

THAINÁ IASBIK LIMA

**EFEITOS DA COEXPOSIÇÃO AO ARSÊNIO E NÍQUEL SOBRE PARÂMETROS
HEPÁTICOS EM RATOS WISTAR ADULTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Mariana Machado Neves

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L732e
2022
Lima, Thainá Iasbik, 1995-
Efeitos da coexposição ao arsênio e níquel sobre parâmetros
hepáticos em ratos Wistar adultos / Thainá Iasbik Lima. –
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (64 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Mariana Machado Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2022.

Referências bibliográficas: f. 46-64.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.661>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Metais - Toxicologia. 2. Ratos - Efeito dos metais
pesados. 3. Arsênio. 4. Níquel. 5. Ratos como animais de
laboratório. I. Neves, Mariana Machado, 1977-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 571.9543

THAINÁ IASBIK LIMA

EFEITOS DA COEXPOSIÇÃO AO ARSÊNIO E NÍQUEL SOBRE PARÂMETROS
HEPÁTICOS EM RATOS WISTAR ADULTOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de agosto de 2022

Assentimento:


Thainá Iasbik Lima
Autora


Mariana Machado Neves
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre guiar meu caminho e estar comigo nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Adriana e Leonardo, pelo apoio incondicional, por todo amor e suporte. Por nunca medirem esforços para minha felicidade e sempre me acolherem de braços abertos. Nada disso seria possível sem vocês.

Ao meu irmão, Leone, que além de sempre estar ao meu lado, nessa jornada ainda colocou a mão na massa. Admiro muito você!

Ao meu namorado, Lucas, pelo apoio sem igual. Por ser calma, me dar forças e acreditar em mim. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

À minha família, por toda torcida e incentivo.

Obrigada Ana Lúcia, Carol e Luidhy, por cada conversa e risada! Vocês deixam o caminho mais fácil de seguir. Obrigada pelo companheirismo e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Animal e Toxicologia (LARAT). Em especial ao Luiz Otávio, Isabela, Mírian, Renner, Camila, Mariana, Arabela, Daniel e Felipe. Pelos aprendizados compartilhados, mas ainda mais por cada conversa e cada lanche.

Ao Luiz Otávio, que é o coração do LARAT, sempre disposto a ajudar todos ao seu redor, e compartilhar seus conhecimentos (que não são poucos). Mas o mais importante, por cada risada e drink compartilhado. Quero levar nossa amizade para a vida toda!

À Isabela e Mírian, por toda ajuda e pelo companheirismo de sempre.

À Marcella, por todo apoio e incentivo, por ser além de duplinha da graduação, amizade para a vida.

A minha orientadora Prof^ª Dr^a Mariana, por ser tão receptiva e disponível. Por ter confiado no meu potencial e me dado a oportunidade de trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, a mais linda do Brasil, que já era minha morada antes mesmo da época universitária. A seus funcionários e professores, por todo apoio e suporte.

À agência de fomento CAPES pelo consentimento da bolsa.

RESUMO

LIMA, Thainá Iasbik, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Efeitos da coexposição ao arsênio e níquel sobre parâmetros hepáticos em ratos Wistar adultos.** Orientadora: Mariana Machado Neves.

Arsênio e níquel são elementos químicos amplamente encontrados na natureza. A exposição a altas concentrações desses agentes tóxicos na água de beber pode causar disfunções orgânicas que levam a sérios problemas de saúde. O efeito negativo da intoxicação por arsênio ou níquel está bem documentado na literatura. No entanto, pouco se sabe sobre as consequências da ingestão simultânea desses metais no indivíduo. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da coexposição ao arsênio e níquel sobre parâmetros hepáticos de ratos Wistar adultos, uma vez que o fígado é o principal órgão detoxificador do organismo. Ratos Wistar machos (70 dias de idade) foram distribuídos em quatro grupos ($n = 10$ animais/grupo): grupo controle (solução salina), grupo arsênio (1mg L^{-1} de arsênio), grupo níquel (7mg L^{-1} de níquel) e grupo da coexposição (1mg L^{-1} de arsênio + 7mg L^{-1} de níquel). Os animais tiveram acesso às soluções por meio da água de beber *ad libitum* por 70 dias, sendo eutanasiados 24 h após a último dia de exposição (CEUA 45/2021). O sangue foi coletado para obtenção de soro e determinação da concentração de transaminases. O fígado foi removido e dissecado para realização de análises histológicas, bioquímicas e enzimáticas. Os dados foram submetidos aos testes One-way ANOVA e Tukey ao nível de significância $p = 0,05$. Nossos resultados mostraram, que os animais foram expostos ao arsênio e níquel apresentaram níveis aumentados destes metais no fígado. Animais coexpostos aos dois metais apresentaram redução de hepatócitos e de seu citoplasma, aumento na proporção de capilares sinusoides e vasos sanguíneos, além de aumento no percentual de colágeno, glicogênio e mastócitos. Congestão, infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica foram as patologias observadas em animais do grupo arsênio+níquel. Estes animais também apresentaram redução na atividade de catalase e aumento nas concentrações de proteínas carboniladas e óxido nítrico. A atividade de ATPase total reduziu em animais do grupo arsênio+níquel. Não foram observadas alterações nas concentrações séricas de transaminases e biometria corporal e hepática. Pode-se concluir que a coexposição ao arsênio e níquel por 70 dias pode ter desencadeado um processo inicial de dano que, em exposições crônicas, pode haver uma intensificação nas alterações com consequente prejuízo à funcionalidade hepática.

Palavras-chave: Arsenito. Cloreto de níquel. Hepatócitos. Exposição subcrônica. Estresse oxidativo. Histomorfometria. Inflamação. Degeneração.

ABSTRACT

LIMA, Thainá Iasbik, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Effects of arsenic and nickel coexposure on hepatic parameters in adult Wistar rats.** Advisor: Mariana Machado Neves.

Arsenic and nickel are chemical elements widely found in nature. Exposure to high concentrations of these toxic agents in drinking water can cause organ dysfunction that leads to serious health problems. The negative effect of arsenic or nickel poisoning is well known. However, little is known about the consequences of the simultaneous ingestion of these metals in the individual. In this context, the present work aimed to analyze the effects of coexposure to arsenic and nickel on hepatic parameters of adult Wistar rats, since the liver is the main detoxifying organ of the organism. Male Wistar rats (70 days old) were divided into four groups (n = 10 animals/group): control group (saline solution), arsenic group (1mg L⁻¹ of arsenic), nickel group (7mg L⁻¹ of nickel), and coexposure group (1mg L⁻¹ of arsenic + 7mg L⁻¹ of nickel). The animals had access to the solutions through drinking water ad libitum for 70 days, being euthanized 24 h after the last day of exposure (CEUA 45/2021). Blood was collected to obtain serum and determination of transaminase concentration. The liver was removed, dissected, and fragmented for histological, biochemical and enzymatic analyses. Data were submitted to One-way ANOVA and Tukey tests at a significance level of p = 0.05. The results showed that animals intoxicated with arsenic and/or nickel showed an increase in their concentrations in the liver. Animals coexposed to the two metals showed a reduction in hepatocytes and their cytoplasm, an increase in the proportion of sinusoid capillaries and blood vessels, in addition to an increase in the percentage of collagen, glycogen, and mast cells. Congestion, inflammatory infiltrate and hydropic degeneration were observed in the arsenic + nickel group. These animals also showed reduced catalase activity and increased concentrations of carbonyl proteins and nitric oxide. Total ATPase activity was reduced in animals in the arsenic + nickel group. No changes were observed in serum concentrations of transaminases and in body and liver biometry. It can be concluded that coexposure to arsenic and nickel for 70 days may have triggered an initial process of damage that, in chronic exposures, may have an intensification of changes with consequent damage to liver functionality.

Keywords: Arsenite. Nickel chloride. Hepatocytes. Sub chronic exposure. Oxidative stress. Histomorphometry. Inflammation. Degeneration.

SUMÁRIO

1. Introdução	9
2. Objetivos	11
2.1 Objetivo geral:	11
2.2 Objetivos específicos:	11
3. Revisão de literatura	11
3.1. Arsênio	11
3.2. Níquel	13
3.3. Fígado: morfologia e função	14
3.4 Técnicas para avaliação microscópica do tecido hepático	15
3.5 Estresse oxidativo	18
4. Materiais e métodos	19
4.1 Animais	19
4.2 Design experimental	19
4.3 Eutanásia, coleta de material biológico e biometria	20
4.4 Análise bioquímica de enzimas séricas	21
4.5 Concentração de arsênio e níquel no fígado	21
4.6 Avaliação histopatológica	21
4.7 Estereologia do fígado	22
4.8 Ensaio de atividade enzimática e marcadores de dano oxidativo	23
4.9 Atividades de ATPases total, Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+/K^+ ATPase	24
4.10 Análise estatística	24
5. Resultados	25
5.1 Consumo diário dos compostos químicos de arsênio e níquel	25
5.2 Parâmetros biométricos e bioquímicos	26
5.3 Análises histológicas, estereológicas e histoquímicas	28
5.4 Atividade de ATPase total, Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+/K^+ ATPases	36
5.5 Atividade das enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo	36
6. Discussão	40
7. Conclusão	46
8. Referências	46

1. Introdução

Nas últimas décadas, a exposição a poluentes ambientais tornou-se um problema de saúde pública global devido a seus potenciais efeitos deletérios ao organismo humano (Chowdhury et al., 2018). Entre os diversos poluentes, podemos citar os metais pesados. Vários estudos têm relatado danos na função e estrutura de diversos órgãos devido a intoxicação por metais tóxicos, incluindo arsênio (Souza et al., 2016a,b; Da Cunha De Medeiros et al., 2019) e níquel (Pari et al., 2008; Adedara et al., 2019). Estes elementos químicos são naturalmente encontrados na superfície terrestre e liberados em pequenas concentrações no ambiente por fontes naturais, como a lixiviação de rochas e sedimentos. Entretanto, atividade antrópica como processos industriais, mineração, agricultura, desastres ambientais e descarte inadequado de produtos químicos, acabam biodisponibilizando altas concentrações destes metais no ar, solo e água (Nielsen et al., 2001; Orloff et al., 2009). Consequentemente, seres humanos e animais são expostos a estes poluentes principalmente através da ingestão de água e alimentos contaminados (Ibrahim et al., 2006).

O arsênio é classificado como um metaloide por possuir características de natureza metálica e não metálica. Ocupando a posição 33^o da tabela periódica e o 20^o elemento mais abundante da terra (Mandal e Suzuki, 2002). Contudo, perante sua capacidade de bioacumulação em organismos vivos, no âmbito da toxicologia podemos considerar este metaloide como membro do grupo dos metais pesados (Jomova et al., 2011). A exposição ao arsênio está associada a alterações nos rins, fígado, testículos e cérebro (Chiou et al. 2008; Noman, 2015; Couto-Santos et al., 2020; Souza et al., 2020). Já o níquel é o 24^o elemento mais abundante no planeta (Ciurli e Mangani, 2001). Considerando suas propriedades físicas e químicas, o níquel é classificado como um metal de transição. Porém, assim como o arsênio, o níquel também apresenta capacidade de bioacumulação quando em contato com organismos vivos, sendo também classificado como metal pesado no ramo da toxicologia. Características

de bioacumulação de metais levam em consideração dose, tempo e via de exposição (Klaassen e Watkins, 2012). O contato com compostos de níquel pode causar efeitos adversos à saúde, como comprometimento neurocomportamental, lesão hepática e alterações testiculares (Pari, 2008; Adedara et al., 2019; Adedara et al., 2020).

Na natureza, a exposição a metais não ocorre de forma isolada, podendo ocorrer por dois ou mais compostos (Khan et al., 2019; Li et al., 2019). Um estudo epidemiológico realizado por Vormittag et al. (2021) mostrou que pessoas residentes na área afetada pelo rompimento da barragem em Barra Longa - Minas Gerais, apresentaram no sangue e espermatozoides a presença de arsênio e níquel. Dessa forma, novas abordagens são necessárias para avaliar os riscos associados à exposição simultânea a tóxicos ambientais. Uma questão importante a se considerar é o potencial de competição entre arsênio e níquel por sítios de ligação a proteínas que, no final, causam comprometimento da função celular (Klaassen e Watkins, 2012). Além disso, as interações de metais podem influenciar sua absorção, o que pode resultar em uma relação de adição, sinergismo, antagonismo ou independência da toxicidade geral em organismos expostos (Driessnack et al., 2017).

Neste contexto, o fígado pode servir como modelo de estudo sobre a toxicologia de metais quando expostos simultaneamente a estes, por ser um órgão de síntese de enzimas, colesterol, bile e outras moléculas necessárias para a homeostase corporal (Ross e Pawlina, 2016), processamento dos nutrientes absorvidos no sistema digestivo, principal sítio de detoxicação de toxinas e metilação do arsênio (Ratnaike, 2003), e um dos principais órgãos de bioacumulação tecidual de níquel (Gonzalez, 2016). Apesar de já se conhecer os efeitos deletérios do arsênio e do níquel sobre parâmetros hepáticos em animais adultos, ainda não está claro como a exposição simultânea a estes metais pode provocar danos neste órgão. Por isso, o presente estudo foi conduzido no intuito de testar a hipótese de que coexposição subcrônica ao

arsênio e níquel na água de beber causa danos teciduais e funcionais no fígado de animais adultos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos da exposição e coexposição subcrônica ao arsênio e níquel sobre parâmetros morfológicos, oxidativos e funcionais do fígado de ratos Wistar adultos.

