

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 19/11/2018.

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**Estudo dos efeitos biológicos da poliamina putrescina  
em diferentes organismos-teste**

**FRANCO DANI CAMPOS PEREIRA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Rio Claro - SP  
Maio - 2017

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**Estudo dos efeitos biológicos da poliamina putrescina  
em diferentes organismos-teste**

**Doutorando: Franco Dani Campos Pereira**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales**

**Coorientadora: Profa. Dra. Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.



Rio Claro – São Paulo – Brasil

Maio - 2017

574.88      Pereira, Franco Dani Campos  
P436e          Estudo dos efeitos biológicos da poliamina putrescina em diferentes  
organismos-teste / Franco Dani Campos Pereira. - Rio Claro, 2017  
163 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biotecnologia de Rio Claro

Orientador: Maria Aparecida Marin Morales

Coorientador: Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar

1. Biologia molecular. 2. Toxicologia ambiental - Risco de  
contaminação pelos cemitérios. 3. Necrochorume. 4. Cemitérios. 5.  
Aderências cromossômicas. 6. Estresse oxidativo. 7. Esteroidogênese. I.  
Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: Estudo dos efeitos biológicos da poliamina putrescina em diferentes organismos teste

**AUTOR: FRANCO DANI CAMPOS PEREIRA**

**ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:




Prof.ª Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Pmfa. Dra. IGUEIREDO  
Centro Universitário Herminio Ometto / UNIARARAS

Prof.ª. Dra. AJ !Pr.  
Departamentode Genética / Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. EDSON LUIS MAISTRO  
DepartamM} : logia / Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília - UNESP

Prof.ª. Dra. ISTIANE MARTINEZ DEMORAES  
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 19 de maio de 2017

“Todas as substâncias são venenos, não existe nada que não seja veneno. Somente a dose correta diferencia o veneno do remédio.” Paracelso

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu agradeço imensamente a Deus, por ter me dado a honra de ter vindo ao mundo por meio de duas pessoas tão encantadoras como meus pais. Agradeço também a Deus, por ter me dado muita força quando eu achava que sozinho já não conseguia mais.

Agradeço ao meu pai, minha mãe e ao meu irmão, que souberam entender toda a ausência de uma vida ao lado deles, para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos. Obrigado pelo carinho, companheirismo, respeito e toda ajuda que me deram ao longo de tanto tempo.

Obrigado ao meu irmão Alan, por toda parceria e amor, e por sempre me encorajar nos momentos difíceis e me estimular a perseguir todos os meus sonhos.

À toda a minha família, tios e tias, primos e primas, que também souberam entender a minha ausência e sempre me apoiaram em todos os momentos. Agradeço muito pela generosidade de todos.

À minha orientadora, Profa Dra Maria Aparecida Marin Morales, por ter me aceito como seu orientado permitindo que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa. Serei eternamente agradecido por toda ajuda, puxões de orelhas, conversas e pela amizade. Muito obrigado por ser essa profissional tão talentosa e um ser humano exemplar. Se tornou uma das pessoas que eu mais admiro nesse mundo.

Agradeço à minha coorientadora, Profa Dra Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar, por quem sou eternamente grato, por ter me apresentado ao mundo científico, por ter sido minha primeira orientadora e por ter me ensinado muito do que sei hoje.

À FAPESP (**Processo No 2013/08279-4**), pela bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro na realização dos experimentos. Graças a essa bolsa eu tive a oportunidade de realizar muitos dos sonhos.

A todos os meus amigos e colegas mutagênicos: Bairral, Camila, Cris, Cleiton, Dânia, Jaque, Jorge, Laís, Letícia Gigeck, Leticia Gonçalves, Leticia, Bulas, Márcia, Maria Tereza, Matheus, Michele, Nádia, Thays, William, Samatha, Mileni e a Adriana Correa. Obrigado pela amizade e pelo convívio.

Agradeço ao Bairral e ao Cleiton, pela convivência na nossa república (Rep. dos confusos) e pela amizade.

Agradeço imensamente a Raquel Hara, pela amizade, parceria nos trabalhos, trocas de conhecimento e por tantas conversas e risadas.

Um AGRADECIMENTO em maiúsculo, aos meus alunos de iniciação científica, os meus primeiros alunos nesta jornada científica, com os quais eu aprendi muito e que tiveram participação muito grande na realização deste trabalho. Obrigado Guilherme, Leticia Franco, Leticia Gonçalves, Leticia Bulascoschi e Raissa. Foi uma honra fazer parte da vida de vocês.

