

MARIANA SOUZA OLIVEIRA

**EFEITOS DA COEXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO ARSÊNIO E NÍQUEL SOBRE
PARÂMETROS HISTOLÓGICOS E OXIDATIVOS NO INTESTINO DELGADO DE
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
2023**

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

T

Oliveira, Mariana Souza, 1998-
O48e Efeitos da coexposição subcrônica ao arsênio e níquel sobre
2023 parâmetros histológicos e oxidativos no intestino delgado de
ratos Wistar adultos / Mariana Souza Oliveira. – Viçosa, MG,
2023.

1 dissertação eletrônica (74 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Mariana Machado Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.639>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Intestinos - Microbiologia. 2. Intestinos - Ferimentos e
lesões. 3. Ratos como animais de laboratório - Efeito dos metais
pesados. 4. Estresse oxidativo. 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. 573.37


MARIANA SOUZA OLIVEIRA

**EFEITOS DA COEXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO ARSÊNIO E NÍQUEL SOBRE
PARÂMETROS HISTOLÓGICOS E OXIDATIVOS NO INTESTINO DELGADO DE
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: 02 de agosto de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **MARIANA SOUZA OLIVEIRA**
Data: 16/10/2023 10:05:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mariana Souza Oliveira
Autora

Documento assinado digitalmente
 **MARIANA MACHADO NEVES**
Data: 16/10/2023 10:30:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mariana Machado Neves
Orientadora

“É preciso estudar muito para saber um pouco.”
Montesquieu

AGRADECIMENTOS

Com o coração repleto de gratidão agradeço a Deus por todo o seu cuidado em minha vida. Desde o início da graduação Ele colocou esse sonho em meu coração para que hoje eu pudesse realizá-lo. Não foi fácil, mas Deus esteve comigo em todos esses momentos. À Nossa Senhora das Graças que sempre me conduziu com amor e carinho de mãe.

À minha orientadora Mariana Machado Neves, por sua acolhida, por sua disponibilidade em me auxiliar no desenvolvimento desta pesquisa e para que superássemos todas as dificuldades ao longo do mestrado. Obrigada pela paciência e por todos os conselhos e trocas que tivemos.

Agradeço à toda a minha família, em especial, aos meus pais Jormiro e Silvani, e ao meu irmão Murilo. Vocês são a minha base. Obrigada por todo apoio e por não medirem esforços para eu chegasse até aqui. De modo muitíssimo especial agradeço à minha mãe, a bióloga que eu tenho mais orgulho. Essa vitória é nossa!

Ao meu marido Rodrigo, que me apoiou em todas as circunstâncias. Obrigada por ser meu apoio, por me dar forças e sempre acreditar em mim. Você foi insubstituível nessa jornada e ainda colocou a mão na massa nas mais diversas situações. Obrigada por tudo! Eu te amo e sempre serei grata por sua bondade e apoio nessa fase das nossas vidas.

À Carol e o Mateus, que mesmo de longe, se fizeram presente. Obrigada por sempre torcerem por mim.

Aos amigos de Viçosa, Mírian, Luiz, Renner, Isabela, Thainá, Camila, Elizabeth, Willian e Pedro, obrigada por deixarem essa jornada mais leve. Obrigada por cada risada, desabafos, rolê aleatório e por me ajudarem sempre.

Aos amigos do LARAT. Obrigada por toda ajuda e pelos ensinamentos ao longo do mestrado. Vocês são incríveis e eu sou muito grata por tudo que aprendi com vocês. Obrigada por todos os cafezinhos, conversas e risadas.

Gostaria de enfatizar a minha gratidão ao Luiz e a Mírian. Luiz, obrigada por ter me guiado e me ajudado com o seu jeitinho desde o primeiro dia em que cheguei no LARAT. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos. Mírian, obrigada por sempre me ajudar a

pensar em uma solução para cada problema e por dividir comigo essa jornada de aprendizados. Agradeço a vocês por todo o companheirismo que tivemos.

Aos professores pelos ensinamentos e por sempre estarem disponíveis em me ajudar. Em especial gostaria de agradecer a Sirlene, por compartilhar seus conhecimentos (que não são poucos) que me fizeram gostar tanto do sistema digestório. Nossa troca foi fundamental para esse estudo e agradeço pela sua contribuição nesse trabalho. Aos professores Clóvis e Sérgio da Matta, obrigada por cada dúvida que vocês me esclareceram e por todo o aprendizado.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, a mais linda do Brasil, e ao Departamento de Biologia Geral. Sou grata por ter tido essa oportunidade e pelas vivências que me fizeram amadurecer.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram para que o presente estudo se tornasse realidade. Essa vitória é nossa!

RESUMO

OLIVEIRA, Mariana Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Efeitos da coexposição subcrônica ao arsênio e níquel sobre parâmetros histológicos e oxidativos no intestino delgado de ratos Wistar adultos.** Orientadora: Mariana Machado Neves.

Nas últimas décadas, a exploração exponencial dos recursos hídricos e terrestres tem preocupado populações em todo o mundo devido a liberação de poluentes no ambiente. Seres humanos são expostos diariamente a misturas de metais tóxicos como arsênio e níquel, conhecidos pelos prejuízos à saúde humana e animal. Sendo que uma das vias no organismo é o intestino delgado no que diz respeito a contaminação de alimentos e água. Sabe-se que metais pesados podem causar danos ao intestino delgado e interferir na sua microbiota intestinal. Poucos estudos, porém, reportam danos ao intestino quando da exposição a mistura de metais. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da coexposição de níquel e arsênio no trato intestinal de ratos Wistar. Ratos adultos foram distribuídos em cinco grupos experimentais (n = 10/ grupo): controle (sem ingestão de metais), 1 mg L⁻¹ arsênio (As), 7 mg L⁻¹ níquel (Ni), coexposição com 1 mg L⁻¹ As + 7 mg L⁻¹ Ni (AsNi [+]) e coexposição com 0,01 mg L⁻¹ As + 0,07 mg L⁻¹ Ni (AsNi [-]). Os animais tiveram acesso às soluções (arsenito de sódio e cloreto de níquel) por meio da água de beber *ad libitum* por 70 dias, sendo eutanasiados 24 h após a último dia de exposição. O intestino foi dissecado e dividido em duodeno, jejuno e íleo para realização de análises histológicas e oxidativas. Os dados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey (p = 0,05). Os resultados mostraram que ratos dos grupos AsNi [-] e AsNi [+] apresentaram maior diâmetro de vilosidades e lâmina própria em todas as regiões intestinais. As alterações histológicas observadas incluíram infiltrado inflamatório, congestão, fusão de vilosidades e descamação celular. Ratos desses dois grupos apresentaram aumento na área das mucinas ácidas em todas as regiões. A atividade de catalase foi maior em ratos que ingeriram a maior concentração de níquel e arsênio. Já a atividade de glutatona s transferase foi menor em todos os animais expostos aos dois metais, juntos ou isolados. Não foram observadas alterações na biometria corporal. Pode-se concluir que, a coexposição em um período subcrônico causou alterações histológicas e oxidativas nas regiões intestinais estudadas, mas sem aparente comprometimento na sua funcionalidade.

Palavras-chave: Trato digestivo. Metais pesados. Toxicidade. Estresse oxidativo. Histopatologias.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Mariana Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2023. **Effects of subchronic co-exposure to arsenic and nickel on histological and oxidative parameters in the small intestine of adult Wistar rats.** Adviser: Mariana Machado Neves.

In recent decades, the exponential exploitation of water and land resources has worried populations around the world due to the release of pollutants into the environment. Human beings are exposed daily to mixtures of toxic metals such as arsenic and nickel, known to be harmful to human and animal health. One of the pathways in the body is the small intestine when it comes to contamination of food and water. It is known that heavy metals can cause damage to the small intestine and interfere with your intestinal microbiota. Few studies, however, report damage to the intestine when exposed to a mixture of metals. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of co-exposure of nickel and arsenic in the intestinal tract of Wistar rats. Adult rats were distributed into five experimental groups (n = 10/group): control (no metal intake), 1 mg L⁻¹ arsenic (As), 7 mg L⁻¹ nickel (Ni), co-exposure with 1 mg L⁻¹ As + 7 mg L⁻¹ Ni (AsNi [+]) and co-exposure with 0.01 mg L⁻¹ As + 0.07 mg L⁻¹ Ni (AsNi [-]). The animals had access to the solutions (sodium arsenite and nickel chloride) through drinking water ad libitum for 70 days, being euthanized 24 h after the last day of exposure. The intestine was dissected and divided into duodenum, jejunum and ileum to perform histological and oxidative analyses. The data were subjected to ANOVA and Tukey tests (p = 0.05). The results showed that rats from the AsNi [-] and AsNi [+] groups had larger villi and lamina propria diameters in all intestinal regions. Histological changes observed included inflammatory infiltrate, congestion, villus fusion and cellular desquamation. Rats from these two groups showed an increase in the area of acidic mucins in all regions. Catalase activity was greater in rats that ingested the highest concentration of nickel and arsenic. Glutathione transferase activity was lower in all animals exposed to both metals, together or alone. No changes were observed in body biometrics. It can be concluded that co-exposure in a subchronic period caused histological and oxidative changes in the intestinal regions studied, but without apparent impairment in their functionality.

Keywords: Digestive tract. Heavy metals. Toxicity. Oxidative stress. Histopathologies.

SUMÁRIO

1. Introdução geral	9
2. Revisão de literatura	11
2.1 Metais pesados	11
2.1.1 Níquel.....	12
2.1.2 Arsênio.....	13
2.2 Intestino delgado.....	14
2.3 Referências.....	18
3. Capítulo 1: Efeitos da coexposição subcrônica de arsênio e níquel sobre o intestino delgado de ratos Wistar	27
3.1 Resumo	27
3.2 Introdução	28
3.3 Materiais e Métodos.....	30
3.3.1 Animais e comitê de ética	30
3.3.2 Delineamento experimental.....	30
3.3.3 Eutanásia e coleta de material biológico	31
3.3.4 Processamento histológico do intestino delgado para microscopia de luz	32
3.3.5 Análises histológicas e histomorfométricas	33
3.3.6 Ensaio de atividade enzimática e marcadores de dano oxidativo	36
3.3.7 Análise estatística.....	36
3.4 Resultados.....	37
3.4.1 Consumo diário das soluções de arsênio e níquel, peso corporal e sinais clínicos	37
3.4.2 Análises histológicas e histoquímicas do duodeno	38
3.4.3 Análises histológicas e histoquímicas do jejuno	43
3.4.4 Análises histológicas e histoquímicas do íleo	48
3.4.5 Atividade das enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo.....	57
3.5 Discussão	59
3.6 Conclusões	65
3.7 Referências.....	66

1. Introdução geral

Elementos químicos ocorrem naturalmente na crosta terrestre. Eles são liberados lentamente no ambiente devido a processos naturais, como erosão, lixiviação, processos vulcânicos e fontes termais (Sall et al., 2020). No entanto, atividades antrópicas, como agricultura, mineração, industrialização e produção de resíduos químicos, aceleram a biodisponibilidade de minerais no ambiente. O problema acontece quando alguns desses elementos biodisponíveis são tóxicos e se tornam uma ameaça à saúde, por não exercerem um papel fisiológico no organismo (Machado-Neves, 2022). Por exemplo, animais e vegetais podem absorver esses elementos que, nos tecidos, causam o aumento das reações de oxidação-redução produzindo radicais livres (Fu & Xi, 2020). Esses radicais livres reagem com componentes estruturais das células, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. A exposição a elementos metálicos e metaloides pode ocorrer através da água, ar e alimentos (Ibrahim et al., 2006; Orloff et al., 2009; Wu et al., 2013; Couto-Santos et al., 2020). Dentre esses metais podemos destacar os metais pesados (Ibrahim et al., 2006; Orloff et al., 2009; Wu et al., 2013). No contexto toxicológico, os metais pesados formam um grupo variado de elementos, como cádmio, mercúrio, chumbo, cromo, arsênio e níquel, que apresentam grande potencial de bioacumular no corpo e causar danos teciduais mesmo em baixas concentrações (Alamdar et al., 2016).

Apesar de serem classificados como metais pesados, o arsênio (As) é um metaloide, enquanto o níquel (Ni) é um elemento de transição. O As é quimicamente classificado como metaloide por apresentar, ao mesmo tempo, características de metais e não metais (Bhardwaj et al., 2021). Pode ser encontrado na água de beber em suas formas inorgânicas altamente solúveis, arsenito (As^{3+}) e arsenato (As^{5+}) (Orloff et al., 2009). Já o Ni é um elemento de transição por possuir o subnível de energia *d* incompleto (Yruela, 2013). Os sais de Ni de

ácidos orgânicos possuem alta solubilidade em água, e sais de Ni de ácidos inorgânicos geralmente são insolúveis (Genchi et al., 2020).

A toxicidade do As e do Ni depende de suas características físico-químicas, além do tempo de contato, da concentração absorvida e vias de exposição (Genchi et al., 2020). Estudos mostram que a exposição crônica ao Ni pode causar vários efeitos adversos à saúde dos seres humanos, como câncer no aparelho respiratório, doenças cardiovasculares e renais, fibrose pulmonar e doenças gastrointestinais (McGregor et al., 2000; Denkhaus & Salnikow, 2002; Seilkop & Oller, 2003; Genchi et al., 2020). Já para o As, uma vez ingerido, tanto o arsenato quanto o arsenito são absorvidos e transportados pelo sangue até os tecidos (Subhani et al., 2015; Alamdar et al., 2016). Além disso, eles podem ser biotransformados e retidos nos tecidos (Goldhaber, 2003; Kobayashi et al., 2005). Metabólitos intermediários do As, além de eliminados na urina, podem se acumular em vários órgãos, como rim, pulmão, fígado, testículos, intestino e cérebro (Chen et al., 1992; Vahter, 2002; Souza et al., 2016).

Os metais pesados podem ser encontrados juntos na natureza (Khan et al., 2019; Li et al., 2019; Vormittag et al., 2021) e, portanto, estarem disponíveis como um coquetel de metais para os seres humanos e animais (Wu et al., 2016). Os seres humanos e animais quando expostos a esses coquetéis de metais por meio da via oral, tem como porta de entrada para os metais no organismo o intestino delgado. A partir dele, os metais absorvidos na mucosa intestinal são distribuídos para outros órgãos. Apesar de já se estudar os efeitos de metais pesados no intestino delgado (Arnich et al., 2000; Radike et al., 2002; Ratnaike, 2003; Wu et al., 2013), pesquisas recentes têm estudado a relação deles com a microbiota intestinal (Ya et al., 2019; Brabec et al., 2020; Bist & Choudhary, 2022). Mesmo assim, poucos estudos reportam os danos causados no parênquima intestinal (Zhang et al., 2020), principalmente considerando a mistura de metais no intestino. Por causa da importante função absorptiva realizada por este órgão, bem como o potencial efeito deletério dos metais no trato digestivo e

consequentemente na homeostase do organismo, formulou-se a hipótese de que a coexposição ao níquel e ao arsênio afeta o intestino delgado de ratos Wistar adultos. Para testar essa hipótese, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da coexposição oral ao arsênio e níquel, em diferentes concentrações, sobre parâmetros histológicos e oxidativos do intestino delgado.

2. Revisão de literatura

2.1 Metais pesados

Os metais pesados são um grupo variado de elementos naturais que possuem um alto peso e densidade atômica ($> 5 \text{ g/cm}^3$) (Festa & Thiele, 2011). Os metais pesados podem ser classificados em dois contextos diferentes. Do ponto de vista fisiológico, alguns possuem funções relevantes para os seres vivos, como ferro e o zinco (Souza et al., 2016). Do ponto de vista toxicológico, outros elementos que não metais podem ser incluídos neste grupo, por serem prejudiciais à saúde humana e animal se acumulados no corpo ao longo do tempo. Neste contexto, os metais pesados são altamente tóxicos mesmo em baixas concentrações, como mercúrio, As, chumbo, cádmio e cromo (Festa & Thiele, 2011).

