado

Para o estudo bioenergético, o primeiro passo consistiu no isolamento das mitocôndrias do fígado dos murganhos. O fígado recolhido no final do ensaio experimental, conforme descrito no ponto 3.4., foi colocado num copo a 4 °C contendo um meio de homogeneização com pH 7,2 constituído por: manitol 250 mM, sacarose 75 mM, 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico (Hepes) 10 mM, ácido etilenoglicoltetracético (EGTA) 0,5 mM e albumina de soro bovino (BSA) deslipidada a 0,05% (m/v). Posteriormente foi cortado em pequenas porções, lavado com o meio de homogeneização para remover o excesso de sangue e, seguidamente, juntou-se 60 mL do mesmo meio e colocou-se num homogeneizador de vidro do tipo “Potter-Evjhem” com um pistão de teflon a 250 rotações por minuto. O homogenato foi posteriormente centrifugado a 800 x g durante 10 minutos a 4 °C. O sedimento (composto pelo material mais denso das células como o núcleo, eritrócitos e células fragmentadas) foi rejeitado e o sobrenadante, após se retirar a camada superior que correspondia a alguma matéria lipídica ainda presente, foi centrifugado a 10000 x g durante 10 minutos a 4 °C para obtenção da fracção mitocondrial, por precipitação. O sedimento contendo a fracção

mitocondrial foi ressuspensão em 40 mL do meio de lavagem, cuja composição é similar à do meio de homogeneização com excepção do EGTA e BSA, e novamente centrifugado a 10000 x g durante 10 minutos a 4 °C. O processo de lavagem realizado à temperatura de 4 °C foi repetido com vista à obtenção de uma fracção mitocondrial mais pura. Para a lavagem recorreu-se ao auxílio de um pequeno homogeneizador de vidro do tipo “Potter-Evjhem” com um pistão frouxo. As mitocôndrias foram então ressuspensas em meio de lavagem de modo a que a sua concentração final fosse de aproximadamente 30 mg/mL.

3.7.2. Quantificação da proteína – método do biureto

A concentração da proteína no preparado mitocondrial foi determinada pelo método de biureto proposto em 1915 por Autenrieth (Zaia *et al.*, 1998) com as alterações propostas por Gornall *et al.* (1949). Este método espectrofotométrico baseia-se na mudança de cor do reagente de biureto de azul para roxo, após a reacção com as proteínas. A 50 µL de suspensão mitocondrial adicionou-se 50 µL de dodecilsulfato de sódio a 10% (m/v). Adicionou-se água desmineralizada até perfazer 500 µL e 2 mL de reagente de biureto: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,15% (m/v), tartarato de sódio e potássio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a 0,6% (m/v), NaOH a 3% (m/v) e KI a 0,1% (m/v). Foram preparados padrões de BSA na gama de 0 a 1,5 mg/L aos quais se adicionaram os mesmos reagentes que foram adicionados às amostras de suspensão mitocondrial. Foi preparado um branco com todos os reagentes à excepção da proteína. Após 15 minutos de reacção, os padrões e as amostras foram lidos contra o branco a 540 nm num espectrofotómetro Varian Cary 50. A quantidade de proteína foi calculada com base na curva de calibração obtida com os valores dos padrões.

3.7.3. Determinação da actividade respiratória

A determinação da actividade respiratória foi avaliada numa câmara de reacção fechada e termostaticada a 25 °C, sob acção magnética contínua e estável e com um volume de 1 mL. O consumo de O_2 foi medido polarograficamente com um eléctrodo de O_2 (Yellow Springs Instruments, Co) do tipo Clark (Estabrook, 1967) ligado a um

monitor de dióxigénio biológico (YSI modelo 5300), cuja saída de sinal se fazia directamente para um registador da marca Kipen Zone. De início foram adicionados 0,5 mg de suspensão mitocondrial ao meio de respiração (solução com pH 7,2 composta por sacarose 250 mM, K₂HPO₄ 5 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, Hepes 15 mM, BSA deslipidada a 0,05% (m/v) e rotenona 2µM), dando-se depois início à respiração mitocondrial com a adição de succinato 5 mM (sal potássico), o que induziu um pequeno aumento no consumo de O₂. O estado 3 da respiração foi induzido com a adição de uma pequena quantidade de ADP (100-120 nmol). O estado 4 da respiração foi avaliado como sendo o consumo de oxigénio após o consumo do ADP adicionado.

A determinação da respiração mitocondrial dissociada da fosforilação oxidativa fez-se na presença de succinato (5 mM) com posterior adição de carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil hidrazona (FCCP) (1,5 mM), uma molécula lipossolúvel com capacidade de transportar portões, fazendo com que regressem à matriz sem passarem pela ATPsintetase.

3.7.4. Determinação do índice de controlo respiratório

O índice de controlo respiratório (ICR) é o valor da razão entre os estados respiratórios na presença e na ausência de ADP, quando as concentrações de substrato são saturantes em ambos os casos.

$$ICR = \frac{\text{estado3}}{\text{estado4}}$$

3.7.5. Determinação do potencial transmembranar em mitocôndrias

O potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi$) foi estimado através da monitorização da distribuição do catião lipofílico tetrafenilfosfónio (TPP⁺) com recurso a um eléctrodo sensível ao catião TPP⁺ preparado conforme procedimento descrito por Kamo *et al.* (1979). As mitocôndrias foram incubadas num meio de reacção suplementado com TPP⁺ e o decréscimo da concentração em catião TPP⁺ traduz a sua transferência do meio para a membrana mitocondrial. Foi construído um mini eléctrodo

com um tubo de PVC que foi fechado com uma membrana feita à base de PVC contendo tetrafenilboro como permutador de catiões. Este mini-eléctrodo continha no seu interior uma solução TPP⁺ 10 mM. Como eléctrodo de referência usou-se um eléctrodo saturado de prata/cloreto de prata. Ambos os eléctrodos foram inseridos numa câmara de vidro termostática e ligados a um potenciómetro Jenway 3305 que registou a diferença de potencial entre os mesmos. O sinal foi debitado para um registor da marca Kipen Zon após passagem por circuito de compensação de voltagem basal. Todas as reacções foram realizadas à temperatura de 25 °C, numa câmara de reacção semiaberta termostatizada, sob agitação magnética contínua e estável. A suspensão mitocondrial foi incubada num volume de 1 mL de meio de reacção composto por sacarose 250 mM, K₂HPO₄ 5 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, Hepes 15 mM e BSA deslipídada a 0,05 % (m/v), suplementado com cloreto de tetrafenilfosfónio (TPPCI) 3 µM. A concentração de TPP⁺ utilizada (3 µM) permitiu uma elevada sensibilidade nas medições e não produziu qualquer efeito tóxico nas mitocôndrias. O potencial de membrana foi calculado de acordo com Kamo *et al.* (1979) por intermédio da seguinte equação (a 25 °C)

$$\Delta\Psi(mV) = 59 \log\left(\frac{v}{V}\right) - 59 \log\left(10^{\frac{\Delta E}{59}} - 1\right)$$

onde v , V e ΔE representam o volume de suspensão mitocondrial, o volume do meio de reacção e a deflexão do potencial do eléctrodo a partir da linha basal, respectivamente. Para os cálculos considerou-se que 1 mg de proteína correspondia a um volume matricial da mitocôndria de 1,1 µL. O valor do potencial de referência foi medido após a adição de valinomicina que colapsa o potencial de membrana, num meio com 30 mM de catião potássio. Não foram efectuadas correcções devido à contribuição do valor da ligação do catião TPP⁺ à membrana mitocondrial uma vez que só era pretendido avaliar as alterações relativas no potencial e não valores absolutos.

3.7.6. Estudo do comportamento osmótico das mitocôndrias – permeabilidade aos protões

O comportamento osmótico das mitocôndrias foi monitorizado por turbidimetria conforme os métodos descritos por Beavis e Vercesi (1992) e Mitchell e Moyle (1969) com algumas alterações. As alterações de volume causadas por diferenças osmóticas foram detectadas num espectrofotómetro Spectronic Genesys 2PC. A absorvância aparente das suspensões mitocondriais foi registada ao comprimento de onda de 520 nm. O conteúdo da câmara foi mantido em agitação constante. Os ensaios foram realizados à temperatura de 25°C num meio em que não ocorre a energização das mitocôndrias e que é composto por CH₃COOK (acetato de potássio) 54 mM, EGTA 0,1 mM, ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA) 0,2 mM e Hepes 5 mM a pH 7,1. O meio foi preparado na altura do ensaio. Foram adicionados 2µL de atractilósídeo 10 mM, 6µL de propranolol 10 mM, 2 µL de antimicina A 750 µM, 6 µL de ATP 100 mM, 25µL de BSA a 10% (m/v) e 1,0 µL de rotenona 5 mM.

As mitocôndrias estruturalmente íntegras não entumescem em soluções isosmóticas de CH₃COOK. Ainda que a membrana interna seja permeável ao anião acetato, o potencial transmembranar de difusão, que é negativo internamente, opõe-se à entrada efectiva do anião na mitocôndria. A adição de valinomicina levanta a restrição à entrada do acetato pois a valinomicina permite a livre entrada do potássio e, assim, a diferença de cargas entre o interior e o exterior é compensada.

3.7.7. Análise de diversos mecanismos antioxidantes em fracções mitocondriais - determinação da actividade enzimática

3.7.7.1. Superóxido dismutase

A determinação da actividade da enzima superóxido dismutase (SOD) realizou-se através do método espectrofotométrico de absorção molecular. Foi utilizado um volume de 3 mL de um meio de reacção composto por uma mistura homogénea de tampão de fosfato 50 mM, (pH 7,4), KCN 2 mM, hipoxantina 100 µM, EDTA 1 mM,

azul de nitrotetrazólio (NBT) 100 μM e Triton X-100 a 0,025 % (v/v), tendo-se adicionado, sob agitação, quantidades adequadas da suspensão mitocondrial que foram incubadas durante 1 minuto. Seguidamente adicionou-se, também sob agitação, xantina oxidase 0,025 U/mL, cuja pureza foi verificada cromatograficamente. A reacção de redução do NBT verificou-se pelo aumento da absorvância a 560 nm. A diluição da enzima no tampão utilizado para os ensaios foi efectuada sempre imediatamente antes do seu uso. A adição de cianeto ao meio de reacção teve como objectivo inibir qualquer actividade de Cu-Zn-SOD presente na fracção mitocondrial. (Bridges e Salin, 1981) A actividade da Mn-SOD é expressa em U/mg de proteína mitocondrial e foi determinada com base na alteração da velocidade da redução do NBT pela adição da fracção membranar. Foi realizada uma curva padrão em triplicado nas mesmas condições experimentais, em que a suspensão mitocondrial foi substituída por quantidades adequadas de SOD, obtida comercialmente. A unidade de actividade foi definida como a quantidade de enzima que provoca a redução de 50 % do NBT.