À FHO- UNIARARAS, por ter disponibilizado o centro de experimentação animal e os laboratórios de pesquisa para a realização dos experimentos com ratos Wistar.

À técnica da UNIARARAS, Renata Barbieri Pulz, por mais uma vez ter sido um anjo na minha vida, colabando com o processamento dos materiais biológicos.

A todos os professores que eu já tive na minha vida, que ajudaram a construir o caminho até essa tese. E aos professores e pesquisadores do departamento de biologia.

E um agradecimento especial aos membros da banca de defesa, que se prontificaram a ler este trabalho e pelas contribuições que serão feitas.



## RESUMO

A qualidade das águas superficiais e subterrâneas tem sido ameaçada por diferentes fontes de contaminação ambiental. Os cemitérios têm se destacado neste quesito, principalmente por disponibilizar para o ambiente um líquido produzido pela decomposição cadavérica, denominado de necrochorume. O necrochorume é rico em substâncias químicas, dentre elas a poliamina putrescina, uma substância que desempenha importantes funções fisiológicas nos organismos. Porém, se essa substância se apresenta em concentrações maiores que as fisiológicas, pode desencadear problemas para os organismos expostos, pois, devido à sua alta bioatividade, passa a ser um contaminante perigoso para os seres vivos. Como esse tipo de contaminação tem sido pouco estudada ecotoxicologicamente, este trabalho é pioneiro nesta abordagem. Para a avaliação dos efeitos biológicos desencadeados pela exposição à diferentes concentrações de putrescina, foram realizados diversos ensaios com diferentes bioindicadores. Ensaios biológicos, *in vitro* e *in vivo*, foram desenvolvidos com os organismos testes *Allium cepa*, *Salmonella typhimurium*, cultura de células humanas (HepG2) e ratos Wistar. Em células meristemáticas de *A. cepa* foram avaliados o potencial genotóxico, por meio do teste de aberrações cromossômicas, e mutagênico, por meio da análise de micronúcleos. As células meristemáticas expostas a concentração de 23 mg/kg de putrescina apresentaram aumento significativo no índice de mutagenicidade e aumento na frequência de aderências cromossômicas, indicando uma ação aneugênica da substância. O potencial mutagênico da putrescina foi avaliado pelo teste de Ames, com as linhagens de *S. typhimurium* TA 98 e TA 100 (com e sem fração metabolizadora). Foi observada uma resposta positiva para as duas linhagens utilizadas, após ativação metabólica, mostrando que a metabolização da putrescina aumenta seu potencial de causar mutações no DNA. Foram desenvolvidos com células HepG2, testes de citotoxicidade (MTT e resazurina), genotoxicidade (cometa), de mutagenicidade (micronúcleo com bloqueio de citocinese). Também foram avaliados nestas células os padrões de expressão gênica para genes envolvidos com a via de metabolização de xenobióticos, na resposta a danos no reparo do DNA e estresse oxidativo. Os testes de citotoxicidade permitiram selecionar concentrações não citotóxicas para a realização dos demais experimentos com HepG2. Foram estabelecidas as concentrações de 46,3, 138,9, 231,5 e 324,1 mg/kg, correspondendo respectivamente a 10, 30, 50 e 70 % da DL50 estabelecida para ratazanas (463 mg/kg). No ensaio do cometa, todas as concentrações testadas foram significativas para o critério intensidade da cauda, enquanto que para os critérios comprimento da cauda e momento da cauda, apenas as concentrações de 10 e 50 %