2.2 Objetivos específicos:

- Quantificar a bioacumulação de arsênio e níquel no fígado dos animais;
- Analisar os efeitos do arsênio e níquel sobre a biometria corporal e hepática em ratos Wistar adultos intoxicados na água de beber por 70 dias;
- Avaliar a organização tecidual do parênquima hepático dos ratos após a exposição aos metais e identificar as possíveis patologias relacionadas a esta exposição;
- Quantificar as possíveis alterações teciduais causadas pela exposição simultânea ao arsênio e níquel no fígado de animais adultos, analisando parâmetros histológicos e histomorfométricos;
- Quantificar a atividade das enzimas antioxidantes e a concentração de marcadores de danos oxidativos;
- Avaliar a atividade de ATPases no tecido hepático após a exposição aos metais.

3. Revisão de literatura

3.1. Arsênio

O arsênio é quimicamente classificado como metaloide, por possuir características de metais e não metais (Jomova et al., 2011), tendo seus números de oxidação mais comuns +5,

+3, 0 e -3 (Orloff et al., 2009). Pode ser encontrado na natureza na forma inorgânica como arsenito (As^{3+}) ou arsenato (As^{5+}) (Ferreira et al., 2012). O arsenito é considerado mais tóxico que o arsenato, por reagir com grupos tiois endógenos de proteínas, lipídeos e DNA (Neves et al., 2004). Após a ingestão, os compostos arsênicos são absorvidos no intestino e transportados pelo sangue até órgãos e tecidos, onde podem ser biotransformados, retidos no local ou reagir com moléculas (Goldhaber, 2003; Kobayashy et al., 2005). O arsênio também pode ser encontrado na forma orgânica, como ácido metilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA) (Ferreira et al., 2012). Dentre esses compostos, os inorgânicos são considerados mais tóxicos que os orgânicos (USEPA, 2000). O principal evento metabólico do arsênio no organismo é sua metilação em MMA e DMA. Essa metilação envolve a redução do arsênio pentavalente em trivalente com adição do grupo metil em sua molécula (Hirano, 2020). Intermediários metabólicos do arsênio, além de eliminados na urina, podem se acumular em vários órgãos, como rim, pulmão, fígado e cérebro (Singh et al., 2011).

A contaminação do ambiente por arsênio pode ocorrer através de fontes naturais, como erosão de rochas e atividades vulcânicas, ou por fontes antrópicas destacando-se mineração, atividades industriais, utilização de pesticidas agrícolas e fertilizantes (Orloff et al., 2009). A contaminação do ar, solo, alimentos e água por arsênio ocorre principalmente por atividades antrópicas, sendo a água a principal forma de contaminação de organismos vivos (Ibrahim et al., 2006). Assim, a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2011) estabeleceu que o limite tolerável de arsênio a ser encontrado na água potável deve ser de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$. Todavia, existem regiões contaminadas por este metaloide onde foram encontradas concentrações em níveis muito elevados em diversos países no mundo, como China, Japão, Canadá, Estados Unidos, Índia, Brasil e Chile (Mukherjee et al., 2006). A exposição a grandes quantidades de arsênio, principalmente através de água contaminada, é considerada uma das principais ameaças à saúde em todo o mundo (Li et al., 2012).

3.2. *Níquel*

O níquel é um elemento de transição, também amplamente distribuído no meio ambiente, incluindo ar, água e solo (Genchi et al., 2020). Assim como o arsênio, o níquel pode ser classificado como metal pesado em decorrência de sua toxicidade e capacidade de bioacumulação. O níquel pode ser encontrado na forma de sais de níquel de ácidos orgânicos fortes, com característica de alta solubilidade em água, e sais de níquel de ácidos inorgânicos fracos, geralmente insolúveis (Azevedo et al., 2003). Este metal existe em vários estados oxidativos, variando entre -1 e +4, sendo o +2 o mais abundante no ambiente e sistemas biológicos (Muñoz et al., 2012). Este é o caso do cloreto de níquel, que é facilmente solúvel em água (Denkhaus et al., 2002).

Uma vez que pode derivar de fontes naturais e atividade antropogênica, é possível encontrar compostos de níquel em locais de ocorrência de lixiviação de rochas e sedimentos. A consequência destes processos é a contaminação de água subterrâneas e superficiais, que é o principal meio de contaminação de níquel divalente a seres humanos (Genchi et al., 2020). Dentre os contaminantes de decorrência da atividade antrópica podemos citar derivados da combustão de combustíveis fósseis, mineração e fabricação de ligas contendo níquel, sendo a taxa de emissão por essas fontes considerada maior que a taxa de emissão natural (Stannard et al., 2017). Assim, o aumento do uso de níquel para fins industriais tem causado preocupação perante a saúde humana (Das et al., 2008), sendo a concentração máxima permitida de níquel na água potável de $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ (OMS, 2011).

Depois de absorvido, o níquel é distribuído por todo o corpo através do sangue ao se ligar à albumina, se acumulando em rins, pulmão, fígado e coração (Kang et al., 2012). Os compostos solúveis de níquel são transportados para dentro das células por difusão ou através de canais de cálcio (Gonzalez, 2016). A exposição crônica à compostos de níquel podem ser responsável por uma variedade de efeitos adversos à saúde dos seres humanos, como câncer do

trato respiratório, doenças cardiovasculares e renais e fibrose pulmonar (McGregor et al., 2000, Seilkop et al., 2000). O sistema nervoso é um dos principais órgãos-alvo da toxicidade do níquel (Genchi et al., 2020), além da exposição ao metal estar associada à toxicidade reprodutiva (Kong et al., 2016).

3.3. Fígado: morfologia e função

O fígado é o maior órgão interno e glândula anficrina do corpo humano. Dentre suas funções podemos citar, a produção de proteínas plasmáticas como a albumina, além de eliminação da bile para digestão de lipídeos (Si-Taye et al., 2010). É uma interface entre o sistema digestivo e o sangue. Os nutrientes absorvidos pelo intestino chegam ao fígado pela veia porta, exceto os lipídios complexos que chegam pela artéria hepática, onde são processados e armazenados para serem utilizados por outros órgãos. O fígado é capaz de captar, transformar e acumular metabólitos, além de neutralizar e eliminar substâncias tóxicas. É revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo que subdivide o órgão em lóbulos compostos por cordões de hepatócitos, as principais células do parênquima hepático (Cullen e Stalker, 2016). Em cada lóbulo há uma veia centrolobular por onde irradiam os capilares sinusoides que permeiam os cordões de hepatócitos. Os capilares contêm macrófagos conhecidos como células de Kupffer. Em algumas regiões na periferia dos lóbulos são encontradas regiões denominadas espaços porta, que contêm ductos biliares, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (Junqueira e Carneiro, 2017). Algumas das funções importantes desempenhadas pelo órgão são armazenamento de lipídios e glicogênio, que são importantes em situação de estresse, formação da bile, síntese de proteínas plasmáticas, além de detoxificação do organismo (Ross e Pawlina, 2016). Portanto, alterações na organização do parênquima hepático podem afetar seu funcionamento e danificar o metabolismo de um organismo.

Assim, exposições repetidas ou crônicas à metais pesados, como arsênio e níquel, podem acarretar sua acumulação levando a distúrbios hepáticos. A presença destes compostos, principalmente nos hepatócitos, pode causar competição por sítios de ligação a proteínas levando ao comprometimento do processo de desintoxicação do corpo. Como consequência destes distúrbios, pode haver a elevação dos níveis de enzimas hepáticas, desequilíbrio do status antioxidante e várias patologias no parênquima do órgão, como hemorragia, inflamação e degenerações (Pari et al., 2008; Souza et al., 2018).

Quando se tratam das patologias, um grande aumento da proporção de hemácias circulantes é característica de congestão vascular, com vasos túrgidos e edemaciados pelas hemácias. Uma das consequências da congestão é a formação de hemorragia, que é caracterizada pela saída de sangue dos vasos para o interstício. A congestão favorece a migração de células de defesa, promovendo focos de infiltrado inflamatório no tecido hepático (Destro et al., 2021). Quando a lesão persiste, tem outra sequência de eventos envolvendo processo degenerativo. A degeneração hidrópica é caracterizada pelo acúmulo de água dentro das células em decorrência de um desequilíbrio eletrolítico na célula. Pode estar diretamente relacionada ao comprometimento do funcionamento de bombas ATPases de membrana, como bomba de Na^+/K^+ , podendo causar acúmulo de Na^+ intracelular e eliminação de K^+ , resultando no acúmulo de água no citoplasma afim de manter a isosmolaridade (Brasileiro Filho 2016).

3.4 Técnicas para avaliação microscópica do tecido hepático

Uma das formas de estudar os efeitos de compostos na estrutura, e consequentemente, na função de um órgão é avaliar o seu parênquima por meio de análises microscópicas. Assim, por meio de diferentes técnicas e microscopias, é possível avaliar a saúde do órgão e mensurar danos, considerando estudos toxicológicos (Junqueira e Carneiro, 2017). Para análises de rotina, onde pode-se verificar a estrutura do parênquima mediante a proporção de seus

componentes e a presença de patologias mais graves, são utilizados corantes convencionais. Os diferentes tipos de corantes podem se ligar a estruturas celulares específicas, de acordo com sua afinidade química. Os corantes ácidos, como a eosina, se ligam aos componentes básicos (acidófilos) dos tecidos, como proteínas do citoplasma e a matriz extracelular, enquanto os corantes básicos, como a hematoxilina, se ligam aos componentes ácidos (basófilos), como os ácidos nucleicos do núcleo (Caputo et al., 2010). A coloração de hematoxilina e eosina (HE) permite visualizar características de matriz citoplasmática, nuclear e extracelular. Em um tecido típico, os núcleos apresentam coloração púrpura, corados pela hematoxilina, enquanto o citoplasma e matriz extracelular são corados pela eosina, apresentando vários graus de coloração rosa (Fischer et al., 2008).

Quando há a necessidade de estudos histológicos mais complexos, podemos utilizar colorações especiais. Quando há presença de processo inflamatório subcrônico, há processos degenerativos associados à morte celular, que podem causar fibrose (Wynn e Ramalingam 2012). Desse modo, um exemplo de coloração utilizada é o Tricrômico de Masson, que envolve a coloração de células do tecido conjuntivo, onde o citoplasma é corado de vermelho, o colágeno de azul e o núcleo com uma cor mais escura. O tecido conjuntivo tem diversas funções, incluindo sustentação, preenchimento e defesa. É composto por células, como fibroblastos, macrófagos e mastócitos, e matriz extracelular que é composta principalmente por fibras, glicoproteínas, glicosaminoglicanas e proteoglicanas (Junqueira e Carneiro, 2017). A coloração Tricrômico de Masson possibilita a análise da proporção de colágeno no tecido. Se houver proporção anormal, pode ser realizada outra coloração, a coloração especial de *Picrosirius*, para a caracterização do tipo de colágeno (Montes e Junqueira 1991; Liu et al., 2021). Diferente da coloração de Tricrômico de Masson, a coloração por *Picrosirius* diferencia as fibras colágenas, sendo as fibras de colágeno I observadas em coloração vermelho em microscópio óptico de luz polarizada e as fibras de colágeno III representado em verde e

amarelo (Borges et al., 2007). Devido à sua capacidade de quantificação de fibras de colágeno tipo I, é muito eficaz para a demonstração da fibrose, não apenas por sua presença, mas, principalmente, por seu padrão de distribuição, sendo o colágeno I localizado predominantemente nos tratos portais (Iezzoni, 2018). A fibrose pode ser definida como a deposição de componentes da matriz extracelular em proporção superior à normal (Rauterberg et al., 1981).

Além das colorações de rotina e especiais, outro método de estudo histológico são as colorações histoquímicas. Por suas propriedades seletivas de coloração, contribuem para o delineamento de estruturas arquitetônicas e celulares específicas (Iezzoni, 2018). Para a coloração de carboidratos, principalmente glicogênio, é utilizada a coloração histoquímica de ácido periódico de Schiff (PAS). Componentes da glicose são oxidados, com formação de aldeídos que interagem com o PAS, gerando coloração púrpura/magenta (Figueiredo et al., 2007). O glicogênio é um polímero de glicose que atua como reserva energética, sendo que nos mamíferos, as reservas mais importantes são encontradas no fígado e no músculo esquelético (Roach et al., 2001). O glicogênio hepático é necessário para manter a homeostase da glicose sanguínea entre as refeições (Agius, 2015). A desregulação do metabolismo do glicogênio está relacionada ao desenvolvimento de doenças como diabetes (Cline et al., 1994). Um outro exemplo de histoquímica é a coloração por azul de toluidina modificado. O azul de toluidina é um corante que cora células metacromáticas em tons de vermelho-púrpura, também usado como um corante nuclear devido à sua ligação com o DNA (Silverman et al., 1984). A coloração de azul de toluidina modificado, em pH ácido, é usada para corar grânulos de mastócitos em azul (Rosa et al., 2018). Os mastócitos participam do processo inflamatório, sendo recrutados para os locais de inflamação. São células do sistema imune que participam da regulação da resposta imunológica, através da liberação de mediadores químicos a partir de um estímulo (Zhao et al., 2001).

3.5 Estresse oxidativo

A geração de radicais livres tem relevantes papéis biológicos, atuando como mediadores para a transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas, com sua produção contínua e fisiológica resultando no desenvolvimento de mecanismo antioxidante (Shami e Moreira, 2004). A principal fonte geradora desses radicais livres é a mitocôndria, na cadeia transportadora de elétrons (Green et al., 2004). A partir da redução do O_2 são gerados os radicais superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-), além de espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e espécies reativas de nitrogênio como óxido nítrico (Ferreira e Matsubara, 1997).