3.7.7.2. *Catalase*

A determinação da actividade da catalase (CAT) realizou-se através de um método polarográfico (Del Rio *et al.*, 1977). Este método baseia-se na determinação da velocidade inicial da produção de dioxigénio resultante da decomposição do H_2O_2 pela catalase, num tampão em que o dioxigénio é removido por saturação com azoto. Foi utilizado um eléctrodo de dioxigénio YSI 5331 (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio), o potencial aplicado foi de 0,8 V e a deflecção obtida no registador foi convertida em concentração de dioxigénio, tendo-se em linha de conta o facto de o meio saturado de ar apresentar, a 25 °C, uma concentração de 0,25 μmol de O_2 /mL. Todas as reacções foram realizadas em tampão de fosfato 50 mM (pH 7,0) a 25 °C e num volume final de 1,5 mL. A concentração do H_2O_2 foi calculada com base no coeficiente de extinção molar a 240 nm (ϵ 39,58 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). O H_2O_2 foi diluído no mesmo tampão utilizado nos ensaios da actividade enzimática, tendo as diluições sido realizadas no momento dos ensaios. Para a determinação da escala, adicionou-se, com agitação magnética, 1,5 mL de tampão de fosfato 50 mM à temperatura de 25 °C. Após alguns minutos a equilibrar considerou-se o valor registado como correspondendo a 100 % de

dioxigénio dissolvido no tampão e ajustou-se o aparelho de modo a obter a escala máxima. Seguidamente, borbulhou-se a solução com azoto através de uma agulha hipodérmica até que a deflexão fosse mínima (correspondendo então a 0 %). Adicionou-se, de seguida H₂O₂ 10 mM e iniciou-se o registo a uma velocidade de 1 mm/s. Após 2 minutos adicionou-se uma alíquota da fracção mitocondrial, que tinha sido previamente incubada durante 10 minutos com Triton X-100 a 0,025 % (v/v), tendo-se deixado decorrer o tempo necessário (sensivelmente 30 s) para a determinação da velocidade inicial. A identidade da enzima foi testada através da sua sensibilidade ao KCN (Nohl e Hegner, 1978). A adição de KCN 2 mM inibiu completamente a produção de O₂. Para a determinação da actividade da CAT assumiu-se que num tampão saturado de ar e à temperatura de 25 °C a concentração de dioxigénio é de 0,25 µmol/mL, o que, considerando o volume final de 1,5 mL, dá um valor de 0,375 µmol de O₂ dissolvidos na câmara. Sabendo a correspondência na escala de papel foi efectuada a conversão de centímetros em µmol de O₂. Consequentemente, o desvio produzido na agulha devido à decomposição de H₂O₂ em O₂ pela catalase traduziu-se na medida da sua actividade enzimática. A unidade de actividade de CAT foi definida como a produção de 1 µmol O₂/minuto (Spychalla e Desborough, 1990).

3.7.7.3. *Glutatio S-transferase*

A actividade da glutatio *S*-transferase (GST) foi avaliada de acordo com Hatton *et al.* (1996). Registou-se o aumento da absorvância a 340 nm devido à reacção do glutatio (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A reacção realizou-se em tampão de fosfato 100 mM (pH 7,0) contendo CDBN 2 mM e GSH 2 mM, tendo-se adicionado um volume adequado de fracção enzimática de forma a obter-se uma concentração proteica de 50 µg/mL, sendo o volume final de 2 mL. A reacção foi realizada à temperatura constante de 25 °C. A actividade de GST foi expressa em nmol de CDBN conjugado por min⁻¹·mg⁻¹proteína.

3.7.8. Determinação da actividade enzimática e integridade das membranas mitocondriais

3.7.8.1. Succinato desidrogenase

A actividade da succinato desidrogenase, ou succinato-coenzima Q redutase (SQR), foi quantificada polarograficamente com um eléctrodo de O₂ (Yellow Springs Instruments, Co) do tipo Clark de acordo com o método descrito por Singer (1974). Os ensaios enzimáticos foram realizados à temperatura de 25°C em 1 mL de meio de respiração constituído por sacarose 250 mM, K₂HPO₄ 5 mM, Hepes 15 mM e BSA deslipada 0,05% (m/v) a pH 7,2 suplementado com succinato 5 mM, rotenona 2 µM, 0,1µg de antimicina A, KCN 1 mM, Triton X-100 0,03% (v/v) e 0,5 mg de fracção mitocondrial. A reacção foi iniciada com a adição de metassulfato de fenazina (PMS). A actividade enzimática foi calculada a partir da velocidade inicial, de modo a evitar problemas relacionados com o esgotamento do dioxigénio no meio e a acumulação de certos produtos de reacção que afectariam a velocidade de reacção.

3.7.8.2. Citocromo c oxidase

A actividade da citocromo c oxidase (COX) foi quantificada polarograficamente de acordo com o descrito por Brautigan *et al.* (1978). Os ensaios enzimáticos foram realizados à temperatura de 25 °C com 0,5 mg de proteína mitocondrial em 1 mL de meio de respiração suplementado com citocromo c 10 µM, Triton X-100 a 0,3 % (v/v) e rotenona 2 µM. Iniciou-se a reacção pela adição de ascorbato 5 mM e tetrametilfenilenodiamina (TMPD) 0,25 mM. A linha basal, correspondente à auto-oxidação do ascorbato/TMPD, foi subtraída à velocidade do consumo de dioxigénio na presença das mitocôndrias.

3.7.8.3. *ATP sintetase*

A actividade da ATP sintetase foi quantificada de acordo com o método descrito por Madeira *et al.* (1974). Este método baseia-se na determinação potenciométrica do consumo de H^+ associado à síntese de ATP. Os ensaios enzimáticos foram realizados a temperatura de 25 °C em 2 mL de meio de respiração com ião fosfato 2 mM em vez de 5 mM e ao qual se adicionou succinato 5 mM e 1 mg de proteína mitocondrial. A alteração na concentração de fosfato teve como finalidade tornar o método mais sensível às alterações de pH induzidas pelo consumo de H^+ . Uma quantidade elevada de fosfato tamponiza excessivamente o meio dificultando a detecção da alteração do valor de pH. A reacção foi iniciada por adição de ADP 200-300 mM. A reacção é terminada por meio de adição de oligomicina 2µg/mL, no fim do tempo de reacção, que faz cessar o consumo de H^+ . O consumo de H^+ foi calculado decorridos 3 minutos após o início da reacção e a variação de pH foi continuamente medida com um eléctrodo de pH Metter Toledo U402-M6-S7/100 ligado a um potenciómetro Jenway 330 sendo o sinal debitado para registador da marca Kipen Zon, após passagem por um circuito de compensação basal. A calibração interna do equipamento foi feita no final de cada ensaio por adição de solução padronizada de HCl.

3.8. *Análise estatística dos resultados*

Os valores do I_p , da massa corporal, da massa absoluta e relativa dos órgãos, dos parâmetros bioquímicos e do estudo bioenergético são apresentados como valor médio \pm desvio padrão da média, em cada grupo. A análise dos dados e comparação entre grupos foi feita com recurso ao teste t- Student para duas amostras com variâncias iguais ou desiguais, dependendo dos casos. Assim, os resultados foram analisados previamente a fim de verificar se existia, ou não, homogeneidade de variâncias. A homogeneidade de variâncias foi avaliada com recurso ao teste F. Os testes F e t- Student foram feitos recorrendo à ferramenta análise de dados do Microsoft Excel. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$.

4. Resultados

O ensaio experimental foi iniciado com 42 animais dos quais 30 sobreviveram às 5 semanas de duração do protocolo experimental. Os animais que morreram pertenciam aos grupos 1 (1 animal), 2 (1 animal), 3 (5 animais) e 4 (5 animais). Dois animais morreram durante a execução da entubação gástrica para administração dos THMs. Somente os 30 animais que sobreviveram até ao final do ensaio experimental foram incluídos nos resultados.

4.1. Índice de perdas

O número de animais em cada grupo, no início do período de quarentena bem como no início e no fim do protocolo experimental encontra-se descrito no quadro 3. Os grupos 3 e 4 tiveram um índice de perdas idêntico e mais elevado do que os grupos 1 e 2. A morte de um murgancho no grupo controlo resultou de golpes infringidos durante lutas entre os Murganhos que partilhavam a mesma gaiola. O animal ferido foi retirado da gaiola onde estava e colocado numa gaiola sozinho, mas acabou por morrer.

Quadro 3. Índice de perdas			
	Nº de animais no início do período de quarentena e do protocolo experimental	Nº de animais no final do protocolo experimental	Ip (%)
Grupo 1 (Controlo)	9	8	11,1
Grupo 2 (MeOH)	11	10	9,1
Grupo 3 (DBCM)	11	6	45,5
Grupo 4 (BDCM)	11	6	45,5

4.2. Variação média da massa corporal

A variação média da massa corporal dos animais de cada grupo desde o início do período de quarentena e ao longo do ensaio experimental encontra-se ilustrada na figura 4. A massa corporal média dos animais variou com oscilações pontuais, mas com uma

tendência crescente ao longo do tempo. Verificou-se uma diminuição da massa corporal nos grupos 2, 3 e 4 no final do período de administração do MeOH e THMs.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre massa corporal média dos animais pertencentes aos grupos 2, 3 e 4 relativamente ao grupo controlo no final do protocolo experimental (quadro 4).