foram significativas. Houve aumento da frequência de MN para as concentrações de 10, 30 e 50 %, enquanto que a frequência de alterações nucleares (brotos e pontes) foram significativas somente para a maior concentração testada (70 %). A expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo aumentaram, em relação ao grupo controle. Houve também aumento da expressão dos genes de reparo do DNA, principalmente para as concentrações de 10 e 50 %. Os genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos tiveram maior expressão nas células expostas às maiores concentrações. Esses resultados indicam uma ação genotóxica e mutagênica da putrescina para células HepG2 e mostram que a substância foi capaz de modular os níveis de expressão gênica desses genes estudados. Os ratos Wistar foram expostos, por gavagem, a três diferentes concentrações de putrescina (10, 30 e 50 % da DL50), durante 56 dias consecutivos. Foram avaliados parâmetros biométricos, hematológicos e bioquímicos, que forneceram informações sistêmica sobre o potencial tóxico da substância. Os animais expostos apresentaram parâmetros alterados para o peso de órgão como fígado, rim, pulmão; alterações nos índices hematológicos (aumento de células vermelhas, plaquetas e células do sistema imunológico); e alterações nos parâmetros bioquímicos, como distúrbios nos índices glicêmicos e colesterolêmicos. O potencial genotóxico da putrescina foi avaliado em células sanguíneas dos ratos, por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo em medula óssea. Nestes organismos, a putrescina se mostrou genotóxica para todos os grupos expostos, porém em maior intensidade no grupo exposto à menor concentração (46,3 mg/kg). Essa mesma concentração induziu um aumento significativo de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN), confirmando o seu potencial genotóxico. Foram também avaliados parâmetros reprodutivos como contagem de espermatozoides nos testículos e nos epidídimos, expressão proteica de enzimas envolvidas na biossíntese de testosterona, alterações morfológicas, morfométricas e estereológicas nos testículos e morfológicas nos epidídimos, além de avaliação do estresse oxidativo nos testículos e nos epidídimos. Os resultados demonstraram forte ação da putrescina sobre os índices reprodutivos, como diminuição na produção espermática, diminuição na expressão de enzimas importantes para a biossíntese de testosterona (CYP11A1, 17 $\beta$ -HSD e StAR) e indução de estresse oxidativo e alterações morfológicas.

**Palavras-chave:** necrochorume, cemitérios, aderências cromossômicas, Teste de Ames, ratos Wistar, genotoxicidade, mutagênicidade, estresse oxidativo, parâmetros reprodutivos, esteroidogênese.

## ABSTRACT

The quality of surface water and groundwater has been threatened by different sources of environmental contamination. The cemeteries have stood out in this question, mainly for making available to the environment a liquid produced by the cadaveric decomposition, denominated of necroslurry. Necroslurry is rich in chemicals, among them a polyamine called putrescine, a substance that plays important physiological functions in organisms. However, if this substance is present in higher concentrations than the physiological ones, it can cause problems for the exposed organisms, because, due to its high bioactivity, it becomes a contaminant dangerous to living beings. As this type of contamination has been little studied ecotoxicologically, this work is pioneering in this approach. For the evaluation of the biological effects triggered by the exposure to different concentrations of putrescine, several tests with different bioindicators were carried out. Biological assays, *in vitro* and *in vivo*, were developed with the test organisms *Allium cepa*, *Salmonella typhimurium*, culture of human cells (HepG2) and Wistar rats. The genotoxic potential were evaluated in meristematic cells of *A. cepa* by the chromosomal aberration test and the mutagenic potencial by the micronucleus analysis. The meristematic cells exposed to the concentration of 23 mg/kg of putrescine showed a significant increase in the index of mutagenicity and increase in the frequency of chromosomal adherence, indicating aneugenic action of the substance. The mutagenic potential of putrescine was evaluated by the Ames test, with *S. typhimurium* TA 98 and TA 100 strains (with and without metabolizing fraction). A positive response was observed for the two strains used after metabolic activation, showing that the metabolic process of putrescine increases its potential to cause mutations in the DNA. Cytotoxicity (MTT and resazurin), genotoxicity (comet) and, mutagenicity test (micronucleus with block of cytokinesis) were developed with HepG2 cells. We also evaluated the gene expression patterns of genes involved in the xenobiotic metabolism pathway in response to damage to DNA repair and oxidative stress. Cytotoxicity tests allowed the selection of non-cytotoxic concentrations, which were used in the other experiments with HepG2. Concentrations of 46.3, 138.9, 231.5 and 324.1 mg/kg, corresponding respectively to 10, 30, 50 and 70 % of the LD50 for rats (463 mg/kg) were established. From the comet assay it was observed that all the concentrations tested were significant for the tail intensity criterion, whereas for the tail length and tail moment criteria only the concentrations of 10 and 50 % were significant. There was an increase in the frequency of MN at concentrations of 10, 30 and 50 %, while the frequency of nuclear changes (buds and chromosomal bridges) were significant only at the

