



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DE LESÕES DO TRATO
DIGESTÓRIO POR INTOXICAÇÃO COM CÁDMIO EM RATOS**

MOZART ALVES GONÇALVES FILHO



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DE LESÕES DO TRATO
DIGESTÓRIO POR INTOXICAÇÃO COM CÁDMIO EM RATOS**

MOZART ALVES GONÇALVES FILHO

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof. Dra. Gisele Alborghetti Nai

612.3
G635e

Gonçalves Filho, Mozart Alves.

Influência do ph da água na gênese de lesões do trato digestório por intoxicação com cádmio em ratos / Mozart Alves Gonçalves Filho. – Presidente Prudente, 2015.

31 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2015.

Bibliografia.

Orientador: Gisele Alborghetti Nai.

1. Cádmio. 2. Acidificação. 3. toxicidade crônica. 4. Câncer 5. Estômago I. Título.

MOZART ALVES GONÇALVES FILHO

**INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DE LESÕES DO TRATO
DIGESTÓRIO POR INTOXICAÇÃO COM CÁDMIO EM RATOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 26 de junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Bruno Andraus Filardi
Escola Paulista de Medicina - Unifesp
São Paulo-SP

Prof. Dr. Oscar Haruo Higa
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

A DEUS, a minha família; esposa e filhos, irmãos, a minha mãe; Gisele e amigos que me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Todos que acreditaram em mim.

Algumas coisas pertencem a DEUS, somente a DEUS.

Toda Glória

Toda Glória

Toda Glória

Pertence a DEUS, somente a DEUS.

RESUMO

INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DE LESÕES DO TRATO DIGESTÓRIO POR INTOXICAÇÃO COM CÁDMIO EM RATOS

Câncer é uma doença universal, com taxa de mortalidade elevada em alguns casos. É a segunda causa de morte no mundo ocidental, e passará para primeiro lugar por volta do ano de 2020. Tem causas genéticas e ambientais, sendo uma delas a ingestão de metal pesado, como cádmio. Há poucos estudos avaliando a toxicidade gastrointestinal do cádmio. Não há consenso na literatura sobre o tratamento da toxicidade por cádmio. Há necessidade de métodos simples de evitar seus efeitos. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar as lesões causadas por intoxicação por cádmio no aparelho digestório e os possíveis efeitos do pH da água na gênese destas lesões. **Material e métodos:** Para este estudo, foram utilizados 90 ratos Wistar, machos. Os animais foram distribuídos em 6 grupos (n=15): A – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH neutro (pH 7,0); B – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH ácido (pH 5,0); C – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água com pH básico (pH 8,0). D – água de beber com pH ácido (pH 5,0); E – água de beber com pH básico (pH 8,0); F – água com pH neutro (pH 7,0). Animais de todos os grupos foram eutanasiados após 6 meses. Foram retirados fragmentos do esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso de cada rato para análise microscópica. **Resultados:** Não foram observadas alterações microscópicas no esôfago nem no intestino delgado e grosso. Somente animais expostos ao cádmio apresentaram displasia leve da mucosa gástrica (p= 0,012), porém sem diferença com relação aos diferentes pH da água (p>0,05). **Conclusão:** O cádmio levou a formação de lesões displásicas no epitélio glandular gástrico, independente do pH da água.

Palavras-chave: cádmio, acidificação, toxicidade crônica, câncer, estômago.

ABSTRACT

INFLUENCE OF THE pH OF WATER IN THE INITIATION OF DIGESTIVE TRACT INJURY IN CADMIUM POISONING IN RATS

Cancer is a universal disease, with high mortality rates in some cases. It is the second leading cause of death in the Western world, and go to the first place around the year 2020. Cancer has genetic and environmental causes, one of them the ingestion of heavy metals such as cadmium. There are few studies evaluating the gastrointestinal toxicity of cadmium. There is no consensus in the literature on the treatment of cadmium toxicity. We need simple methods to avoid its effects. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the lesions caused by cadmium poisoning in the digestive tract and the possible effect of the drinking water pH in the initiation of these lesions. **Methods:** For this study, 90 male Wistar rats were used, divided into 6 groups: A - 15 rats that received 400 mg / L cadmium chloride (CdCl_2) in drinking water at a neutral pH of 7.0; B - 15 rats that received CdCl_2 (400 mg / L) in drinking water at an acidic pH of 5.0; C - 15 rats that received CdCl_2 (400 mg / L) in drinking water at a basic pH of 8.0; D - 15 rats that received water at an acidic pH of 5.0; E - 15 rats that received water at a basic pH of 8.0; and F - 15 rats that received water at a neutral pH of 7.0. All animals were euthanized after 6 months. Fragments of the esophagus, stomach, small intestine and large intestine of each rat were removed for microscopic analysis. **Results:** There were microscopic changes neither in the esophagus nor in the small and large intestine. Only cadmium exposed animals showed mild dysplasia of the gastric mucosa ($p=0.012$), regardless of the pH ($p>0.05$). **Conclusion:** The cadmium led to the formation of dysplastic lesions in the gastric glandular epithelium, regardless of water pH.

Keywords: cadmium, acidification, chronic toxicity, cancer, stomach.

SUMÁRIO

1	ARTIGO.....	9
	ANEXOS.....	29
	ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE).....	30
	ANEXO 2 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO PARA REVISTA CIENTÍFICA.....	31

1 ARTIGO**INFLUÊNCIA DO pH DA AGUA NA GENÊSE DE LESÕES DO TRATO DIGESTÓRIO POR INTOXICAÇÃO COM CADMIO EM RATOS****INFLUENCE OF THE pH OF WATER IN THE GENESIS OF DIGESTIVE TRACT INJURY IN CADMIUM POISONING IN RATS**

Mozart Alves Gonçalves Filho^a, Gisele Alborghetti Nai^b, Mariani Paulino Soriano Estrella^c, Larissa Di Santi Teixeira^c.

^aDiscente de Mestrado, Médico, Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

^bDoutora, professora do Departamento de Patologia e do Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

^cDiscente de graduação em Medicina, Faculdade de Medicina de Presidente Prudente (FAMEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

Correspondência: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil.