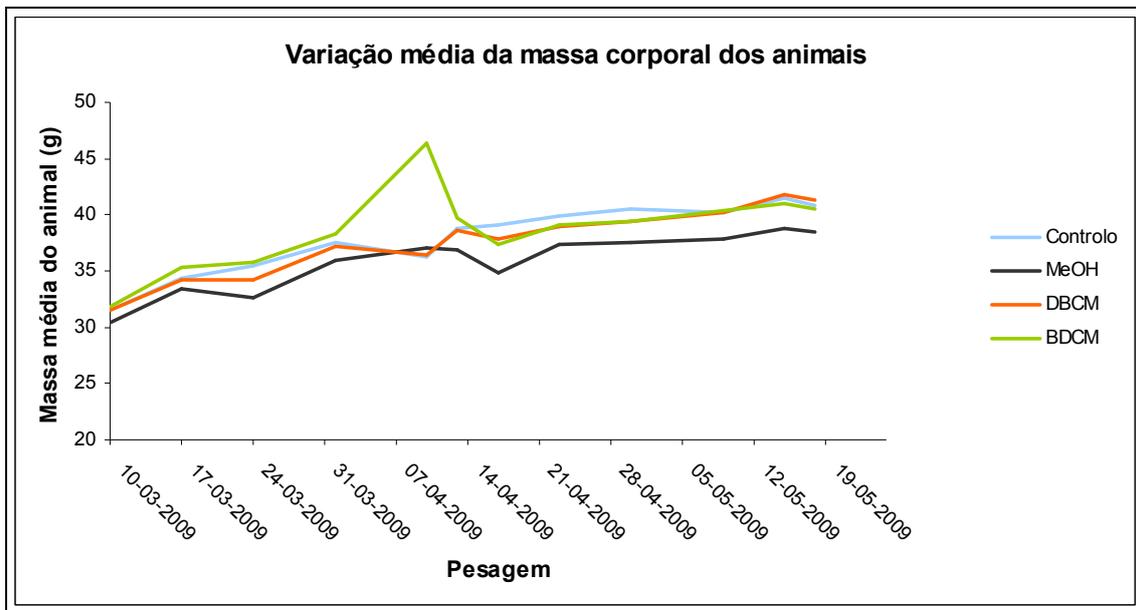


Figura 4. Variação média da massa corporal dos animais.

4.3. Consumo médio de água

O consumo médio de água (figura 5) foi oscilatório em todos os grupos experimentais. Ao longo do período experimental, o consumo de água em cada grupo foi sensivelmente idêntico nos grupos 1, 3 e 4 sendo que o grupo 2 (MeOH) apresentou consumos médios de água ligeiramente diferentes dos outros grupos.

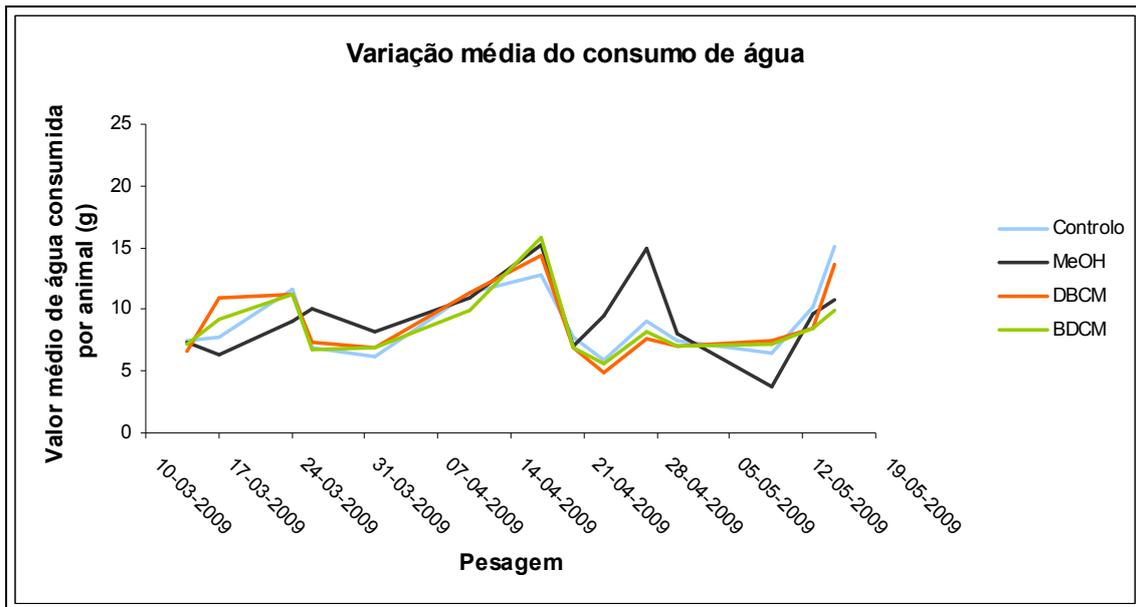


Figura 5. Varição média do consumo de água.

4.4. Consumo médio de ração

O consumo médio de ração (figura 6), não apresentou qualquer tendência. Os valores são bastante similares em todos os grupos. Apenas num momento existe uma pequena diferença entre o consumo de comida do grupo 2 (MeOH), que se mantém constante, e dos restantes grupos que aumentam o consumo de alimento.

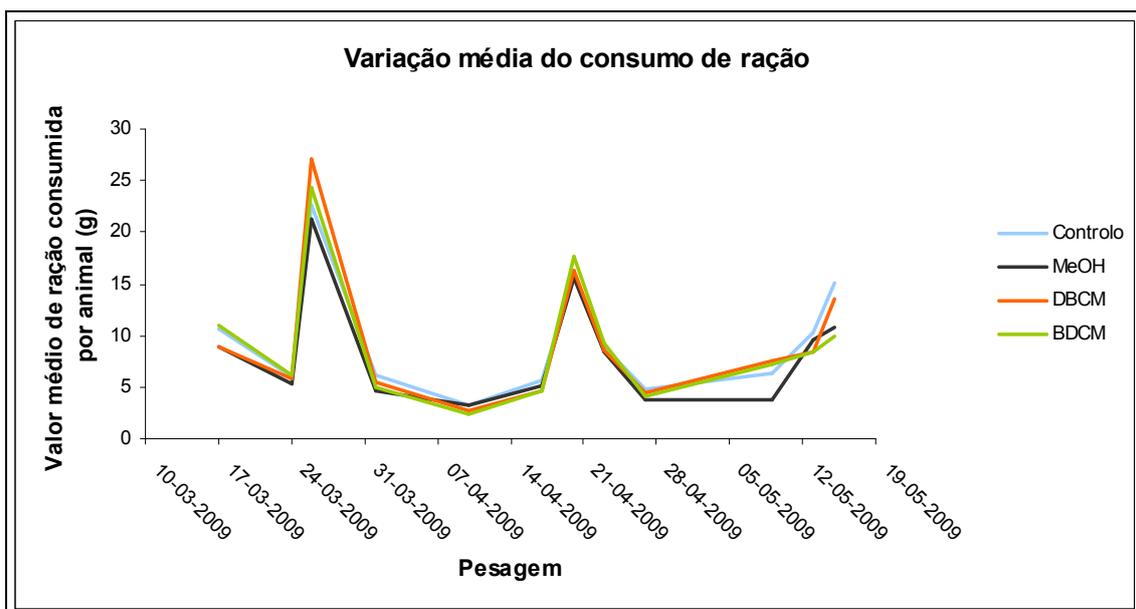


Figura 6. Varição média do consumo de ração.

4.5. Alterações comportamentais dos animais

Ao longo do ensaio experimental os animais foram observados diariamente a fim de verificar a existência de eventuais alterações no seu comportamento. Durante a semana em que foram administrados os compostos, e na seguinte, verificou-se que os animais dos grupos 2, 3 e 4 estavam menos activos e mais letárgicos. O comportamento dos animais voltou ao habitual após essa fase.

4.6. Massa inicial e final dos animais e massa dos órgãos

A massa média dos órgãos recolhidos aos animais de cada grupo no decorrer da necrópsia está descrita no quadro 4. Após análise estatística de todos os dados verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre a massa do baço dos animais do grupo 4 e dos grupos 1 e 2.

4.7. Massa relativa dos órgãos

Para cada animal, foi calculada a relação a massa relativa de cada órgão recolhido durante a necrópsia, dividindo a massa do órgão pela massa corporal do respectivo animal. O quadro 5 apresenta os valores médios para cada grupo e o respectivo desvio padrão. A massa relativa do baço dos animais do grupo 4 revelou ser estatisticamente diferente dos grupos 1 e 2. A massa relativa dos pulmões dos animais do grupo 2 revelou diferenças estatisticamente significativas dos grupos 1 e 4.

4.8. Aspecto macroscópico dos órgãos

Não foram observadas alterações macroscópicas em nenhum dos órgãos recolhidos no final do ensaio.

Quadro 4. Massa corporal inicial e final e massa dos órgãos dos murganhos (média ± desvio padrão).

	Massa corporal média inicial	Massa corporal média final	Massa fígado	Massa Rim Esquerdo	Massa Rim Direito	Massa Baço	Massa Pulmões	Massa Coração
	(g)							
Grupo 1 (Controlo)	37,57±3,05	40,88±3,76	1,99±0,35	0,29±0,06	0,29±0,08	0,14±0,05	0,29±0,04	0,24±0,07
Grupo 2 (MeOH)	36,84±3,17	38,40±3,14	1,83±0,24	0,26±0,07	0,30±0,07	0,15±0,07	0,31±0,06	0,25±0,05
Grupo 3 (DBCM)	38,71±3,25	41,25±3,15	1,98±0,20	0,28±0,04	0,35±0,05	0,17±0,08	0,32±0,04	0,23±0,10
Grupo 4 (BDCM)	40,31±2,46	40,45±1,78	1,93±0,23	0,32±0,04	0,32±0,04	0,10±0,00 ¹	0,27±0,05	0,22±0,04

¹ Resultados estatisticamente diferentes dos grupos 1 (p=0,040) e 2 (p=0,026).

Quadro 5. Massa relativa dos diferentes órgãos (media ± desvio padrão).