A produção dessas espécies reativas ocorre como resultado de atividades metabólicas das células, porém, sua produção excessiva pode resultar em danos oxidativos (Schneider e Oliveira, 2004). As EROs são subprodutos dos radicais livres, sendo processadas por um sistema de defesa antioxidante. Quando O_2^- recebe mais um elétron e dois íons hidrogênio, há formação de H_2O_2 , reação essa catalisada pela enzima superóxido dismutase. Esse H_2O_2 formado é decomposto em água e oxigênio pela ação da catalase e a glutathione S-transferase (Yu, 1994). O H_2O_2 é menos reativo que O_2^- , mas seu acúmulo também pode trazer riscos às estruturas celulares (Hermes-Lima, 2004). Um outro marcador da atividade antioxidante celular é a capacidade de redução férrica do plasma, que indica a quantidade total de antioxidantes não enzimáticos (Chandramathi et al., 2009), medindo a capacidade dos antioxidantes de reduzir o ferro férrico (Fe^{3+}). Já o radical óxido nítrico é gerado pela oxidação da arginina em citrulina pelo óxido nítrico sintase (Snyder e Brecht, 1992).

O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs), e sua neutralização. Essas espécies reativas são naturalmente produzidas no corpo, mas quando há produção em grande quantidade, a ponto de não conseguirem ser neutralizadas, pode haver comprometimento de lipídeos, proteínas e

ácidos nucleicos (Persson et al., 2014). O desequilíbrio na produção e neutralização desses radicais pode causar danos que são mensurados por alguns marcadores, como hidroperóxidos, malondialdeído, e 4-hidrononenal, todos formados a partir da peroxidação lipídica iniciada pela ação destes radicais livres (Barbosa et al., 2010). O malondialdeído pode ser indicativo de dano ao se acumular na célula (Rahal et al., 2014). Outro marcador de estresse é o acúmulo de proteínas carboniladas, que são geradas a partir de reações com radicais que resultam na oxidação de resíduos de lisina, arginina, prolina e treonina. O processo de oxidação gera derivados carbonilados que podem gerar danos ao processo de transcrição e atividade mitocondrial comprometendo o dobramento correto das proteínas e comprometendo sua função (Hauck et al., 2018).

4. Materiais e métodos

4.1 Animais

Ratos Wistar machos adultos (n = 40, 70 dias de idade) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa foram mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno, sob temperatura (21 °C) e fotoperíodo (12h claro/escuro) controlados. O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (UFV; protocolo 45/2021), sendo conduzido de acordo com as diretrizes éticas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Design experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n = 10/grupo). Animais do grupo controle receberam solução salina 0,9%, enquanto animais expostos ao arsênio e níquel receberam, respectivamente, soluções de 1mg L⁻¹ de arsênio, na

forma de arsenito de sódio ($\text{NaAsO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO), e 7 mg L^{-1} níquel, na forma de cloreto de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO). Por fim, animais intoxicados simultaneamente com os dois metais receberam uma solução contendo 1 mg L^{-1} de arsênio e 7 mg L^{-1} de níquel. Essas concentrações são 100x acima das permitidas por organizações nacionais e internacionais (OMS, 2011), mas próximas às concentrações encontradas em áreas contaminadas (Figueiredo et al., 2007; Mohammed Abdul et al., 2015; Mukherjee et al., 2016; Rehman et al., 2017; Prueitt et al., 2020). Os metais foram ofertados aos animais durante 70 dias de experimento, considerando um tempo de exposição subcrônico (Li et al., 2012). Foi feito o controle diário do consumo de água para cálculo da concentração dos compostos químicos ingeridos ao dia. As condições clínicas de saúde dos animais foram examinadas durante todo o experimento. Os metais foram fornecidos via água de beber *ad libitum* com o intuito de extrapolar as condições experimentais para a realidade humana.

4.3 Eutanásia, coleta de material biológico e biometria

No 71º dia de experimento, os animais foram pesados, sedados com xilazina 10 mg/kg intraperitoneal e anestesiados usando quetamina 150 mg/kg intraperitoneal. Posteriormente, os animais foram sacrificados por punção cardíaca. Neste momento, coletou-se sangue para obtenção de soro a ser usado em análises bioquímicas. O fígado foi dissecado e pesado para obtenção do peso absoluto e índice hepatossomático, que foi calculado a partir da relação do peso do órgão pelo peso corporal final $\times 100$ (Gonçalves et al., 2012). Fragmentos do órgão foram obtidos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C , para determinação de atividades enzimáticas e fatores relacionados ao estresse oxidativo, além da determinação de ATPases. Ainda, outros fragmentos do órgão foram fixados em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2), para avaliações histológicas. Parte do tecido hepático fixado também foi utilizado para

avaliação do conteúdo de água por unidade de peso do tecido (mL/g). Fragmento do tecido hepático foi seco a 60°C por 96 h e pesado para obtenção do seu peso seco. Esse valor foi usado no cálculo da diferença entre o peso do fígado úmido e seco para obter o teor de água (mL/g) no tecido (Novaes et al., 2012).

4.4 Análise bioquímica de enzimas séricas

O sangue coletado foi centrifugado a 2.000g por 15 min em temperatura ambiente. O soro obtido foi utilizado para a avaliação da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) usando kits bioquímicos (Bioclin Laboratories, Belo Horizonte, MG, Brasil) adequados para o equipamento BS-200 (Bioclin Laboratories, Belo Horizonte, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

4.5 Concentração de arsênio e níquel no fígado

A proporção de arsênio e níquel no fígado foi estimada em fragmentos de órgãos congelados que foram secos em estufa a 60°C por 96 h até alcançar peso seco constante. Em seguida os fragmentos foram revestidos com carbono (Quorum Q150 T, East Grinstead, West Sussex, Reino Unido), e analisados em microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Carl Zeiss, Jena, Thuringia, Alemanha) com um detector de desvio de silício com radiação de raios-X.

4.6 Avaliação histopatológica

Fragmentos de fígado (cinco animais por grupo) foram desidratados em séries crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95%, absoluto), com passagens em xilol até serem incluídos em parafina. Foram obtidos cortes de fígado com 5µm de espessura, com o auxílio de um micrótomo rotativo (RM 2255, Leica, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram corados com

os corantes hematoxilina-eosina (HE) para análises histológicas e estereológicas, ácido periódico-Schiff (PAS) para quantificação de glicogênio, Tricrômico de Masson para quantificação de tecido conjuntivo, *Picrosirius* para colágeno e azul de toluidina para quantificação de mastócitos. Cada lâmina continha oito secções do órgão, com distância de 10 cortes entre uma e outra para evitar análises repetitivas da mesma região histológica. Foram avaliadas dez regiões do tecido hepático por animal, utilizando um microscópio (Olympus CX40, Tóquio, Japão) com aumento de 40x.

Observou-se a ocorrência de alterações histológicas em cortes de tecido hepático corados em HE de animais controle e animais expostos aos metais, individualmente e simultaneamente. A presença e frequência de congestão, hemorragia, infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica foi categorizada em quatro níveis, considerando ausência de alterações histológicas (-), ocorrência de alterações leves (+) em um animal por grupo, ocorrência de alterações moderadas (++) em dois ou três animais por grupo, e alterações graves (+++) observadas em quatro ou cinco animais por grupo (Carvalho et al., 2022).

4.7 Estereologia do fígado

Para as análises estereológicas, dez imagens digitais por animal, para cada uma das quatro colorações realizadas (objetiva 20x), foram obtidas utilizando um microscópio óptico (Olympus BX-53, Tóquio, Japão) conectado a uma câmera digital (Olympus DP73, Tóquio, Japão). Para análise estereológica, foi utilizado um sistema de grades com 266 pontos. Nas secções coradas com HE, foram registrados pontos sobre componentes do fígado, incluindo citoplasma e núcleo de hepatócitos, capilares sinusoides, vasos sanguíneos e macrófagos. A proporção de cada componente foi calculada usando a relação do número de pontos localizados na estrutura de interesse pelo número total de pontos na área histológica (Mandarin-De-Lacerda, 2003). Nas secções coradas com PAS, Tricrômico de Masson e *Picrosirius*, a proporção

de glicogênio, tecido conjuntivo e colágeno, respectivamente, foi realizada por contagem de pixels. Para análise de *Picrosirius*, foi utilizado um microscópio óptico de luz polarizada. Já o número de mastócitos foi quantificado de acordo com a relação da quantidade de mastócitos pela área total, tendo sido analisados dez campos histológicos aleatoriamente. Todas as análises estereológicas foram realizadas no software ImageJ (National Institutes of Health).

4.8 Ensaio de atividade enzimática e marcadores de dano oxidativo

Para análise das enzimas antioxidantes, 100mg de fígado por animal foram homogeneizadas em 1ml de solução salina tamponada com fosfato, centrifugadas a 4000 g a 5°C por 10 min. A partir do sobrenadante obtido foram realizadas as análises das atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), capacidade de redução férrica do plasma (FRAP), malondialdeído (MDA), óxido nítrico (NO). O pellet foi congelado para análise das proteínas carboniladas (PC).

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de pirogalol, baseado na habilidade desta enzima de catalisar a reação do O_2^- e H_2O_2 (Dieterich et al., 2000), enquanto CAT foi avaliada de acordo com o método de Aebi (1984) pela mensuração da cinética de decomposição do H_2O_2 . A atividade de GST foi estimada no espectrofotômetro a 340 nm como descrito por Habig et al. (1974) e calculada de acordo com a formação de 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB) conjugado com glutathione. O FRAP consiste em uma dosagem colorimétrica baseada no princípio de redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) em tripiridiltriazina ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ) pelos antioxidantes de uma amostra.

Com a análise de MDA foi possível avaliar a peroxidação lipídica com formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como descrito por Buege e Aust (1978). A concentração de PC, produto da oxidação de proteínas, foi mensurada bioquimicamente, baseado nos grupos carbonil da reação com DNPH e mensurado em espectrofotometria a 370

nm (Levine et al., 1990). A produção de NO foi quantificada indiretamente pelo teor de nitrito nos sobrenadantes do homogenato de fígado, usando a reação padrão de Griess (Tsikas, 2007). Os níveis de proteína total nos órgãos foram determinados de acordo com Bradford (1976), e o resultado utilizado na normalização da atividade das enzimas.

4.9 Atividades de ATPases total, Ca^{2+} , Mg^{2+} e $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$

Fragmentos de fígado congelados (100mg) foram homogeneizados em 1ml de tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) e centrifugado a 1.500 xg por 10min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de ATPase Total (Evans, 1969), Ca^{2+} (Hjertén e Pan, 1983), Na^+/K^+ (Bonting et al., 1962) e Mg^{2+} (Ohnishi et al., 1982). A solução de ATP (0,01 M) foi utilizada como substrato para gerar fosfato livre pela atividade de ATPases. Foi adicionado 500 µL de TCA 10% para interromper a reação. Os tubos foram centrifugados a 1.500 xg por 10 min. O sobrenadante foi usado para medir o teor de fósforo usando um kit bioquímico (Bioclin Laboratories, Belo Horizonte, MG, Brasil) conforme descrito nas instruções do fabricante. A atividade de ATPase foi expressa em µg de fósforo/min/miligramma de proteína.

4.10 Análise estatística

Os resultados tiveram sua normalidade avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, eles foram submetidos ao teste de análise de variância unidirecional (*one way* ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste *post hoc* de Tukey. Tanto a análise estatística quanto a elaboração dos gráficos foram feitas utilizando o GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças foram significativas quando $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (DP).

5. Resultados

5.1 Consumo diário dos compostos químicos de arsênio e níquel

Animais intoxicados com arsênio ingeriram $0,12 \pm 0,01$ mg de arsênio Kg^{-1} de peso corporal/dia. Já animais intoxicados com níquel ingeriram $0,78 \pm 0,05$ mg de níquel Kg^{-1} de peso corporal/dia. Animais expostos aos dois compostos simultaneamente ingeriram $0,11 \pm 0,01$ mg de arsênio e $0,79 \pm 0,06$ mg de níquel Kg^{-1} de peso corporal/dia. Houve aumento da proporção de arsênio em animais do grupo arsênio e com coexposição comparados aos animais controle e aqueles que receberam somente níquel ($p < 0,05$; Figura 1A). Ratos do grupo níquel e da coexposição apresentaram aumento na proporção de níquel quando comparados aos animais dos grupos controle e arsênio ($p < 0,05$; Figura 1B). Sinais clínicos toxicológicos como perda de peso, lesões cutâneas e sangramentos aparentes não foram observados em nenhum dos animais durante o período experimental.

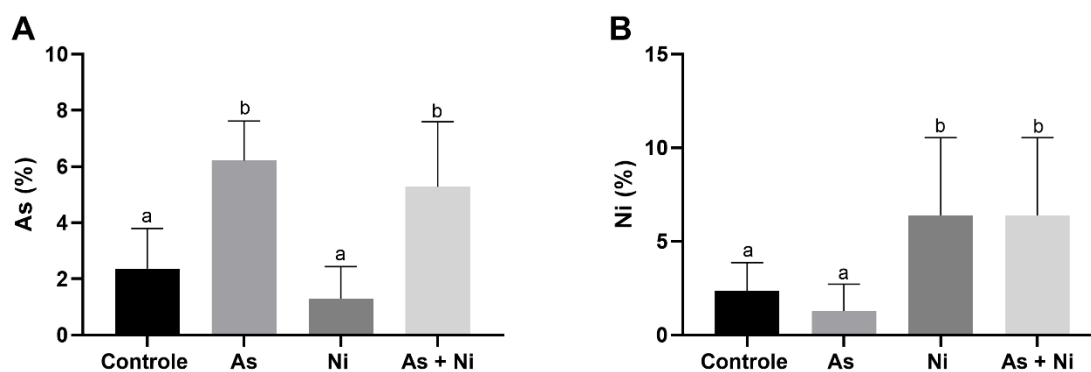


Figura 1. Proporção de arsênio e níquel presente no fígado de ratos Wistar expostos aos metais por 70 dias. As = 1 mg L^{-1} de arsênio; Ni = 7 mg L^{-1} de níquel; As+Ni = 1 mg L^{-1} de arsênio e 7 mg L^{-1} de níquel. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey; $p < 0,05$). ($n = 5$ animais/grupo).