Animais e seres humanos podem entrar em contato com os metais por várias vias, como ingestão de alimentos contaminados e/ou água potável, contato dérmico e absorção por via inalatória. A principal fonte de exposição humana a metais pesados é a água potável contaminada (Fu & Xi, 2020). A contaminação das águas naturais está muito relacionada com a expansão das cidades e ao desenvolvimento das indústrias e da agricultura intensiva. Isso resulta em uma série de despejos mais ou menos tóxicos e prejudiciais (Sall et al., 2020). Um estudo realizado por Fu e Xi (2020) mostrou que os metais pesados na água potável excederam os limites recomendados (OMS, 2011), merecendo especial atenção a exposição

ao arsênio, chumbo, níquel, cádmio e mercúrio e suas consequências para o metabolismo humano e equilíbrio antioxidante (Rehman et al., 2018; Fu & Xi, 2020).

Uma vez dentro do organismo, esses metais causam o aumento nas reações de oxidação-redução produzindo radicais livres (Fu & Xi, 2020). Os radicais livres podem interagir com componentes de membranas celulares, modificando estruturas proteicas importantes e resultando em problemas com o transporte de substâncias (Souza et al., 2016). Além disso, os radicais livres também podem interagir com outros componentes estruturais das células, como os lipídeos e DNA. Essa interação com os componentes celulares pode formar espécies reativas de oxigênio. Como consequência, o surgimento de espécies reativas de oxigênio inativa sistemas enzimáticos, mostrando vulnerabilidade do metabolismo enzimático a esses metais (Ibrahim et al., 2006).

2.1.1 Níquel

O Ni é um elemento que está presente em 3% da crosta terrestre, sendo o 24º elemento mais abundante na Terra. Esse elemento é maleável e resistente a corrosão e oxidação, por conta dessas propriedades físicas e químicas o Ni possui muitas aplicações industriais e comerciais, tornando seus trabalhadores expostos a esse metal (Zambelli et al., 2016). Dessa forma, o níquel pode ser encontrado em muitos objetos de uso geral, como telefone, moedas, brincos, relógios, implantes dentários e ortopédicos (Schmidt & Goebeler, 2011). Com o consumo acelerado de produtos contendo Ni, seus compostos são liberados no meio ambiente em todos os estágios de produção e utilização (Denkhaus & Salnikow, 2002). A lixiviação ou corrosão são os principais motivos pelos quais o Ni está presente em tubulações e recipientes, se dissolvendo na água potável. Esses processos podem levar a ingestão oral diária de 1mg L^{-1} (Rehman et al., 2018), embora a concentração máxima permitida seja de $0,07\text{ mg L}^{-1}$ (OMS, 2011).

Quantidades significativas de Ni em diferentes formas podem ser depositadas no corpo humano, resultando em sintomas de toxicidade (Denkhaus & Salnikow, 2002). No intestino delgado o Ni é transportado para dentro da célula por canais de cálcio, e após ser absorvido, é transportado pelo sangue, mediado pela albumina (Asato et al., 1975). Estando presente na circulação sanguínea, o Ni pode entrar em contato com vários órgãos. O Ni combina com grupos de enxofre formando complexos Ni-Tiol. Quando esses complexos reagem com o oxigênio molecular resultam na produção de radicais livres, promovendo a retenção do Ni em vários órgãos (Das & Buchner, 2007). As consequências da exposição ao Ni dependem e são influenciadas pelas mudanças ativas no metabolismo, estresse oxidativo, proliferação celular, inflamação e morte celular (Salnikow & Kasprzak, 2007). O acúmulo crônico de Ni pode levar a fibrose pulmonar, doenças cardiovasculares e renais. Estudos também mostraram o Ni relacionado com atividades cancerígenas (Denkhaus & Salnikow, 2002; Zambelli et al., 2016).

2.1.2 Arsênio

O As é um elemento químico com número atômico 33 e densidade de $5,727 \text{ g/cm}^3$ (Bhardwaj et al., 2021). Seus principais números de oxidação são +5, +3 e -3, nos quais ele é capaz de formar compostos orgânicos e inorgânicos no organismo ou ambiente (Orloff et al., 2009; Souza et al., 2016). O As na forma +3 (trivalente) é chamado de arsenito, enquanto na forma +5 (pentavalente) é chamado de arsenato. A poluição por esses compostos é resultado de forças naturais e atividades humanas, tais como a mineração, fabricação de vidro, pesticidas agrícolas, produção de aditivos alimentares, poluindo conseqüentemente lençóis freáticos e água potável (Couto-Santos et al., 2020; Huang et al., 2016). Mesmo que as diretrizes da OMS coloquem o limite recomendado de As na água potável de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, áreas

na Índia, China, Argentina, Chile, Estados Unidos, Brasil e Bangladesh exibem concentrações de As maiores que o recomendado (Alamdar et al., 2016; Couto-Santos et al., 2020).

O As no estado livre não é comum na natureza, sendo geralmente encontrado nas valências +3 e +5, consideradas tóxicos e solúveis em água (Pires Das Neves et al., 2004; Ferreira et al., 2012; Rehman et al., 2018). O arsenito é relacionado por reagir com ligantes biológicos com grupos de enxofre e devido essas reações, inibem muitas enzimas e é mais tóxico do que o arsenato. Após a ingestão da água contaminada com As, esse metaloide é absorvido pelo intestino. Posteriormente, o As se liga a parte globina (parte proteica) da hemoglobina e é transportado pelo sangue até entrar em contato com vários órgãos (Bhardwaj et al., 2021). Depois os compostos são metabolizados por redução repetitiva e metilação oxidativa e são excretados principalmente na urina como As metilados (Li et al., 2021). Entretanto, estudos mostram que intermediários metabólicos do As, além de serem excretados na urina, podem se acumular em órgãos, como bexiga, rim, próstata, cérebro e pulmão (Singh et al., 2011). O acúmulo de As produz espécies reativas de oxigênio, portanto, o estresse oxidativo é considerado o mecanismo pelo qual provoca lesões. Como resultado, os radicais livres produzidos por essas reações causam oxidação, peroxidação lipídica e danos ao DNA (Souza et al., 2016; Couto-Santos et al., 2020; Fu & Xi, 2020). Desta forma, esses danos podem levar a produção de várias doenças. Estudos mostram efeitos adversos à saúde sendo associados a ingestão de As, tais como doenças cardiovasculares, diabetes, doenças pulmonares e problemas relacionados a toxicidade reprodutivas em homens (Singh et al., 2011; Souza et al., 2016; Couto-Santos et al., 2020).

2.2 Intestino delgado

O intestino delgado é a porta de entrada dos metais tóxicos no organismo ingeridos oralmente. Sabe-se que metais como As e Ni podem ser acumulados no intestino delgado de

roedores (Radike et al., 2002). Este fato pode acarretar geração de espécies reativas de oxigênio e desequilíbrio do sistema de defesa (Bisht et al., 2017; Souza et al., 2016), com consequente ocorrência de danos estruturais às células e, dependendo da gravidade, danos ao parênquima do órgão (Das & Buchner, 2007). No entanto, pesquisas sobre esses metais tóxicos no parênquima intestinal ainda são escassas. Portanto, faz-se necessário compreender os efeitos toxicológicos dos metais no parênquima intestinal, com potencial de alterar importantes funções desempenhadas pelo intestino delgado.

O intestino delgado é o segmento mais funcional e essencial para a absorção de nutrientes do aparelho digestório. Para um metabolismo eficiente de absorção de nutrientes, o intestino delgado adulto requer uma grande área de superfície interna, possui em média 30m² (Kwon et al., 2020). É subdividido em três regiões ao longo do eixo céfalocaudal, (duodeno, jejuno e íleo). O duodeno é a menor porção do intestino delgado, apresentando-se posterior ao estômago e terminando na flexura duodenojejunal. O duodeno recebe o quimo, composto pelo suco gástrico e o alimento parcialmente digerido, o processo de digestão continua ocorrendo no duodeno. Considerando que o quimo é ácido, o duodeno apresenta glândulas de Brunner produtoras de uma secreção mucosa contendo bicarbonato, com o objetivo de neutralizar sua acidez. Além disso, para continuar o processo digestivo, essa região recebe ductos que trazem a bile, de origem hepática, com sais biliares para emulsificação de lipídios e o suco pancreático, produzido pela porção exócrina do pâncreas com várias enzimas digestivas (Boland, 2016). O suco pancreático e bile também contém bicarbonato para neutralização do pH intestinal. O jejuno é a parte média do intestino delgado, se inicia após a flexura duodenojejunal e termina no início do íleo. Essa região é responsável pela absorção de carboidratos e aminoácidos digeridos. O íleo é a porção final do intestino delgado se inicia ao final do jejuno e se estende até o ceco, também participa da absorção, especialmente de gorduras. Essa região possui um importante componente do tecido linfóide associado ao trato

digestivo, as placas de Peyer. Estas são compostas por nódulos linfáticos, que podem estar presentes na camada submucosa ou no conjuntivo da lâmina própria. O epitélio associado as placas de Peyer é diferente, composto por células M que auxiliam no mecanismo de defesa (Junqueira & Carneiro, 2017).

No geral, a parede das três regiões do intestino delgado é organizada em quatro túnicas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. A mucosa apresenta uma estrutura em especial, conhecidas como vilosidades. Estas são projeções da mucosa formadas pelo epitélio e lâmina própria voltadas para o lúmen, que aumentam significativamente a área de superfície de contato. As vilosidades podem apresentar variações na sua forma de acordo com a região do intestino delgado. No duodeno, as vilosidades têm formato semelhante a folhas. No jejuno essas vilosidades são mais alongadas, semelhante a dedos. Já no íleo, as vilosidades são mais curtas (Junqueira & Carneiro, 2017). Entre as vilosidades são encontradas as criptas intestinais, que são glândulas tubulares simples. O epitélio é classificado como simples colunar, possuindo células altas denominadas como enterócitos, responsáveis pela absorção dos nutrientes. Os enterócitos possuem seu núcleo na porção basal e no seu ápice, possuem microvilosidades. Além dos enterócitos, o epitélio intestinal também é composto por células caliciformes, células enteroendócrinas, células de Paneth e células tronco. As células caliciformes apresentam grânulos contendo mucina no seu citoplasma apical, essa secreção será liberada para formar o muco que reveste o epitélio. As células enteroendócrinas secretam hormônios, como a colecistocinina e secretina, possuem a função de estimular a produção do suco pancreático e estimula a contração da musculatura da vesícula biliar (Schwartz & Moran, 1994). Nas criptas temos secreção de enzimas de defesas pelas células de Paneth e proliferação intensa das células tronco (Cash et al., 2006; Junqueira & Carneiro, 2017). Abaixo do epitélio, temos a lâmina própria que preenche a vilosidade. A lâmina própria é constituída de tecido conjuntivo frouxo, possuem vasos sanguíneos e linfáticos diretamente

relacionados com o processo de absorção no epitélio. Além disso, possuem grande quantidade de glândulas tubulosas denominadas glândulas de Lieberkuhn, e células típicas desse tecido, como os macrófagos e fibroblastos. Para finalizar a camada mucosa, separando-a da submucosa temos uma fina camada de musculo liso, chamada de muscular da mucosa.

A submucosa é constituída por tecido conjuntivo denso, possui nervos e muitos vasos sanguíneos e linfáticos. Abaixo da submucosa se localizada a região muscular do intestino. A camada muscular é bem desenvolvida e formada por uma camada de musculo circular interno e outra camada de musculo longitudinal externo, ambas de musculo liso. O revestimento externo do órgão possui uma membrana serosa, composta por uma delgada camada de tecido conjuntivo recoberta pelo mesotélio (Junqueira & Carneiro, 2017).

O processo de digestão ocorre em simbiose com bilhões de bactérias que residem no lúmen do intestino. Essa população bacteriana é conhecida como a microbiota intestinal (Lu et al., 2014). O Ni tem sido muito pesquisado por seu potencial em modificar a microbiota intestinal trazendo alterações desfavoráveis para o ambiente intestinal (Richardson et al., 2018; Wu et al., 2022; Yang et al., 2023). É importante ressaltar que a microbiota é a primeira linha de defesa contra os efeitos de substâncias tóxicas, como os metais pesados e microrganismos (Duan et al., 2020). O intestino delgado também desempenha um importante papel no controle de várias funções fisiológicas, tais como a regulação do sistema imunológico e homeostase da microbiota intestinal (Kwon et al., 2020).

Devido aos danos causados pelo ambiente agressivo, o epitélio intestinal se autorrenova mais rapidamente para reparar os danos (Seno et al., 2009). Além disso, a camada de células epiteliais enfrenta o lúmen formando uma barreira protetora que protege o corpo contra a exposição direta a micróbios e antígenos alimentares (Antfolk & Jensen, 2020). Essas barreiras intestinais impedem que substâncias nocivas passem pela mucosa intestinal para outros tecidos e órgãos (Duan et al., 2020). Um outro tipo de barreira intestinal é o muco,

caracterizado por ser um fluido viscoso. As glicoproteínas mucinas, produzidas especialmente pelas células caliciformes, são o principal componente do muco, mas também é composto por moléculas antimicrobianas secretadas pelas células de Paneth e imunoglobulinas específicas transportadas pelos enterócitos (McGuckin et al., 2011). O muco é bastante hidratado e necessariamente poroso, para permitir a difusão de moléculas na absorção intestinal. Mesmo com essas características, é uma eficaz barreira biofísica para os microrganismos (Lai et al., 2007). A microbiota comensal geralmente não causa doenças ao hospedeiro, mas esse cenário pode mudar dependendo das circunstâncias do ambiente intestinal. Quando a superfície da mucosa é lesada, os microrganismos comensais podem se tornar patógenos oportunistas e colaborar para a patologia. Portanto, o muco possui diversas funções importantes no ambiente intestinal (McGuckin et al., 2011).

2.3 Referências

- Alamdar, A., Ali Musstjab Akber Shah Eqani, S., Waqar Ali, S., Sohail, M., Bhowmik, A. K., Cincinelli, A., Subhani, M., Ghaffar, B., Ullah, R., Huang, Q., & Shen, H. (2016). Human arsenic exposure via dust across the different ecological zones of Pakistan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.044>
- Antfolk, M., & Jensen, K. B. (2020). A bioengineering perspective on modelling the intestinal epithelial physiology in vitro. In *Nature Communications* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20052-z>
- Arnich, N., Lanhers, M. C., Cunat, L., Joyeux, M., & Burnel, D. (2000). Nickel absorption and distribution from rat small intestine in situ. *Biological Trace Element Research*, 74(2). <https://doi.org/10.1385/bter:74:2:141>

- Asato, N., van Soestbergen, M., & Sunderman, F. W. (1975). Binding of $^{63}\text{Ni}(\text{II})$ to ultrafiltrable constituents of rabbit serum in vivo and in vitro. *Clinical Chemistry*, 21(4). <https://doi.org/10.1093/clinchem/21.4.521>
- Bhardwaj, J. K., Paliwal, A., & Saraf, P. (2021). Effects of heavy metals on reproduction owing to infertility. In *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* (Vol. 35, Issue 8). <https://doi.org/10.1002/jbt.22823>
- Bist, P., & Choudhary, S. (2022). Impact of heavy metal toxicity on the gut microbiota and its relationship with metabolites and future probiotics strategy: a Review. In *Biological Trace Element Research* (Vol. 200, Issue 12). <https://doi.org/10.1007/s12011-021-03092-4>
- Boland, M. (2016). Human digestion - a processing perspective. In *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 96, Issue 7). <https://doi.org/10.1002/jsfa.7601>
- Brabec, J. L., Wright, J., Ly, T., Wong, H. T., McClimans, C. J., Tokarev, V., Lamendella, R., Sherchand, S., Shrestha, D., Uprety, S., Dangol, B., Tandukar, S., Sherchand, J. B., & Sherchan, S. P. (2020). Arsenic disturbs the gut microbiome of individuals in a disadvantaged community in Nepal. *Heliyon*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03313>
- Cash, H. L., Whitham, C. v., Behrendt, C. L., & Hooper, L. v. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 313(5790). <https://doi.org/10.1126/science.1127119>
- Chen, C. J., Chen, C. W., Wu, M. M., & Kuo, T. L. (1992). Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *British Journal of Cancer*, 66(5). <https://doi.org/10.1038/bjc.1992.380>