	Fígado	Rim Esquerdo	Rim Direito	Baço	Pulmões	Coração
Grupo 1 (Controlo)	0,0484±0,0059	0,0070±0,0012	0,0070±0,0021	0,0034±0,0012	0,0071±0,0010	0,0058±0,0017
Grupo 2 (MeOH)	0,0477±0,0050	0,0068±0,0019	0,0078±0,0012	0,0040±0,0020	0,0081±0,0014 ²	0,0066±0,0015
Grupo 3 (DBCM)	0,0482±0,0046	0,0068±0,0006	0,0085±0,0010	0,0040±0,0019	0,0077±0,0009	0,0056±0,0024
Grupo 4 (BDCM)	0,0478±0,0053	0,0078±0,0009	0,0078±0,0009	0,0021±0,0001 ¹	0,0066±0,0013	0,0053±0,0009

¹ Resultados estatisticamente diferentes dos grupos 1 (p=0,042) e 2 (p=0,021); ² Resultados estatisticamente diferentes dos grupos 1 (p=0,048) e 4 (p=0,024).

4.9. Parâmetros bioquímicos

Os valores médios e respectivos desvios padrão das actividades séricas da ALT, AST e FA e das concentrações séricas da BT, BD, PT, Alb, creatinina e ureia encontram-se no quadro 6. A administração de ambos os THMs induziu um aumento estatisticamente significativo da actividade sérica da ALT e o BDCM causou um aumento estatisticamente significativo da concentração sérica de BT.

Quadro 6. Parâmetros bioquímicos.

	ALT UI/L	AST UI/L	FA UI/L	BT mg/dL	BD mg/dL	Alb g/dL	PT g/dL	Creatinina mg/dL	Ureia mg/dL
Grupo 1	38,9±7,5	99±25	34±13	0,64±0,10	0,14±0,05	0,98±0,08	3,97±0,20	0,27±0,05	42,9±6,7
Grupo 2	40,7±7,0	154±33 ³	27,6±7,2	0,56±0,17	0,13±0,07	0,99±0,07	3,98±0,27	0,23±0,05	48,7±8,8
Grupo 3	49,2±6,6 ¹	167±59 ⁴	38,4±6,8 ⁶	0,66±0,17	0,18±0,08	1,04±0,05	4,06±0,24	0,30±0,12	57±14
Grupo 4	71±16 ²	177±58 ⁵	41±11 ⁷	0,77±0,06 ⁸	0,20±0,08	1,00±0,07	4,00±0,27	0,28±0,04	53±15

¹ Resultados estatisticamente diferentes dos grupos 1 (p=0,016) e 2 (p=0,030); ² Resultados estatisticamente diferentes dos grupos 1 (p=0,001) e 2 (p=0,044); ³ Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,001); ⁴ Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,030) e idênticos aos do grupo 2; ⁵ Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,019) e idênticos aos do grupo 2; ⁶ Resultados estatisticamente diferentes do grupo 2 (p=0,009) e idênticos aos do grupo 1; ⁷ Resultados estatisticamente diferentes do grupo 2 (p=0,010) e idênticos aos do grupo 1; ⁸ Resultados estatisticamente diferentes dos grupos 1 (p=0,040) e 2 (p=0,040).

4.10. Estudo histopatológico

No quadro 7 estão referidas as lesões histopatológicas identificadas no fígado dos animais dos 4 grupos experimentais. Verificou-se, por observação dos cortes histológicos corados com H&E, que a arquitetura do fígado se manteve preservada em todos os animais de todos os grupos experimentais. Na figura 7 pode observar-se o aspecto histológico do fígado pertencente a um Murganho do grupo controlo. Em termos de alterações no parênquima hepático dos Murganhos, as mais importantes identificadas nos grupos expostos aos THMs foram a degenerescência vacuolar do citoplasma dos hepatócitos (figura 8), núcleos com a cromatina dispersa e com vários nucléolos (figura 8) e zonas de necrose de coagulação (figura 9). O infiltrado inflamatório (figura 10) caracterizou-se pela presença de neutrófilos. Não foram encontradas mitoses nas células hepáticas de nenhum dos animais dos 4 grupos experimentais, foram observadas algumas células em apoptose (figura 8).

As colorações pela reticulina (figura 11) e tricrómio de Masson (figura 12) não evidenciaram qualquer alteração do estroma hepático.

Quadro 7. Lesões histopatológicas encontradas no fígado dos animais pertencentes aos 4 grupos experimentais.

	Arquitetura	Citoplasma	Núcleo	Necrose	Fibrose	Infiltrado Inflamatório	Mitoses	Células em apoptose
Grupo 1 (Controlo) (n=8)	Preservada 100% (n=8)	Normal 100% (n=8)	Normal 100% (n=8)	Ausente 100% (n=8)	Ausente 100% (n=8)	Ausente 100% (n=8)	Ausente 100% (n=8)	Ausente 100% (n=8)
Grupo 2 (MeOH) (n=10)	Preservada 100% (n=10)	DV 10% (n=1)	CDVN 100% (n=10)	NC 20% (n=2)	Ausente 100% (n=10)	NCN 20% (n=2)	Ausente 100% (n=10)	Escassas 20% (n=2)
Grupo 3 (DBCM) (n=6)	Preservada 100% (n=6)	DV 100% (n=6)	CDVN 100% (n=6)	NC 33,3% (n=2)	Ausente 100% (n=6)	ECN 33,3% (n=2)	Ausente 100% (n=6)	Ausente 100% (n=6)
Grupo 4 (BDCM) (n=6)	Preservada 100% (n=6)	DV 100% (n=6)	CDVN 100% (n=6)	NC 33,3% (n=2)	Ausente 100% (n=6)	ECN 33,3% (n=2)	Ausente 100% (n=6)	Ausente 100% (n=6)

DV: Degenerescência Vacuolar; **CDVN:** Cromatina dispersa, vários nucléolos; **NC:** Necrose de coagulação; **NCN:** Nodular, composto por neutrófilos; **ECN:** Escasso, composto por neutrófilos;

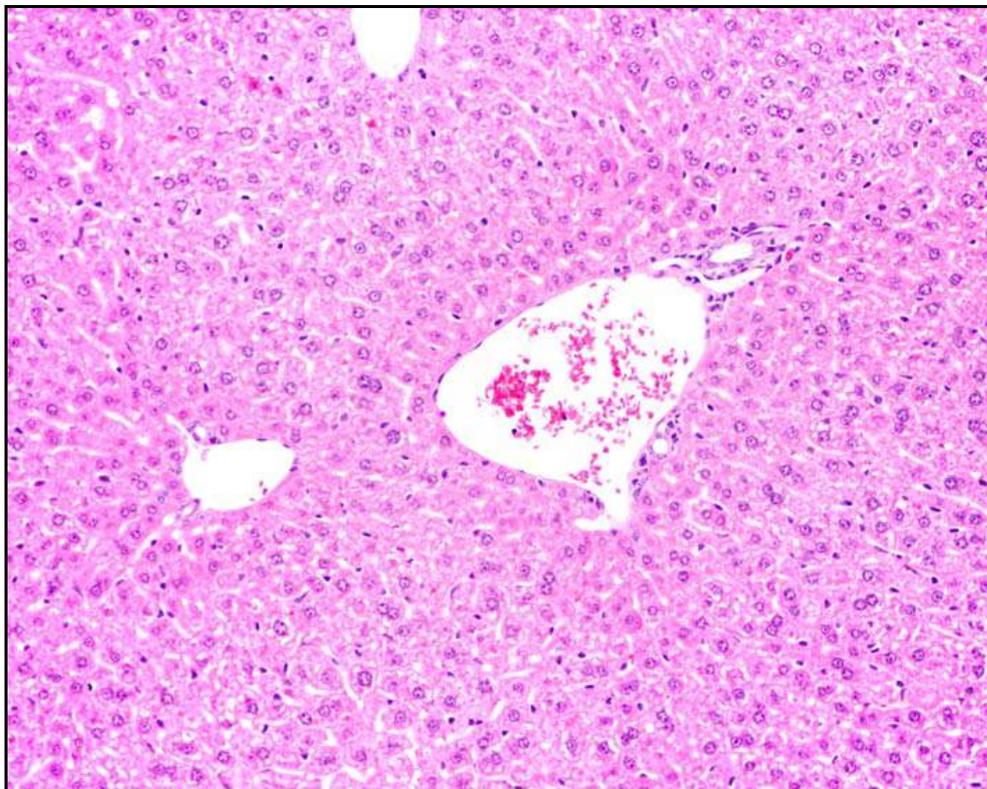


Figura 7. Fígado normal (H&E 200x).

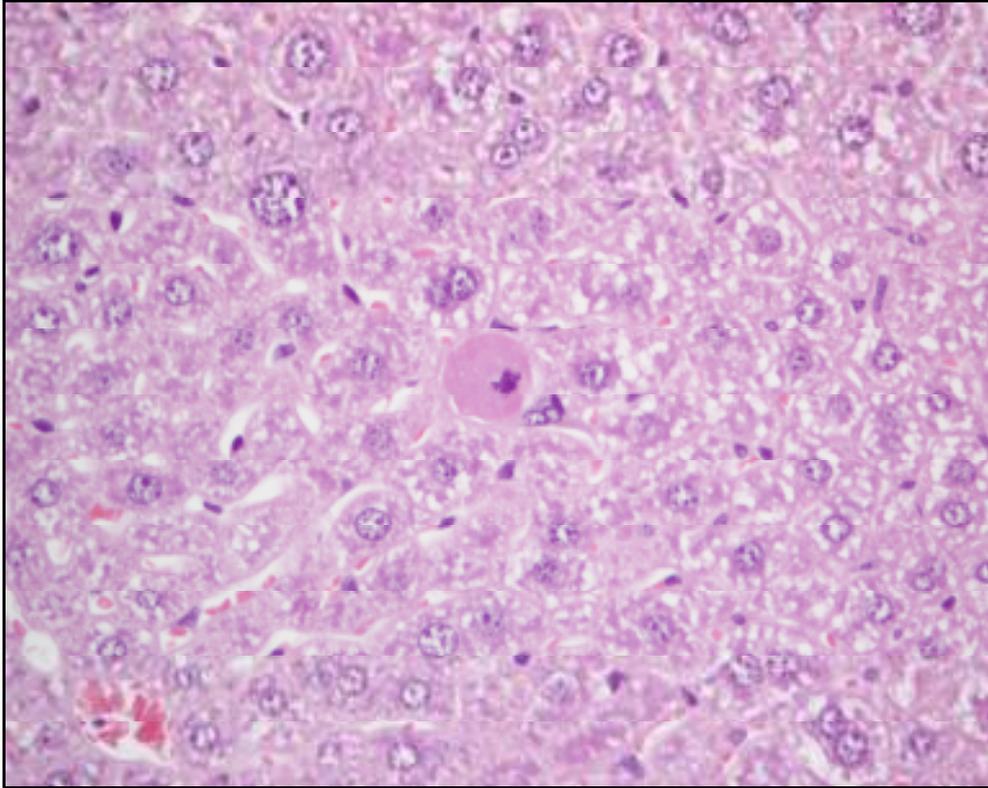


Figura 8. Degenerescência vacuolar dos hepatócitos, núcleo dos hepatócitos com cromatina dispersa e com vários nucléolos e célula em apoptose (H&E 400x).