RESUMO

Câncer é uma doença universal, com taxa de mortalidade elevada em alguns casos. É a segunda causa de morte no mundo ocidental, e passará para primeiro lugar por volta do ano de 2020. Tem causas genéticas e ambientais, sendo uma delas a ingestão de metal pesado, como cádmio. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar as lesões causadas por intoxicação por cádmio no aparelho digestório e os possíveis efeitos do pH da água na gênese destas lesões. **Material e métodos:** Foram utilizados 90 ratos Wistar, machos. Os animais foram distribuídos em 6 grupos (n=15): A – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH neutro (pH 7,0); B – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH ácido (pH 5,0); C – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água com pH básico (pH 8,0). D – água de beber com pH ácido (pH 5,0); E – água de beber com pH básico (pH 8,0); F – água com pH neutro (pH 7,0). Animais de todos os grupos foram eutanasiados após 6 meses. Foram retirados fragmentos do esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso de cada rato para análise microscópica. **Resultados:** Não foram observadas alterações microscópicas no esôfago nem no intestino delgado e grosso. Somente animais expostos ao cádmio apresentaram displasia leve da mucosa gástrica ($p= 0,012$), porém sem diferença com relação aos diferentes pH da água ($p>0,05$). **Conclusão:** O cádmio levou a formação de lesões displásicas no epitélio glandular gástrico, independente do pH da água.

Palavras-chave: cádmio, acidificação, toxicidade crônica, câncer, estômago.

ABSTRACT

Cancer is a universal disease, with high mortality rates in some cases. It is the second leading cause of death in the Western world, and go to the first place around the year 2020. Cancer has genetic and environmental causes, one of them the ingestion of heavy metals such as cadmium. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the lesions caused by cadmium poisoning in the digestive tract and the possible effect of the drinking water pH in the initiation of these lesions. **Methods:** 90 male Wistar rats were used, divided into 6 groups: A - 15 rats that received 400 mg / L cadmium chloride (CdCl_2) in drinking water at a neutral pH of 7.0; B - 15 rats that received CdCl_2 (400 mg / L) in drinking water at an acidic pH of 5.0; C - 15 rats that received CdCl_2 (400 mg / L) in drinking water at a basic pH of 8.0; D - 15 rats that received water at an acidic pH of 5.0; E - 15 rats that received water at a basic pH of 8.0; and F - 15 rats that received water at a neutral pH of 7.0. All animals were euthanized after 6 months. Fragments of the esophagus, stomach, small intestine and large intestine of each rat were removed for microscopic analysis. **Results:** There were microscopic changes neither in the esophagus nor in the small and large intestine. Only cadmium exposed animals showed mild dysplasia of the gastric mucosa ($p= 0.012$), regardless of the pH ($p> 0.05$). **Conclusion:** The cadmium led to the formation of dysplastic lesions in the gastric glandular epithelium, regardless of water pH.

Key words: cadmium, acidification, chronic toxicity, cancer, stomach.

1. Introdução

Nos países mais desenvolvidos, o câncer é responsável por uma parte importante das despesas mundiais de saúde com internações e tratamento (Jazaeri et al., 2002). Embora as taxas de incidência tenham diminuindo para muitos tipos de câncer devido a mudanças na prevalência de fatores de risco e os esforços de prevenção, o número absoluto de pacientes com câncer recém-diagnosticados deverá aumentar devido ao crescimento da população e envelhecimento (Rosenwald et al., 2002; Kun et al., 2004). O câncer tem causas genéticas e ambientais, sendo uma delas a ingestão de metal pesado (Jarüp e Akesson, 2009).

O cádmio (Cd) é um metal pesado e carcinogênico para o homem (Jarüp, 2003; Hellstrom et al, 2007; Jarüp e Akesson, 2009; Peralta-Videa et al., 2009). Tem sido amplamente descartado no ambiente como resultado de resíduos da indústria e da agricultura (Jarüp, 2003). Pessoas são expostos principalmente ao cádmio pelo hábito do tabagismo, ou por ingestão de cereais contaminados, certos vegetais, e mariscos (Satarug et al. 2003; Jarüp, 2003; Olsson et al., 2005). A dieta é a principal fonte de exposição ao cádmio entre não fumantes (Jarüp e Akesson, 2009). Apesar disso, há poucos estudos sobre o impacto direto dos metais pesados na mucosa do trato digestório (Breton et al., 2013b).

O Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) da Food and Agriculture Organization (FAO) e World Health Organization (WHO) estabeleceu que a ingestão semanal tolerável provisória (DSAP) de cádmio é de 7µg/kg de peso corporal (COTAM, 2009; Ciobanu et al., 2012). Apenas cerca de 5% da dosagem de cádmio é absorvido pelo trato gastrointestinal, enquanto que a absorção pulmonar é, cerca de 90% de uma dose inalada pelos pulmões (Godt et al., 2006). Embora a absorção pelo trato gastrointestinal seja menor, a exposição ao cádmio pode ocorrer pela ingestão de alimentos (por exemplo, crustáceos, carnes orgânicas, vegetais folhosos, arroz de certas áreas do Japão e da China), água (tubulações fechadas de água ou por poluição industrial) ou contaminação de medicamentos e pode produzir efeitos na saúde a longo prazo (Abernethy et al., 2010). Apesar disto, os estudos na literatura com cádmio ingerido ainda são em menor número do que aqueles com cádmio inalado.

O trato gastrointestinal é um dos principais alvos de cádmio (Ninkov et al., 2015). Há evidências da resiliência do intestino que equilibra os diversos efeitos crônicos do cádmio na mucosa intestinal (Breton et al., 2013b). Além disso, o a

microbiota intestinal tem papel essencial para limitar a carga corporal de metais pesados (Breton et al., 2013a).

Estudos têm mostrado que o microambiente em tumores é geralmente mais ácido do que nos tecidos normais (Tannock e Rotin, 1989; Barar e Omid, 2013; Pellegrini et al., 2014). O estudo de Nai et al (2015) mostrou aumento de incidência de lesões pré-neoplásicas na próstata de animais expostos ao cádmio em alta concentração administrado na água de beber com pH ácido.

Não há estudos anteriores que avaliaram o efeito do pH da água na intoxicação do cádmio no aparelho digestório. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as lesões causadas por intoxicação por cádmio no aparelho digestório e os possíveis efeitos do pH da água na gênese destas lesões.

2. Material e métodos

2.1. Aprovação ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (CEUA – UNOESTE), Presidente Prudente, Brasil (Protocolo nº 2202).

2.2. Protocolo animal

Para este estudo, foram utilizados 90 ratos Wistar albinos (*Rattus Norvegicus albinus*), adultos (90 dias de idade), machos, com peso entre 200 a 250g. Os animais foram separados e agrupados em número de três em caixas grandes retangulares, medindo 49x34x16cm, preconizadas para alojamento de cinco ratos adultos. Os animais foram mantidos em biotério climatizado em umidade (50±15%) e temperatura (25±2°C) e com fotoperíodo normal (12 horas de claro e escuro) controlados.