5.2 Parâmetros biométricos e bioquímicos

O peso corporal, peso absoluto e volume do fígado não apresentaram diferença significativa entre os animais ($p > 0,05$; Tabela 1). O índice hepatossomático foi menor em animais expostos ao níquel quando comparados com ratos controle ($p < 0,05$; Tabela 1). O conteúdo de água no fígado não diferiu entre animais dos grupos experimentais ($p > 0,05$; Tabela 1). Os resultados da análise bioquímica mostraram que as concentrações séricas de ALT, AST e ALP não apresentaram diferenças significativas entre animais dos grupos experimentais ($p > 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros biométricos e enzimáticos séricos de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio e níquel na água de beber por 70 dias.

Parâmetros	Controle	As	Ni	As + Ni
Peso corporal (g)	399,34 ± 9,49 ^a	436,31 ± 7,48 ^a	438,20 ± 12,81 ^a	436,80 ± 16,76 ^a
Peso do fígado (g)	15,22 ± 0,45 ^a	15,90 ± 0,67 ^a	14,15 ± 0,46 ^a	16,09 ± 0,86 ^a
Índice hepatossomático (%)	3,81 ± 0,09 ^a	3,65 ± 0,16 ^{ab}	3,24 ± 0,12 ^b	3,68 ± 0,13 ^{ab}
Volume do fígado (mL)	44,00 ± 0,53 ^a	45,43 ± 0,71 ^a	44,00 ± 0,87 ^a	45,43 ± 0,84 ^a
Conteúdo de água (mL/g)	0,69 ± 0,01 ^a	0,69 ± 0,01 ^a	0,69 ± 0,01 ^a	0,68 ± 0,00 ^a
ALT (U/L)	49,00 ± 3,72 ^a	49,60 ± 2,94 ^a	51,80 ± 3,33 ^a	47,00 ± 1,38 ^a
AST (U/L)	70,03 ± 2,67 ^a	86,00 ± 10,23 ^a	89,80 ± 8,85 ^a	82,00 ± 2,81 ^a
ALP (U/L)	174,01 ± 23,27 ^a	231,01 ± 19,67 ^a	209,80 ± 19,74 ^a	171,40 ± 11,46 ^a

Média ± DP. As = 1 mg L⁻¹ de arsênio; Ni = 7 mg L⁻¹ de níquel; As+Ni = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey; p < 0,05). (n = 5 animais/grupo).

5.3 Análises histológicas, estereológicas e histoquímicas

Ao analisar as lâminas histológicas coradas com HE qualitativamente em microscópio óptico foi observado histologia normal do parênquima hepático dos animais do grupo controle (Fig. 2 A, B, C). O parênquima apresenta-se organizado por hepatócitos em cordões, apresentando um ou dois núcleos arredondados. Entre os cordões de células observou-se a presença de capilares sinusoides que irradiam dos e para os vasos sanguíneos. Os animais dos grupos expostos com metais apresentaram alterações no parênquima do fígado, tendo sua organização comprometida. Apesar dos hepatócitos ainda estarem organizados em cordões entremeados por capilares sinusoidais, os mesmos apresentavam excesso água distribuída uniformemente em seu citoplasma (Fig. 2 D, E, H, K). Também foi percebida a presença abundante de hemácias nos vasos sanguíneos e capilares, além de focos de infiltrado inflamatório (Fig. 2 E, I, K, L).

Após esta primeira análise, as lâminas histológicas foram revistas em busca de quantificar a presença destes processos patológicos. Como mencionado na metodologia, os achados histológicos foram agrupados de acordo com a frequência vista em microscopia de luz e estão presentes na Tabela 2. Nos animais do grupo controle foram observadas leves alterações de congestão e infiltrado inflamatório (Tabela 2; Fig. 2 A, B, C). Os animais expostos ao arsênio apresentaram presença moderada de congestão, leve de hemorragia, moderada de infiltrado inflamatório e alteração grave de degeneração hidrópica (Tabela 2; Fig. 2 D, E, F). Já os animais do grupo exposto ao níquel apresentaram alterações moderadas de congestão, leve presença de hemorragia e moderado infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica (Tabela 2; Fig. G, H, J). Por fim, os animais do grupo da coexposição apresentaram intensa congestão vascular, presença leve de hemorragia, intenso infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica (Tabela 2; Fig. 2 J, K, L).

Tabela 2. Histopatologia do fígado de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio e níquel na água de beber por 70 dias.

Parâmetros	Controle	As	Ni	As + Ni
Congestão	+	++	++	+++
Hemorragia	-	+	+	+
Infiltrado inflamatório	+	++	++	+++
Degeneração hidrópica	-	+++	++	+++

Ausência de alterações histológicas (-), ocorrência de alterações leves (+), ocorrência de alterações moderadas (++) e alterações graves (+++). As = 1 mg L⁻¹ de arsênio; Ni = 7 mg L⁻¹ de níquel; As+Ni = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel. (n = 5 ratos/grupo).

As análises estereológicas do fígado mostraram que a proporção do núcleo diminuiu em animais do grupo arsênio em comparação aos outros grupos ($p < 0,05$; Tabela 3). Já a proporção de citoplasma foi menor em animais expostos aos dois metais, arsênio e níquel, em relação aos demais animais ($p < 0,05$; Tabela 3). A proporção de hepatócitos diminuiu nos três grupos de animais intoxicados com metais tóxicos em relação ao grupo controle, sendo esta redução intensificada quando ocorreu a coexposição de arsênio e níquel ($p < 0,05$; Tabela 3). Quanto à proporção de capilares sinusoides e vasos sanguíneos, houve um aumento em ratos do grupo da coexposição quando comparado com os animais do grupo controle ($p < 0,05$; Tabela 3). Por fim, a proporção de macrófagos não alterou nos grupos experimentais ($p > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3. Proporção dos componentes do parênquima hepático de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio e níquel na água de beber por 70 dias.

Parâmetros	Controle	As	Ni	As + Ni
Núcleos (%)	8,73 ± 0,3687 ^a	5,33 ± 0,1976 ^b	8,21 ± 0,5370 ^a	7,55 ± 0,4629 ^a
Citoplasma (%)	63,65 ± 0,6165 ^a	60,76 ± 1,515 ^a	58,43 ± 1,558 ^a	52,18 ± 1,574 ^b
Hepatócitos (%)	72,38 ± 0,3097 ^a	65,82 ± 1,505 ^b	66,55 ± 1,069 ^b	59,73 ± 1,763 ^c
Capilares sinusoides (%)	25,11 ± 0,4148 ^a	26,65 ± 0,6094 ^{ab}	27,31 ± 0,7236 ^{ab}	29,54 ± 1,105 ^b
Macrófagos (%)	1,03 ± 0,1113 ^a	1,06 ± 0,1297 ^a	1,35 ± 0,09132 ^a	1,63 ± 0,08944 ^a
Vasos sanguíneos (%)	1,37 ± 0,5276 ^a	6,15 ± 0,8026 ^{ab}	3,91 ± 1,438 ^{ab}	9,05 ± 2,566 ^b

Média ± DP. ^{a,b,c}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey; $p < 0,05$). ($n = 5$ animais/grupo). As = 1 mgL⁻¹ de arsênio; Ni = 7 mgL⁻¹ de níquel; As+Ni = 1 mgL⁻¹ de arsênio e 7 mgL⁻¹ de níquel.

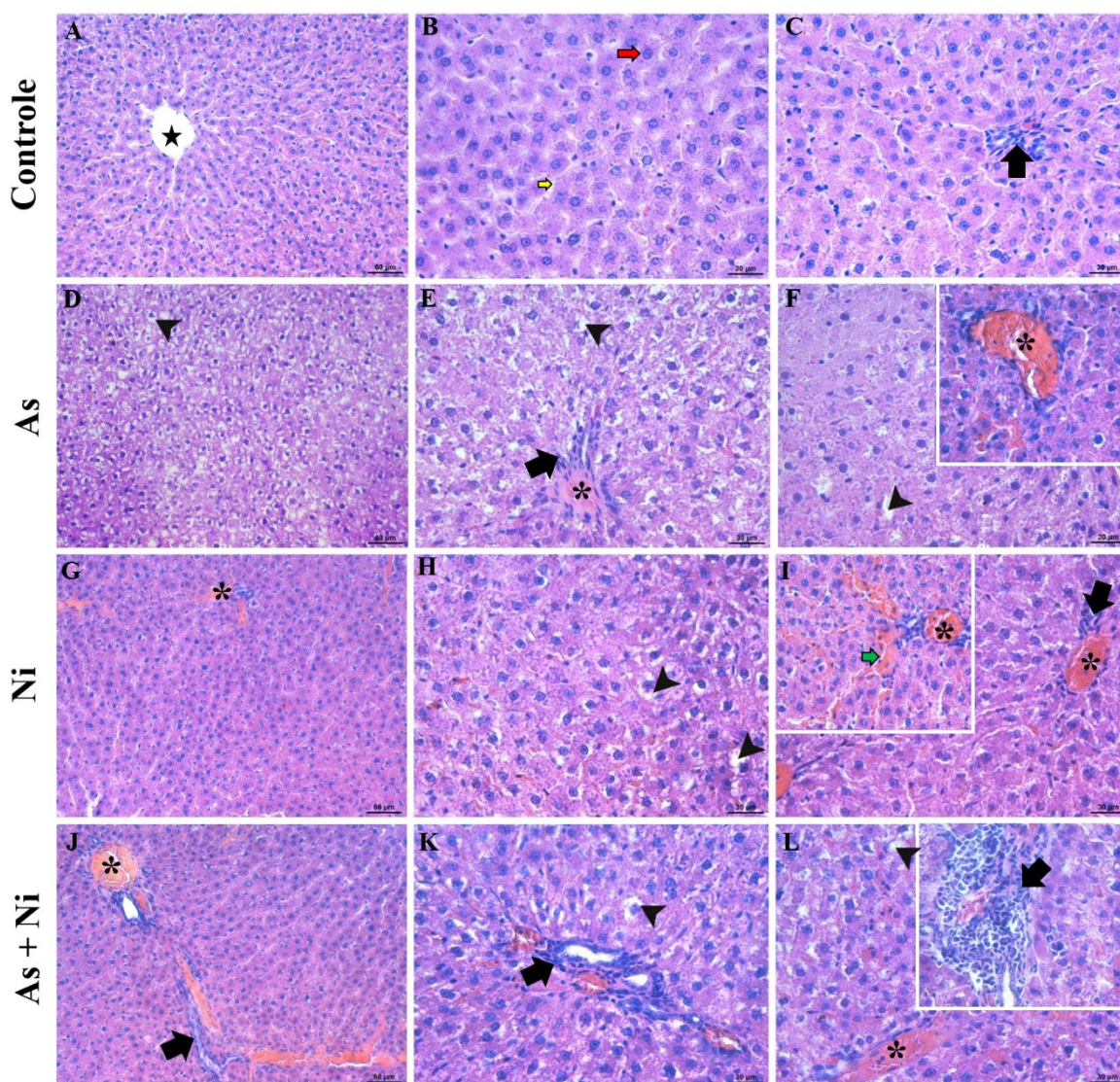


Figura 2. Fotomicrografias do parênquima hepático de ratos Wistar submetidos a coexposição subcrônica de arsênio e níquel na água de beber por 70 dias. A, B, C retratam o parênquima hepático intacto, composto por hepatócitos (seta vermelha) organizados em cordões, entremeados por capilares sinusoides (seta amarela). Há a presença de vasos sanguíneos com lúmen desobstruído (estrela). As figuras D, E, e F, são compostas por fotomicrografias do parênquima de animais desafiados pela exposição ao arsênio. É possível observar a presença de congestão vascular (asterisco), infiltrado inflamatório (seta preta) e degeneração hidrópica no citoplasma dos hepatócitos (cabeça de seta). Nas fotomicrografias G, H e I, observamos o parênquima do fígado de animais expostos ao níquel, sendo visível congestão de vasos,

hemorragia (seta verde), infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica. Nas figuras J, K e L, o parênquima de animais desafiados com a coexposição entre arsênio e níquel, revelam a presença de congestão, hemorragia, infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica. As = 1 mg L⁻¹ de arsênio; Ni = 7 mg L⁻¹ de níquel; As+Ni = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel.

As análises histoquímicas indicaram aumento do número de mastócitos nos animais do grupo exposto com níquel e com arsênio+níquel em comparação aos animais do controle ($p < 0,05$; Fig. 3T). A porcentagem de glicogênio aumentou em ratos intoxicados com arsênio+níquel comparado aos animais dos outros grupos ($p < 0,05$; Fig. 3Q). Nas colorações especiais para a quantificação de colágeno, a porcentagem de colágeno I analisado na coloração de *Picrosirius* aumentou nos animais da coexposição em comparação aos animais do grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 3R), enquanto a porcentagem de tecido conjuntivo, pela coloração de Tricrômio de Masson, apresentou um aumento no grupo arsênio e níquel quando comparado aos animais do grupo controle e aos animais que receberam apenas níquel ($p < 0,05$; Fig. 3S).