highest concentration tested (70 %). The expression of genes related to oxidative stress increased in relation to the control group. There was also increased expression of DNA repair genes, especially at concentrations of 10 and 50 %. Genes related to xenobiotic metabolism had greater expression in the cells exposed to higher concentrations. These results indicate a genotoxic and mutagenic action of putrescine for HepG2 cells and show that the substance was able to modulate the levels of gene expression of these studied genes. Wistar rats were exposed by gavage to three different concentrations of putrescine (10, 30 and 50 % of LD50) for 56 consecutive days. Biometric, hematological and biochemical parameters were evaluated, which provided systemic information about the toxic potential of the substance. The exposed animals presented altered parameters for organ weight such as liver, kidney, lung; changes in hematological indices (increase of red blood cells, platelets and cells of the immune system); and alterations in biochemical parameters, such as disturbances in glycemie and cholesterolemie indexes. The genotoxic potential of putrescine was evaluated in the blood cells of the rats by the comet assay and the mutagenic potential by the micronucleus test in bone marrow. In these organisms, putrescine was genotoxic for all exposed groups, but more intense in the group exposed to the lowest concentration (46.3 mg/kg). This same concentration induced a significant increase of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes (PCEMN), confirming its genotoxic potential. Reproductive parameters such as sperm counts in the testicles and epididymides, protein expression of enzymes involved in testosterone biosynthesis, morphological, morphometric and stereological alterations in the testicles and morphological aspects of the epididymides, as well as evaluation of oxidative stress in the testicles and epididymides were also evaluated. The results showed a strong action of putrescine on the reproductive indices, such as decrease in sperm production, decrease in the expression of enzymes important for testosterone biosynthesis (CYP11A1, 17 $\beta$ -HSD and StAR) and induction of oxidative stress and morphological changes. In view of all these evaluations, it was possible to aggregate information on the biological effects promoted by the exposure of different organisms to the different concentrations of putrescine evaluated. These results contribute to information concerning the toxicity of this substance and alert to its potential as an environmental contaminant.

**Key words:** necroslurry, cemeteries, chromosomal adherence, Ames test, Wistar rats, genotoxicity, mutagenicity, oxidative stress, reproductive parameters, steroidogenesis.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

3R	Replacement, Reduction e Refinement
Abs	Absorbância
AC	Aberrações Cromossômicas
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CN	Controle Negativo
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CP	Controle Positivo
DNTB	5-5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathiona Reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
HepG2	Células de Hepatocarcinoma Humano
IDC	Índice de Divisão Celular
IM	Índice Mitótico
LMP	Low Melting Point
MDA	Malondialdeído
MEM	<i>Meio Mínimo Essencial Eagle</i>
MMS	Matanossulfonato de metila
MN	Micronúcleo
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCE	Eritrócito Normocromático
NMP	Normal Melting Point
OMS	Organização Mundial da Saúde
EPC	Eritrócitos Policromáticos
SBF	Soro Bovino Fetal
-SH	Grupo Sulfidril
SOD	Superóxido Dismutase
TCA	Ácido Tricloroacético
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1. Cemitérios como fonte de contaminação ambiental .....	15
2.2. Poliaminas.....	17
2.3. Putrescina.....	18
2.4. Principais tipos de bioensaios para estudos de toxicidade.....	20
2.4.1. Bioensaios com plantas .....	20
2.4.2. Bioensaios In vitro.....	20
2.4.3. Bioensaios In vivo .....	21
2.5. Estudos de exposição sistêmica, por meio de avaliações hematológicas e bioquímicas 22	
2.6. Avaliação do potencial genotóxico de substâncias químicas .....	23
2.7. Efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutor .....	26
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos .....	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Substância química avaliada.....	32
4.2 Bioensaio com <i>A. cepa</i> .....	33
4.2.1 Exposição das sementes de <i>A. cepa</i> .....	33
4.2.2 Teste de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> .....	33
4.3 Teste de Ames.....	34
4.3.1 Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	34
4.3.2 <i>Salmonella</i> /microsoma – Teste de Ames .....	34
4.4 Bioensaios com células de hepatocarcinoma humano (HepG2).....	35
4.4.1 Cultura de células de hepatocarcinoma humano (HepG2).....	35
4.4.2 Teste de citotoxicidade do MTT (Brometo de Tiazolil azul de Tetrazólio) .....	36
4.4.3 Teste de citotoxicidade com redução da resazurina .....	36
4.4.4 Ensaio do cometa.....	37
4.4.5 Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese .....	38
4.4.6 Cálculo do índice de divisão nuclear (IDN) .....	38
4.4.7 Análises moleculares: extração de RNA e perfil de expressão gênica.....	39
4.5 Bioensaios com ratos Wistar.....	41