A exposição ao cádmio foi feita com cloreto de cádmio (CdCl₂ – Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), com as seguintes especificações: hidrato mínimo de 98%, conteúdo de água de aproximadamente 2,5 mole/mole. A solução de cloreto cádmio foi dada aos animais na água de beber, todos os dias durante 6 meses, dissolvido na concentração de 400mg/L (adaptado de Motta et al., 2004). A água foi acidificada com ácido clorídrico e alcalinizada com hidróxido de sódio. A troca da água do bebedouro foi realizada três vezes por semana, para evitar alteração do pH. As soluções residuais de água com cádmio foram encaminhadas

para central de resíduos da Universidade e neutralizadas para posterior descarte. A água residual nos bebedouros foi medida a cada troca de solução, para se saber a ingestão média de cada animal. Além disso, o pH da água restante foi medido para assegurar sua estabilidade.

Os animais foram distribuídos em 6 grupos (n=15): A – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH neutro (pH 7,0); B – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH ácido (pH 5,0); C – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água com pH básico (pH 8,0). D – água de beber com pH ácido (pH 5,0); E – água de beber com pH básico (pH 8,0); F – água com pH neutro (pH 7,0). Animais de todos os grupos receberam água e ração ad libitum. Os animais de todos os grupos foram eutanasiados 6 meses após o início do experimento. A eutanásia foi realizada com Pentobarbital sódico (Syntec, EUA), na dose de 100 mg/Kg administrado na cavidade peritoneal (Paiva et al., 2005). A necropsia foi realizada com abertura mento-púbica dos animais e foram retirados fragmentos do esôfago (terço proximal, médio e distal), estômago, intestino delgado e intestino grosso de cada rato para análise microscópica.

2.3. Análise histopatológica

Os fragmentos retirados foram fixados em formol a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas e submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Cortes de 5 μ foram obtidos e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil).

A análise histopatológica foi cega e realizada por um único observador experiente, utilizando um microscópio óptico convencional (NIKON Labophot, Japão). Os parâmetros avaliados foram: infiltrado inflamatório intersticial (0=ausente, 1=leve, 2=moderado, 3=intenso) e tipo de célula inflamatória presente (polimorfonucleares e/ou monucleares); congestão tecidual (0=ausente, 1=leve, 2=moderada, 3=intensa); alterações não neoplásicas na mucosa (atrofia, necrose, hiperplasia); lesões displásicas (0=ausente, 1=displasia leve, 2= displasia moderada, 3= displasia grave) e lesões neoplásicas benignas e malignas (0=ausente, 1=presente). Nos intestinos delgado e grosso também foram avaliadas: hiperplasia linfóide (0=ausente, 1=presente). As medidas da espessura da mucosa do esôfago

foram realizadas em duas áreas de cada fragmento, utilizando-se o sistema de análise de imagem Leica Application Suíte LAS 4.2.0 (Leica Microsystems, Suíça) (Figura 1).

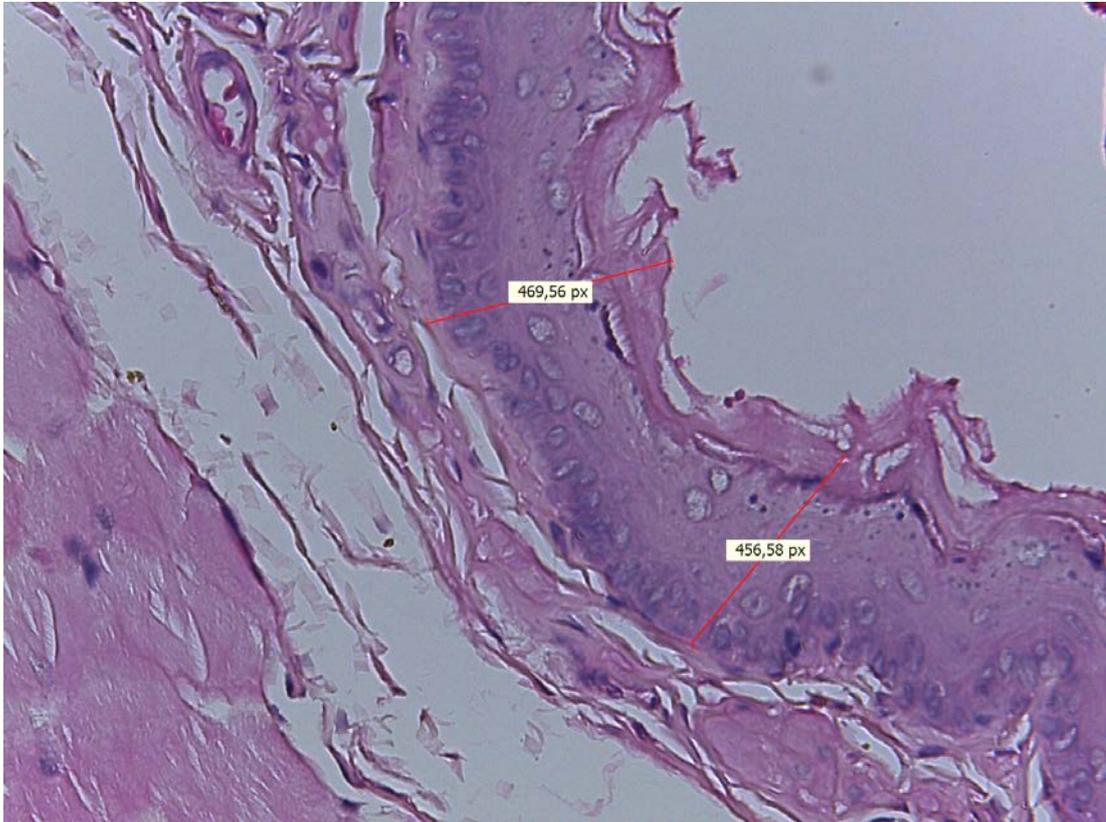


Figura 1 – Fotomicroscopia da mucosa do esôfago mostrando o padrão de medição da espessura do epitélio (animal do Grupo A – Hematoxilina-eosina, aumento de 200x). px: pixel.

2.4. Análise estatística

Para a avaliação da variável espessura do epitélio esofágico foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de comparação múltipla dos postos pelo teste de Dunn.

Para os demais parâmetros, foram realizados o Teste da Razão de Verossimilhança (Likelihood Ratio – LR) e o Teste Exato de Fisher para comparação entre os grupos. Adotou-se o nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1. Mortalidade

Cinco animais morreram ao longo do estudo (um do grupo A, um do grupo C, um do grupo D e dois do grupo E). A causa de morte dos animais do grupo A e C foi edema agudo pulmonar, complicação esta associada à exposição ao cádmio (Järup and Akesson, 2009). Nos animais do grupo D e E, não foi possível se estabelecer a causa mortis após a necrópsia.