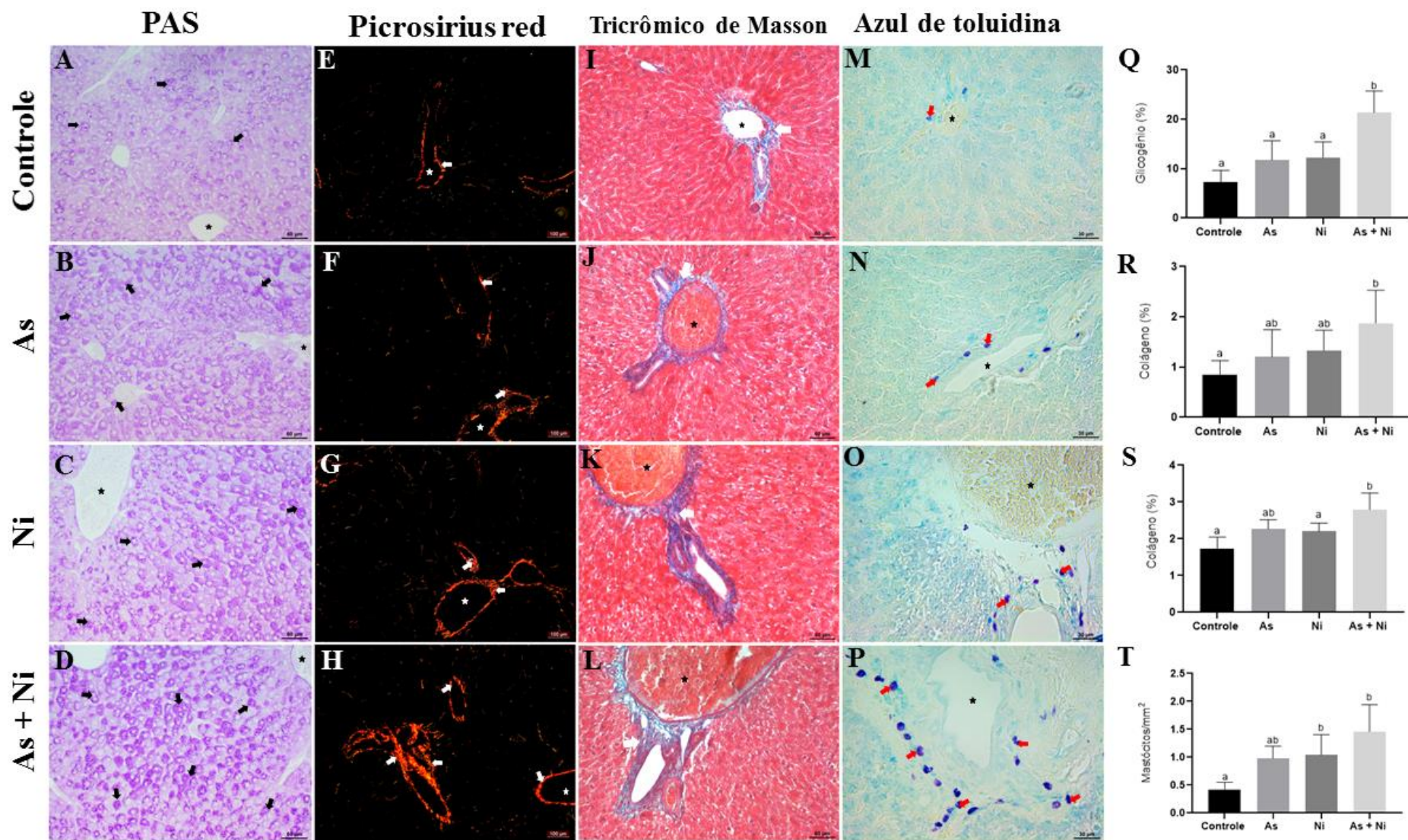


Figura 3. Fotomicrografias do parênquima hepático de ratos Wistar submetidos a coexposição de arsênio e níquel na água de beber por 70 dias. A, B, C e D revelam o parênquima hepático corado pela coloração de ácido periódico-Schiff (PAS), revelando agregados de glicogênio, apontados pelas setas pretas, gráfico Q. As fotomicrografias em E, F, G e H mostram o parênquima hepático corado por *Picrosirius* e visto sob luz polarizada, revelando a presença de colágeno (setas brancas), gráfico R. De forma similar, as figuras I, J, K e L destacam o colágeno em azul pela coloração de Tricrômico de Masson, gráfico S. M, N, O e P revelam a presença de mastócitos (setas vermelhas) pela coloração de azul de toluidina modificado no parênquima hepático dos animais, gráfico T. Estrela: vasos sanguíneos. Média $\pm$ DP. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey; $p < 0,05$). ($n = 5$ animais/grupo) As = 1 mg L⁻¹ de arsênio; Ni = 7 mg L⁻¹ de níquel; As+Ni = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel.

5.4 Atividade de ATPase total, Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+/K^+ ATPases

A atividade de ATPase total foi menor em animais dos grupos níquel e arsênio+níquel que animais do grupo controle ($p < 0,05$; Tabela 4). Animais expostos apenas ao níquel apresentaram atividade aumentada de bomba Ca^{2+} ATPase no tecido hepático quando comparados com animais que tiveram acesso apenas ao arsênio e aos dois metais simultaneamente, porém foram todos semelhantes ao grupo controle ($p < 0,05$; Tabela 4). Já a atividade de Na^+/K^+ e Mg^{2+} ATPases não diferiram entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Tabela 4).

5.5 Atividade das enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo

Não foram observadas alterações na atividade da enzima SOD ($p > 0,05$; Fig. 4A). A atividade de CAT foi menor em animais que ingeriram níquel e a combinação arsênio+níquel, sendo esta redução mais intensa neste último grupo ($p < 0,05$; Fig. 4B). Já a atividade de GST foi menor em animais expostos ao arsênio+níquel que em ratos intoxicados apenas com níquel, mas ambos não diferiram do controle ($p < 0,05$; Fig. 4C). A produção de NO foi maior em animais intoxicados com arsênio+níquel que em ratos controles ($p < 0,05$; Fig. 4D). Além disso, a produção de PC foi maior em ratos expostos ao níquel que em ratos controles ($p < 0,05$; Fig. 4F). Os níveis de MDA e FRAP não diferiram entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 4E, G).

Tabela 4. Atividade enzimática de ATPase total, Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+/K^+ ATPases no fígado de ratos Wistar adultos expostos à arsênio e níquel, na água de beber por 70 dias.

Parâmetros (Pi/min/mg/proteína)	Controle	As	Ni	As + Ni
ATPase total	$0,026 \pm 0,001^a$	$0,024 \pm 0,001^{ab}$	$0,023 \pm 0,0002^b$	$0,02187 \pm 0,0006^b$
Ca^{2+} ATPase	$0,008 \pm 0,0001^{ab}$	$0,008 \pm 0,0003^a$	$0,009 \pm 0,0002^b$	$0,007 \pm 0,0002^a$
Na^+/K^+ ATPase	$0,011 \pm 0,0005^a$	$0,012 \pm 0,0006^a$	$0,012 \pm 0,0005^a$	$0,011 \pm 0,0003^a$
Mg^{2+} ATPase	$0,010 \pm 0,0002^a$	$0,009 \pm 0,0006^a$	$0,010 \pm 0,0005^a$	$0,009 \pm 0,0002^a$

Média $\pm$ DP. As = 1 mg L⁻¹ de arsênio; Ni = 7 mg L⁻¹ de níquel; As+Ni = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey; P < 0,05). (n = 5 animais/grupo).

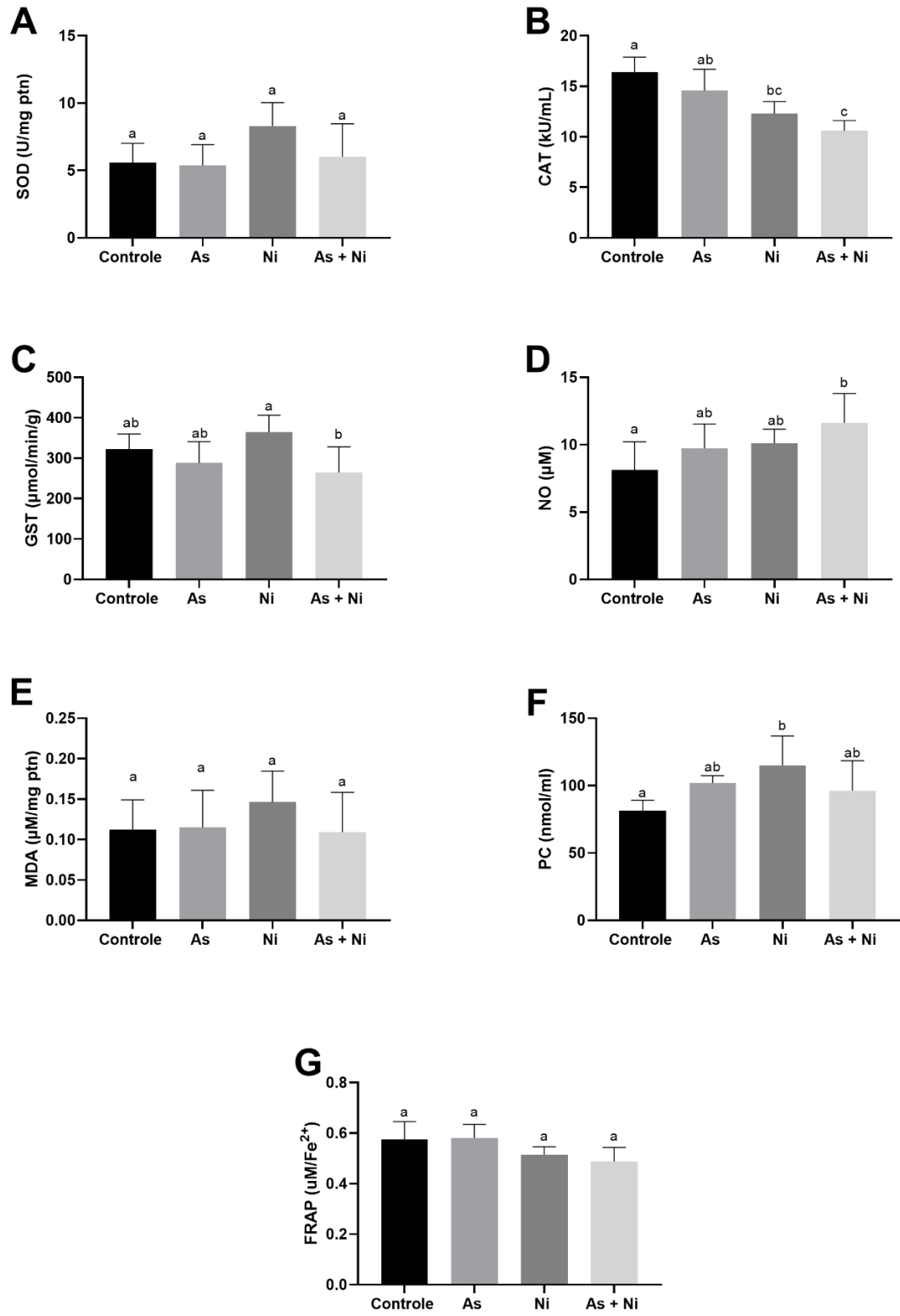


Figura 4. Efeitos da exposição ao arsênio e níquel sobre atividades de enzimas antioxidantes, produtos do estresse oxidativo e capacidade antioxidante total em fígado de ratos Wistar. SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GST = glutathione S-transferase; NO = óxido nítrico; MDA = malondialdeído; PC = proteína carbonilada; FRAP = capacidade antioxidante total. As = 1 mg L⁻¹ de arsênio; Ni = 7 mg L⁻¹ de níquel; As+Ni = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel. Média ± DP. ^{a,b,c}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey; P < 0,05). (n = 5 animais/grupo).

6. Discussão

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ingestão oral de arsênio e níquel sobre parâmetros morfológicos e funcionais do fígado de ratos adultos. Diante o desafio da coexposição, este órgão apresentou alterações histológicas, como ocorrência de congestão, infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica, alterações na proporção de componentes do parênquima hepático e na atividade de enzimas antioxidantes e de ATPases. O contato com a mistura de metais tóxicos também provocou bioacumulação de arsênio e níquel no tecido hepático, aumento na proporção de glicogênio em hepatócitos, além do aumento na proporção de colágeno e mastócitos. No entanto, as concentrações ofertadas por 70 dias não causaram prejuízo a parâmetros biométricos e bioquímicos séricos relacionados a enzimas marcadoras da funcionalidade hepática.

Os resultados mostraram um aumento na proporção de arsênio e níquel no fígado de animais que ingeriram os compostos químicos, tanto de forma simultânea quanto isolada. O fígado, por ser o principal local de desintoxicação do corpo, torna-se um agente central em processos toxicológicos (Cullen e Stalker, 2016). Neste órgão, por exemplo, o arsênio passa por processos de redução e metilação como forma de minimizar seu potencial tóxico, ao convertê-lo em um composto arsênico metilado. Isso porque o fígado expressa a enzima metiltransferase responsável por esta reação química (Stýblo et al., 2021). No entanto, estudos atuais têm mostrado que a metilação do arsênio pode aumentar a toxicidade deste metaloide no organismo ao invés de reduzi-la (Zheng et al., 2014). Já o níquel, após ser absorvido pelo intestino, pode ser transportado no sangue para o fígado e outros órgãos, ligado à albumina, acumulando nos tecidos por meio da ligação a metaloproteínas (Yang et al., 2021). Existe uma controvérsia com relação ao papel do níquel no organismo de mamíferos. A essencialidade do níquel parece existir em organismos como plantas, bactérias e invertebrados, mas não há relatos de que sua

deficiência cause síndromes em humanos ou que inative proteínas, ao atuar como cofator enzimático (Tokar et al., 2013).