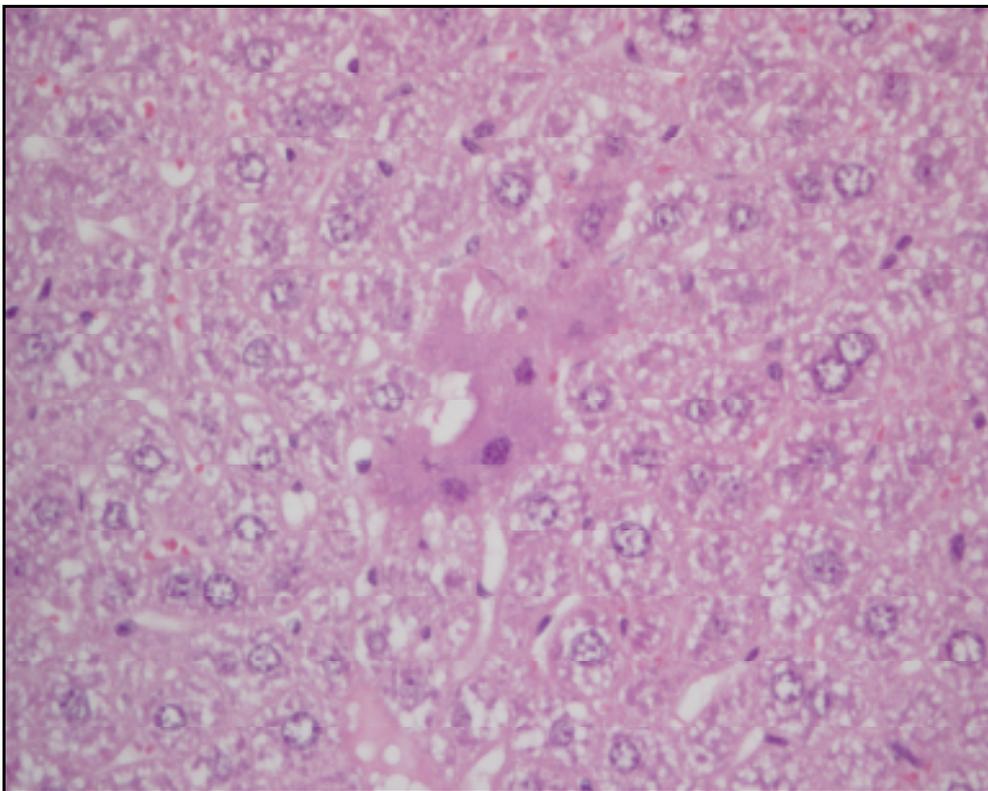


Figura 9. Fígado com zona de necrose de coagulação (H&E 400x).

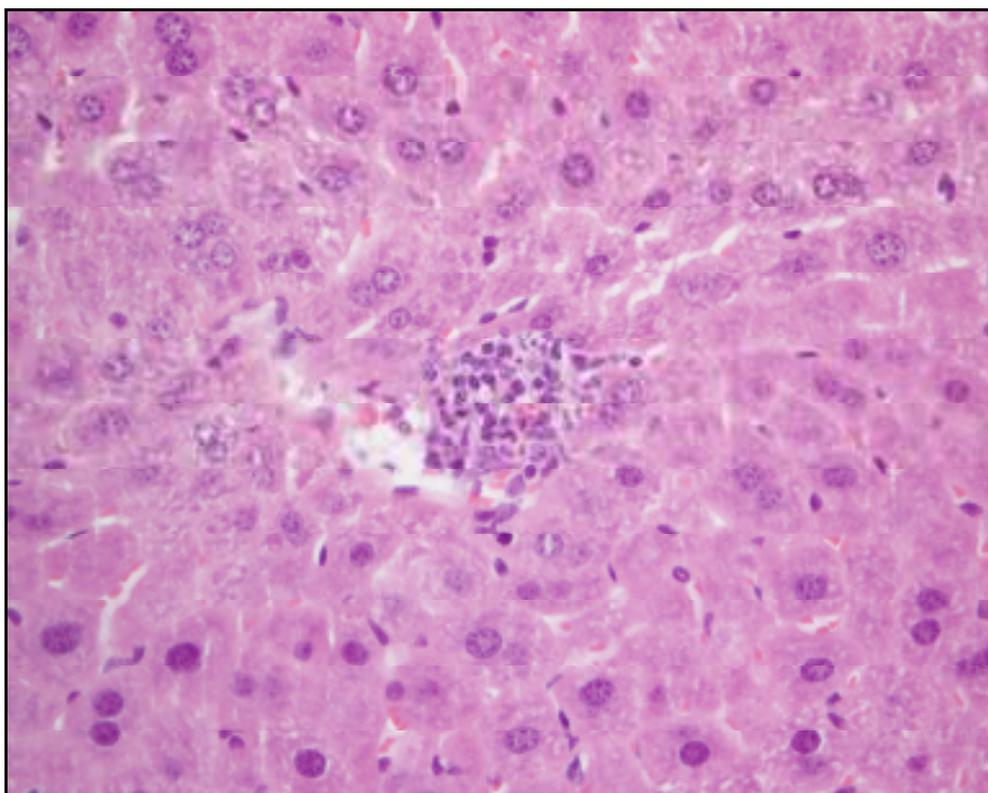


Figura 10. Fígado com zona de infiltrado inflamatório composto por neutrófilos (H&E 400x).

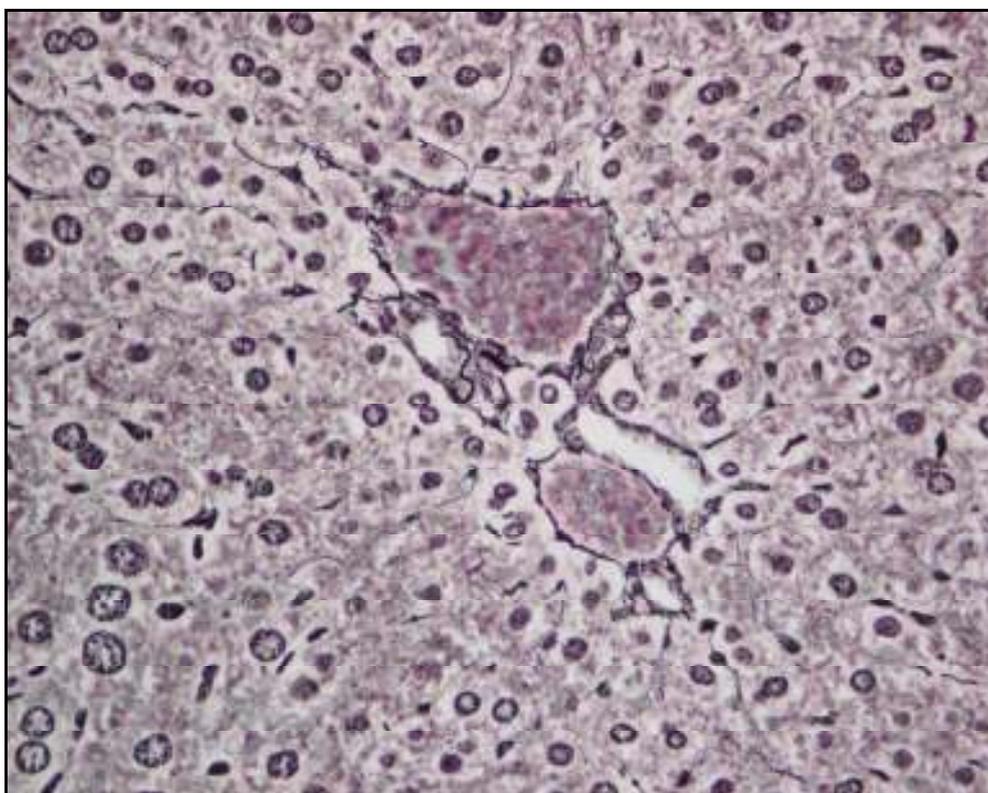


Figura 11. Coloração pela reticulina de um fígado normal (400x).