3.2. Ingestão hídrica

A ingestão média de água por animal por dia no Grupo A foi de 55ml (aproximadamente 22 mg de cádmio), no Grupo B de 57ml (aproximadamente 22,8 mg de cádmio), no Grupo C de 52ml (aproximadamente 20,8 mg de cádmio), no Grupo D de 60ml, no grupo E de 70ml e no Grupo F de 73ml. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à ingestão de cádmio nem a de água ($p > 0,05$).

3.3. Análise histopatológica do esôfago

Não foram observados infiltrado inflamatório intersticial, congestão tecidual, alterações não neoplásicas na mucosa (atrofia, necrose, hiperplasia), lesões displásicas nem lesões neoplásicas benignas nem malignas em nenhum dos seguimentos esofágicos em todos os grupos avaliados (Figura 2).

A análise histomorfométrica da espessura da mucosa do esôfago não mostrou diferença estatística entre os grupos estudados (Tabela 1) ($p > 0,05$).

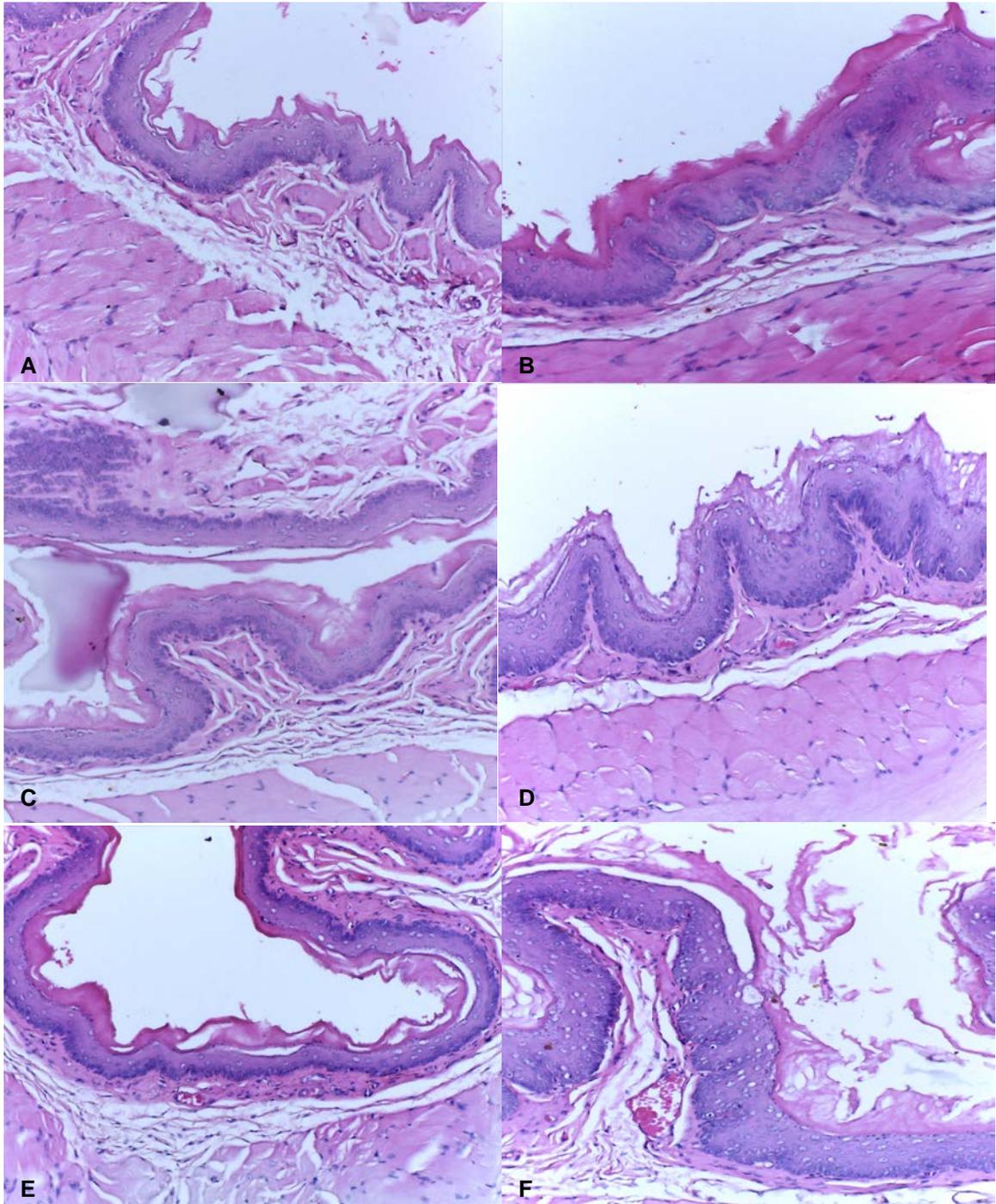


Figura 2 – Fotomicroscopia do esôfago sem alterações em todos os grupos estudados. A – animal do Grupo A. B – animal do Grupo B. C – animal do Grupo C. D – animal do Grupo D. E – animal do Grupo E. F – animal do Grupo F. Hematoxilina-eosina, aumento de 200x.

Tabela 1 – Mediana da espessura da mucosa esofágica em cada grupo estudado (n=85).

Grupos*	Espessura da mucosa esofágica (em px[#])
A	459,96 ^a
B	493,44 ^a
C	476,38 ^a
D	445,56 ^a
E	438,34 ^a
F	453,65 ^a

*Grupo A: cádmio em água com pH 7,0; Grupo B: cádmio em água com pH 5,0; Grupo C: cádmio em água com pH 8,0; Grupo D: somente água com pH 5,0; Grupo E: somente água com pH 8,0; Grupo F: somente água com pH 7,0. Letras minúsculas comparam grupos no mesmo momento. Letras minúsculas diferentes: $p < 0,05$. [#]px: pixel.

3.4. Análise histopatológica do estômago

Não foram observadas congestão tecidual, alterações não neoplásicas na mucosa (atrofia, necrose, hiperplasia) nem lesões neoplásicas benignas nem malignas no estômago em nenhum dos grupos avaliados.

O infiltrado inflamatório leve e intersticial na mucosa gástrica foi observado em um animal do grupo B, dois do grupo E e três do grupo F ($p > 0,05$).

Somente animais expostos ao cádmio apresentaram displasia leve da mucosa gástrica (Figura 3) ($p = 0,012$), porém sem diferença estatística com relação aos diferentes pH da água ($p > 0,05$) (Tabela 2).