A presença de metais não biodegradáveis pode causar um comprometimento das funções hepáticas, principalmente quando em altas concentrações (Klaassen e Watkins, 2012). Os mecanismos de ação de metais tóxicos como arsênio e níquel nos sistemas biológicos geralmente envolvem desencadeamento do estresse oxidativo, inativação de enzimas e desconfiguração estrutural de proteínas e competição com elementos essenciais por sítios de ligação (Tokar et al., 2013; Machado-Neves, 2021). No presente estudo, porém, pode-se sugerir que o comprometimento hepático é inicial, ao considerar que não foram encontradas alterações significativas dos pesos absoluto e relativo do fígado. Vale lembrar que esses animais também não apresentaram alterações no peso corporal quando receberam simultaneamente arsênio e níquel. Essa não alteração no índice hepatossomático, mesmo com aumento da proporção de fibras colágenas, pode ser em decorrência da presença de degeneração hidrópica. O índice hepatossomático é um bom indicativo da saúde do órgão (Singh et al., 2015). Tal índice esteve diminuído nos animais que receberam apenas níquel, o que reflete a tendência à diminuição do peso do órgão não acompanhando a tendência ao aumento do peso corporal, ou seja, uma menor representatividade hepática no organismo, o que poderia repercutir na sua menor funcionalidade.

Embora não apresentassem alterações biométricas, animais que ingeriram simultaneamente arsênio e níquel apresentaram alterações histológicas e estereológicas no fígado. O aumento observado na proporção dos capilares sinusoides, por exemplo, se refletiu na ocorrência de dilatação do lúmen sinusoidal. Ainda, a exposição simultânea aos dois metais reduziu o percentual de citoplasma dos hepatócitos que, conseqüentemente, pode ter influenciado na redução do percentual deste tipo celular em ratos intoxicados e proporcionou espaço para o aumento da proporção de capilares sinusoides. Este achado é relevante, uma vez

que os capilares desempenham um papel fundamental no fornecimento de fluxo sanguíneo para hepatócitos, principalmente durante a regeneração hepática (Souza et al., 2018). Além disso, o aumento da proporção de vasos sanguíneos observado pode ser consequência da ocorrência de congestão, que está associada à proeminência da veia central (Alvarez et al., 2011). Esses distúrbios vasculares podem ser responsáveis pela presença de infiltrado inflamatório associado à congestão vascular, aumento da proporção sinusoidal e elevado número de mastócitos (Marzano et al., 2015; Souza et al., 2018). Ainda com relação às respostas vasculares, observamos aumento nos níveis de NO. A NO sintase catalisa a produção de NO, que serve como molécula mensageira para processos fisiológicos, como vasodilatação (Ahmad et al., 2018). Apesar de não terem sido observadas alterações significativas no conteúdo de água no fígado de ratos expostos simultaneamente ao arsênio e níquel, observou-se a ocorrência de degeneração hidrópica, o que pode indicar comprometimento no sistema de transporte da membrana celular com excesso de água dentro das células (Susilo et al., 2019).

Alterações histológicas e estereológicas também ocorreram nos animais expostos aos metais isoladamente, porém geralmente de forma menos expressiva, a exemplo da diminuição do percentual de hepatócitos. Os animais que ingeriram somente arsênio apresentaram alterações histológicas no fígado, como congestão, infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica. Dentre os compostos inorgânicos de arsênio, o arsenito é considerado o mais tóxico por ter uma forte afinidade aos grupos tiois presentes em ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, inibindo a atividade de enzimas como GST, e promovendo estresse oxidativo (Neves et al., 2004; Hirano, 2020; Machado-Neves, 2021). Alguns estudos reportaram efeitos deletérios do arsênio sobre parâmetros hepáticos, após ingestão do arsênio na concentração de 10 mg L⁻¹ (Souza et al., 2018) e 3,2 mg L⁻¹ (Santra et al., 2000). Apesar da sua alta toxicidade, a concentração de 1 mg L⁻¹ não resultou em alterações significativas na maioria dos parâmetros aqui avaliados, como observado em órgãos reprodutores masculinos de animais pré-puberes

(Couto-Santos et al., 2020) e coração (Souza et al., 2020). Os animais que receberam somente níquel também apresentaram alterações histopatológicas como a presença de congestão, infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica, além de aumento na proporção de mastócitos e desbalanço nas atividades antioxidante e enzimática.

Nossos resultados indicaram aumento da porcentagem de glicogênio, colágeno e tecido conjuntivo em animais do grupo arsênio+níquel. Segundo Rogers et al. (2002), o acúmulo intracelular de glicogênio hepático pode ser um sinal de hepatotoxicidade ou perturbação no metabolismo de carboidratos. Já o acúmulo de colágeno margeando vasos e capilares pode ser uma característica importante da resposta hepática a lesões infecciosas, tóxicas ou metabólicas (Friedman, 1990). O acúmulo dos metais no órgão pode induzir uma deposição inicial de colágeno, mesmo que não haja aumento no peso do órgão. Já o aumento da porcentagem de tecido conjuntivo ao redor de veias, antecedido de processo apoptótico, pode estar relacionado à fibrose, caracterizada especialmente pela deposição de colágeno do tipo I (Rauterberg et al., 1981). Evidências clínicas de fibrose devido ao consumo de arsênio foram relatadas anteriormente por Datta et al. (1979) e Guha Mazumder et al. (1988). Já estudos como o de Chang et al. (2016) observaram fibrose em decorrência da exposição à compostos de níquel, devido a relação entre cloreto de níquel e a supressão de prolidase, uma enzima que participa da degradação de colágeno. Como consequência, ocorre um aumento da incorporação de prolina, aminoácido relacionado à formação de colágeno (Miltyk et al., 2005). O aumento de fibras de colágeno pode dificultar a remodelação vascular, o que pode resultar em problemas na comunicação entre os componentes do parênquima e prejuízos à função do órgão (Mouro et al., 2019). Já a análise bioquímica do soro de animais intoxicados isolada ou simultaneamente pelos dois metais não mostrou alterações nas concentrações das transaminases ALT, AST e ALP. As transaminases são enzimas presentes nas células do organismo, inclusive nos hepatócitos. Quando as células que contêm essas enzimas sofrem algum dano em sua membrana

plasmática, há alteração na permeabilidade celular com liberação dessas enzimas no sangue, aumentando suas concentrações neste local (Reagan et al., 2012). Por isso, a mensuração dos níveis de transaminases hepáticas em estudos toxicológicos serve como um indicativo de lesão hepatocelular (Novaes et al., 2012; Souza et al., 2018). Assim sendo, podemos sugerir que a exposição ao arsênio e níquel não causou dano expressivo nos hepatócitos a ponto de alterar os níveis das transaminases.

Apesar de não haver indicativo de dano de membrana, nossos resultados mostraram uma diminuição na atividade de ATPase total em animais coexpostos aos dois metais. A diminuição da atividade de ATPase total pode estar relacionada à ligação dos metais diretamente à estrutura das enzimas, inativando-as. As ATPases ligadas à membrana têm papel relevante no equilíbrio osmótico, regulação iônica e permeabilidade das membranas. A manutenção das concentrações dos íons e da osmolaridade dos fluidos extracelulares são funções vitais do sistema de osmorregulação (Dogan et al., 2015; Atli et al., 2019). Assim, os possíveis fatores atrelados a essa diminuição na atividade de ATPases incluem disfunção na osmorregulação e perturbação da homeostase hidroeletrolítica, os quais também podem ter relação com a degeneração hidrópica observada nos animais coexpostos aos metais. Essa alteração nas ATPases pode ter ocasionado disfunção na distribuição de água nos compartimentos intra e extra celulares, causando degeneração hidrópica mesmo sem a observação de edema.

Além disso, animais coexpostos ao arsênio e níquel, como também aqueles expostos somente ao níquel, apresentaram redução na atividade da enzima antioxidante CAT. Considerando que não houve diferença estatística nesses animais quanto a atividade de SOD, podemos inferir que esta enzima conseguiu converter O_2^- em H_2O_2 , e esse H_2O_2 disponível pode ter forçado uma maior atividade de CAT, uma vez que ela age convertendo H_2O_2 em água e O_2 , protegendo a célula contra os danos oxidativos gerados por H_2O_2 (Bisht et al., 2017). Porém, o estímulo à atividade das enzimas chegou a um nível de exaustão, com consequente queda de

sua atividade. Sabe-se que tanto arsênio quanto níquel produzem um ambiente oxidativo nos tecidos em que são retidos (Pari et al., 2008; Wang et al., 2016), e apresentam correlação com marcadores de estresse oxidativo e alterações na morfologia hepática (Novaes et al., 2012; Cupertino et al., 2013). Essa redução da atividade de CAT pode ter permitido uma maior disponibilidade do H_2O_2 para agir sobre as proteínas celulares e consequentemente produzir PC, que são produtos da oxidação de proteínas (Dalle-Donne et al., 2003). A oxidação de proteínas resulta em proteínas modificadas e seu acúmulo leva a alterações da função celular (Georgescu et al., 2018). Levine (1990) relacionou o aumento nos níveis de PC ao aumento do estresse oxidativo, sendo a determinação desses biomarcadores uma abordagem para avaliação dos danos de radicais livres e EROs. Aumento dos níveis de PC e redução na atividade da CAT foram no presente trabalho nos animais expostos ao níquel. O estresse oxidativo causado pelo níquel pode inibir as respostas dos sistemas antioxidantes, suprimindo atividades de enzimas antioxidantes como a CAT (Misra et al., 1990; Rodriguez et al., 1990) e glutathione redutase (Misra et al., 1990; Cartañá et al., 1992), como observado neste estudo. Enquanto os níveis de PC estiveram alto no grupo exposto ao níquel, os níveis de NO estiveram alto no grupo coexposto ao níquel e arsênio, revelando um estresse nitrosativo. O NO em condições normais atua como regulador necessário para resposta imune e mediador funcional, porém, em níveis elevados é potencialmente tóxico, sendo um importante marcador para o estresse nitrosativo (Dusse et al., 2003; Pierini e Bryan, 2015). Por outro lado, não foi observada significativa ocorrência de peroxidação lipídica, dado que as concentrações de MDA não foram alteradas, o que suporta a hipótese de que não houve lesão de membrana relacionada à peroxidação lipídica em hepatócitos que pudesse promover a liberação de enzimas transaminases no sangue (Novaes et al., 2012a,b). Assim, podemos inferir que o processo lesivo é relacionado à outra via celular, que não inclui via relacionada à metabolização lipídica ou à síntese proteica.

Os resultados do estresse oxidativo podem estar atrelados aos resultados de atividade das bombas de membrana. A atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ é altamente suscetível aos radicais livres e à peroxidação lipídica da membrana (Mishra et al., 1989). Assim, inferimos que a manutenção dos níveis de atividade de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ observada pode ter relação com a também manutenção dos níveis de MDA, não havendo danos significativos na membrana lipídica. Da mesma forma, a atividade de outras ATPases também não se alterou. Quanto à $\text{Mg}^{2+}\text{ATPase}$ e $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$, estudos anteriores mostraram que são menos sensíveis (Canli et al., 2017; Canli et al., 2019; Carvalho et al., 2020).

7. Conclusão

Os resultados revelaram que a coexposição ao arsênio e níquel na água de beber, nas concentrações testadas, causou modificações histológicas no fígado de ratos Wistar adultos, como redução na proporção de hepatócitos e aumento no percentual de capilares sinusoides e vasos sanguíneos, ocorrência de congestão, degeneração hidrópica e infiltrados inflamatórios. Além disso, o desafio da coexposição resultou em bioacumulação dos metais, com comprometimento da atividade antioxidante, bem como da osmorregulação de bombas de membrana plasmática (ATPases). Todavia, apesar do comprometimento histológico do parênquima, não houve alterações nas concentrações séricas de transaminases e no peso do órgão, indicando que apesar destas alterações observadas, a coexposição subcrônica a estas concentrações de arsênio e níquel não são capazes de afetar totalmente a função do órgão.

8. Referências

Adedara, I. A., Abiola, M. A., Adegbosin, A. N., Odunewu, A. A., & Farombi, E. O. (2019).

Impact of binary waterborne mixtures of nickel and zinc on hypothalamic-pituitary-

- testicular axis in rats. *Chemosphere*, 237, 124501. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124501>
- Adedara, I. A., Adegbosin, A. N., Abiola, M. A., Odunewu, A. A., Owoeye, O., Owumi, S. E., & Farombi, E. O. (2020). Neurobehavioural and biochemical responses associated with exposure to binary waterborne mixtures of zinc and nickel in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 73, 103294. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103294>
- Aebi, H., 1984. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. Doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- Agius L. (2015). Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Molecular aspects of medicine*, 46, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.09.002>
- Ahmad, A., Dempsey, S. K., Daneva, Z., Azam, M., Li, N., Li, P. L., & Ritter, J. K. (2018). Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2605. <https://doi.org/10.3390/ijms19092605>
- Alvarez, A. M., & Mukherjee, D. (2011). Liver abnormalities in cardiac diseases and heart failure. *The International journal of angiology: official publication of the International College of Angiology, Inc*, 20(3), 135–142. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1284434>
- Atli, O., Kilic, V., Baysal, M., Kilic, G., Gormus, G., Ucarcan, S., Korkut, B., & Ilgin, S. (2019). Assessment of trazodone-induced cardiotoxicity after repeated doses in rats. *Human & experimental toxicology*, 38(1), 45–55. <https://doi.org/10.1177/0960327118769717>
- Azevedo, F. A. D., & Chasin, A. A. da M. (2003). Metais - Gerenciamento da Toxicidade (1st ed., Vol. 1). *Atheneu*.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição*, 23, 629-643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.

- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, & M., Dada, R., (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 14(8), 470–485. Doi:10.1038/nrurol.2017.69
- Bonting, S. L., Caravaggio, L. L., & Hawkins, N. M. (1962). Studies on sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase. IV. Correlation with cation transport sensitive to cardiac glycosides. *Archives of biochemistry and biophysics*, 98, 413–419. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(62\)90206-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(62)90206-0)
- Borges, L. F., Gutierrez, P. S., Marana, H. R., & Taboga, S. R. (2007). Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 38(6), 580–583. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.10.005>
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brasileiro Filho, G (2016) Bogliolo Patologia Geral. 9ª edição. Rio de Janeiro - RJ: *Guanabara Koogan*.
- Buege, J. A., Aust, S. D., (1978). Biomembranes - Part C: Biological Oxidations. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310.
- Canli E.G., & Canli, M. (2017), Effects of aluminum, copper, and titanium nanoparticles on some blood parameters in Wistar rats, *Turkish Journal of Zoology*. 41(2) 259–266. <http://dx.doi.org/10.3906/zoo-1512-23>
- Canli, E. G., Ila, H. B., & Canli, M. (2019). Responses of biomarkers belonging to different metabolic systems of rats following oral administration of aluminium nanoparticle. *Environmental toxicology and pharmacology*, 69, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.04.002>

- Caputo, L. F. G., Gitirana, L. De B., Manso, & P. P. De A. (2010). Técnicas Histológicas. In: Molinaro, E., Caputo, L., Amendoeira, R. (Org.). Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: *EPSJV*; p. 89-188.
- Cartañà, J., Romeu, A., & Arola, L. (1992). Effects of copper, cadmium and nickel on liver and kidney glutathione redox cycle of rats (*Rattus sp.*). *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 101(2), 209–213. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(92\)90262-6](https://doi.org/10.1016/0742-8413(92)90262-6)
- Carvalho, R. P. R., Ribeiro, F. C. D., Lima, T. I., Ervilha, L. O. G., de Oliveira, E. L., de Oliveira Faustino, A., Lima, G & Machado-Neves, M. (2022). High doses of eugenol cause structural and functional damage to the rat liver. *Life Sciences*, 120696. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120696>
- Chandramathi, S., Suresh, K. G., Anita, Z. B., & Kuppusamy, U. R. (2009). Attenuation of hydrogen peroxide and ferric reducing/antioxidant power serum levels in colorectal cancer patients with intestinal parasitic infection. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 16(2), 15–20.
- Chang, W., Lee, J. M., Yoon, J. H., Han, J. K., Choi, B. I., Yoon, J. H., Lee, K. B., Lee, K. W., Yi, N. J., & Suh, K. S. (2016). Liver Fibrosis Staging with MR Elastography: Comparison of Diagnostic Performance between Patients with Chronic Hepatitis B and Those with Other Etiologic Causes. *Radiology*, 280(1), 88–97. <https://doi.org/10.1148/radiol.2016150397>
- Chiou, T.J.; Chu, S.T.; Tzeng, W.F.; Huang, Y.C.; Liao, C.J. (2008). Arsenic Trioxide Impairs Spermatogenesis via Reducing Gene Expression Levels in Testosterone Synthesis Pathway. *Chemical Research in Toxicology*, 21(8), 1562–1569. doi:10.1021/tx700366x
- Chowdhury, R., Ramond, A., O'Keeffe, L. M., Shahzad, S., Kunutsor, S. K., Muka, T., Gregson, J., Willeit, P., Warnakula, S., Khan, H., Chowdhury, S., Gobin, R., Franco, O. H., & Di

- Angelantonio, E. (2018). Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 362, k3310. <https://doi.org/10.1136/bmj.k3310>
- Ciurli, S., & Mangani, S. (2001). Nickel-containing Enzymes. In: Handbook of Metalloproteins, pp. 669-708 Eds: Ivano Bertini, Astrid Sigel, Helmut Sigel Marcel Dekker.
- Cline, G. W., Rothman, D. L., Magnusson, I., Katz, L. D., & Shulman, G. I. (1994). ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of hepatic glucose metabolism in normal subjects and subjects with insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation*, 94(6), 2369-2376.
- Couto-Santos, F., Souza, A., Bastos, D., Ervilha, L., Dias, F., Araújo, L. S., Guimarães, S., Oliveira, L. L., & Machado-Neves, M. (2020). Prepubertal exposure to arsenic alters male reproductive parameters in pubertal and adult rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 409, 115304. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115304>
- Cullen JM, Stalker MJ. (2016). Liver and Biliary System. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2. 258–352.e1. doi: 10.1016/B978-0-7020-5318-4.00008-5.
- Cupertino, M. C., Costa, K. L., Santos, D. C., Novaes, R. D., Condessa, S. S., Neves, A. C., Oliveira, J. A., & Matta, S. L. (2013). Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. *International journal of experimental pathology*, 94(5), 343–351. <https://doi.org/10.1111/iep.12046>
- da Cunha de Medeiros, P., Samelo, R. R., Silva, A., da Silva Araujo Santiago, M., Duarte, F. A., de Castro, Í. B., & Perobelli, J. E. (2019). Prepubertal exposure to low doses of sodium

- arsenite impairs spermatogenesis and epididymal histophysiology in rats. *Environmental toxicology*, 34(1), 83–91. <https://doi.org/10.1002/tox.22660>
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2003). *Protein carbonylation in human diseases. Trends in Molecular Medicine*, 9(4), 169–176. doi:10.1016/s1471-4914(03)00031-5
- Das, K. K., Das, S. N., & Dhundasi, S. A. (2008). Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *The Indian journal of medical research*, 128(4), 412–425.
- Datta, D. V., Mitra, S. K., Chhuttani, P. N., & Chakravarti, R. N. (1979). Chronic oral arsenic intoxication as a possible aetiological factor in idiopathic portal hypertension (non-cirrhotic portal fibrosis) in India. *Gut*, 20(5), 378–384. <https://doi.org/10.1136/gut.20.5.378>
- Denkhaus, E., & Salnikow, K. (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical reviews in oncology/hematology*, 42(1), 35–56. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(01\)00214-1](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(01)00214-1)
- Destro, A. L. F., Silva, S. B., Gregorio, K. P., de Oliveira, J. M., Lozi, A. A., Zuanon, J. A. S., ... & Freitas, M. B. (2021). Effects of subchronic exposure to environmentally relevant concentrations of the herbicide atrazine in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111601. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111601>
- Dieterich, S., Bieligk, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., & Prestle, J. (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, 101(1), 33–39. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.1.33>
- Dogan, S., Schwedhelm, E. R., Heindl, H., Mancl, L., & Raigrodski, A. J. (2015). Clinical efficacy of polyvinyl siloxane impression materials using the one-step two-viscosity

- impression technique. *The Journal of prosthetic dentistry*, 114(2), 217–222.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2015.03.019>
- Driessnack, M. K., Jamwal, A., & Niyogi, S. (2017). Effects of chronic exposure to waterborne copper and nickel in binary mixture on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Chemosphere*, 185, 964–974.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.100>
- Dusse, L. M. S. A., Vieira, L. M., & Carvalho, M. D. G. (2003). Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial*, 39, 343-350.
- Evans D. J., Jr (1969). Membrane adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*: activation by calcium ion and inhibition by monovalent cations. *Journal of bacteriology*, 100(2), 914–922. <https://doi.org/10.1128/jb.100.2.914-922.1969>
- Ferreira, A. L. A., & Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da associação médica brasileira*, 43, 61-68. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>.
- Ferreira, M., Matos, R. C., Oliveira, H., Nunes, B., & Pereira, M. (2012). Impairment of mice spermatogenesis by sodium arsenite. *Human & experimental toxicology*, 31(3), 290–302.
<https://doi.org/10.1177/0960327111405862>
- Figueiredo B.R, Borba R.P., Angélica R.S., (2007) Arsenic occurrence in Brazil and human exposure, *Environ. Geochem. Health* 29 109–118, <https://doi.org/10.1007/s10653-006-9074-9>.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH protocols*, 2008, pdb.prot4986.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>.
- Friedman S. L. (1990). Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. *Seminars in liver disease*, 10(1), 20–29. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1040454>

- Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2020). Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *International journal of environmental research and public health*, 17(3), 679. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>
- Georgescu, S. R., Mitran, C. I., Mitran, M. I., Caruntu, C., Sarbu, M. I., Matei, C., Nicolae, I., Tocut, S. M., Popa, M. I., & Tampa, M. (2018). New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress. *Journal of immunology research*, 2018, 5315816. <https://doi.org/10.1155/2018/5315816>
- Goldhaber S. B. (2003). Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 38(2), 232–242. [https://doi.org/10.1016/s0273-2300\(02\)00020-x](https://doi.org/10.1016/s0273-2300(02)00020-x)
- Gonçalves, R. V., Novaes, R. D., Leite, J. P., Vilela, E. F., Cupertino, M. C., Nunes, L. G., & Matta, S. L. (2012). Hepatoprotective effect of *Bathysa cuspidata* in a murine model of severe toxic liver injury. *International journal of experimental pathology*, 93(5), 370–376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2012.00835.x>
- Gonzalez, K. R. (2016). Toxicologia do níquel. *Revista Intertox De Toxicologia, Risco Ambiental E Sociedade*, 9(2). <https://doi.org/10.22280/revintervol9ed2.242>
- Green, K., Brand, M. D., & Murphy, M. P. (2004). Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, 53 (suppl_1), S110-S118. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S110>.
- Guha Mazumder, D. N., Chakraborty, A. K., Ghose, A., Gupta, J. D., Chakraborty, D. P., Dey, S. B., & Chattopadhyay, N. (1988). Chronic arsenic toxicity from drinking tubewell water in rural West Bengal. *Bulletin of the World Health Organization*, 66(4), 499–506.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-Transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7140.

- Hauck, A. K., Zhou, T., Hahn, W., Petegrosso, R., Kuang, R., Chen, Y., & Bernlohr, D. A. (2018). Obesity-induced protein carbonylation in murine adipose tissue regulates the DNA-binding domain of nuclear zinc finger proteins. *The Journal of biological chemistry*, 293(35), 13464–13476. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003469>
- Hermes-Lima, M., (2004) Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Storey, K.B., Ed., Functional Metabolism: Regulation and Adaptation, John Wiley & Sons, Inc., *Hoboken*, 319-368.
- Hirano S. (2020). Biotransformation of arsenic and toxicological implication of arsenic metabolites. *Archives of toxicology*, 94(8), 2587–2601. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02772-9>
- Hjertén, S., & Pan, H. (1983). Purification and characterization of two forms of a low-affinity Ca²⁺-ATPase from erythrocyte membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 728(2), 281–288. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90480-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90480-7)
- Ibrahim, D., Froberg, B., Wolf, A., & Rusyniak, D. E. (2006). Heavy metal poisoning: clinical presentations and pathophysiology. *Clinics in laboratory medicine*, 26(1), 67–viii. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2006.02.003>
- Iezzoni J. C. (2018). Diagnostic histochemistry in hepatic pathology. *Seminars in diagnostic pathology*, 35(6), 381–389. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2018.10.003>
- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of applied toxicology: JAT*, 31(2), 95–107. <https://doi.org/10.1002/jat.1649>
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2017) Histologia básica. 13^a edição. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan.

- Kang, M. Y.; Lim, C. S.; Kim, H. S.; Seo, E. W.; Kim, H. M.; Kwon, O.; Cho, B. R. (2012). Detection of Nickel in Fish Organs with a Two-Photon Fluorescent Probe. *Chemistry - A European Journal*, 18(7), 1953–1960. doi:10.1002/chem.201103191
- Khan, U. A., Kujala, K., Nieminen, S. P., Räisänen, M. L., & Ronkanen, A. K. (2019). Arsenic, antimony, and nickel leaching from northern peatlands treating mining influenced water in cold climate. *The Science of the total environment*, 657, 1161–1172. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.455>
- Klaassen C. D., Watkins, J. B. (2012). *Fundamento em toxicologia de Casarett e Doull*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed.
- Kobayashi, Y., Cui, X., & Hirano, S. (2005). Stability of arsenic metabolites, arsenic triglutathione [As(GS)3] and methylarsenic diglutathione [CH3As(GS)2], in rat bile. *Toxicology*, 211(1-2), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.03.001>
- Kong, L., Gao, X., Zhu, J., Cheng, K., & Tang, M. (2016). Mechanisms involved in reproductive toxicity caused by nickel nanoparticle in female rats. *Environmental toxicology*, 31(11), 1674–1683. <https://doi.org/10.1002/tox.22288>
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., & Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*, 186, 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h).
- Li, Y.; Wang, M.; Piao, F.; Wang, X. (2012). Subchronic Exposure to Arsenic Inhibits Spermatogenesis and Downregulates the Expression of Ddx3y in Testis and Epididymis of Mice. *Toxicological Sciences*, 128(2), 482–489. doi:10.1093/toxsci/kfs169.
- Li, Z., Xu, Y., Huang, Z., Wei, Y., Hou, J., Long, T., Wang, F., Hu, H., Duan, Y., Guo, H., Zhang, X., Chen, X., Yuan, H., Wu, T., Shen, M., & He, M. (2019). Association between exposure to arsenic, nickel, cadmium, selenium, and zinc and fasting blood glucose