- Couto-Santos, F., Souza, A. C. F., Bastos, D. S. S., Ervilha, L. O. G., Dias, F. C. R., Araújo, L. de S., Guimarães, S. E. F., Oliveira, L. L. de, & Machado-Neves, M. (2020). Prepubertal exposure to arsenic alters male reproductive parameters in pubertal and adult rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 409. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115304>
- Das, K. K., & Buchner, V. (2007). Effect of nickel exposure on peripheral tissues: Role of oxidative stress in toxicity and possible protection by ascorbic acid. In *Reviews on Environmental Health* (Vol. 22, Issue 2). <https://doi.org/10.1515/REVEH.2007.22.2.157>
- Denkhaus, E., & Salnikow, K. (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 42, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00214-1)
- Duan, H., Yu, L., Tian, F., Zhai, Q., Fan, L., & Chen, W. (2020). Gut microbiota: A target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy. In *Science of the Total Environment* (Vol. 742). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140429>
- Ferreira, M., Matos, R. C., Oliveira, H., Nunes, B., & Pereira, M. D. L. (2012). Impairment of mice spermatogenesis by sodium arsenite. *Human and Experimental Toxicology*, 31(3). <https://doi.org/10.1177/0960327111405862>
- Festa, R. A., & Thiele, D. J. (2011). Copper: An essential metal in biology. In *Current Biology* (Vol. 21, Issue 21). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040>
- Fu, Z., & Xi, S. (2020). The effects of heavy metals on human metabolism. In *Toxicology Mechanisms and Methods* (Vol. 30, Issue 3). <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>
- Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2020). Nickel: Human health and environmental toxicology. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>

- Goldhaber, S. B. (2003). Trace element risk assessment: Essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38(2). [https://doi.org/10.1016/S0273-2300\(02\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0273-2300(02)00020-X)
- Huang, Q., Luo, L., Alamdar, A., Zhang, J., Liu, L., Tian, M., Eqani, S. A. M. A. S., & Shen, H. (2016). Integrated proteomics and metabolomics analysis of rat testis: Mechanism of arsenic-induced male reproductive toxicity. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep32518>
- Ibrahim, D., Froberg, B., Wolf, A., & Rusyniak, D. E. (2006). Heavy metal poisoning: Clinical presentations and pathophysiology. In *Clinics in Laboratory Medicine* (Vol. 26, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.cll.2006.02.003>
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2017) *Histologia básica*. 13ª edição. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan
- 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. *Science of the Total Environment*, 657. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.455>
- 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). <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.03.001>
- Kwon, O., Han, T. S., & Son, M. Y. (2020). Intestinal morphogenesis in development, regeneration, and disease: the potential utility of intestinal organoids for studying compartmentalization of the crypt-villus structure. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593969>
- Lai, S. K., O'Hanlon, D. E., Harrold, S., Man, S. T., Wang, Y. Y., Cone, R., & Hanes, J. (2007). Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human

- mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.0608611104>
- Li, D., Yang, Y., Li, Y., Li, Z., Zhu, X., & Zeng, X. (2021). Changes induced by chronic exposure to high arsenic concentrations in the intestine and its microenvironment. *Toxicology*, 456. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152767>
- 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*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113325>
- Lu, K., Abo, R. P., Schlieper, K. A., Graffam, M. E., Levine, S., Wishnok, J. S., Swenberg, J. A., Tannenbaum, S. R., & Fox, J. G. (2014). Arsenic exposure perturbs the gut microbiome and its metabolic profile in mice: An integrated metagenomics and metabolomics analysis. *Environmental Health Perspectives*, 122(3). <https://doi.org/10.1289/ehp.1307429>
- Machado-Neves, M. (2022). Effect of heavy metals on epididymal morphology and function: An integrative review. In *Chemosphere* (Vol. 291). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133020>
- 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. *European Journal of Cancer*, 36(3). [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(99\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(99)00312-3)
- McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>

- Orloff, K., Mistry, K., & Metcalf, S. (2009). Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. In *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* (Vol. 12, Issue 7). <https://doi.org/10.1080/10937400903358934>
- Pires Das Neves, R. N., Carvalho, F., Carvalho, M., Fernandes, E., Soares, E., Bastos, M. de L., & Pereira, M. de L. (2004). Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium arsenite acute toxicity in mice. *Toxicologic Pathology*, 32(5). <https://doi.org/10.1080/01926230490502566>
- Radike, M., Warshawsky, D., Caruso, J., Goth-Goldstein, R., Reilman, R., Collins, T., Yaeger, M., Wang, J., Vela, N., Olsen, L., & Schneider, J. (2002). Distribution and accumulation of a mixture of arsenic, cadmium, chromium, nickel, and vanadium in mouse small intestine, kidneys, pancreas, and femur following oral administration in water or feed. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 65(23). <https://doi.org/10.1080/00984100290071324>
- Ratnaike, R. N. (2003). Acute and chronic arsenic toxicity. In *Postgraduate Medical Journal* (Vol. 79, Issue 933). <https://doi.org/10.1136/pmj.79.933.391>
- Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., & Akash, M. S. H. (2018). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1). <https://doi.org/10.1002/jcb.26234>
- Richardson, J. B., Dancy, B. C. R., Horton, C. L., Lee, Y. S., Madejczyk, M. S., Xu, Z. Z., Ackermann, G., Humphrey, G., Palacios, G., Knight, R., & Lewis, J. A. (2018). Exposure to toxic metals triggers unique responses from the rat gut microbiota. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24931-w>
- Sall, M. L., Diaw, A. K. D., Gningue-Sall, D., Efremova Aaron, S., & Aaron, J. J. (2020). Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with

- conducting organic polymers, a review. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 27, Issue 24). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09354-3>
- Salnikow, K., & Kasprzak, K. S. (2007). Nickel-dependent gene expression. In *Nickel and Its Surprising Impact in Nature* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1002/9780470028131.ch16>
- Schmidt, M., & Goebeler, M. (2011). Nickel allergies: Paying the toll for innate immunity. In *Journal of Molecular Medicine* (Vol. 89, Issue 10). <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0780-0>
- Schwartz, G. J., & Moran, T. H. (1994). CCK Elicits and modulates vagal afferent activity arising from gastric and duodenal sites. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 713(1). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb44058.x>
- 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. In *Regulatory Toxicology and Pharmacology* (Vol. 37, Issue 2). [https://doi.org/10.1016/S0273-2300\(02\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S0273-2300(02)00029-6)
- Seno, H., Miyoshi, H., Brown, S. L., Geske, M. J., Colonna, M., & Stappenbeck, T. S. (2009). Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.0803343106>
- Singh, A. P., Goel, R. K., & Kaur, T. (2011). Mechanisms pertaining to arsenic toxicity. *Toxicology International*, 18(2). <https://doi.org/10.4103/0971-6580.84258>
- Souza, A. C. F., Marchesi, S. C., Domingues de Almeida Lima, G., Ferraz, R. P., Santos, F. C., da Matta, S. L. P., & 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). <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0523-0>

- Subhani, M., Mustafa, I., Alamdar, A., Katsoyiannis, I. A., Ali, N., Huang, Q., Peng, S., Shen, H., & Eqani, S. A. M. A. S. (2015). Arsenic levels from different land-use settings in Pakistan: Bio-accumulation and estimation of potential human health risk via dust exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.019>
- Vahter, M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181–182. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00285-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00285-8)
- Vormittag, E., Saldiva, P., Anastacio, A., & Barbosa, F. (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. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103566>
- Wu, B., Cui, H., Peng, X., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., & Huang, J. (2013). Dietary nickel chloride restrains the development of small intestine in broilers. *Biological Trace Element Research*, 155(2). <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9792-7>
- Wu, B., Liu, Y., Zhen, J., Mou, P., Li, J., Xu, Z., & Song, B. (2022). Protective effect of methionine on the intestinal oxidative stress and microbiota change induced by nickel. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 244. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114037>
- Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., & Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>

- Ya, J., Ju, Z., Wang, H., & Zhao, H. (2019). Exposure to cadmium induced gut histopathological damages and microbiota alterations of Chinese toad (*Bufo gargarizans*) larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.038>
- Yang, J., Feng, P., Ling, Z., Khan, A., Wang, X., Chen, Y., Ali, G., Fang, Y., Salama, E. S., Wang, X., Liu, P., & Li, X. (2023). Nickel exposure induces gut microbiome disorder and serum uric acid elevation. *Environmental Pollution*, 324. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121349>
- Yruela, I. (2013). Transition metals in plant photosynthesis. In *Metallomics* (Vol. 5, Issue 9). <https://doi.org/10.1039/c3mt00086a>
- Zambelli, B., Uversky, V. N., & Ciurli, S. (2016). Nickel impact on human health: An intrinsic disorder perspective. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1864, Issue 12). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.09.008>
- Zhang, Y., Li, Z., Kholodkevich, S., Sharov, A., Chen, C., Feng, Y., Ren, N., & Sun, K. (2020). Effects of cadmium on intestinal histology and microbiota in freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*). *Chemosphere*, 242. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125105>

3. CAPÍTULO 1: Efeitos da coexposição subcrônica de arsênio e níquel sobre o intestino delgado de ratos Wistar

3.1 Resumo

Considerando a importante função absorptiva realizada pelo intestino delgado, bem como o potencial efeito deletério de metais pesados como arsênio e níquel, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da coexposição destes metais no parênquima intestinal de ratos Wistar adultos. Ratos adultos foram distribuídos em cinco grupos experimentais (n = 10/grupo): controle (sem ingestão de metais), 1 mg L⁻¹ arsênio (As), 7 mg L⁻¹ níquel (Ni); coexposição com 1 mg L⁻¹ As + 7 mg L⁻¹ Ni (AsNi [+]) e coexposição com 0,01 mg L⁻¹ As + 0,07 mg L⁻¹ Ni (AsNi [-]). Os animais tiveram acesso às soluções (arsenito de sódio e cloreto de níquel) por meio da água de beber *ad libitum* por 70 dias, sendo eutanasiados 24 h após o último dia de exposição. O intestino foi removido e dissecado e dividido em duodeno, jejuno e íleo, para realização de análises histológicas e oxidativas. Os dados foram submetidos aos testes One-way ANOVA e Tukey (p = 0,05). As alterações histológicas observadas incluíram infiltrado inflamatório, congestão, fusão de vilosidades e descamação celular. Ratos desses dois grupos apresentaram aumento na área das mucinas ácidas em todas as regiões. A atividade de catalase foi maior em ratos que ingeriram a maior concentração de níquel e arsênio. Já a atividade de glutathione S transferase foi menor em todos os animais expostos aos dois metais, juntos ou isolados. Não foram observadas alterações na biometria corporal. Pode-se concluir que, a coexposição em um período subcrônico causou alterações histológicas e oxidativas nas regiões intestinais estudadas, mas sem aparente comprometimento na sua funcionalidade.

Palavras-chave: Trato digestivo. Metais pesados. Toxicidade. Estresse oxidativo. Histopatologias.

3.2 Introdução

Nas últimas décadas, a exploração exponencial dos recursos hídricos e terrestres tem preocupado populações em todo o mundo devido a liberação de poluentes no ambiente, consequentemente, a exposição e intoxicação por esses agentes contaminantes representam um perigo à saúde humana (Chowdhury et al., 2018; Rehman et al., 2018; Sall et al., 2020). Animais e seres humanos podem entrar em contato com metais tóxicos por várias vias, como oral, dérmica e inalatória, sendo a ingestão de alimentos e água contaminados a mais relevante (Fu & Xi, 2020). Neste contexto, no Brasil tiveram eventos de desastres ambientais ocasionando o despejo de rejeitos de mineração em canais hídricos (Noal et al., 2019). Um estudo realizado após o rompimento da barragem no município de Barra longa (Minas Gerais, Brasil) mostrou que os níveis de metais pesados na água excederam os limites recomendados por organizações nacionais e internacionais (CONAMA, 2005; OMS, 2011). Pessoas afetadas e que vivem em áreas contaminadas apresentaram no sangue a presença de metais pesados, tais como o arsênio e níquel (Vormittag et al., 2021). Dependendo da concentração e do tempo de contato, esses metais podem provocar efeitos tóxicos no organismo (Rehman et al., 2018).

O arsênio e o níquel estão onipresentes no meio ambiente tanto na forma inorgânica, quanto na forma orgânica (Azevedo et al., 2003; Xu et al., 2021). A exposição a altas concentrações de arsênio está relacionada com o desenvolvimento de doenças, como câncer, alterações vasculares, hipertensão, doenças da pele e problemas reprodutivos (Chen et al., 1992; Vahter, 2002; Souza et al., 2016; Couto-Santos et al., 2020). Já a contaminação por níquel pode causar doenças cardiovasculares, câncer do aparelho respiratório, dermatites e doenças renais (Chen et al., 2017; Genchi et al., 2020; Kumar et al., 2021). Quando a contaminação por esses metais acontece por via oral, eles serão absorvidos no intestino delgado (Subhani et al., 2015; Alamdar et al., 2016), causando danos estruturais às células

deste órgão e de outros órgãos, após distribuição do metal por via sanguínea (Souza et al., 2016; Fu & Xi, 2020). O mecanismo de toxicidade dos metais pesados geralmente envolve a geração de espécies reativas de oxigênio juntamente com o desbalanço na atividade das substâncias antioxidantes de defesa, tanto enzimáticas quanto não enzimáticas (Das & Buchner, 2007; Bisht et al., 2017; Souza et al., 2018).

Além disso, os metais podem causar danos a membranas celulares e suas enzimas, modificando estruturas proteicas importantes para o transporte de substâncias. Esses efeitos no intestino delgado são preocupantes, visto que o epitélio que reveste a parede intestinal em contato com a luz do órgão é indispensável para a digestão e absorção adequada dos nutrientes (Clevers et al., 2019). O epitélio intestinal possui regiões específicas para transportadores de nutrientes (Middendorp et al., 2014), promovendo sua absorção. Estes nutrientes caem nos vasos sanguíneos e linfáticos que estão na lâmina própria e, a partir daí, estabelecem uma via de distribuição pela circulação hepática e sistêmica. Portanto é fundamental que esse epitélio tenha um desenvolvimento correto para digestão e absorção (Clevers et al., 2019; Kwon et al., 2020; Sugimoto et al., 2021).

No geral, estudos experimentais descrevem a toxicidade do arsênio e níquel de maneira separada no intestino (Arnich et al., 2000; Brabec et al., 2020). No entanto, os seres humanos podem ser expostos diariamente a um coquetel de metais (Wu et al., 2016) como, por exemplo, uma mistura de arsênio e níquel, tanto na natureza quanto em áreas contaminadas (Khan et al., 2019; Z. Li et al., 2019; Vormittag et al., 2021). Apesar disso, pouco se sabe dos efeitos dessa mistura de metais no intestino delgado, mesmo sabendo a importante função absorptiva realizada por este órgão, bem como o potencial efeito deletério dos metais. Por isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da coexposição ao arsênio e níquel, em diferentes concentrações, sobre parâmetros histológicos e oxidativos do

intestino delgado. O fornecimento dos metais tóxicos foi realizado oralmente via água de beber *ad libitum*, com o intuito de mimetizar as condições humanas.

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Animais e comitê de ética

Este estudo faz parte de um projeto mais amplo que envolve a análise da coexposição ao arsênio e níquel em diferentes órgãos (Iasbik-Lima, 2022). Neste experimento, foram utilizados 50 ratos Wistar machos adultos (70 dias de idade) procedentes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Estes animais foram mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno, temperatura de 21 °C e fotoperíodo controlado (12/h claro/escuro), recebendo ração comercial e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais Experimentais da UFV (número de protocolo 45/2021).

3.3.2 Delineamento experimental

Após sete dias de aclimação, os animais foram divididos, aleatoriamente, em cinco grupos experimentais (10 animais/ grupo): controle (sem ingestão de metais), arsênio (As), níquel (Ni); coexposição com altas concentrações de As e Ni (AsNi [+]) e coexposição com baixas concentrações de As e Ni (AsNi [-]). Animais do grupo controle receberam solução salina 0,09%. Já os ratos dos grupos controles dos metais receberam, respectivamente, 1 mg L⁻¹ de As, na forma de arsenito de sódio (NaAsO₂.7H₂O; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO), e 7 mg L⁻¹ de Ni, na forma de cloreto de níquel (NiCl₂.6H₂O; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO). Os animais do grupo AsNi [+]) receberam uma solução contendo 1 mg L⁻¹ de arsenito de sódio + 7 mg L⁻¹ de cloreto de níquel. Estas concentrações estão próximas daquelas encontradas em áreas contaminadas, tais como no município de Barra longa (Minas Gerais - Brasil), afetado pelo rompimento da barragem de rejeitos (Vormittag et al., 2021). Já ratos do

grupo AsNi [-] receberam solução contendo 0,01 mg L⁻¹ de arsenito de sódio + 0,07 mg L⁻¹ de cloreto de níquel, com concentrações 100x menores e que correspondem às concentrações permitidas desses metais na água de beber por organizações nacionais e internacionais (OMS,2011). O fornecimento dos metais tóxicos foi realizado oralmente via água de beber *ad libitum* (Iasbik-Lima, 2022). O experimento durou 70 dias, caracterizando um período subcrônico de exposição (Li et al., 2012). Nesse período foi feito o controle diário de 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, observando sinais clínicos toxicológicos, como perda de peso, lesões cutâneas e sangramentos aparentes.