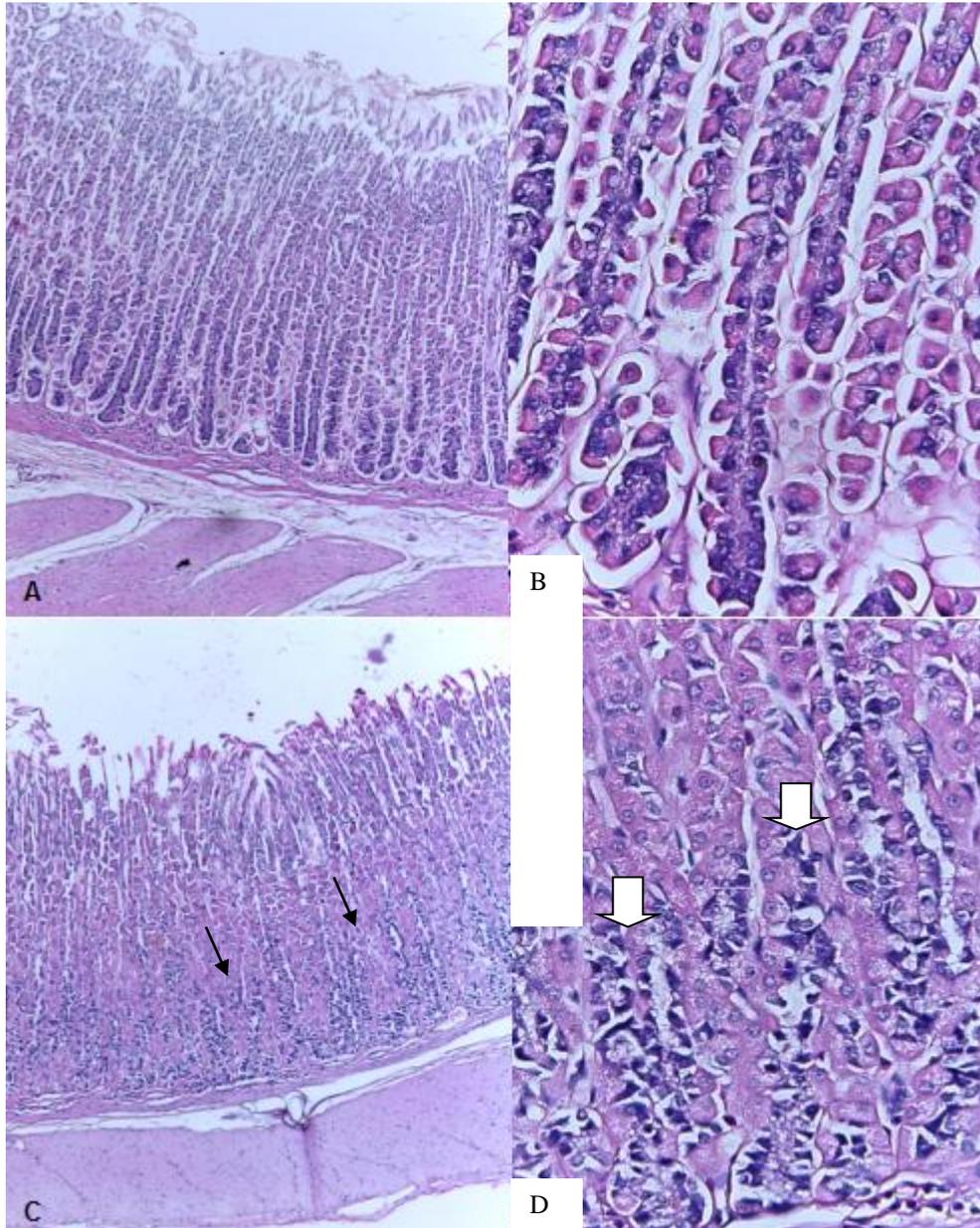


Figura 3 – Fotomicroscopia do estômago. A grupo B). C e D – Mucosa com displasia lefinas) e hiperchromasia dos núcleos (setas la eosina, aumento de 100x em A e C e de 40

– Mucosa sem alteração (animal do lotar o desarranjo arquitetural (setas) (animal do grupo A). Hematoxilina- n B e D.

Tabela 2 – Frequência de displasia leve na mucosa gástrica dos animais, segundo o grupo de estudo (n=85).

Grupos*	Displasia leve
A	1/14 (7,1%) ^a
B	2/15 (13,3%) ^a
C	4/14 (28,6%) ^a
D	0/14 (0%) ^b
E	0/13 (0%) ^b
F	0/15 (0%) ^b

*Grupo A: cádmio em água com pH 7,0; Grupo B: cádmio em água com pH 5,0; Grupo C: cádmio em água com pH 8,0; Grupo D: somente água com pH 5,0; Grupo E: somente água com pH 8,0; Grupo F: somente água com pH 7,0. Letras minúsculas comparam grupos no mesmo momento. Letras minúsculas diferentes: $p < 0,05$.

3.5. Análise histopatológica do intestino delgado

Não foram observados infiltrado inflamatório intersticial, congestão tecidual, alterações não neoplásicas na mucosa (atrofia, necrose, hiperplasia), lesões displásicas nem lesões neoplásicas benignas nem malignas no intestino delgado em nenhum dos grupos avaliados.

Embora tenha sido observada uma menor incidência de hiperplasia linfóide no intestino delgado dos animais do grupo C, não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudado para este parâmetro ($p > 0,05$) (Figuras 4A e 4B e Tabela 3).

3.6. Análise histopatológica do intestino grosso

Não foram observados infiltrado inflamatório intersticial, congestão tecidual, alterações não neoplásicas na mucosa (atrofia, necrose, hiperplasia), lesões displásicas nem lesões neoplásicas benignas nem malignas no intestino grosso em nenhum dos grupos avaliados.

Houve uma incidência discretamente menor de hiperplasia linfóide no intestino grosso dos animais do grupo A, porém sem diferença estatística significativa entre os grupos estudado para este parâmetro ($p > 0,05$) (Figuras 4C e 4D e Tabela 3).