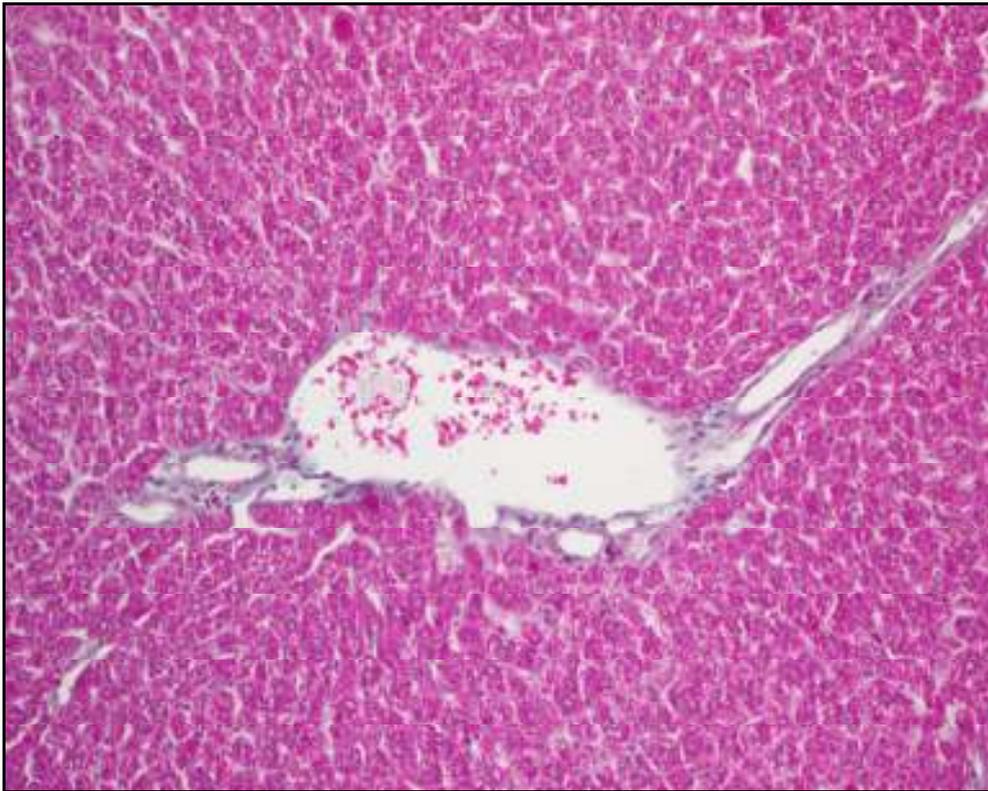


Figura 12. Coloração pelo tricrômio de Masson de um fígado normal (400x).

4.11. Bioenergética

4.11.1. Funcionamento mitocondrial

Os valores relativos à respiração mitocondrial (estado 3, estado 4, estado dissociado da fosforilação oxidativa e índice de controlo respiratório), ao potencial de membrana, à diferença de *swelling* mitocondrial e à cinética de *swelling* mitocondrial encontram-se no quadro 8. A administração de DBCM causou um aumento do estado 4 da respiração mitocondrial. A administração de ambos os THMs causou um aumento da respiração dissociada da fosforilação oxidativa (FCCP). Os aumentos verificados no ICR e $\Delta\Psi$ nos grupos 3 e 4 bem como o aumento do estado 4 da respiração mitocondrial verificado no grupo 4, não podem ser atribuídos à administração dos THMs uma vez que a administração de MeOH provocou o mesmo efeito e não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos grupos expostos aos THMs (grupos 3 e 4) e os valores do grupo 2.

Quadro 8. Funcionamento mitocondrial							
	estado 3	estado 4	FCCP	ICR	$\Delta\Psi$ mV	Δ swelling Δ abs/min/mg proteína	Cinética swelling
	nmolO ₂ /mg proteína						
Grupo 1	49,9±5,4	18,0±3,0	132± 12	2,80±0,42	-193±5	0,36±0,06	-1,08 ±0,46
Grupo 2	46,9±4,0	29,2±6,3 ¹	129± 8	1,61±0,12 ⁶	-170±14 ⁹	0,48±0,14	-1,10 ±0,26
Grupo 3	46,3±8,4	26,3±3,2 ²	119±13 ⁴	1,80±0,42 ⁷	-165±10 ¹⁰	0,39±0,06	-1,01 ±0,25
Grupo 4	46,6±6,8	33±15 ³	120±11 ⁵	1,43±0,32 ⁸	-165±13 ¹¹	0,39±0,02	-0,84 ±0,15

¹Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=2,78E⁻⁹); ²Resultados estatisticamente diferentes dos grupos 1 (p=5,94E⁻¹¹) e 2 (p=0,031); ³Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,001) e idênticos ao grupo 2; ⁴Resultados estatisticamente diferentes dos grupos 1 (p=0,018) e 2 (p=0,035); ⁵Resultados estatisticamente diferentes dos grupos 1 (p=0,020) e 2 (p=0,036); ⁶Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=1,35x10⁻⁷); ⁷Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=9,41x10⁻⁵) e idênticos ao grupo 2; ⁸Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=4,08x10⁻⁷) e idênticos ao grupo 2; ⁹Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,011); ¹⁰Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=2,44x10⁻⁴) e idênticos ao grupo 2; ¹¹Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,007) e idênticos ao grupo 2.

4.11.2. Determinação da actividade enzimática

As actividades enzimáticas médias em cada grupo experimental da SQR, COX e ATPsintetase encontram-se no quadro 9. O DBCM induziu um decréscimo na actividade das enzimas SQR e COX e o BDCM induziu um decréscimo na actividade das enzimas SQR e ATPsintetase.

Quadro 9. Actividade enzimática mitocondrial			
	SQR	COX	ATPsintetase
	nmolO ₂ /mg proteína		nmolH ⁺ /mg proteína
Grupo 1	107 ± 12	732 ± 25	159 ± 38
Grupo 2	101 ± 19	701 ± 127	146 ± 20
Grupo 3	85 ± 15 ¹	528 ± 77 ³	119 ± 1
Grupo 4	86 ± 13 ²	677 ± 88	114 ± 1 ⁴

¹Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,011) e idênticos ao grupo 2; ²Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,008) e idênticos ao grupo 2; ³Resultados estatisticamente diferentes dos grupos 1 (p=4,24E-4) e 2 (p=0,009); ⁴Resultados estatisticamente diferentes dos grupos 1 (p=0,049) e 2 (p=0,026).

4.11.3. Determinação da actividade das enzimas do stresse oxidativo

As actividades das enzimas do stresse oxidativo (valor médio por grupo) SOD, GST e CAT estão indicadas no quadro 10. O DBCM e o BDCM induziram um aumento da actividade da enzima GST. Os aumentos das actividades das enzimas SOD e CAT verificados nos grupos 3 e 4 não podem ser atribuídos à administração dos THMs uma vez que também foram verificados aumentos destas actividades enzimáticas no grupo 2 e não existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos grupos expostos aos THMs e os valores do grupo exposto ao MeOH.

Quadro 10. Actividade das enzimas do stresse oxidativo			
	SOD	GST	CAT
	U/min/mgproteína		nmolH ₂ O ₂ /min/mgproteína
Grupo 1	1,93 ± 0,12	38 ± 2	81 ± 16
Grupo 2	2,35 ± 0,20 ¹	46 ± 11	119 ± 41 ⁶
Grupo 3	2,50 ± 0,28 ²	56 ± 7 ⁴	98 ± 13 ⁷
Grupo 4	2,17 ± 0,08 ³	57 ± 12 ⁵	103 ± 5 ⁸

¹Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,005); ²Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,004) e estatisticamente idênticos ao grupo 2; ³Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,007) e estatisticamente idênticos ao grupo 2; ⁴Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,001) e 2 (p=0,040); ⁵Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,011) e idênticos aos do grupo 2; ⁶Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,040); ⁷Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,033) e idênticos aos do grupo 2; ⁸Resultados estatisticamente diferentes do grupo 1 (p=0,008) e idênticos aos do grupo.

5. Discussão

Vários estudos epidemiológicos realizados ao longo dos últimos anos mostraram uma relação, ainda que fraca, entre o consumo de água sujeita a processos de desinfecção com cloro e a ocorrência de cancro de bexiga, cancro rectal e cancro colorectal (King e Marret, 1996; Doyle *et al.*, 1997; Cantor *et al.*, 1998; Hildesheim *et al.*, 1998). Em Portugal, o valor máximo admissível de THMs totais (soma das concentrações de clorofórmio, BDCM, DBCM e bromofórmio) na água destinada ao consumo humano é de 100 µg/L (Dec.-Lei N° 306/2007). Em Portugal não existem registos epidemiológicos sobre a relação entre a exposição a estes compostos e a ocorrência de doenças neoplásicas.

Os estudos de toxicidade animal têm-se revestido de grande importância para a fixação dos valores máximos admissíveis dos vários SPD. Estes estudos são conduzidos, geralmente, com exposição dos animais a um único composto SPD e a uma concentração elevada e têm sido muito úteis na identificação de potenciais riscos reprodutivos e cancerígenos (Boornam *et al.*, 1999).

Este trabalho foi elaborado com o objectivo de avaliar o efeito resultante da exposição de Murganhos a baixas concentrações de BDCM e DBCM.

No final do protocolo experimental, foram observados valores distintos de índice de perdas nos diferentes grupos experimentais, sendo o seu valor francamente superior nos grupos expostos aos THMs. Este resultado era expectável uma vez que já se previa que houvesse mais mortes nos grupos de animais sujeitos à administração dos compostos, não só pela toxicidade dos THMs, já referenciada na literatura, mas também pelo *gavage* que é uma via de administração delicada, especialmente em animais de porte tão pequeno como é o caso do Murganho. A massa corporal média dos animais de cada grupo variou de forma oscilatória ao longo do ensaio experimental. Verificou-se uma diminuição da mesma nos grupos 2, 3 e 4 durante a administração do MeOH, DBCM e BDCM, respectivamente. Após esse período a massa corporal dos animais aumentou. As massas médias e massas relativas médias dos órgãos recolhidos aos animais de cada grupo experimental não apresentaram, no momento da eutanásia, diferenças significativas à excepção da massa média e massa relativa média do baço dos animais do grupo 4 que era significativamente inferior ao correspondente valor nos grupos 1 e 2. Nos estudos apresentados por Lilly *et al.* (1996), Coffin *et al.* (2000) e

Torti *et al.* (2001), apenas estão relatados aumentos da massa relativa do fígado para doses 1000 vezes superiores às doses administradas neste estudo.

A variação média do consumo de água e ração teve também um carácter oscilatório em todos os grupos experimentais. Não houve diferenças entre os consumos de água e ração nos diferentes grupos experimentais.