3.3.3 Eutanásia e coleta de material biológico

No dia 71º, os ratos foram pesados e colocados em jejum por 10 h. Posteriormente, eles foram sedados com xilazina 10 mg Kg⁻¹ intraperitoneal e anestesiados usando quetamina 150 mg Kg⁻¹ intraperitoneal. A anestesia foi aprofundada até a morte utilizando 50 mg Kg⁻¹ de tiopental por via intraperitoneal. Após abertura da cavidade abdominal, o intestino delgado foi removido e dissecado nas suas respectivas regiões, duodeno, jejuno e íleo. As regiões foram selecionadas de acordo com a literatura e anatomia do órgão. Para a região do duodeno foi definido os três primeiros centímetros após o final do estômago. Para o jejuno, foi definido a região medial do órgão. Já a região do íleo, foi definido a porção final próxima ao ceco no intestino grosso (Sousa, 2021). Fragmentos destas regiões oriundos de cinco animais foram fixados em formalina 10% por 24 h para as análises histológicas. Outros fragmentos das três regiões intestinais obtidos de outros cinco ratos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em -80Cº, para realização de análises enzimáticas e de marcadores de dano oxidativo.

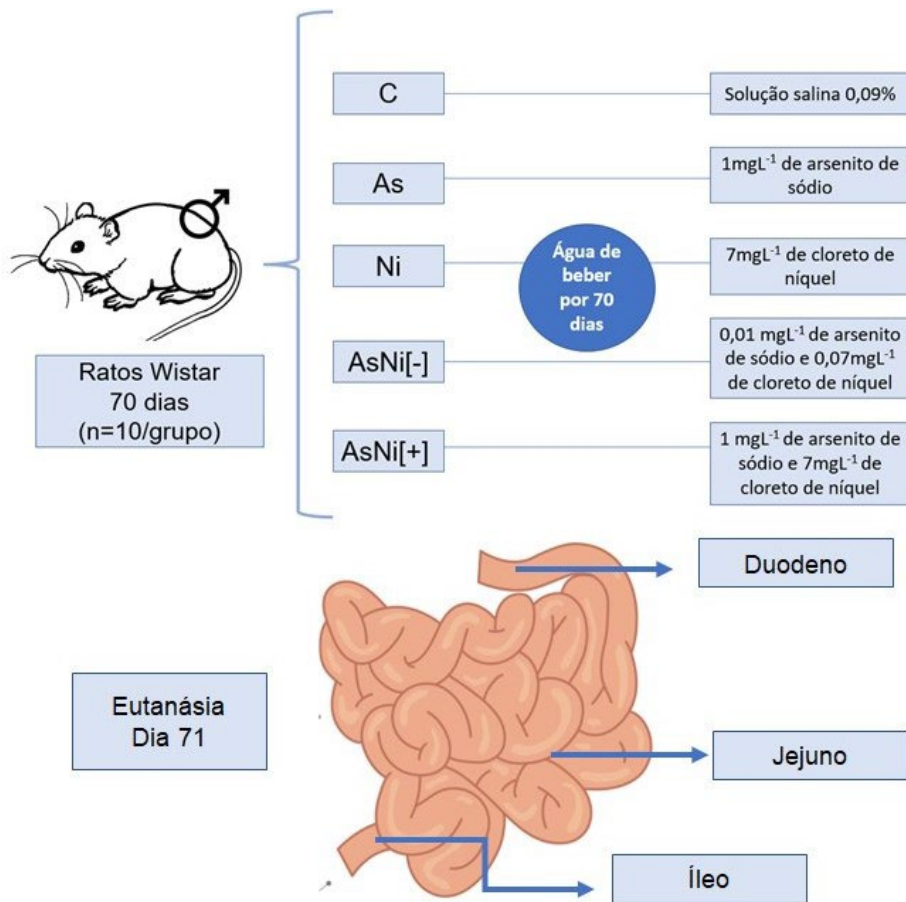


Figura 1. Esquema do delineamento experimental utilizando ratos Wistar com 70 dias de idade. Foram utilizadas diferentes concentração dos metais arsênio e níquel na água de beber durante 70 dias. No dia 71, aconteceu a eutanásia dos animais e a após a abertura da cavidade abdominal o intestino delgado foi removido, dissecado e fragmentado em duodeno, jejuno e íleo para as demais análises.

3.3.4 Processamento histológico do intestino delgado para microscopia de luz

Fragmentos do duodeno, jejuno e íleo fixados em formalina 10% foram desidratados em séries crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95%, absoluto), clarificados em xileno e embebidos em parafina. Cortes histológicos com espessura de 5 μm foram obtidos utilizando navalha de aço acoplada ao micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha). Para evitar a análise da mesma área histológica, as seções do órgão foram feitas em semi-série, descartando-se 10 cortes histológicos (50 μm) entre um e outro que foram usados nas análises. Os cortes foram esticados em água morna e coletados em lâminas histológicas. Logo após, os cortes foram corados com os corantes hematoxilina e eosina (HE)

para a visualização da organização tecidual nas três regiões do intestino delgado. Também foi utilizado a técnica histoquímica de Ácido Periódico de Schiff (PAS) conjugado com Alcian Blue, para identificação e quantificação de mucinas produzidas pelas células caliciformes. Essa técnica permite que mucinas ácidas sejam coradas apenas pelo corante Alcian Blue e mucinas neutras sejam coradas apenas com o PAS. Já a combinação desses corantes permite a visualização de mucinas mistas (Ibrahim et al., 2017). As lâminas histológicas foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). As análises foram feitas utilizando microscópio de luz (Olympus BX -53, Tóquio, Japão) nas objetivas de 10, 20 e 40x.

3.3.5 Análises histológicas e histomorfométricas

A avaliação histológica foi feita qualitativamente para observação de aspectos relacionados com a organização estrutural típica de cada uma das três regiões do intestino delgado, como presença de vilosidades intestinais, criptas, glândulas e composição das camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa. Posteriormente, as regiões intestinais foram quantificadas a ocorrência de alterações histológicas. Para isso, foram avaliados 90 campos histológicos por animal em microscópio óptico (Olympus CX40, Tóquio, Japão) na objetiva de 40x, sendo a contagem realizada da seguinte forma: 30 campos com foco no epitélio, 30 campos com foco na lâmina própria e 30 campos com foco na submucosa, utilizando os cortes histológicos corados em HE. Para cada uma dessas áreas, os achados histológicos foram classificados em três níveis, considerando o grau de importância das lesões, seguindo o protocolo de Barišić et al. (2018) modificado:

Nível 1 (sem alterações histológicas): Nesta classificação foram observadas características normais quanto a estrutura de cada uma das regiões intestinais, como aspectos das vilosidades e criptas, ocorrência de epitélio de revestimento simples colunar, apresentando células altas e núcleos alongados no sentido do maior eixo da célula, composição e espessura da lâmina

própria, composta por tecido conjuntivo frouxo, e camada submucosa formada por tecido conjuntivo denso rico em vasos sanguíneos e linfáticos;

Nível 2: Presença de alterações histológicas consideradas leves, como hiperplasia, descamação celular e aumento considerável da lâmina própria;

Nível 3: Presença de alterações histológicas consideradas graves, com potencial de comprometer a função do parênquima, tais como aparência celular irregular, fusão de vilosidades, congestão vascular e infiltrados inflamatórios (Barišić et al., 2018). Os resultados foram expressos em porcentagem.

Para as análises histomorfométricas, 25 cortes corados com HE foram fotografados na objetiva de 10x em fotomicroscópio (Olympus AX 70 TRF, Tóquio, Japão) para uso no programa de análise de imagens Image ProPlus. Foram realizadas 50 medidas para cada parâmetro nas fotomicrografias do duodeno, jejuno e íleo como mostra a figura 2. A altura da vilosidade foi medida traçando uma linha desde a base da vilosidade até o ápice da vilosidade. Já o diâmetro da vilosidade foi traçado uma linha entre o ápice de um enterócito e outro na horizontal. O diâmetro da lâmina própria foi medido traçando uma linha horizontal abrangendo toda essa região. Para a altura do epitélio foi traçado uma linha vertical sobre todo o epitélio. Já a espessura mucosa, foi traçada uma linha em toda essa camada, desde o ápice da vilosidade até a base da cripta. Para as medidas da espessura submucosa, espessura muscular, espessura musculo circular e espessura musculo longitudinal, foram traçadas linhas verticais abrangendo toda a área das respectivas camadas (Fig 2). Os resultados foram expressos em micrômetros (μm).

Para a quantificação e identificação de mucinas, 25 cortes corados com PAS conjugado com Alcian Blue em cada região, foram fotografados utilizando a objetiva de 40x



Figura 3: Paleta de cor utilizada para contagem de pixel através da colorimetria no programa Image ProPlus.

3.3.6 Ensaio de atividade enzimática e marcadores de dano oxidativo

Fragmentos intestinais de 100 mg congelados foram homogeneizados (homogeneizador Tissue Master 125, OMNI) em tampão fosfato (pH 7.4) e centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi separado do pellet e usado na quantificação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-s-transferase (GST), e de metabólitos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA). A atividade de SOD foi avaliada pelo método de pirogalol, baseado na habilidade desta enzima de catalisar a reação do superóxido (O_2) e peróxido de hidrogênio (Dieterich et al., 2000). Já atividade de CAT foi analisada de acordo com o método de Aebi (1984), pela mensuração da cinética de decomposição do peróxido de hidrogênio. A atividade de GST foi avaliada segundo método descrito por Habig et al. (1974), que calcula taxa de oxidação de NADPH. Já a peroxidação lipídica foi examinada analisando-se os níveis teciduais de malondialdeído (MDA), conforme metodologia descrita por Buege & Aust (1978). Tais análises foram realizadas em leitor de microplaca ELISA (Multiskan GO, Thermo Scientific).

3.3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram submetidos ao teste de análise de variância unidirecional

(one way ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste *post hoc* de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DP).

3.4 Resultados

3.4.1 Consumo diário das soluções de arsênio e níquel, peso corporal e sinais clínicos

Animais expostos somente ao arsenito de sódio ingeriram $0,12 \pm 0,01$ mg Kg⁻¹ por dia de As. Já animais expostos ao cloreto de níquel ingeriram $0,78 \pm 0,05$ mg Kg⁻¹ por dia de Ni. Animais expostos a baixas concentrações dos dois metais simultaneamente consumiram um valor médio de $0,002 \pm 0,01$ mg Kg⁻¹ de As e $0,14 \pm 0,03$ mg Kg⁻¹ de Ni. Animais do grupo que recebeu as maiores concentrações dos dois metais consumiram simultaneamente uma média diária de $0,11 \pm 0,01$ mg Kg⁻¹ de As e $0,79 \pm 0,06$ mg Kg⁻¹ de Ni. O peso final médio dos ratos não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 4). Não foram observados em nenhum dos animais sinais clínicos característicos de intoxicação durante o período experimental.

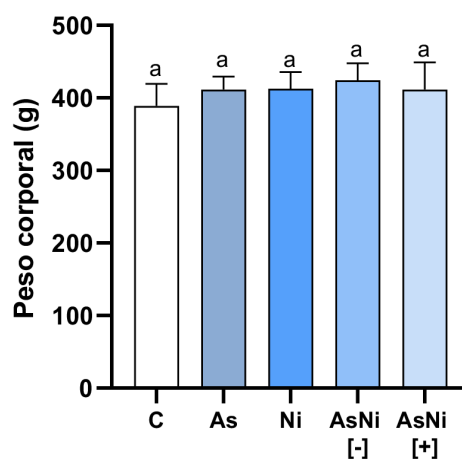


Figura 4: Peso corporal de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio (As) e níquel (Ni) na água de beber por 70 dias. C = controle; As = 1 mg L⁻¹ de arsênio; Ni = 7 mg L⁻¹ de níquel; AsNi [-] = 0,01 mg L⁻¹ de arsênio e 0,07 mg L⁻¹ de níquel; AsNi [+] = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel. $P > 0,05$. (n = 5 animais/grupo).

3.4.2 Análises histológicas e histoquímicas do duodeno

Ao analisar lâminas coradas com HE, animais do grupo controle apresentaram o trato duodenal com as quatro camadas, mucosa, submucosa, muscular e serosa. A camada mucosa apresentou vilosidades com formato semelhante a folhas (Fig. 5A). O epitélio que revestia essas vilosidades se mostrou do tipo simples, contendo células colunares. Abaixo do epitélio foi observada a presença de lâmina própria e uma fina camada de músculo liso. Já a camada submucosa apresentou tecido conjuntivo denso e não foram observadas glândulas de Brunner. Em seguida foram observadas as camadas musculares, composta por uma camada circular interno e outra longitudinal externo. Por fim, a camada serosa apresentou um epitélio pavimentoso.

Quanto aos achados patológicos, a maioria dos animais do grupo controle não apresentaram alterações relevantes (achados de nível 1) nas regiões do epitélio, lâmina própria e submucosa (Tab. 1). Quando encontradas algumas alterações de nível 2, estas se mostraram principalmente relacionadas com proliferação celular no epitélio (Fig. 5A). Não foram encontradas lesões classificadas como nível 3 (Tab. 1). Animais dos grupos As, Ni, AsNi[-] e AsNi[+] apresentaram alto percentual de áreas de epitélio, lâmina própria e submucosa com aspecto normal (Nível 1; Tab. 1) em relação às outras alterações (nível 2 e 3).

As porcentagens de alterações do nível 2 foram maiores em áreas epiteliais de ratos dos grupos As, Ni e AsNi[-], em relação a ocorrência de alterações de nível 2 na lâmina própria e submucosa. Já os animais do grupo AsNi[+] tiveram o percentual igual de alterações nível 2 em áreas do epitélio e lâmina própria, esse percentual foi maior quando comparado com a submucosa. Quanto a ocorrência de lesões nível 3, ratos dos grupos As e Ni, nas três áreas da parede duodenal apresentaram a menor porcentagem. Em animais dos grupos AsNi[-] e AsNi[+], a ocorrência de lesões nível 3 foi maior quando comparada aos grupos controle, As e Ni em todas as áreas da parede duodenal. Em ratos do grupo AsNi[-] as lesões nível 3

foram maiores em áreas epiteliais em relação a lâmina própria e submucosa. Já em animais do grupo AsNi[+], o percentual de alterações nível 3 foi maior em áreas da lamina própria em relação a área epitelial e submucosa. Ratos expostos ao As e Ni separadamente mostraram como principal alteração a fusão de vilosidades (Tab 1; Fig. 5D, G). Os animais dos grupos AsNi[-] e AsNi[+], apresentaram como principais lesões, fusão de vilosidades e descamação celular (Tab 1; Fig. 5J, M).

Tabela 1. Histopatologia do duodeno de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio e níquel na água de beber por 70 dias.

Parâmetros	Controle	As 1 mgL ⁻¹	Ni 7 mgL ⁻¹	AsNi [-]	AsNi [+]
<i>Epitélio</i>					
Nível 1	27 (90%)	24 (80%)	24 (80%)	21 (70%)	20,6 (69%)
Nível 2	3 (10%)	5 (17%)	4,8 (16%)	4,5 (15%)	4,5 (15%)
Nível 3	0 (0%)	1 (3%)	1,2 (4%)	4,5 (15%)	4,9 (16%)
<i>Lâmina própria</i>					
Nível 1	29,4 (98%)	27,8 (93%)	27,8 (93%)	23,2 (77%)	20,2 (67%)
Nível 2	0,6 (2%)	1,4 (4%)	1,6 (5%)	3 (10%)	4,5 (15%)
Nível 3	0 (0%)	0,8 (3%)	0,6 (2%)	3,8 (13%)	5,3 (18%)
<i>Camada Submucosa</i>					
Nível 1	29,6 (99%)	30 (100%)	28,8 (96%)	23,9 (79%)	23,4 (78%)
Nível 2	0,4 (1%)	0 (0%)	0,6 (2%)	2,3 (8%)	3 (10%)
Nível 3	0 (0%)	0 (0%)	0,6 (2%)	3,8 (13%)	3,6 (12%)

Trinta secções histológicas analisadas por parâmetro. Resultados expressos em média e percentual %. (n = 5 animais/grupo). AsNi[-]= 0,01 mgL⁻¹ de arsênio e 0,07 mgL⁻¹ de níquel; AsNi[+] = 1 mgL⁻¹ de arsênio e 7 mgL⁻¹ de níquel. Nível 1: sem alterações histológicas; Nível 2: alterações histológicas leves; Nível 3: alterações histológicas graves.