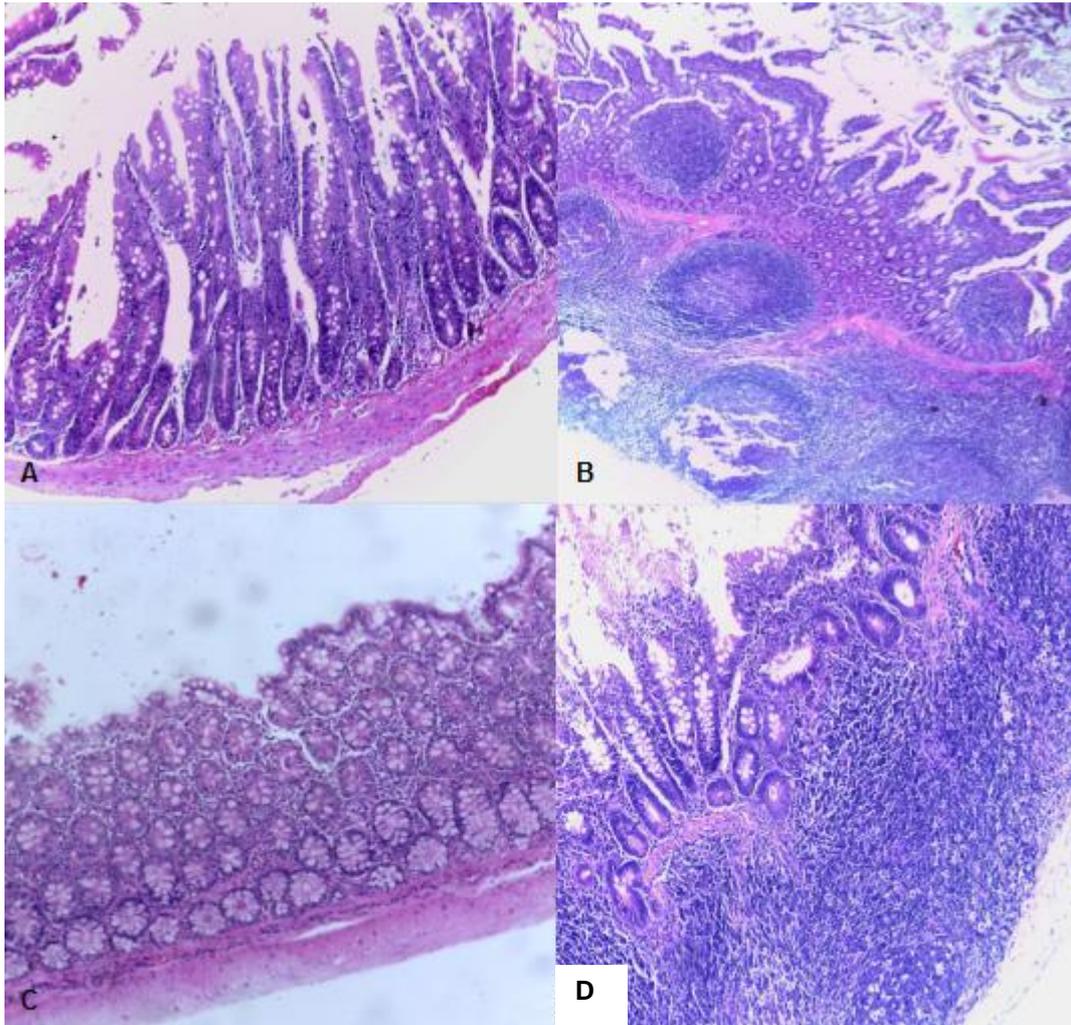


Figura 4 – Fotomicroscopia do intestino. A – Mucosa de intestino delgado sem alteração (animal do grupo C – Hematoxilina-eosina, aumento de 40x). B – Mucosa animal do grupo B – Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). C – Mucosa de intestino delgado sem alteração (animal do grupo F – Hematoxilina-eosina, aumento de 40x). D – Mucosa de intestino grosso com hiperplasia linfóide (animal do grupo D – Hematoxilina-eosina, aumento de 40x).

Tabela 3 – Frequência de hiperplasia linfóide no intestino delgado e grosso dos animais, segundo o grupo de estudo (n=85).

Grupos*	Hiperplasia linfóide	
	Intestino delgado	Intestino grosso
A	7/14 (50%) ^a	1/14 (7,1%) ^a
B	7/15 (46,6%) ^a	2/15 (13,3%) ^a
C	4/14 (28,6%) ^a	2/14 (14,3%) ^a
D	10/14 (71,4%) ^a	2/14 (14,3%) ^a
E	9/13 (69,2%) ^a	2/13 (15,4%) ^a
F	5/15 (33,3%) ^a	3/15 (20%) ^a

*Grupo A: cádmio em água com pH 7,0; Grupo B: cádmio em água com pH 5,0; Grupo C: cádmio em água com pH 8,0; Grupo D: somente água com pH 5,0; Grupo E: somente água com pH 8,0; Grupo F: somente água com pH 7,0. Letras minúsculas comparam grupos no mesmo momento e na mesma coluna. Letras minúsculas diferentes: $p < 0,05$.

4. Discussão

Um dos principais fatores que afeta a disponibilidade dos metais pesados às plantas é o pH do solo, o qual apresenta, em geral, relação inversa com a disponibilidade desses elementos (Cunha et al., 2008). Assim, neste estudo o uso de pH em diferentes concentrações foi realizado para avaliar se em animais, o pH também poderia influenciar no efeito tóxico do cádmio sobre o trato digestório, o que poderia ser uma alternativa de prevenir ou minimizar este tipo de intoxicação.

O estudo de Martelli et al (2014), o qual também avaliou a influência do pH da água sobre a intoxicação por cádmio, porém em alterações da mucosa bucal e de glândulas salivares, não demonstrou alterações na mucosa jugal e mucosa da língua, apesar do contato direto, ou nas glândulas salivares mesmo com exposição à alta concentração de cádmio adicionado à água de beber, independente do pH da água. O mesmo pode ser observado com relação à mucosa esofágica no presente estudo. Assim, pode-se inferir que provavelmente o epitélio escamoso seja resistente ao efeito direto do cádmio.

O câncer gástrico é uma das principais causas mundiais de mortalidade por câncer, superado apenas pelo câncer de pulmão (IARC, 2003). Geralmente, o câncer de estômago apresenta fator ambiental e comportamental como características predisponentes para o seu aparecimento (Tsugane, 2005). No

presente estudo, o cádmio levou a formação de lesões displásicas na mucosa gástrica, mostrando que o cádmio ingerido é um fator predisponente para câncer gástrico. Além disso, diferente do encontrado no epitélio esofágico é que é do tipo escamoso, o epitélio gástrico que é glandular sofreu alterações talvez pelo contato direto com o cádmio. O estudo de Nai et al (2015) mostrou formação de lesões pré-neoplásicas glandulares na próstata de animais expostos à alta concentração de cádmio adicionado à água de beber, corroborando que o epitélio glandular é mais susceptível ao efeito tóxico do cádmio. Porém, o estudo de Nai et al (2015) mostrou aumento de incidência de lesões pré-neoplásicas na próstata quando os animais foram expostos ao cádmio em pH ácido e no presente estudo o pH não influenciou a incidência destas lesões no estômago. Provavelmente, porque o pH deve influenciar na absorção de cádmio e para ação sobre o epitélio prostático, este elemento precisa ser absorvido, diferente do epitélio gástrico onde parecer ter efeito pelo contato direto.