A administração oral aos murganhos de BDCM e DBCM induziu, em termos histológicos, alterações idênticas. A arquitectura celular hepática manteve-se conservada em todos os animais de todos os grupos. A exposição dos animais aos THMs induziu uma hepatite ligeira caracterizada pela existência de necrose de coagulação, pela presença de infiltrado inflamatório e degenerescência vacuolar dos hepatócitos. No grupo 2, grupo exposto ao MeOH, estas lesões também foram identificadas embora em percentagens menores. Nos animais expostos aos THMs e ao MeOH foram identificadas várias alterações nucleares nomeadamente a cromatina dispersa e a existência de vários nucléolos. Nos ductos biliares não foram observadas alterações histológicas, fibrose ou colestase. Estes resultados são concordantes com os descritos por Dunnick *et al.* (1987), Lilly *et al.* (1996) Coffin *et al.* (2000), Torti *et al.* (2001) e DeAngelo *et al.* (2002). Os THMs estudados neste trabalho têm sido relatados como agentes carcinogénicos. A via de administração dos THMs parece desempenhar, contudo, um importante papel na dosimetria e no metabolismo dos mesmos nos animais e, conseqüentemente, na sua toxicidade (Coffin *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2007; Faweel, 2000; Boornman *et al.*, 1999; Komulainen, 2004; IARC, 1991; IARC Group 2B, 1999). A toxicidade do BDCM e do DBCM é menor quando administrados na água de bebida do que por *gavage* em óleo de milho (Coffin *et al.*, 2000). O BDCM induziu tumores no rim e no intestino grosso em Ratos machos e fêmeas da estirpe F344/N, quando dissolvido em óleo de milho e administrado por *gavage* durante dois anos consecutivos. Em Murganhos da estirpe B6C3F1 induziu tumores no fígado em fêmeas e no rim em machos quando administrado pela mesma via e durante o mesmo período de tempo (Dunnick *et al.*, 1987). Um outro estudo indica que o BDCM, quando administrado na água de bebida, não tem actividade carcinogénica no entanto induziu o aparecimento de focos de criptas aberrantes, lesões putativamente pré-neoplásicas, no cólon de Ratos machos da estirpe F/344N e Murganhos machos da estirpe B6C3F1 (DeAngelo *et al.*, 2002). Está publicado um outro estudo que indica que o BDCM e o DBCM aumentaram a proliferação celular, diminuíram a metilação do gene *c-myc* no fígado e mostraram ser tóxicos para o fígado de Murganhos da estirpe B6C3F1

induzindo necrose centrolobular e fibrose, quando administrados na água de bebida e por *gavage* em óleo de milho (Coffin *et al.*, 2000). No estudo efectuado por Torti *et al.* (2001) Murganhos das estirpes C57BL/6 e FVB/N inalaram BDCM durante 7 dias, 6 horas/dia o que induziu o desenvolvimento de alterações histológicas no fígado como necrose centrolobular e degenerescência vacuolar. Alterações histológicas hepáticas idênticas foram identificadas em Ratos machos da estirpe F344 após um período de exposição de 6 semanas, com 5 dias de administração por *gavage* de solução de BDCM em Emulphor[®]. O BDCM induziu tumores no fígado em Murganhos machos e fêmeas da estirpe B6C3F1, mas não manifestou actividade carcinogénica em Ratos da estirpe F344 (Komulainen, 2004). Todos estes resultados foram obtidos após a administração do BDCM em doses bastantes superiores às utilizadas neste trabalho.

A função hepática foi avaliada através da determinação das concentrações séricas da Alb, BT, BD, PT, ureia e pela determinação das actividades séricas da ALT, AST e FA. A exposição aos THMs causou um aumento estatisticamente significativo na actividade sérica da ALT e da AST o que vai ao encontro dos resultados histológicos uma vez que indica lesão nos hepatócitos. A ALT é uma enzima que se encontra localizada no citoplasma dos hepatócitos e cujo aumento da actividade sérica pode ser identificado em condições que alterem a permeabilidade da sua membrana ou que provoquem a sua necrose, sendo o seu aumento directamente proporcional ao número de hepatócitos afectados (Amacher, 1998; Kew, 2000). No caso da actividade sérica da AST, não foi possível relacionar o aumento deste valor com a exposição aos THMs uma vez que os valores são estatisticamente idênticos aos do grupo exposto ao MeOH. No estudo apresentado por Lilly e seus colaboradores (1996) a administração oral de BDCM, (composto administrado aos animais do grupo 4) causou também um aumento significativo das actividades séricas da ALT e da AST.

O BDCM causou ainda um aumento estatisticamente significativo da concentração sérica de BT. Não houve uma alteração significativa na actividade sérica da FA nem tão pouco das concentrações séricas de Alb, BD, PT, ureia e creatinina. A Alb tem a propriedade de reter água dentro do espaço intracelular impedindo que a mesma se difunda pelos tecidos causando a formação de edemas (Pinto, 2007). A capacidade de reserva de Alb e ureia do fígado é significativa, logo, o grau de insuficiência hepática teria de ser muito elevado para que se observasse uma diminuição das suas concentrações séricas (Anderson e Washabau, 1992; Ramaiah, 2007). Uma redução na concentração sérica de Alb pode verificar-se por razões não hepáticas como

a inflamação mas, uma vez que o infiltrado inflamatório encontrado no fígado foi moderado, não era expectável alteração no seu valor. A FA é uma enzima que se encontra localizada na membrana canalicular dos hepatócitos e cuja actividade sérica se encontra aumentada na maior parte das formas de colestase, sendo por isso também denominada de enzima de colestase (Ozer *et al.*, 2008). O facto de não se verificar alterações no valor da actividade sérica da FA é concordante com os resultados da histologia visto que não se observou colestase. O valor da concentração sérica da creatinina foi determinado para avaliar a função renal que se revelou normal, visto não haver alteração dos seus valores relativamente ao grupo controlo.

As alterações histológicas do fígado induzidas pelos dois THMs estudados podem estar relacionadas com a diminuição da energia da célula resultante da má funcionalidade das mitocôndrias. A bioenergética do fígado dos murganhos foi negativamente afectada pela exposição dos mesmos aos dois THMs estudados. A exposição ao DBCM estimulou o estado 4 da respiração e, conseqüente diminuiu o índice de controlo respiratório. Este aumento do estado 4 da respiração pode ser explicado por um menor bombardeamento de prótons para o espaço intramembranar o que indica que existe um desacoplamento mitocondrial. Nos animais expostos ao BDCM observou-se também um estímulo do estado 4 da respiração só que semelhante ao também provocado pela exposição ao MeOH, não podendo, por isso, atribuir-se este aumento à administração de BDCM. A respiração mitocondrial dissociada da fosforilação oxidativa sofreu uma diminuição significativa após exposição a ambos os THMs estudados o que é também indicativo de desacoplamento mitocondrial nos animais expostos aos THMs. Houve também um decréscimo significativo do potencial de membrana mas que não pode ser relacionado com a exposição aos THMs visto que se verificou valores estatisticamente idênticos no grupo exposto ao MeOH que foi o veículo de administração dos mesmos.

A avaliação do efeito dos THMs na actividade das enzimas da cadeia respiratória COX, SQR e ATP sintetase mostrou um decréscimo na actividade destas enzimas nos grupos expostos aos 2 THMs estudados. Esse decréscimo foi estatisticamente significativo relativamente ao grupo controlo para os dois THMs no caso da actividade enzimática da SQR o que indica uma inibição do complexo II da cadeia respiratória e também alterações no ciclo de Krebs uma vez que esta enzima cataliza a oxidação do succinato a fumarato. A actividade da COX foi significativamente diminuída apenas pelo DBCM enquanto que a actividade da ATP

sintetase apenas foi significativamente diminuída após administração de BDCM. Este decréscimo na actividade das enzimas pertencentes aos complexos II, IV e V mostra que a exposição aos THMs diminuiu a eficiência da cadeia transportadora de electrões e fosforilação oxidativa resultando numa diminuição da energia disponível para armazenamento, situação nefasta para o normal funcionamento do organismo visto que, como referido em 1.5.2, mais de 90% da energia celular provém da respiração mitocondrial. O decréscimo da actividade das enzimas dos complexos da cadeia respiratória provocam também alterações no fluxo de electrões e, consequentemente de prótons o que pode levar a alterações no potencial membranar interno da mitocôndria alterando a sua permeabilidade. Foi observada uma diminuição do potencial transmembranar mitocondrial nos grupos expostos a ambos os THMs mas que é idêntica à diminuição também observada no grupo exposto ao MeOH, não podendo, por isso, estabelecer-se uma relação causa-efeito entre a administração dos THMs e o decréscimo no $\Delta\Psi$. O entumescimento mitocondrial (*swelling*), bem como a sua cinética, manteve-se inalterado.

A formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) está directamente relacionada com o gradiente de prótons e é controlada pela membrana interna da mitocôndria. As espécies reactivas de oxigénio, quando em contacto com a célula, têm tendência a reagirem com algumas macromoléculas como, por exemplo, proteínas, lípidos, ácidos desoxirribonucleicos e ribonucleicos e glúcidos. Estas reacções podem degradar prontamente as macromoléculas ou desencadear uma série de reacções em que o radical livre passa de macromolécula em macromolécula resultando na inviabilização de genes de onde resulta a formação de proteínas não funcionais, a inactivação de enzimas e a alteração da funcionalidade de algumas estruturas celulares como a membrana. Os antioxidantes enzimáticos SOD, CAT e GST catalizam, respectivamente, as reacções de dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogénio, decomposição do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, e conjugação do glutatião com uma série de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos que, assim conjugados, serão mais facilmente metabolizados e eliminados. (Harris, 1995; Dalton *et al.*, 1999; Nicholls e Ferguson, 2002) Nos animais aos quais foram administrados os THMs observou-se um aumento na actividade das três enzimas antioxidantes avaliadas. No caso da GST esse aumento é mais marcante e significativo uma vez que se deu apenas nos grupos expostos aos THMs e não no grupo exposto ao MeOH. O aumento provocado nas actividades enzimáticas da SOD e CAT não pode ser atribuído à acção

dos THMs uma vez que o aumento foi significativo relativamente ao grupo controlo mas não em relação ao grupo exposto ao MeOH. Este aumento da actividade das enzimas antioxidantes pode estar relacionado com o aumento de ROS. O aumento da quantidade de ROS e consequente oxidação celular activa o gene que codifica a formação das enzimas antioxidantes (Dalton *et al.*, 1999). A alteração na funcionalidade da cadeia transportadora de electrões e o desacoplamento mitocondrial favorecem o aumento da formação de ROS que pode ser uma explicação para o aumento da actividade das enzimas antioxidantes.