As análises histomorfométricas do duodeno mostraram que os diâmetros das vilosidades e da lâmina própria aumentaram em ratos do grupo AsNi[+] quando comparados com ratos dos grupos controle e As ($p < 0,05$; Tab. 2). Já a espessura da mucosa foi menor somente em animais do grupo AsNi[-] em relação aos animais do grupos controle, As, Ni e AsNi[+] ($p < 0,05$; Tab. 2). Outros parâmetros histomorfométricos, como altura do epitélio, altura das vilosidades, espessura de submucosa, muscular total, muscular circular e longitudinal, não apresentaram diferenças entre ratos controle e aqueles expostos aos metais administrados sozinhos ou simultaneamente ($p > 0,05$; Tab. 2).

Tabela 2. Comparação dos parâmetros histomorfométricos do duodeno de ratos Wistar expostos à arsênio e níquel, isolada e simultaneamente, na água de beber por 70 dias.

Parâmetros (μm)	Controle	As 1 mg L ⁻¹	Ni 7 mg L ⁻¹	AsNi [-]	AsNi [+]
Altura da vilosidade	361,97 \pm 37,06 ^a	348,62 \pm 27,14 ^a	381,74 \pm 20,52 ^a	358,97 \pm 48,81 ^a	400,38 \pm 51,70 ^a
Diâmetro da vilosidade	86,43 \pm 3,57 ^{ab}	83,23 \pm 9,25 ^a	101,17 \pm 10,58 ^{bc}	99,27 \pm 9,31 ^{abc}	104,18 \pm 11,38 ^c
Diâmetro lâmina própria	58,42 \pm 2,90 ^a	60,02 \pm 9,13 ^a	74,10 \pm 10,33 ^{ab}	75,04 \pm 10,25 ^{ab}	78,46 \pm 13,19 ^b
Altura do epitélio	28,01 \pm 1,94 ^a	23,21 \pm 3,24 ^a	27,07 \pm 2,34 ^a	24,23 \pm 4,13 ^a	25,72 \pm 3,13 ^a
Espessura mucosa	556,07 \pm 79,19 ^a	615,95 \pm 18,53 ^a	645,31 \pm 52,62 ^a	440,08 \pm 66,39 ^b	555,68 \pm 42,08 ^a
Espessura submucosa	55,73 \pm 7,40 ^a	43,06 \pm 1,86 ^a	50,76 \pm 3,13 ^a	49,08 \pm 13,92 ^a	60,68 \pm 7,36 ^a
Espessura muscular total	74,09 \pm 6,72 ^a	65,46 \pm 7,90 ^a	69,99 \pm 11,39 ^a	93,75 \pm 16,91 ^a	94 \pm 11,50 ^a
Espessura muscular circular	40,53 \pm 3,82 ^a	38,31 \pm 7,31 ^a	43,18 \pm 6,04 ^a	51,94 \pm 11,17 ^a	52,54 \pm 9,56 ^a
Espessura muscular longitudinal	33,56 \pm 6,48 ^a	27,15 \pm 4,53 ^a	26,68 \pm 5,80 ^a	41,81 \pm 6,06 ^a	45,93 \pm 2,76 ^a

Média \pm DP. AsNi[-] = 0,01 mg L⁻¹ de arsênio e 0,07 mg L⁻¹ de níquel; AsNi[+] = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel. ^{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).

Lâminas coradas com PAS conjugado com Alcian blue evidenciaram os glicoconjugados presentes nas mucinas (Fig. 6). Os achados foram descritos na Tabela 3. Animais dos grupos Ni e AsNi[+] apresentaram maior área de mucinas ácidas na mucosa do duodeno que ratos do grupo controle ($p < 0,05$;). As mucinas mistas também aumentaram nos grupos Ni e AsNi[-] em comparação com os grupos controle, As e AsNi[+] ($p < 0,05$; Tabela 3). As mucinas neutras não alteraram entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3. Percentual da área de mucinas na mucosa do duodeno de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio e níquel isolada e simultaneamente por 70 dias.

Mucinas	Controle	As 1 mg L ⁻¹	Ni 7 mg L ⁻¹	AsNi [-]	AsNi [+]
Ácidas	8,04 ± 3,43 ^a	12,42 ± 2,39 ^{ab}	14,11 ± 4,01 ^b	12,43 ± 0,47 ^{ab}	15,30 ± 3,79 ^b
Neutras	1,07 ± 0,27 ^a	1,27 ± 0,52 ^a	1,81 ± 0,25 ^a	1,41 ± 0,15 ^a	1,35 ± 0,67 ^a
Mistas	1,64 ± 0,87 ^a	1,78 ± 0,29 ^a	3,08 ± 0,66 ^b	2,89 ± 0,44 ^b	1,49 ± 0,57 ^a

Mensuração de mucinas obtida por colorimetria, calculando-se a área da coloração por área do campo. Dados expressos média ± DP. AsNi[-] = 0,01 mg L⁻¹ de arsênio e 0,07 mg L⁻¹ de níquel; AsNi[+] = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel. ^{a,b,c}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre os grupos (one way ANOVA e teste de Tukey; $p < 0,05$). (n = 5 animais/grupo).

3.4.3 Análises histológicas e histoquímicas do jejuno

Ao analisar lâminas coradas com HE, animais do grupo controle apresentaram o trato jejunal, com as quatro camadas, mucosa, submucosa, muscular e serosa. Com as mesmas características descritas na região do duodeno. No entanto, a camada mucosa apresentou vilosidades com formato mais alongado quando comparada a região do duodeno (Fig. 5B). Quanto aos achados patológicos, a maioria dos animais do grupo controle não apresentaram alterações relevantes (achados de nível 1) nas regiões do epitélio, lâmina própria e submucosa (Tab. 4). Quando encontradas algumas alterações, estas se mostraram principalmente relacionadas com fusão de vilosidades (Fig. 5B). Animais dos grupos As, Ni, AsNi[-] e

AsNi[+] apresentaram maior percentual de alterações em áreas de epitélio, lâmina própria e submucosa com aspecto normal (Tab. 4). Em seguida, as porcentagens de alterações do nível 2 foram maiores em áreas epiteliais de ratos dos grupos As, Ni, AsNi[-] e AsNi[+], em relação a ocorrência de alterações de nível 2 na lâmina própria e submucosa. A ocorrência de lesões nível 3 foi baixa em ratos dos grupos As e Ni, nas três áreas da parede intestinal. Já em animais dos grupos AsNi[-] e AsNi[+], a ocorrência de lesões nível 3 foi maior quando comparada aos grupos controle, As e Ni (Tab. 4). Já em animais dos grupos AsNi[-] e AsNi[+], o percentual de alterações nível 3 foi maior em áreas da lamina própria em relação a área epitelial e submucosa. Ratos expostos ao As apresentaram hiperplasia e fusão de vilosidades (Tab. 4; Fig. 5E). Já os animais do grupo exposto ao Ni apresentaram fusão de vilosidades, presença de infiltrado inflamatório, descamação celular e morte celular nas vilosidades (Tab. 4; Fig. 5H). Ratos do grupo AsNi[-] apresentaram fusão de vilosidades, descamação celular e presença de infiltrado inflamatório (Tab. 4; Fig. 5K). Por fim, os animais do grupo AsNi[+] apresentaram congestão vascular, fusão de vilosidades, descamação celular e hiperplasia (Tab. 4; Fig. 5N).

Tabela 4. Histopatologia do jejuno de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio e níquel na água de beber por 70 dias.

Parâmetros	Controle	As 1 mgL ⁻¹	Ni 7 mgL ⁻¹	AsNi [-]	AsNi [+]
<i>Epitélio</i>					
Nível 1	28 (93%)	25,2 (84%)	25,1 (83%)	21 (70%)	20,4 (68%)
Nível 2	2 (7%)	4,2 (14%)	4,3 (15%)	4,6 (15%)	5,4 (18%)
Nível 3	0 (0%)	0,6 (2%)	0,6 (2%)	4,4 (15%)	4,2 (14%)
<i>Lâmina própria</i>					
Nível 1	29,6 (99%)	27,2 (91%)	27,2 (91%)	20,8 (69%)	20,6 (69%)
Nível 2	0,4 (1%)	1 (3%)	1,5 (5%)	3,6 (12%)	4,4 (15%)
Nível 3	0 (0%)	1,8 (6%)	1,3 (4%)	5,6 (19%)	5 (16%)
<i>Camada Submucosa</i>					
Nível 1	29,6 (99%)	28,4 (95%)	29,2 (97%)	24,8 (83%)	22,6 (75%)
Nível 2	0,4 (1%)	0 (0%)	0,8 (3%)	3,2 (10%)	3,4 (11%)
Nível 3	0 (0%)	1,6 (5%)	0 (0%)	2 (7%)	4 (14%)

Trinta secções histológicas analisadas por parâmetro. Resultados expressos em média do grupo e percentual %. (n = 5 animais/grupo). AsNi[-]= 0,01 mgL⁻¹ de arsênio e 0,07 mgL⁻¹ de níquel; AsNi[+] = 1 mgL⁻¹ de arsênio e 7 mgL⁻¹ de níquel. Nível 1: sem alterações histológicas; Nível 2: alterações histológicas leves; Nível 3: alterações histológicas graves.

As análises histomorfométricas do jejuno de ratos controle e contaminados (Tab. 5) mostraram que a altura das vilosidades, altura do epitélio, espessura das camadas mucosa e submucosa diminuíram no jejuno de ratos expostos às misturas de metais, nas duas concentrações usadas, em relação ao grupo controle, As e Ni ($p < 0,05$). Por outro lado, observou-se aumento no diâmetro das vilosidades, diâmetro da lâmina própria em animais dos grupos Ni, AsNi[-] e AsNi[+] em relação a animais do grupo controle, e grupo As no caso do diâmetro da lâmina própria ($p < 0.05$; Tab. 5). Nota-se ainda que a camada muscular total foi menor em animais do grupo Ni e AsNi[-] quando comparadas a ratos do grupo controle ($p < 0.05$). Já no grupo AsNi[-], a camada muscular circular diminuiu em relação a medida observada no jejuno de ratos dos grupos controle, As e AsNi[+] ($p < 0.05$).

Tabela 5. Comparação dos parâmetros histomorfométricos do jejuno de ratos Wistar expostos à arsênio e níquel, isolada e simultaneamente na água de beber por 70 dias.

Parâmetros (μm)	Controle	As 1 mgL^{-1}	Ni 7 mgL^{-1}	AsNi [-]	AsNi [+]
Altura da vilosidade	557,83 \pm 19,03 ^a	549,01 \pm 42,40 ^a	501,82 \pm 28,05 ^{ab}	455,85 \pm 53,54 ^b	450,19 \pm 30,73 ^b
Diâmetro da vilosidade	78,26 \pm 5,09 ^a	86,70 \pm 11,59 ^{ab}	98,33 \pm 12,62 ^b	104,07 \pm 11,23 ^b	100,21 \pm 5,15 ^b
Diâmetro lâmina própria	52,13 \pm 5,52 ^a	59,89 \pm 11,27 ^a	72,09 \pm 13,71 ^b	81,50 \pm 10,72 ^b	80,02 \pm 6,29 ^b
Altura epitélio	26,12 \pm 1,25 ^a	26,80 \pm 1,82 ^a	26,24 \pm 1,78 ^a	22,56 \pm 1,95 ^b	20,18 \pm 1,47 ^b
Espessura mucosa	760,57 \pm 24,33 ^a	745,49 \pm 61,87 ^a	733,06 \pm 55,88 ^{ab}	601,00 \pm 56,61 ^c	653,85 \pm 20,12 ^{bc}
Espessura submucosa	74,64 \pm 22,52 ^a	62,19 \pm 10,89 ^{ab}	57,92 \pm 11,55 ^{abc}	37,49 \pm 1,99 ^c	45,70 \pm 5,37 ^{bc}
Espessura muscular total	97,25 \pm 13,17 ^a	90,81 \pm 16,44 ^{ab}	55,41 \pm 8,29 ^b	71,31 \pm 7,15 ^b	81,95 \pm 10,49 ^{ab}
Espessura muscular circular	56,16 \pm 7,77 ^a	53,89 \pm 11,05 ^a	33,96 \pm 5,00 ^b	38,53 \pm 3,46 ^b	46,75 \pm 5,39 ^a
Espessura muscular longitudinal	41,09 \pm 10,08 ^a	36,92 \pm 7,77 ^a	21,44 \pm 4,74 ^b	32,77 \pm 5,17 ^{ab}	35,19 \pm 6,28 ^a

Média \pm DP. AsNi[-] = 0,01 mg L^{-1} de arsênio e 0,07 mg L^{-1} de níquel; AsNi[+] = 1 mg L^{-1} de arsênio e 7 mg L^{-1} de níquel. ^{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).

Os achados da histoquímica do jejuno foram descritos na Tabela 6. Observou-se um aumento na área de mucinas ácidas no jejuno de animais do grupo AsNi[-] em relação aos animais do grupo controle e As ($p < 0,05$). Já a área de mucinas mistas e mucinas neutras não alteraram entre grupos experimentais ($p > 0,05$; Tab. 6).

Tabela 6. Percentual da área de mucinas na mucosa do jejuno de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio e níquel isolada e simultaneamente por 70 dias.

Mucinas	Controle	As 1 mgL ⁻¹	Ni 7 mgL ⁻¹	AsNi [-]	AsNi [+]
Ácidas	12,85 ± 1,12 ^a	15,62 ± 4,83 ^a	18,40 ± 3,94 ^{ab}	22,32 ± 1,15 ^b	17,25 ± 2,07 ^{ab}
Neutras	1,45 ± 1,25 ^a	0,74 ± 0,09 ^a	0,97 ± 0,50 ^a	0,54 ± 0,15 ^a	0,33 ± 0,06 ^a
Mistas	3,18 ± 2,09 ^a	2,59 ± 0,59 ^a	2,91 ± 0,89 ^a	1,64 ± 0,45 ^a	1,61 ± 0,36 ^a

Mensuração de mucinas obtida por colorimetria, calculando-se a área da coloração por área do campo. Dados expressos média ± DP. AsNi[-] = 0,01 mg L⁻¹ de arsênio e 0,07 mg L⁻¹ de níquel; AsNi[+] = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel. ^{a,b,c}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre os grupos (one way ANOVA e teste de Tukey; $p < 0,05$). (n = 5 animais/grupo).

3.4.4 Análises histológicas e histoquímicas do íleo

Ao analisar lâminas coradas com HE animais do grupo controle apresentaram o parênquima, com as quatro camadas do órgão, mucosa, submucosa, muscular e serosa. A camada mucosa apresentou vilosidades curtas, quando comparadas com as vilosidades do duodeno e jejuno, e a presença de placas de Peyer na camada submucosa (Fig. 5C). Quanto aos achados patológicos, a maioria dos animais do grupo controle não apresentou alterações (achados de nível 1) em epitélio, lâmina própria e submucosa (Tab. 7). Quando encontradas algumas alterações, estas se mostraram principalmente relacionadas com descamação celular no epitélio (Tab. 7; Fig. 5C). Em seguida, as porcentagens de alterações do nível 2 foram maiores em áreas epiteliais de ratos dos grupos As e Ni, em relação a ocorrência de alterações

de nível 2 na lâmina própria e submucosa. Em ratos do grupo AsNi[-], as alterações de nível 2 foram maiores em áreas da lâmina própria, em relação a ocorrência de lesões de nível 2 no epitélio e submucosa. Já os animais do grupo AsNi[+] tiveram o percentual igual de alterações nível 2 em áreas do epitélio e lâmina própria. Esse percentual foi maior quando comparado com a submucosa.