É digno de nota que um dos principais fatores que afetam a toxicidade de cádmio é o tempo de exposição (Jarup e Akesson, 2009). Neste estudo, a exposição ao cádmio por seis meses (exposição crônica) também contribuiu substancialmente para o aparecimento de lesões gástricas.

O pH é um fator relevante em ambas as fases gástrica e intestinal e devem ser levado em consideração na análise dos resultados *in vitro* de análise de digestão (Waisberg et al., 2004).

Na circulação, o cádmio é principalmente ligado a metalotioneínas (MT) (Vesey, 2010). Na intoxicação crônica, o cádmio estimula a síntese *de novo* de metalotioneínas. A toxicidade celular começa quando o carregamento dos íons de cádmio excede a capacidade de tamponamento de metalotioneínas intracelulares (Sabolic et al., 2010). No estudo *in vitro* de Klein et al. (1986), a quase totalidade de cádmio permaneceu ligada à metalotioneína e o complexo Cd-MT foi resistente em relação a proteólise em pH acima de 3,5. Em valores de pH 2,5 e 1,7 a proteína foi digerida em 80% e 100%, respectivamente. O cádmio é pouco absorvido no estômago (Jarup e Akesson, 2009), mas considerando-se que o pH do estômago varia entre 1,5 a 2,0, é possível que também *in vivo* a proteólise do complexo Cd-MT talvez ocorra e pode afetar a absorção intestinal do cádmio (Klein et al., 1986).

O cádmio é absorvido por enterócitos, principalmente no jejuno e no duodeno proximal (Sabolic et al., 2010). Algumas proteínas essenciais de transporte de metal,

como transportador de metal divalente 1 (DMT1) transporta cádmio no intestino (Liu et al, 2008; Sabolic et al, 2010; Vesey, 2010). A DMT1 parece ser um transportador chave envolvido na toxicidade de cádmio. O cádmio livre pode ser retomado a partir do lúmen intestinal em enterócitos através de transporte mediado por DMT1 (Thévenod, 2010).

Os cotransportadores de zinco / bicarbonato, o ZIP8 e ZIP 14, expressos na membrana apical dos enterócitos também podem transportar cádmio nas células (Thévenod, 2010; Vesey, 2010). O receptor transitório do canal de potencial catiônico da subfamília V (TRPV) 5 e 6, que são os principais transportadores de cálcio no intestino e no rim, pode estar envolvido no transporte de cádmio nestes tecidos (Vesey, 2010). O possível papel das metalotioneínas na absorção de cádmio no domínio dos enterócitos luminiais não é clara (Sabolic et al., 2010).

O transportador DMT1 / SLC11A2 é um co-transportador $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ (Garrick et al., 2006). O transportador ZIP8 / SLC39A8 também foi demonstrado ser um $\text{Cd}^{2+}/\text{HCO}_3^-$ simportador (cotransportador) (Liu et al., 2008), bem como ZIP14 / SLC39A8 (Girijashanker et al., 2008). A absorção de Cd^{2+} mediada por ZIP8 (Liu et al., 2008) e ZIP14 (Girijashanker et al., 2008) é dependente dos níveis de HCO_3^- extracelulares. Talvez, a pH ácido ou básico em que o cádmio é carregado possa interferir na sua absorção, devido ao fato de os transportadores de cádmio serem também cotransportadores de ions H^+ e HCO_3^- . Além disso, o estudo *in vitro* de Waisberg et al. (2004) constatou que existe uma ligação de cádmio aumentado em valores de pH acima de 3 durante a fase de digestão intestinal, quando investigou o efeito do pH sobre a adsorção deste metal para alface.

Embora, o estudo de Ninkov et al. (2015) tenha mostrado que o consumo de cádmio resultou em danos nos tecidos e inflamação intestinal, neste estudo, os intestinos delgado e grosso não apresentaram alterações frente à exposição ao cádmio, embora este também apresente mucosa de padrão glandular, como o estômago. Este dado corrobora os achados de outros estudos com relação a resiliência do intestino a metais pesados (Breton et al., 2013b). Talvez, além do fato da microbiota intestinal limitar a carga corporal de metais pesados (Breton et al., 2013a), esta também possa conferir proteção à mucosa intestinal contra a ação dos metais pesados. O pH da água não contribuiu para a toxicidade do cádmio no intestino, apesar da possibilidade de influência deste nos transportadores de cádmio

nos enterócitos, mas este fato pode justificar as alterações dependentes do pH na próstata observadas no estudo de Nai et al. (2015).

5. Conclusão

A exposição crônica ao cádmio na água de beber levou à formação de lesões displásicas no epitélio glandular gástrico, mas não no epitélio do esôfago e intestino. Porém, o pH da água parece não ter influência sobre as lesões do trato digestório.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

Referências

- Abernethy, D.R., DeStefano, A.J., Cecil, T.L., Zaidi, K., Williams, R.L., 2010. Metal impurities in food and drugs. *Pharmaceutical Research* 27, 750-755.
- Barar, J., Omid, Y., 2013. Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy. *BiolImpacts*. 3, 149-162.
- Breton, J., Daniel C., Dewulf, J., Pothion, S., Froux, N., Sauty, M., Thomas, P., Pot, B., Foliginé, B., 2013a. Gut microbiota limits heavy metals burden caused by chronic oral exposure. *Toxicol Lett*. 13, 1249-6.
- Breton, J., Le Clerè, K., Daniel C., Sauty, M., Nakab, I., Chassat, T., Dewulf, J., Penet, S., Carnoy, C., Thomas, P., Pot, B., Nessler, F., Foliginè, B., 2013b. Chronic ingestion of cadmium and lead alters the bioavailability of essential and heavy metals, gene expression pathways and genotoxicity in mouse intestine. *Arch Toxicol*. 87, 1787-1795. doi: 10.1007/s00204-013-1032-6.
- Ciobanu, C., Slencu, B.G., Cuciureanu, R., 2012. Estimation of dietary intake of cadmium and lead through food consumption. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2, 617-623.
- Contam. 2009. Cadmium in food - Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on cadmium in food. *EFSA J*. 980, 1-139.
- Cunha, K.P.V, Nascimento, C.W.A, Pimentel, R.M.M, Accioly, A.M.A., Silva, A.J., 2008. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. *R. Bras. Ci. Solo* 32, 1319-1328.