6. Conclusões

Foi possível concluir, após análise cuidada dos dados histológicos, bioquímicos e da bioenergética mitocondrial, que não é segura a ingestão de água que contenha bromodiclorometano e dibromoclorometano como subprodutos da desinfecção da mesma com cloro. Estes compostos mostraram interferir com o normal funcionamento das mitocôndrias e causaram lesões no fígado bem como alterações nas actividades séricas de enzimas hepáticas. Reveste-se sobretudo de extrema importância o facto de os efeitos da exposição a estes compostos serem resultantes de uma administração em doses muito baixas e com um tempo de exposição muito curto.

7. Bibliografia

Alberts B, Bray D, Lewis J, Johnson A, Raff M, Roberts K, Walter P (2006). Fundamentos da Biologia Celular. Editora Artmed, 2ª Edição, pp: 453-471.

Amacher DE (1998). Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 21: 119-130.

Anderson JG, Washabau RJ (1992). Icterus. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian* 14:1045-1057.

APHA, AWWA e WEF (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. APHA, 21st Edition, pp: 5-65-5-64.

Azevedo C (1994). Biologia Celular. Edições Técnicas, pp: 215-222.

Balls M (1994). Replacement of animal procedures alternatives in research, education and testing. *Laboratory Animals*, 28:193-211.

Boorman GA, Dellarco V, Dunnick JK, Chapin RE, Hunter S, Hauchman F, Gardner H, Cox M, Sills RC (1999). Drinking water disinfection byproducts: Review and approach to toxicity evaluation. *Environmental Health Perspectives*, 107:207-217.

Brautigan, DL, Ferguson-Miller S, Margoliash E (1978). Mitochondrial cytochrome c: Preparation and activity of native and chemically modified cytochrome c. *Methods in Enzymology*, 53:128-164.

Bridges SM, Salin ML (1981). Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiology*. 68: 275-278.

Campos LS (2002). Entender a Bioquímica. Escolar Editora, 3ª edição, pp: 210-225.

Cantor KP, Lynch CF, Hildesheim ME, Dosemeci M, Lubin J, Alavanja M, Craun GF (1998). Drinking water source and chlorination byproducts in Iowa. I: Risk of bladder cancer. *Epidemiology*, 9:21-28.

Coffin JC, Ge R, Yang S, Kramer PM, Tao L, Pereira MA (2000). Effect of trihalomethanes on cell proliferation and DNA methylation in female B6C3F1 mouse liver. *Toxicological Sciences*, 58: 243-252.

DeAngelo AB, Geter DR, Rosenberg DW, Crary CK, George MH (2002). The induction of aberrant crypt foci (AFC) in the colons of rats by trihalomethanes administered in drinking water. *Cancer Letters*, 187:25-31.

Dec.-Lei N° 306/2007 de 27 de Agosto

Del Río LA, Ortega MG, López AL, Gorgé JL (1977). A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode: Application to the kinetic study of the pea leaf enzyme. *Analytical Biochemistry*, 80:409-415.

Doyle TJ, Zheng W, Cerhan JR, Hong CP, Sellers TA, Kushi LH, Folsom AR (1997). The association of drinking water source and chlorination byproducts with cancer incidence among post menopausal women in Iowa: a prospective cohort study. *American Journal of Public Health*, 87:1168-1176.

Dunnick JK, Eustis SL, Lilja HS (1987). Bromodichloromethane, a trihalomethane That Produces Neoplasms in Rodents. *Cancer Research*, 47: 5189-5193.

Estabrook RW (1967). In Membranes of Mitochondria and Chloroplasts. In: Racker E, Van Nostrand, Ed. New York 172-212.

Fawell J (2000). Risk assessment case study – chloroform and related substances. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 91-95.

Fernandes AF, Torres-Pereira JM (1993). A Mitocôndria - Alguns aspectos morfofuncionais. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Série Didática - Ciências Puras.

George MH, Olson GR, Doerfler D, Moore T, Kilburn S, DeAngelo AB (2002). Carcinogenicity of bromodichloromethane administered in drinking water to male F344/N rats and B6C3F₁ mice. *International Journal of Toxicology*, 21:219-230.

Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177:751-766.

Greaves P (2007). Histopathology of Preclinical Studies. Elsevier Science & Technology Books, pp: 463-513.

Gray MW, Burger G, Lang BF (1999). Mitochondrial evolution. *Science*, 283:1476-1481.

Harkness JE, Wagner JE (1995). The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents. Williams & Wilkins, 4th editonon, pp: 58-65.

Harris DA (1995). Bioenergetics at a Glance. Blacwell Science, pp: 24-35.

Hatton PJ, Dixon D, Cole DJ, Edwards R (1999). Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species. *Pesticide Science*, 46:267-275.

Hellyer EV e Quesenberry KE (1996). Ferrets, Rabbits and Rodents - Clinical Medicine and Surgery. Saunders, pp: 295-302.

Hildesheim ME, Cantor KP, Lynch CF, Dosemeci M, Lubin J, Alavanja M, Craun G (1998). Drinking water source and chlorination byproducts in Iowa. II: Risk of colon and rectal cancers. *Epidemiology*, 9:29-35.

IARC (1991). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Chlorinated Drinking-Water, Chlorination By-Products, Some Other Halogenated Compounds, Cobalt and Cobalt Compounds. Vol. 52, World Health Organization WHO.

IARC (1999). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide, part three. Vol. 71, World Health Organization.

Jones, ML (2002). Connective tissues and stains, in: Bancroft, J.D., Gamble, M. (Eds.), Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone, Edimburgh, pp: 139-162

Junqueira LC, Carneiro J (1973). Citologia Básica. Editora Koogan, pp: 75-81.

Junqueira LC, Carneiro J (2008). Histologia Básica. Editora Guanabara, 11ª edição, pp: 324-334.

Kamu N, Muratsugo M, Hongoh R, Kobatake Y (1979). Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *Journal of Membrane Biology*, 49:105-121.

Kew MC (2000). Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet*, 355:591-592.

King WD, Marrett LD (1996). Case-control study of bladder cancer and chlorination byproducts in treated water (Ontario, Canada). *Cancer Causes Control*, 7:596-604.

Kolb E (1987). Fisiologia Veterinária. Editora Guanabara, 4ª edição, pp: 339-347.

Komulainen, H (2004). Experimental cancer studies of chlorinated by-products. *Toxicology*, 198:239-248.

Konig HE, Liebich HG (2005). Anatomía de los animales domésticos. Editorial Medica Panamerica, pp:74-78.

Lilly PD, Simmons JE, Pegram RA (1996). Effect of subchronic corn oil gavage on the acute toxicity of orally administered bromodichloromethane. *Toxicology Letters*, 87: 93-106.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott P, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira PT (2007). Molecular Cell Biology. W.H.Freeman, 6th ed., pp:301-325.

Madeira VMC, Antunes-Madeira MC, Carvalho AP (1974). Activation energies of the ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. *Biochemical and Biophysics Research Communications*, 58:897-904.

Mitchell P, Moyle J (1969a). Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 7:471-784.

Mitchell P, Moyle J (1969b). Translocation of some Anions Cations and Acids in Rat Liver Mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 9:149-155.

Nicholls DG e Ferguson SJ (2002). Bioenergetics 3. Academic Press, 3rd edition, pp: 89-92.

Nohl H, Hegner D (1978). Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat-heart mitochondria. *FEBS Letters*, 89:126-130.

Oliveira PAM (2006). Cancerização experimental do urotélio do rato. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Tese de Doutorado.

Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245:194-205.

Peixoto F, Vicente JAF, Madeira VMC (2003a). Comparative effects of herbicide dicamba and related compound on plant mitochondrial bioenergetics. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 17:185-192.

Peixoto F, Vicente JAF, Madeira VMC (2003b). The herbicide dicamba (2-metoxi-3,6-dichlorobenzoic acid) interacts with mitochondrial bioenergetic functions. *Archives of Toxicology*, 77: 403-409.

Pinto AM (2007). Fundamentos de Fisiopatologia. Edições Lidel, pp:411-421.

Portaria N° 1005/92 de 6 de Julho

Ramaiah SK (2007). A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and Chmeical Toxicology*, 45:1551-1557.

Recomendação da Comunidade Europeia 2007/526/CE.

Richardson SD, Plewa MJ, Wagner ED, Schoeny R, DeMarini DM (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emergent disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutation Research*, 636:178-242.

Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJM, Palmeira CM (2000). Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: Possible relevance for cholestasis therapy. *Toxicological Sciences*, 57:177-185.

Silva ML, Charest-Tardif G, Krishnan K, Tardif R (1999). Influence of oral administration of a quaternary mixture of trihalomethanes on their blood kinetics in the rat. *Toxicology Letters*, 106:49-57.

Singer TP (1974). Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenases. *Methods of Biochemical Analysis*, 22:123-175.

Smoly JM, Kuylenstierna B, Ernster L (1970). Topological and functional organization of the mitochondrion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 66:125-131.

Spychalla JP, Desborough SL (1990). Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiology*, 94:1214-1218.

Stocker KJ, Staham J, Howard WR, Proudlock RJ (1997). Assessment of the potential *in vivo* genotoxicity of three trihalomethanes: chlorodibromomethane, bromodichloromethane and bromoform. *Mutagenesis*, 12:169-173.

Suckow MA, Danneman P, Brayton C (2001). The laboratory mouse – A volume in the laboratory animals pocket reference series. CRC Press pp: 1-2.

Tisdale HD (1967). Preparation and properties of succinic-cytochrome c reductase (complex II-III). *Methods in Enzymology*, 10:213-215.

Torti VR, Cobb AJ, Everitt JI, Marshall MW, Boorman GA, Butterworth BE (2001). Nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by inhaled bromodichloromethane in wild-type and p53-heterozygous mice. *Toxicological Sciences*, 64: 369-280.

Wallace DC (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283:1482-1488.

Zaia DAM, Zaia CTBV, Liegtig J (1998). Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, 21:787-793.