A ocorrência de lesões nível 3 foi baixa em ratos dos grupos As e Ni, nas três áreas da parede intestinal. Já em animais dos grupos AsNi[-] e AsNi[+], a ocorrência de lesões nível 3 foi maior quando comparada aos grupos controle, As e Ni (Tab. 7). Ratos do grupo AsNi[-] apresentaram maior percentual de alterações nível 3 em áreas da lâmina própria, depois em áreas do epitélio e o menor percentual em áreas da submucosa. Já os animais do grupo AsNi[+], os percentuais de nível 3 foram iguais em áreas do epitélio e lâmina própria e foram menores em áreas da submucosa. Ratos do grupo As, apresentaram presença de infiltrado inflamatório (Tab. 7; Fig 5F). Em animais do grupo Ni, foram encontrados infiltrados inflamatórios, descamação celular e fusão de vilosidades (Tab 7; Fig. 5I). Nos grupos AsNi[-] e AsNi[+], os achados foram semelhantes. Foram encontrados fusão de vilosidades, presenças de infiltrados inflamatórios, descamação celular e aumento considerável da lâmina própria. Além disso, foi notado um aumento nas placas de peyer quando comparadas com os grupos controle, As e Ni. Também foi observado o extravasamento dessas placas para a camada mucosa (Tab 7; Fig. 5L, O).

Tabela 7. Histopatologia do íleo de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio e níquel na água de beber por 70 dias.

Parâmetros		C	As	Ni	AsNi [-]	AsNi [+]
<i>Epitélio</i>						
	Nível 1	28 (93%)	23,8 (79%)	23,8 (79%)	22,6 (75%)	20,8 (69%)
	Nível 2	2 (7%)	3,2 (11%)	3,2 (10%)	3,6 (12%)	4 (14%)
	Nível 3	0 (0%)	3 (10%)	3 (11%)	3,8 (13%)	5,8 (17%)
<i>Lâmina própria</i>						
	Nível 1	28 (93%)	25,2 (84%)	25,2 (87%)	20,6 (69%)	20,8 (69%)
	Nível 2	2 (7%)	2 (7%)	2 (5%)	3,8 (12%)	4 (15%)
	Nível 3	0 (0%)	2,8 (9%)	2,8 (8%)	5,6 (19%)	5,8 (16%)
<i>Camada Submucosa</i>						
	Nível 1	29,6 (99%)	30 (100%)	29,4 (98%)	24,6 (83%)	22,2 (74%)
	Nível 2	0,4 (1%)	0 (0%)	0,6 (2%)	2,6 (10%)	3,8 (13%)
	Nível 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2,8 (7%)	4 (13%)

30 secções analisadas por parâmetro. Resultados expressos em média do grupo e percentual %. (n = 5 animais/grupo). AsNi[-] = 0,01 mgL⁻¹ de arsênio e 0,07 mgL⁻¹ de níquel; AsNi[+] = 1 mgL⁻¹ de arsênio e 7 mgL⁻¹ de níquel. Nível 1: sem alterações histológicas; Nível 2: alterações histológicas leves; Nível 3: alterações histológicas graves.

As análises histomorfométricas da parede do íleo mostraram que a altura das vilosidades foi maior em animais do grupo AsNi[-] quando comparado com os grupos controle, As, Ni e AsNi[+] ($p < 0.05$; Tab. 8). Além disso, observou-se aumento no diâmetro das vilosidades e diâmetro da lâmina própria em animais de todos os grupos experimentais quando comparados a ratos do grupo controle ($p < 0.05$). A altura do epitélio também foi maior em animais do grupo AsNi[-] em relação à média observada no íleo de ratos dos grupos controle e Ni ($p < 0.05$; Tab. 8) Por fim, a espessura das camadas mucosa, submucosa e muscular não alteraram nos grupos experimentais ($p > 0,05$; Tab. 8).

Tabela 8 – Comparação dos parâmetros histomorfométricos do íleo de ratos Wistar expostos à arsênio e níquel, isolada e simultaneamente na água de beber por 70 dias.

Parâmetros (μm)	Controle	As 1 mgL^{-1}	Ni 7 mgL^{-1}	AsNi [-]	AsNi [+]
Altura da vilosidade	257,39 \pm 17,05 ^a	319,73 \pm 45,03 ^a	275,63 \pm 46,93 ^a	384,57 \pm 34,61 ^b	300,25 \pm 9,99 ^a
Diâmetro da vilosidade	67,98 \pm 5,52 ^a	99,84 \pm 5,79 ^b	108,57 \pm 4,89 ^b	124,57 \pm 17,01 ^b	108,68 \pm 9,36 ^b
Diâmetro lâmina própria	50,01 \pm 5,05 ^a	74,99 \pm 5,04 ^b	89,78 \pm 4,09 ^b	98,12 \pm 16,88 ^b	87,47 \pm 8,88 ^b
Altura epitélio	17,97 \pm 1,68 ^c	24,84 \pm 1,52 ^{ab}	18,79 \pm 2,24 ^c	26,45 \pm 2,20 ^a	21,22 \pm 2,78 ^{bc}
Espessura mucosa	436,59 \pm 17,17 ^a	427,00 \pm 44,84 ^a	381,13 \pm 40,10 ^a	518,41 \pm 83,93 ^a	441,69 \pm 22,58 ^a
Espessura submucosa	33,26 \pm 4,58 ^a	45,46 \pm 10,41 ^a	35,13 \pm 4,79 ^a	48,18 \pm 72,77 ^a	43,89 \pm 23,59 ^a
Espessura muscular	66,43 \pm 8,08 ^a	83,77 \pm 23,52 ^a	71,33 \pm 9,62 ^a	79,88 \pm 10,47 ^a	84,63 \pm 8,46 ^a
Espessura muscular circular	35,38 \pm 3,32 ^a	49,52 \pm 19,74 ^a	43,89 \pm 6,89 ^a	48,20 \pm 9,04 ^a	48,22 \pm 7,13 ^a
Espessura muscular longitudinal	31,05 \pm 6,00 ^a	34,24 \pm 4,96 ^a	27,44 \pm 4,97 ^a	31,67 \pm 5,80 ^a	36,4 \pm 2,82 ^a

Média \pm DP. AsNi[-] = 0,01 mg L^{-1} de arsênio e 0,07 mg L^{-1} de níquel; AsNi[+] = 1 mg L^{-1} de arsênio e 7 mg L^{-1} de níquel. ^{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).

A análise da área das mucinas ácidas apontou para um maior percentual dessa secreção no íleo de ratos do grupo AsNi[+] em relação ao percentual observado em ratos dos grupos controle, As e Ni ($p < 0,05$; Tab. 9). Enquanto o percentual de mucinas neutras foi menor na mucosa do íleo de animais do grupo AsNi[+] em relação aos ratos do grupo Ni ($p < 0,05$), não foram observadas diferenças entre os grupos para a área das mucinas mistas ($p > 0,05$; Tab. 9).

Tabela 9. Percentual da área de mucinas na mucosa do íleo de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio e níquel isolada e simultaneamente por 70 dias.

Mucinas	Controle	As 1 mgL ⁻¹	Ni 7 mgL ⁻¹	AsNi [-]	AsNi [+]
Ácidas	18,89 ± 3,92 ^a	19,24 ± 3,13 ^a	19,95 ± 5,34 ^a	22,44 ± 3,58 ^{ab}	28,93 ± 4,76 ^b
Neutras	0,67 ± 0,26 ^{ab}	0,60 ± 0,22 ^{ab}	1,16 ± 0,64 ^b	0,59 ± 0,07 ^{ab}	0,10 ± 0,10 ^a
Mistas	0,97 ± 0,14 ^a	2,02 ± 1,03 ^a	2,28 ± 1,10 ^a	1,86 ± 0,53 ^a	0,44 ± 0,10 ^a

Mensuração de mucinas obtida por colorimetria, calculando-se a área da coloração por área do campo. Dados expressos média ± DP. AsNi[-] = 0,01 mg L⁻¹ de arsênio e 0,07 mg L⁻¹ de níquel; AsNi[+] = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel. ^{a,b,c}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre os grupos (one way ANOVA e teste de Tukey; $p < 0,05$). (n = 5 animais/grupo).

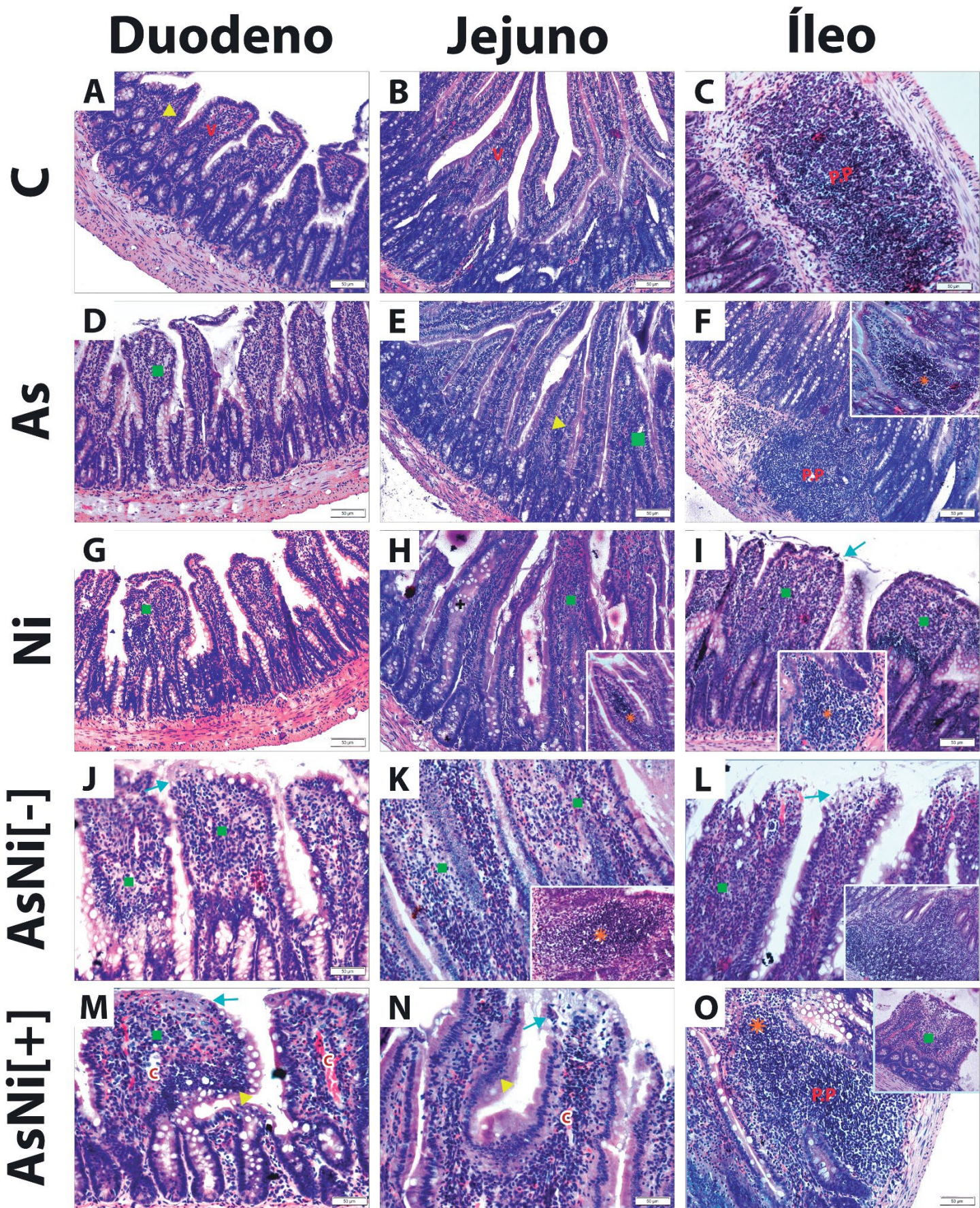


Figura 5: Fotomicrografias do trato intestinal de ratos Wistar submetidos a coexposição subcrônica de arsênio e níquel na água de beber por 70 dias. A, B, C retratam o trato intestinal em condições normais, composto por suas túnicas e suas vilosidades (V). Na letra A, o triângulo chama atenção para um aumento de células. Em C, chama-se atenção para a placa de Peyer (P.P). As figuras D, E, e F, são compostas por fotomicrografias do trato intestinal de animais desafiados pela exposição ao arsênio. É possível observar a presença de fusão de vilosidades (quadrado), hiperplasia (triângulo), infiltrado inflamatório (asterisco) e um extravasamento da placa de Peyer (P.P). Nas fotomicrografias G, H e I, observamos o trato intestinal de animais expostos ao níquel, sendo visível fusão de vilosidades (quadrado), infiltrado inflamatório (asterisco). Nas figuras J, K e L, a respeito de animais desafiados com a coexposição de arsênio e níquel na menor dose, revelam a presença de infiltrado inflamatório (asterisco), fusão de vilosidades (quadrado), descamação celular (seta) e extravasamento da placa de Peyer (P.P). As fotomicrografias M, N e O retratam o trato intestinal de animais desafiados com a coexposição de arsênio e níquel na maior dose. É possível observar alterações semelhantes aos demais grupos, como a presença de fusão de vilosidades (quadrado), hiperplasia (triângulo), extravasamento da placa de Peyer (P.P), descamação celular (seta) e congestão vascular (C). C = controle; As = 1 mg L⁻¹ de arsênio; Ni = 7 mg L⁻¹ de níquel; AsNi[-] = 0,01 mg L⁻¹ de arsênio e 0,07 mg L⁻¹ de níquel; AsNi[+] = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel.

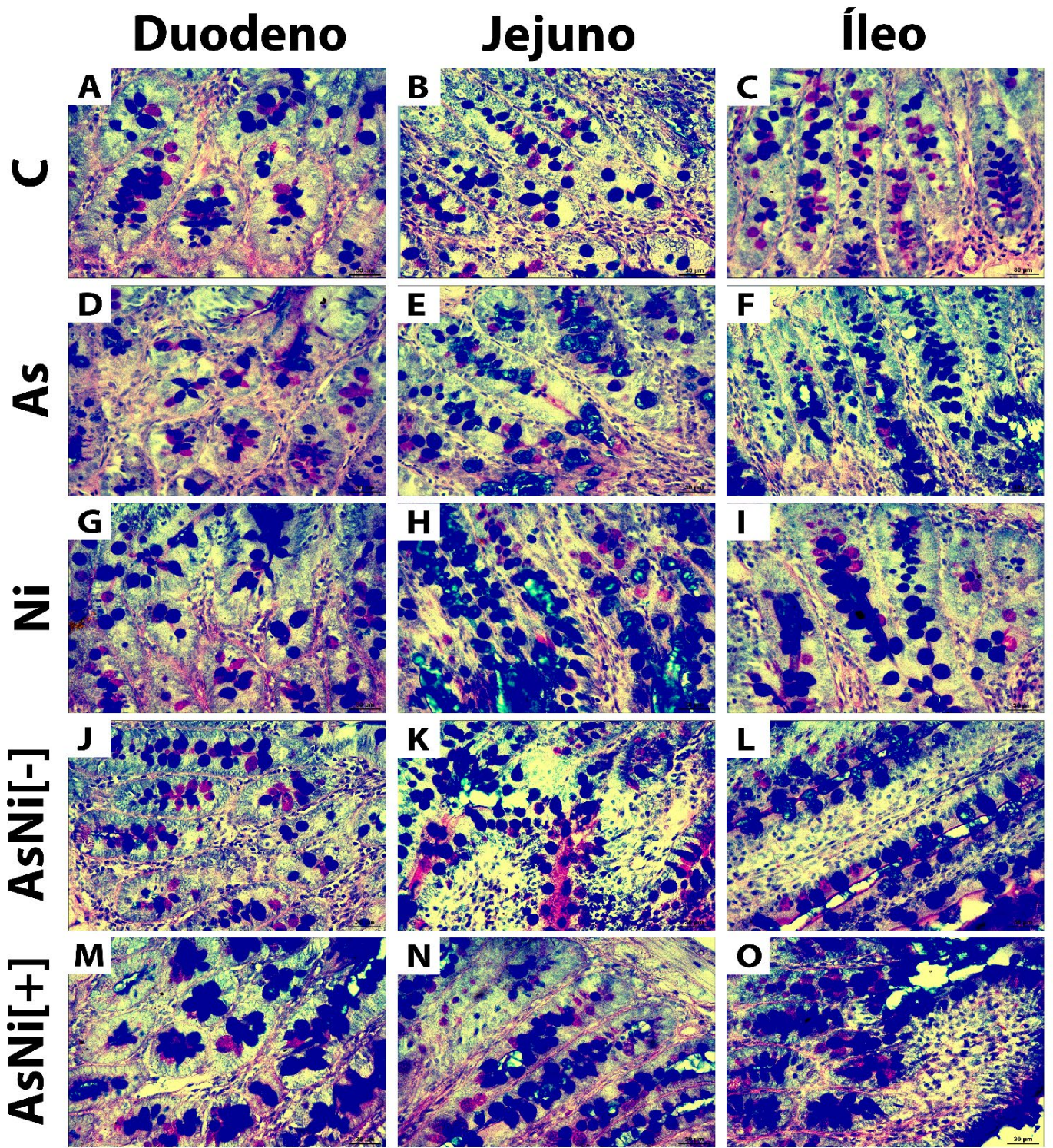


Figura 6. Fotomicrografias do trato intestinal de ratos Wistar submetidos a coexposição subcrônica de arsênio e níquel na água de beber por 70 dias. Corado pela técnica histoquímica de ácido periódico-Schiff + Alcian Blue (AB/PAS). Escala: 30 μ m. C = controle; As = 1 mg L⁻¹ de arsênio; Ni = 7 mg L⁻¹ de níquel; AsNi[-] = 0,01 mg L⁻¹ de arsênio e 0,07 mg L⁻¹ de níquel; AsNi[+] = 1 mg L⁻¹ de arsênio e 7 mg L⁻¹ de níquel.