- levels. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 255(Pt 2), 113325.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113325>
- Liu, J., Xu, M. Y., Wu, J., Zhang, H., Yang, L., Lun, D. X., ... & Liu, B. (2021). Picrosirius-Polarization Method for Collagen Fiber Detection in Tendons: A Mini-Review. *Orthopaedic Surgery*, 13(3), 701-707. <https://doi.org/10.1111/os.12627>
- Machado-Neves, M. (2021). Effect of heavy metals on epididymal morphology and function: An integrative review. *Chemosphere*, 133020.
- Mandal, B. K., & Suzuki, K. T. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58(1), 201-235.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia brasileira de Ciências*, 75, 469-486.
- Marzano, C., Cazals-Hatem, D., Rautou, P. E., & Valla, D. C. (2015). The significance of nonobstructive sinusoidal dilatation of the liver: Impaired portal perfusion or inflammatory reaction syndrome. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 62(3), 956–963.
<https://doi.org/10.1002/hep.27747>
- McGregor, D. B., Baan, R. A., Partensky, C., Rice, J. M., & Wilbourn, J. D. (2000). Evaluation of the carcinogenic risks to humans associated with surgical implants and other foreign bodies - a report of an IARC Monographs Programme Meeting. International Agency for Research on Cancer. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 36(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(99\)00312-3](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(99)00312-3)
- Miltyk, W., & Palka, J. (2005). Acetylsalicylic acid prevents nickel-induced collagen biosynthesis in human fibroblasts. *Environmental toxicology and pharmacology*, 20(3), 501–505. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2005.06.003>
- Mishra, O. P., Delivoria-Papadopoulos, M., Cahillane, G., & Wagerle, L. C. (1989). Lipid peroxidation as the mechanism of modification of the affinity of the Na⁺, K⁺-ATPase

- active sites for ATP, K⁺, Na⁺, and strophanthidin in vitro. *Neurochemical research*, 14(9), 845–851. <https://doi.org/10.1007/BF00964813>
- Misra, M., Rodriguez, R. E., & Kasprzak, K. S. (1990). Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology*, 64(1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(90\)90095-x](https://doi.org/10.1016/0300-483x(90)90095-x)
- Mohammed Abdul K.S., Jayasinghe S.S., E.P.S. Chandana E.P.S., Jayasumana C., De Silva P.M.C.S., (2015). Arsenic and human health effects: a review, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 828–846, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.09.016>.
- Montes, G. S., & Junqueira, L. C. U. (1991). The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86, 1-11. 10.1590/s0074-02761991000700002
- Mouro, V., Martins, A., Silva, J., Menezes, T. P., Gomes, M., Oliveira, J. A., Melo, F., & Matta, S. (2019). Subacute Testicular Toxicity to Cadmium Exposure Intraperitoneally and Orally. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 3429635. <https://doi.org/10.1155/2019/3429635>
- Mukherjee, A., Sengupta, M. K., Hossain, M. A., Ahamed, S., Das, B., Nayak, B., Lodh, D., Rahman, M. M., & Chakraborti, D. (2006). Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario. *Journal of health, population, and nutrition*, 24(2), 142–163.
- Muñoz, A., & Costa, M. (2012). Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: a review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 260(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.014>
- Neves, R. N. P., Carvalho, F., Carvalho, M., Fernandes, E., Soares, E., de Bastos, M. L., & de Pereira, M. L. (2004). Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium

arsenite acute toxicity in mice. *Toxicologic pathology*, 32(5), 527–535.

<https://doi.org/10.1080/01926230490502566>

Nielsen F.H., Shuler T.R., Mclead T.G., Zimmerman T.J. (2001). Nickel influences iron metabolism through physiologic, pharamacologic and toxicologic mechanisms in rats, *J. Nutr.* 14 (2001) 1280–1288.

Noman, A.S.M.; Dilruba, S.; Mohanto, N.C.; Rahman, L.; Khatun, Z.; Riad, W.; Mamun, A.A.; Alam, S.; Aktar, S.; Chowdhury, S.; Saud, Z.A.; Rahman, Z.; Haque, A. (2015). Alterações histológicas induzidas por arsênico em vários órgãos de camundongos. *Jornal de citologia e histologia* , 6 (3).

Novaes, R. D., Gonçalves, R. V., Marques, D. C., Cupertino, M., Peluzio, M., Leite, J. P., & Maldonado, I. R. (2012). Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. *Toxicologic pathology*, 40(1), 62–70. <https://doi.org/10.1177/0192623311425059>.

Ohnishi, T., Suzuki, T., Suzuki, Y., & Ozawa, K. (1982). A comparative study of plasma membrane Mg^{2+} -ATPase activities in normal, regenerating and malignant cells. *Biochimica et biophysica acta*, 684(1), 67–74. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(82\)90050-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(82)90050-5)

Orloff, K., Mistry, K., & Metcalf, S. (2009). Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 12(7), 509–524. <https://doi.org/10.1080/10937400903358934>

Pari, L., & Prasath, A. (2008). Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Chemico-biological interactions*, 173(2), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.02.010>

Persson, E., Madsen, J. J., & Olsen, O. H. (2014). The length of the linker between the epidermal growth factor-like domains in factor VIIa is critical for a productive interaction

- with tissue factor. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 23(12), 1717–1727. <https://doi.org/10.1002/pro.2553>
- Pierini, D., & Bryan, N. S. (2015). Nitric oxide availability as a marker of oxidative stress. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress III* (pp. 63-71). Humana Press, New York, NY.
- Prueitt RL, Li W, Chang YC, Boffetta P, Goodman JE. (2020). Systematic review of the potential respiratory carcinogenicity of metallic nickel in humans. *Crit Rev Toxicol*. Aug;50(7):605-639. doi: 10.1080/10408444.2020.1803792.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014, 761264. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Ratnaike R. N. (2003). Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgraduate medical journal*, 79(933), 391–396. <https://doi.org/10.1136/pmj.79.933.391>
- Rauterberg, J., Voss, B., Pott, G., & Gerlach, U. (1981). Connective tissue components of the normal and fibrotic liver. I. Structure, local distribution and metabolism of connective tissue components in the normal liver and changes in chronic liver diseases. *Klinische Wochenschrift*, 59(14), 767–779. <https://doi.org/10.1007/BF01724682>
- Reagan, W. J., York, M., Berridge, B., Schultze, E., Walker, D., & Pettit, S. (2013). Comparison of cardiac troponin I and T, including the evaluation of an ultrasensitive assay, as indicators of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicologic pathology*, 41(8), 1146–1158. <https://doi.org/10.1177/0192623313482056>
- Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. (2018). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem*. Jan;119(1):157-184. doi: 10.1002/jcb.26234.

- Roach, P. J., Skurat, A. V. & Harris, R. A. (2001) in *The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism*, eds. Cherrington, A. D. & Jefferson, L. S. (Oxford Univ. Press, New York), pp. 609–647.
- Rodriguez, R. E., Misra, M., North, S. L., & Kasprzak, K. S. (1991). Nickel-induced lipid peroxidation in the liver of different strains of mice and its relation to nickel effects on antioxidant systems. *Toxicology letters*, 57(3), 269–281. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(91\)90201-g](https://doi.org/10.1016/0378-4274(91)90201-g)
- Rogers, V. V., Wickstrom, M., Liber, K., & MacKinnon, M. D. (2002). Acute and subchronic mammalian toxicity of naphthenic acids from oil sands tailings. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 66(2), 347–355. <https://doi.org/10.1093/toxsci/66.2.347>
- Rosa, D. F., Sarandy, M. M., Novaes, R. D., Freitas, M. B., do Carmo Gouveia Pelúzio, M., & Gonçalves, R. V. (2018). High-fat diet and alcohol intake promotes inflammation and impairs skin wound healing in Wistar rats. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2018/4658583>
- Ross, M., & Pawlina, W. (2016) Ross | Histologia - Texto e Atlas - Correlações com Biologia Celular e Molecular, 7ª edição. *Guanabara Koogan*.
- Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Charkaborty SK, Mazumder DN. (2000). Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol Clin Toxicol*. 38(4):395-405. doi: 10.1081/clt-100100949.
- Schneider, C. D., & Oliveira, A. R. D. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 10, 308-313.. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922004000400008>.
- Seilkop, S. K., & Oller, A. R. (2003). Respiratory cancer risks associated with low-level nickel exposure: an integrated assessment based on animal, epidemiological, and mechanistic

- data. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 37(2), 173–190.
[https://doi.org/10.1016/s0273-2300\(02\)00029-6](https://doi.org/10.1016/s0273-2300(02)00029-6)
- Shami, N. J. I. E., & Moreira, E. A. M. (2004). Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, 17, 227-236. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732004000200009>.
- Silverman, S., Jr, Migliorati, C., & Barbosa, J. (1984). Toluidine blue staining in the detection of oral precancerous and malignant lesions. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, 57(4), 379–382. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(84\)90154-3](https://doi.org/10.1016/0030-4220(84)90154-3)
- Singh AP, Goel RK, Kaur T. (2011). Mechanisms pertaining to arsenic toxicity. *Toxicol Int.* Jul;18(2):87-93. doi: 10.4103/0971-6580.84258.
- Singh, S., Khera, R., Allen, A. M., Murad, M. H., & Loomba, R. (2015). Comparative effectiveness of pharmacological interventions for nonalcoholic steatohepatitis: A systematic review and network meta-analysis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 62(5), 1417–1432. <https://doi.org/10.1002/hep.27999>
- Si-Tayeb, K.; Lemaigre, F. P.; Duncan, S. A. (2010). Organogenesis and Development of the Liver. *Developmental Cell*, 18(2), 175–189. doi:10.1016/j.devcel.2010.01.011
- Snyder, S. H., & Bredt, D. S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, 266(5), 68-77. doi: 10.1038/scientificamerican0592-68.
- Souza, A. C. F., Bastos, D. S. S., Santos, F. C., Sertorio, M. N., Ervilha, L. O. G., Gonçalves, R. V., de Oliveira, L. L., & Machado-Neves, M. (2018). Arsenic aggravates oxidative stress causing hepatic alterations and inflammation in diabetic rats. *Life sciences*, 209, 472–480. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.054>
- Souza, A. C. F., Marchesi, S. C., Ferraz, R. P., Lima, G. D., de Oliveira, J. A., & Machado-Neves, M. (2016). Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 79(6), 274–286. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1150926>

- Souza, A. C. F., Marchesi, S. C., Lima, G. D., Ferraz, R. P., Santos, F. C., da Matta, S., & Machado-Neves, M. (2016). Effects of Sodium Arsenite and Arsenate in Testicular Histomorphometry and Antioxidants Enzymes Activities in Rats. *Biological trace element research*, 171(2), 354–362. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0523-0>
- Souza, A., de Paiva Coimbra, J. L., Ervilha, L., Bastos, D., Cossolin, J., Santos, E. C., de Oliveira, L. L., & Machado-Neves, M. (2020). Arsenic induces dose-dependent structural and ultrastructural pathological remodeling in the heart of Wistar rats. *Life sciences*, 257, 118132. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118132>
- Stannard, L., Doak, S. H., Doherty, A., & Jenkins, G. J. (2017). Is Nickel Chloride really a Non-Genotoxic Carcinogen. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 121 Suppl 3, 10–15. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12689>
- Stýblo, M., Venkatratnam, F., R.C., Thomas, D.J., (2021). Origins, fate, and actions of methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic: progress and prospects. *Arch. Toxicol.* 95 (5), 1547–1572.
- Susilo, R., Winarni, D., Husen, S. A., Hayaza, S., Punnapayak, H., Wahyuningsih, S., Sajidah, E. S., & Darmanto, W. (2019). Hepatoprotective effect of crude polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Veterinary world*, 12(12), 1987–1991. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1987-1991>
- Tokar, E.J., Boyd, W.A., Freedman, J.H., Waalkes, M.P., (2013). Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. (Ed.), Cassarett and Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons, eighth ed. McGraw Hill, New York (Chapter 23).
- Tsikas D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of

- research. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 851(1-2), 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>
- USEPA, (2000). Arsenic Occurrence in Public Drinking Water Supplies. <http://www.epa.gov/OGWDW/arsenic/pdfs/occurrence.pdf> EPA-815-R-00-023
- Vormittag, E., Saldiva, P., Anastacio, A., & Barbosa, F., Jr (2021). High levels of metals/metalloids in blood and urine of residents living in the area affected by the dam failing in Barra Longa, District, Brazil: A preliminary human biomonitoring study. *Environmental toxicology and pharmacology*, 83, 103566. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103566>
- Wang, Y. X., Feng, W., Zeng, Q., Sun, Y., Wang, P., You, L., Yang, P., Huang, Z., Yu, S. L., & Lu, W. Q. (2016). Variability of Metal Levels in Spot, First Morning, and 24-Hour Urine Samples over a 3-Month Period in Healthy Adult Chinese Men. *Environmental health perspectives*, 124(4), 468–476. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409551>
- World Health Organization (WHO), *Guidelines for Drinking-Water Quality* (2011). World Health Organization.
- Wynn, T. A., & Ramalingam, T. R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine*, 18(7), 1028-1040. <https://doi.org/10.1038/nm.2807>
- Yang J, Ma Z. (2021) Research progress on the effects of nickel on hormone secretion in the endocrine axis and on target organs. *Ecotoxicol Environ Saf*. Apr 15;213:112034. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112034.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 74(1), 139-162. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.139>
- Zhao, Z. Z., Sugerman, P. B., Zhou, X. J., Walsh, L. J., & Savage, N. W. (2001). Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus. *Oral diseases*, 7(4), 246–251.

Zheng, L., Kuo, C.-C., Fadrowski, J., Agnew, J., Weaver, V.M., Navas-Acien, A., (2014).
Arsenic and chronic kidney disease: a systematic review. *Curr. Environ. Health Rep.* 1 (3),
192–207.