- Garrick, M.D., Singleton, S.T., Vargas, F., Kuo, H-C., Zhao, L., Knöpfel, M. Davidson, T., Costa, M., Paradkar, P., Roth, J.A., Garrick, L.M., 2006. DMT1: which metals does it transport? *Biol Res* 39,79–85.
- Girijashanker, K., He, L., Soleimani, M., Reed, J.M., Li, H., Liu, Z. Wang, B., Dalton, T.P., Nebert, D.W., 2008. Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter. *Mol Pharmacol* 73, 1413–1423.
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., Groneberg, D.A. 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol.* 1, 22. doi: 10.1186/1745-6673-1-22
- Hellstrom, L., Persson, B., Brudin, L., Grawé, K.P., Oborn, I., Järup, L., 2007. Cadmium exposure pathways in a population living near a battery plant. *Sci Total Environ.* 373, 447-455.
- IARC - International Agency for Research on Cancer, 2003. World cancer report, in: Stewart, B.W., Kleihues, P. (eds). World Health Organization (WHO). IARC Press, Lyon.
- Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Bri Med Bull.* 68, 167-182.
- Järup, L., Akesson, A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol.* 3, 201-208.
- Jazaeri, A.A., YEE, C.J., Sotiriou, C., Brantley, K.R., Boyd, J., Liu, E.T. 2002. Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2- linked, and sporadic ovarian cancers. *J Natl Cancer Inst.* 94, .990-1000.
- Klein, D., Greim, H., Summer, K.H., 1986. Stability of metallothionein in gastric juice. *Toxicology.* 4,121-129.
- Kun, Y., Lee, C. H., Tan, P.H., Hong, G.S., Wee, S.B., Wong, C.Y., Tan, P., 2004. A molecular signature of the Nottingham prognostic index in breast cancer. *Cancer Res.* 64, 2962-2968.
- Liu, Z., Li, H., Soleimani M., Girijashanker, K., Reed, J.M., He, L., Dalton, T.P., Nebert, D.W., 2008. Cd²⁺ versus Zn²⁺ uptake by the ZIP8 HCO₃⁻ dependent symporter: kinetics, electrogenicity and trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 365, 814–820.
- Martelli, B.K.L., Melo, D.M., Nai, G.A., Parizi, J.L.S., 2014. Influence of water pH in oral changes caused by cadmium poisoning: an experimental study in rats. *Rev Odontol UNESP* 43, 1-5.

- Motta, A.C.F., Migliari, D.A., Gioso, M.A., Komesu, M.C., Sala, M.A., Lopes, R.A., 2004. The carcinogenic potential of cadmium in the palatal and gingival epithelium of rats. A morphologic and morphometric analysis. *Braz J Vet Res Animal Sci* 41,183-188.
- Nai, G.A., Golghetto, G.M., Estrella, M.P.S., Teixeira, L.D.S., Moura, F.C., Bremer Neto, H., Parizi, J.L.S., 2015. Influence of pH of water in the genesis of cancer in cadmium poisoning: an experimental study in rats. *Histology and Histopathology* 30, 61–67.
- Ninkov, M., Popov Aleksandrov, A., Demenesku, J., Mirkov, I., Mileusnik, D., Petrovic, A., Grigorov, I., Zolotarevski, L., Tolinacki, M., Kataranovski, D., Brceski, I., Kataranovski, M., 2015. Toxicity of oral cadmium intake: Impact on gut immunity. *Toxicol Lett.* 237, 89-99. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.06.002.
- Olsson, I.M., Bensryd, I., Lundh, T., Ottosson, H., Skerfving, S., Oskarsson, A., 2002. Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects. *Environ Health Perspect.* 110, 1185-1190.
- Olsson, I.M., Eriksson, J., Oborn, I., Skerfving, S., Oskarsson, A., 2005. Cadmium in food production systems: A health risk for sensitive population groups. *Ambio.* 4-5, 344-351.
- Pellegrine, P., Strambi, A., Zipolli, C., Hägg-Olofsson, M., Buoncervello, M., Linder, S., De Milito, A., 2014. Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: Implications for cancer therapies. *Autophagy.* 4, 562-571.
- Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J., 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *Int J Biochem Cell Biol.* 41, 1665-1677.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C. et al., 2002. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 346, 1937-1947.
- Sabolić I., Breljak D., Škarica M., Herak-Kramberger C.M., 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals* 23, 897–926. doi: 10.1007/s10534-010-9351-z.
- Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P.E., Williams, D.J., Moore, M.R., 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett.* 1-3, 65-83.

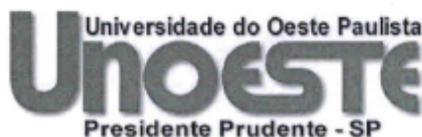
- Tannock, I.F., Rotin, D., 1989. Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation – Department of Medicine and Medical Biophysics, Ontario Cancer Institute and University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.
- Thévenod F., 2010. Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells. *Biometals* 23,857–875. doi: 10.1007/s10534-010-9309-1
- Tsugane, S., 2005. Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Sci.* 96, 1-6.
- Vesey, D.A., 2010. Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: focus on the interaction with essential metals. *Toxicol Lett.* 198, 13-19. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.05.004.
- Waisberg, M., Black, W.D., Waisberg, C.M., Hale, B., 2004. The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. *Ostinata*). *Food Chem Toxicol.* 42, 835-842.

Agradecimentos

A Edvaldo Mamede dos Santos, pelo preparo das soluções.

ANEXOS

**ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO
USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA
(UNOESTE)**



**Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**

PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado “ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DE LESÕES DO TRATO DIGESTÓRIO POR INTOXICAÇÃO COM CÁDMIO EM RATOS”, cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) e na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número nº 2202 tendo como pesquisador responsável o (a) Profº (a) GISELE ALBORGHETTI NAI e os discentes LARISSA DI SANTI TEIXEIRA GUASSÚ, MARIANI PAULINO SORIANO ESTRELLA, MOZART ALVES GONÇALVES FILHO, foi avaliado e **APROVADO** nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente/SP, 7 de Novembro de 2014.


Profº Drº Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq


Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA-UNOESTE

ANEXO 2 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO PARA REVISTA CIENTÍFICA

The screenshot displays the Elsevier Editorial System (EES) interface for the journal 'Food and Chemical Toxicology'. The page shows a list of submissions being processed for the author Gisela Alborghetti Nai, Ph.D., M.D. The submission in question is titled 'STUDY OF THE INFLUENCE OF THE pH OF WATER IN THE INITIATION OF DIGESTIVE TRACT INJURY IN CADMIUM POISONING IN RATS'. The submission date is April 18, 2015, and the current status is 'Submitted to Journal'. The page also includes navigation links, a search bar, and a footer with copyright information.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission		STUDY OF THE INFLUENCE OF THE pH OF WATER IN THE INITIATION OF DIGESTIVE TRACT INJURY IN CADMIUM POISONING IN RATS	Apr 18, 2015	Apr 18, 2015	Submitted to Journal