3.4.5 Atividade das enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo

3.4.5.1 Duodeno

Não foram observadas alterações na atividade das enzimas SOD e CAT entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 7A e D). Já a atividade de GST diminuiu em animais expostos ao arsênio e níquel separadamente em comparação com os grupos controle e ratos expostos às misturas dos metais ($p < 0,05$; Fig. 7G). As concentrações de MDA não diferiram entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 7J).

3.4.5.2 Jejuno

Não foram observadas alterações na atividade da enzima SOD ($p > 0,05$; Fig. 7B). A atividade de CAT foi maior em ratos que ingeriram a maior concentração de níquel e arsênio em comparação com animais dos grupos controle, As, Ni e AsNi[-] ($p < 0,05$; Fig. 7E). Já a atividade de GST foi menor em todos os animais, tanto os expostos separadamente aos compostos e administrados simultaneamente em diferentes concentrações em relação ao controle ($p < 0,05$; Fig. 7H). As concentrações de MDA foram menores em animais do grupo As comparado a animais do grupo controle ($p > 0,05$; Fig. 7K).

3.4.5.3 Íleo

Não foram observadas alterações na atividade da enzima SOD ($p > 0,05$; Fig. 7C). A atividade de CAT foi consideravelmente maior em animais que ingeriram a maior concentração de níquel e arsênio em relação aos demais grupos experimentais ($p < 0,05$; Fig. 7F). Já a atividade de GST e as concentrações de MDA não diferiram entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 7I, L).

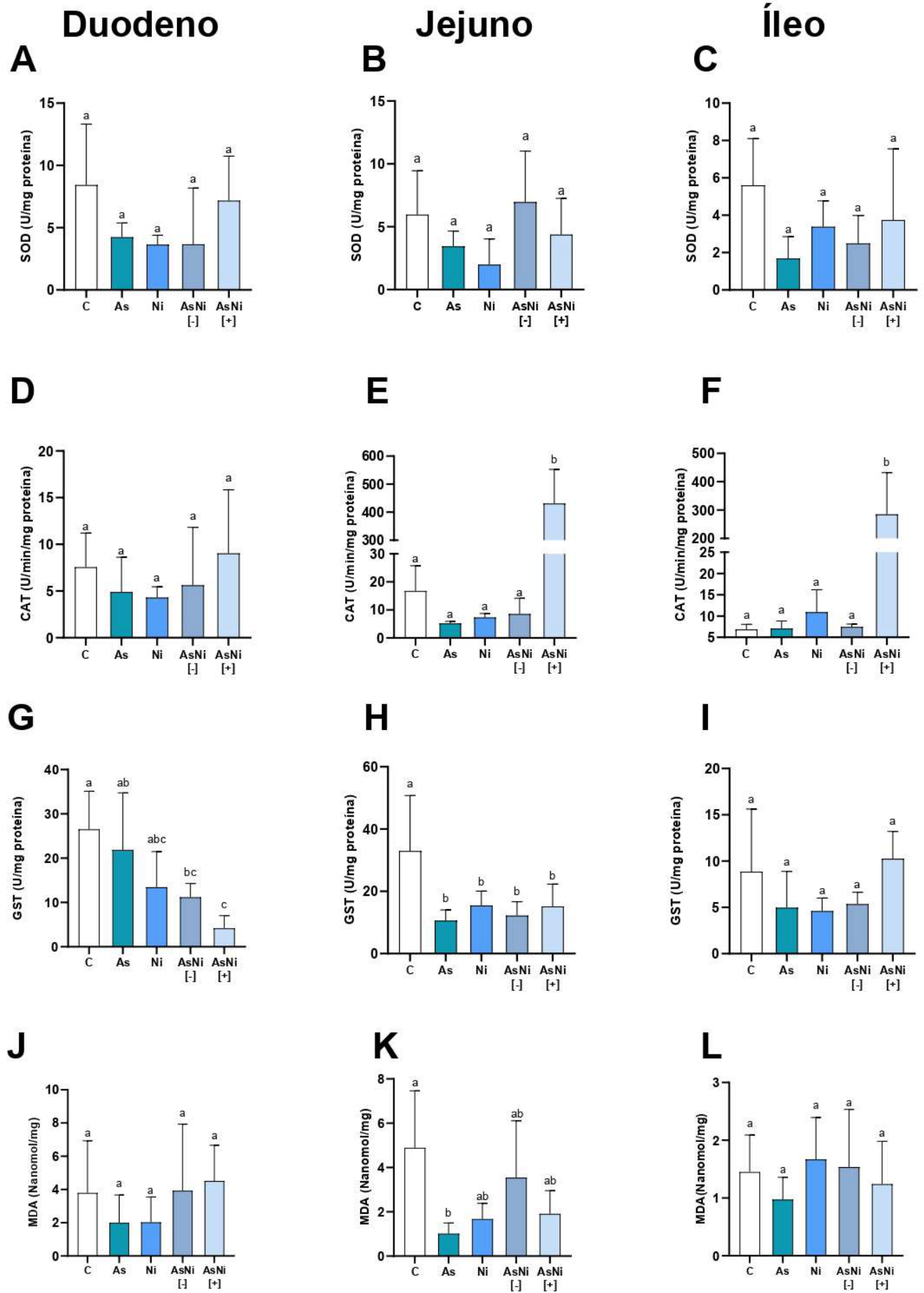


Figura 7: Efeitos da exposição ao arsênio e níquel sobre atividades de enzimas antioxidantes e produtos do estresse oxidativo no intestino delgado de ratos Wistar. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutathione S-transferase; MDA: malondialdeído. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey; $p < 0,05$). ($n = 5$ animais/grupo). C = controle; As = 1 mg L^{-1} de arsênio; Ni = 7 mg L^{-1} de níquel; AsNi[-] = $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de arsênio e $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ de níquel; AsNi[+] = 1 mg L^{-1} de arsênio e 7 mg L^{-1} de níquel.

3.5 Discussão

Neste trabalho avaliamos o efeito da ingestão simultânea de As e Ni por um período subcrônico sobre o intestino delgado. Os resultados mostraram que os dois elementos químicos, fornecidos individualmente ou juntos, alteraram parâmetros microscópicos e oxidativos nas regiões duodeno, jejuno e íleo. Diariamente os seres humanos são expostos a um coquetel de metais pesados (Wu et al., 2016). Já foi descrito na literatura os prejuízos causados à saúde humana após a absorção desses metais (Ibrahim et al., 2006; Lu et al., 2014; Muñoz & Costa, 2012; Vahter, 2002). Mas, pouco se sabe sobre os efeitos desses coquetéis de metais no intestino delgado, mesmo sendo um local importante de assimilação e absorção de nutrientes. Portanto, este estudo pode contribuir para a melhor compreensão dos efeitos desses metais no intestino delgado.

Todos os animais expostos ao As e Ni, independente se ofertados juntos ou separados, apresentaram fusão de vilosidades em todas as regiões do intestino delgado. Nas vilosidades acontece a absorção dos nutrientes e fluidos, portanto seu desenvolvimento correto é crucial para um bom funcionamento intestinal (Kwon et al., 2020). O acometimento das vilosidades pode implicar em má absorção intestinal e causar efeitos sistêmicos relacionados a nutrição. Apesar disso, não se observou alterações nos pesos dos animais (Iasbik-Lima, 2022), indicando que não houve impacto neste parâmetro biométrico. De acordo com Bernet et al. (1999), fusão celular representa o padrão de adaptação da reação tecidual induzida por

xenobióticos, como os metais pesados estudados aqui. Tanto o As quanto o Ni são absorvidos no intestino, sendo conhecidos por sua toxicidade e por terem uma rápida taxa de absorção nas células (Hirano et al., 2004; Wu et al., 2013). A presença de metais nos órgãos proporciona uma reação em sequência que começa com a desregulação do equilíbrio de íons metálicos. No meio intracelular, três mecanismos de ações nocivas dos tóxicos podem ocorrer, como mimetismo de metais essenciais, geração de estresse oxidativo e interação com grupos sulfidrilas (Machado-Neves, 2022). Dessa forma, é possível que a fusão de vilosidades apesar do comprometimento na absorção dos nutrientes, seja um mecanismo de defesa para impedir a entrada de agentes tóxicos.

O intestino representa a conexão entre o meio interno e o ambiente externo, apresentando uma barreira altamente regulada e seletiva para impedir a passagem de agentes tóxicos como os metais pesados (Wu et al., 2013). Os enterócitos são as células que estão em contato com o lúmen e podem absorver esses metais, resultando em prejuízos no processo de absorção dos nutrientes e na própria célula. Os resultados mostraram que a altura do epitélio foi afetada no jejuno de animais expostos a mistura de As e Ni nas duas concentrações propostas. No presente estudo, ratos de todos os grupos experimentais apresentaram descamação do epitélio. Esse achado histológico pode ser uma característica do órgão, considerando que o intestino delgado possui alta taxa de renovação celular (Crosnier et al., 2006). No entanto, combinado com outros acometimentos, como a mudança na altura do epitélio, a descamação pode contribuir para um mau funcionamento intestinal, pois os enterócitos possuem regiões específicas para o transporte de nutrientes (Middendorp et al., 2014). Um estudo analisando a intoxicação por Ni no intestino também encontrou resultados semelhantes relacionados à altura das vilosidades (Wu et al., 2013). A redução da espessura da camada mucosa, como foi visto nas regiões do duodeno e jejuno em animais coexpostos ao As e Ni nas duas concentrações, também podem estar relacionadas com alterações nas vilosidades e com a

maior descamação celular. Por outro lado, o aumento na altura dos vilos como ocorrido no íleo de animais mediante a coexposição ao As e Ni em doses baixas, pode ser um mecanismo compensatório de descamação epitelial, o que já foi reportado em outros estudos (Araujo et al., 2022; Oetting et al., 2006). Além disso, as regiões do duodeno e jejuno apresentaram hiperplasia no epitélio, principalmente em animais dos grupos As e AsNi[+]. Essa é uma resposta adaptativa de células que são capazes de se replicar, podendo ser um reflexo de desequilíbrio causado pelos elementos tóxicos nas células epiteliais, sendo este desequilíbrio compensado com proliferação celular. Além disso, observou-se a presença de congestão vascular no duodeno e jejuno de animais AsNi[+], sendo comum no processo inflamatório intestinal independente da origem (Biondo-Simões et al., 2000; Bonassa et al., 2015; Lima et al., 2019).

Estudos também relacionam a hiperplasia de células epiteliais induzida por danos na mucosa intestinal com a inflamação (Araujo et al., 2022; Oetting et al., 2006). Contribuindo com os achados de congestão vascular, observou-se a presença de infiltrados inflamatórios na região do jejuno de todos os animais experimentais. Já no íleo, a ocorrência de infiltrados inflamatórios foi observada em animais dos dois grupos de coexposição AsNi e do grupo Ni. Alterações na lâmina própria foram observadas no duodeno de animais expostos à maior concentração de AsNi, no jejuno de animais coexpostos ao AsNi nas duas concentrações e em animais expostos ao Ni, bem como no íleo em todos os animais experimentais. O aumento no diâmetro da lâmina própria pode estar relacionado com a presença de infiltrados inflamatórios. A inflamação tecidual com maior número de células do sistema imune pode acarretar maior liberação de citocina pró-inflamatória, que fortalece o desenvolvimento de lesão tecidual e atrai mais células para os pontos de inflamação cronificando o processo inflamatório (Souza et al., 2018; Sprague & Khalil, 2009). Isso também explica o extravasamento das placas de Peyer da camada submucosa para mucosa do íleo em animais

de todos os grupos experimentais. As placas de Peyer são nódulos linfóides que estão presentes na camada submucosa do íleo (Junqueira & Carneiro, 2017). No presente estudo, observou-se uma maior intensidade e aumento desses nódulos, com consequente extravasamento para vilosidades. Ambos os achados levam a um aumento no diâmetro da lâmina própria e, conseqüentemente, aumento no diâmetro das vilosidades.

A ausência de glândulas de Brunner na camada submucosa do duodeno dos animais experimentais pode estar relacionada com a obtenção do fragmento na área da flexura duodenojejunal. Nesta região de transição temos uma diminuição de glândulas de Brunner e início da segunda porção do intestino delgado, o jejuno (Junqueira & Carneiro, 2017). Algumas alterações foram exclusivas da região do jejuno, tais como redução na espessura das camadas muscular e submucosa e morte celular nas vilosidades. As alterações parecem ter sido consequência da exposição ao Ni, uma vez que animais deste grupo apresentaram redução das camadas muscular circular e longitudinal, com consequente efeito sobre a espessura da camada muscular total. Animais do grupo AsNi[-] também apresentaram redução na camada muscular circular e muscular total do jejuno, bem como redução na sua camada submucosa. Isso sugere que tanto de maneira isolada ao Ni, quanto na coexposição ao AsNi, foi possível observar alteração na parede intestinal. A integridade da parede intestinal é extremamente importante para proteger o organismo a poluentes e patógenos (Wu et al., 2013) e para a própria funcionalidade do órgão, o que nos permite inferir que o jejuno foi a região mais acometida pela coexposição aos metais As e Ni.

Nossos resultados mostraram um aumento na área de mucinas ácidas no duodeno de ratos coexpostos ao As e Ni nas maiores concentrações, bem como em animais expostos ao Ni somente. Já no jejuno, somente animais do grupo AsNi[-] apresentaram esse aumento, enquanto este efeito foi observado no íleo de animais expostos à maior concentração de AsNi[+]. Esses achados corroboram com o estudo de Wu et al. (2013), que relatou um efeito

tóxico do Ni nas concentrações de 300 mg/kg, sobre células caliciformes, com consequente efeito sobre a produção de muco. Células secretoras como as células caliciformes são constituintes importantes para o bom funcionamento do intestino delgado, sendo encontradas entre os enterócitos. Elas secretam mucinas que fazem parte do muco que cobre o epitélio intestinal, formando uma importante barreira protetora (Nimmerfall & Rosenthaler, 1980; Schneeman et al., 1982; Wu et al., 2013). Existe uma variedade de mucinas secretadas no intestino delgado, cada uma com sua função específica e secretam antimicrobianos específicos e inespecíficos diferentes umas das outras (McGuckin et al., 2011). Em relação às mucinas neutras, observamos aumento em sua secreção somente na região do íleo de ratos expostos ao Ni. Por fim, a área de mucinas mistas não apresentou alterações nas regiões jejuno e íleo. No duodeno, porém, a área dessas mucinas aumentou em animais expostos ao Ni e em animais expostos ao AsNi na menor concentração, o que certamente é reflexo do aumento das mucinas ácidas. Esses resultados podem ser explicados pela rápida alteração que ocorre no conteúdo do muco para responder uma sinalização das células imunes, sejam da imunidade inata ou adaptativa. Essas células secretam citocinas e outros fatores que modulam a taxa de síntese e liberação de mucinas (McGuckin et al., 2011; Strugnell & Wijburg, 2010). Portanto, alterações nas mucinas podem mostrar a resposta do tecido em relação à inflamação, na tentativa de amenizar os danos. No entanto, novos estudos precisam ser feitos para entendermos como essa coexposição ao As e Ni pode influenciar a produção de mucinas.

Estudos mostram que o estresse oxidativo é um dos mecanismos de ação do As e Ni, estimulando uma excessiva produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e resultando em peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (Couto-Santos et al., 2020; Machado-Neves, 2022; Wu et al., 2013). No nosso trabalho, porém, não foram observadas alterações significativas da SOD nas regiões do duodeno, jejuno e íleo. Iasbik-Lima (2022) também não observou alterações na atividade de SOD, analisando os mesmos elementos

químicos, nas concentrações de 1 e 7 mg Kg⁻¹, no tecido hepático de ratos expostos subcronicamente. A atividade da CAT se alterou nas regiões do jejuno e íleo de animais do grupo AsNi na maior concentração, mas não na duodenal. Como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) estava disponível após dismutação do ânion superóxido por SOD, sugere-se que isso levou a uma intensa atividade da CAT, para converter o H₂O₂ em água e oxigênio (O₂), e proteger as células contra os danos gerados pelo H₂O₂ (Bisht et al., 2017). Já a atividade da GST, reduziu na região do duodeno nos grupos de coexposição de ambas as concentrações, bem como na região do jejuno em todos os grupos. A enzima GST, dentre suas funções, também neutraliza o H₂O₂, mas por uma via diferente da enzima CAT (Habig et al., 1974). Considerando que as duas linhas de defesa (CAT e GST) foram ativadas a fim de reduzir os níveis de H₂O₂, levando a GST a exaustão, esses resultados mostram que os sistemas de defesa foram eficientes, uma vez que as concentrações de MDA, ao final dos 70 dias, estavam reduzidas. Uma maior concentração de MDA mostra danos teciduais, como fusão de vilosidades e descamação celular, observados no duodeno. Altas concentrações de MDA são importantes sinalizadores de peroxidação lipídica (Janero, 1990). Na região do jejuno, as patologias também podem estar relacionadas com a maior peroxidação lipídica, tendo em vista que a célula possui importantes componentes lipídicos, como a membrana plasmática. No íleo, porém, não foram observadas alterações da GST e nas concentrações de MDA.

No entanto, as alterações histológicas e oxidativas não foram intensas, já que grande parte do trato intestinal não foi acometido por patologias. A coexposição no período subcrônico pode ter estimulado um processo inicial de dano, o mesmo foi reportado por Iasbik-Lima (2022) analisando os mesmos elementos químicos, nas mesmas concentrações, no tecido hepático de ratos expostos subcronicamente. Sugerindo que em exposições crônicas e maiores concentrações podem reforçar esses danos e resultar em prejuízo ao órgão. Como visto no estudo de Wu et al. (2013), que utilizou maiores concentrações (300mg/kg) de Ni resultando

em alterações intensas no intestino delgado. O mesmo foi reportado por Liu et al. (2021), utilizando altas concentrações de As (50 mg L^{-1}) observaram alterações intensas na microbiota intestinal. Esses achados são importantes, pois existem locais em que são encontradas altas concentrações de AsNi (Alamdar et al., 2016; Brabec et al., 2020; Vormittag et al., 2021). Portanto, os seres humanos e animais estão entrando em contato com um coquetel de metais em altas concentrações, sendo uma preocupação de saúde mundial (Rehman et al., 2018). O presente estudo fornece informações experimentais sobre os efeitos toxicológicos do AsNi no intestino delgado, podendo auxiliar novos estudos.

3.6 Conclusões

Os resultados do presente estudo mostram que a coexposição oral ao As e Ni, nas concentrações utilizadas em um período subcrônico, gerou alterações histológicas no intestino delgado de ratos Wistar adultos. Estas alterações incluíram aumento no diâmetro da lâmina própria e no diâmetro das vilosidades, fusão de vilosidades, descamação celular no epitélio, presença de infiltrado inflamatório e congestão vascular. Essas alterações histológicas, porém, não acometeram grande parte do epitélio, lâmina própria e submucosa, o que provavelmente não inviabilizou a atividade intestinal. Além disso, houve uma mudança no perfil das mucinas secretadas em todas as regiões do intestino delgado e alteração na atividade de enzimas do sistema antioxidante. Apesar das modificações no trato intestinal, não foram observadas alterações nos pesos dos animais, evidenciando que a coexposição não foi capaz de afetar expressivamente a função do órgão. Os resultados deste estudo fornecem novas informações experimentais para estudos futuros sobre os efeitos da coexposição ao As e Ni no parênquima intestinal em humanos e em outros animais.

3.7 Referências

- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C).
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Alamdar, A., Ali Musstjab Akber Shah Eqani, S., Waqar Ali, S., Sohail, M., Bhowmik, A. K., Cincinelli, A., Subhani, M., Ghaffar, B., Ullah, R., Huang, Q., & Shen, H. (2016). Human arsenic exposure via dust across the different ecological zones of Pakistan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.044>
- Araujo, F. O., Felício, M. B., Lima, C. F., Piccolo, M. S., Pizziolo, V. R., Diaz-Muñoz, G., Bastos, D. S. S., Oliveira, L. L., Peluzio, M. D. C. G., & Diaz, M. A. N. (2022). Antioxidant and anti-inflammatory activity of curcumin transdermal gel in an IL-10 knockout mouse model of inflammatory bowel disease. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 94(4). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220201378>
- Arnich, N., Lanhers, M. C., Cunat, L., Joyeux, M., & Burnel, D. (2000). Nickel absorption and distribution from rat small intestine in situ. *Biological Trace Element Research*, 74(2).
<https://doi.org/10.1385/bter:74:2:141>
- Azevedo, F. A. D., & Chasin, A. A. da M. (2003). *Metais - Gerenciamento da Toxicidade* (1st ed., Vol. 1). Atheneu.
- Barišić, J., Filipović Marijić, V., Mijošek, T., Čož-Rakovac, R., Dragun, Z., Krasnići, N., Ivanković, D., Kružlicová, D., & Erk, M. (2018). Evaluation of architectural and histopathological biomarkers in the intestine of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) challenged with environmental pollution. *Science of the Total Environment*, 642. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.045>

- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22(1). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- Biondo-Simões, M. de L. P., Greca, F. H., Ioshi, S., Abicalaffe, M. D., Colnaghi, M. C., Mattos e Silva, E. de, Yamasaki, E. S., & Smaniotto, G. (2000). Colite do cólon exclusivo: modelo experimental em ratos. *Acta Cirurgica Brasileira*, 15(suppl 3). <https://doi.org/10.1590/s0102-86502000000700002>
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., & Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 14, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>
- Bonassa, C. E. G., Pereira, J. A., de Campos, F. G. C. M., Rodrigues, M. R., Sato, D. T., Chaim, F. D. M., & Martinez, C. A. R. (2015). Tissue content of sulfomucins and sialomucins in the colonic mucosa, without fecal stream, undergoing daily intervention with sucralfate. *Acta Cirurgica Brasileira*, 30(5). <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150050000004>
- Brabec, J. L., Wright, J., Ly, T., Wong, H. T., McClimans, C. J., Tokarev, V., Lamendella, R., Sherchand, S., Shrestha, D., Uprety, S., Dangol, B., Tandukar, S., Sherchand, J. B., & Sherchan, S. P. (2020). Arsenic disturbs the gut microbiome of individuals in a disadvantaged community in Nepal. *Heliyon*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03313>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52(C). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Chen, C. J., Chen, C. W., Wu, M. M., & Kuo, T. L. (1992). Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *British Journal of Cancer*, 66(5). <https://doi.org/10.1038/bjc.1992.380>

- Chen, Q. Y., Brocato, J., Laulicht, F., & Costa, M. (2017). Mechanisms of nickel carcinogenesis. In *Molecular and Integrative Toxicology*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55448-8_8
- 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. In *BMJ (Online)* (Vol. 362). <https://doi.org/10.1136/bmj.k3310>
- Clevers, H., Conder, R. K., Li, V. S. W., Lutolf, M. P., Vallier, L., Chan, S., Grikscheit, T. C., Jensen, K. B., & de Coppi, P. (2019). Tissue-Engineering the Intestine: The Trials before the Trials. In *Cell Stem Cell* (Vol. 24, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.04.018>
- Couto-Santos, F., Souza, A. C. F., Bastos, D. S. S., Ervilha, L. O. G., Dias, F. C. R., Araújo, L. de S., Guimarães, S. E. F., Oliveira, L. L. de, & Machado-Neves, M. (2020). Prepubertal exposure to arsenic alters male reproductive parameters in pubertal and adult rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 409. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115304>
- Crosnier, C., Stamatakis, D., & Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: Stem cells, signals and combinatorial control. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 7, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/nrg1840>
- Das, K. K., & Buchner, V. (2007). Effect of nickel exposure on peripheral tissues: Role of oxidative stress in toxicity and possible protection by ascorbic acid. In *Reviews on Environmental Health* (Vol. 22, Issue 2). <https://doi.org/10.1515/REVEH.2007.22.2.157>
- Dieterich, S., Bieligg, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., & Prestle, J. (2000). Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart. *Circulation*, 101(1). <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.1.33>

- Fu, Z., & Xi, S. (2020). The effects of heavy metals on human metabolism. In *Toxicology Mechanisms and Methods* (Vol. 30, Issue 3). <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>
- Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2020). Nickel: Human health and environmental toxicology. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22).
- Hirano, S., Kobayashi, Y., Cui, X., Kanno, S., Hayakawa, T., & Shraim, A. (2004). The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells: Important roles of thiol compounds. In *Toxicology and Applied Pharmacology* (Vol. 198, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.023>
- Iasbik-Lima, T. Efeitos da coexposição ao arsênio e níquel sobre parâmetros hepáticos em ratos Wistar adultos. 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2022.
- Ibrahim, D., Froberg, B., Wolf, A., & Rusyniak, D. E. (2006). Heavy metal poisoning: Clinical presentations and pathophysiology. In *Clinics in Laboratory Medicine* (Vol. 26, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.cll.2006.02.003>
- Ibrahim, M. M., Zakaria, Z. A. B., Amin, F. M., & Omar, A. R. (2017). Comparative histological evaluations of the sublingual salivary glands of EBN swiftlets (*aerodramus fuciphagus*) in man-made houses and natural caves. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 40(1).

- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 9, Issue 6). [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2)
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2017) *Histologia básica*. 13ª edição. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan
- 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. *Science of the Total Environment*, 657. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.455>
- Kumar, A., Jigyasu, D. K., Kumar, A., Subrahmanyam, G., Mondal, R., Shabnam, A. A., Cabral-Pinto, M. M. S., Malyan, S. K., Chaturvedi, A. K., Gupta, D. K., Fagodiya, R. K., Khan, S. A., & Bhatia, A. (2021). Nickel in terrestrial biota: Comprehensive review on contamination, toxicity, tolerance and its remediation approaches. In *Chemosphere* (Vol. 275). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129996>
- Kwon, O., Han, T. S., & Son, M. Y. (2020). Intestinal Morphogenesis in Development, Regeneration, and Disease: The Potential Utility of Intestinal Organoids for Studying Compartmentalization of the Crypt-Villus Structure. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593969>
- 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). <https://doi.org/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*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113325>
- Lima, A. M., Nascimento, C. E. C., Dos Santos, C. H. M., Dourado, D. M., Siqueira, G. E. C., Rigo, G. M., Bernardi, L. U., Leonel, P. O. S., Matias, R., Ferreira, V. C., & de SOUZA, V. C. R. P. (2019). Efficacy of *Curcuma longa* in the treatment of diversion colitis in rats. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 32(3). <https://doi.org/10.1590/0102-672020190001e1456>
- Liu, P., Li, R., Tian, X., Zhao, Y., Li, M., Wang, M., Ying, X., Yuan, J., Xie, J., Yan, X., Lyu, Y., Wei, C., Qiu, Y., Tian, F., Zhao, Q., & Yan, X. (2021). Co-exposure to fluoride and arsenic disrupts intestinal flora balance and induces testicular autophagy in offspring rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112506>
- Lu, K., Abo, R. P., Schlieper, K. A., Graffam, M. E., Levine, S., Wishnok, J. S., Swenberg, J. A., Tannenbaum, S. R., & Fox, J. G. (2014). Arsenic exposure perturbs the gut microbiome and its metabolic profile in mice: An integrated metagenomics and metabolomics analysis. *Environmental Health Perspectives*, 122(3). <https://doi.org/10.1289/ehp.1307429>
- Machado-Neves, M. (2022). Effect of heavy metals on epididymal morphology and function: An integrative review. In *Chemosphere* (Vol. 291). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133020>
- McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>

- Middendorp, S., Schneeberger, K., Wiegerinck, C. L., Mokry, M., Akkerman, R. D. L., Van Wijngaarden, S., Clevers, H., & Nieuwenhuis, E. E. S. (2014). Adult stem cells in the small intestine are intrinsically programmed with their location-specific function. *Stem Cells*, 32(5). <https://doi.org/10.1002/stem.1655>
- Muñoz, A., & Costa, M. (2012). Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: A review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. In *Toxicology and Applied Pharmacology* (Vol. 260, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.014>
- Nimmerfall, F., & Rosenthaler, J. (1980). Significance of the goblet-cell mucin layer, the outermost luminal barrier to passage through the gut wall. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94(3). [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)91328-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)91328-5)
- Noal, D. da S., Rabelo, I. V. M., & Chachamovich, E. (2019). The mental health impact on individuals affected by the vale dam rupture. In *Cadernos de Saude Publica* (Vol. 35, Issue 5). <https://doi.org/10.1590/0102-311X00048419>
- Oetting, L. L., Utiyama, C. E., Giani, P. A., Ruiz, U. D. S., & Miyada, V. S. (2006). Effects of herbal extracts and antimicrobials on apparent digestibility, performance, organs morphometry and intestinal histology of weanling pigs. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(4). <https://doi.org/10.1590/s1516-35982006000500019>
- Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., & Akash, M. S. H. (2018). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1). <https://doi.org/10.1002/jcb.26234>
- Sall, M. L., Diaw, A. K. D., Gningue-Sall, D., Efremova Aaron, S., & Aaron, J. J. (2020). Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 27, Issue 24). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09354-3>

- Schneeman, B. O., Richter, B. D., & Jacobs, L. R. (1982). Response to dietary wheat bran in the exocrine pancreas and intestine of rats. *Journal of Nutrition*, 112(2). <https://doi.org/10.1093/jn/112.2.283>
- Sousa, Alex Felipe Ramos de. Morfofisiologia comparada do trato gastrointestinal de três espécies de morcegos com hábitos alimentares diferente. 2021. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa. 2021
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.054>
- Souza, A. C. F., Marchesi, S. C., Domingues de Almeida Lima, G., Ferraz, R. P., Santos, F. C., da Matta, S. L. P., & 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). <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0523-0>
- Sprague, A. H., & Khalil, R. A. (2009). Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 78, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.029>
- Strugnell, R. A., & Wijburg, O. L. C. (2010). The role of secretory antibodies in infection immunity. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2384>
- Subhani, M., Mustafa, I., Alamdar, A., Katsoyiannis, I. A., Ali, N., Huang, Q., Peng, S., Shen, H., & Eqani, S. A. M. A. S. (2015). Arsenic levels from different land-use settings in Pakistan: Bio-accumulation and estimation of potential human health risk via dust

- exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.019>
- Sugimoto, S., Kobayashi, E., Fujii, M., Ohta, Y., Arai, K., Matano, M., Ishikawa, K., Miyamoto, K., Toshimitsu, K., Takahashi, S., Nanki, K., Hakamata, Y., Kanai, T., & Sato, T. (2021). An organoid-based organ-repurposing approach to treat short bowel syndrome. *Nature*, 592(7852). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03247-2>
- Vahter, M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181–182.
[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00285-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00285-8)
- Vormittag, E., Saldiva, P., Anastacio, A., & Barbosa, F. (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.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103566>
- Wu, B., Cui, H., Peng, X., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., & Huang, J. (2013). Dietary nickel chloride restrains the development of small intestine in broilers. *Biological Trace Element Research*, 155(2). <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9792-7>
- Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., & Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>
- Xu, Y., Tokar, E. J., & Pi, J. (2021). Arsenic as an environmental toxicant and a therapeutic agent: Foe and friend. In *Toxicology and Applied Pharmacology* (Vol. 415).
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115438>