4.5.1	Animais experimentais e delineamento experimental .....	41
4.5.2	Coleta de sangue caudal, após 15 e 30 dias de exposição .....	42
4.5.3	Eutanásia e coleta de materiais biológicos .....	42
4.5.4	Sangue para análises hematológicas e bioquímicas.....	43
4.5.5	Dosagem de glicemia e colesterol nas amostras de sangue dos ratos submetidos a 15, 30 e 56 dias de exposição .....	43
4.5.6	Ensaio do cometa com células sanguíneas. ....	44
4.5.7	Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores.....	44
4.5.8	Análises dos testículos e epidídimos .....	45
4.5.9	Quantificação de estresse oxidativo nos testículos e epidídimos .....	46
4.5.10	Obtenção do material para análises histológicas .....	48
4.5.11	Histoquímica.....	48
4.5.12	Análise morfométrica e estereológica dos testículos e células de Leydig.....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
	<b>Artigo 1 .....</b>	<b>52</b>
	<b>Avaliação toxicogenética da putrescina para <i>Allium cepa</i> e <i>Salmonella typhimurium</i> .....</b>	<b>52</b>
	<b>Artigo 2 .....</b>	<b>69</b>
	<b>Potencial genotóxico da putrescina e alteração na expressão de genes envolvidos em mecanismos de toxicidade na linhagem celular de hepatocarcinoma humano HepG2.....</b>	<b>69</b>
	<b>Artigo 3 .....</b>	<b>91</b>
	<b>Toxicidade da poliamina putrescina em ratos Wistar machos.....</b>	<b>91</b>
	<b>Artigo 4 .....</b>	<b>111</b>
	<b>Danos no DNA de ratos Wistar induzidos pela poliamina putrescina.....</b>	<b>111</b>
	<b>Artigo 5 .....</b>	<b>128</b>
	<b>Avaliação dos efeitos reprodutivos em ratos wistar induzidos pela poliamina putrescina ..</b>	<b>128</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>153</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>156</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O grande desenvolvimento tecnológico, agrícola e industrial vivenciado pelo mundo nas últimas décadas, teve como uma de suas consequências a introdução de uma vasta quantidade de novas substâncias químicas potencialmente tóxicas no ambiente (ZAGATO; BERTOLLETI, 2006). O ambiente aquático, por sua vez, tem sido o mais impactado, devido ao intenso lançamento de efluentes domésticos, industriais e mesmo agrícolas, sem o tratamento adequado. A contaminação dos recursos hídricos põe em risco a disponibilidade de água potável para os organismos e, conseqüentemente, para o homem (MORAES; JORDAO, 2002; MATSUMOTO et al., 2006; MIRANDA; SILVA, 2011; ZENG; WU, 2013). Segundo Rebouças (1999), somente 0,001 % da água existente no planeta corresponde às águas doces superficiais, que podem ser utilizadas pelo homem de forma sustentável e sem caracterizar impacto ao meio ambiente.

O aumento da população mundial reflete num maior consumo de água potável e como os recursos hídricos disponíveis estão cada vez mais comprometidos e escassos, tem havido, gradativamente, um aumento no interesse de uso de reservas de águas subterrâneas (ALMEIDA et al., 2006). Atualmente, essas reservas se caracterizam como reservatórios de água de boa qualidade para o abastecimento de água potável (CCE, 2003). Estima-se que 22 % de toda a massa aquática doce do planeta estão representadas pelas águas subterrâneas (VASCONCELOS et al., 2006). Segundo Falkenmark (2005), um terço da população mundial é dependente dessas águas para sobreviver.

A Agência Nacional de Águas – ANA (2007) relata que no Brasil, o aproveitamento das águas subterrâneas é crescente, principalmente nas áreas de grandes centros urbanos como Recife, Fortaleza, Brasília, Campo Grande e Dourados. No Estado de São Paulo, aproximadamente 70 % dos municípios utilizam, de forma total ou parcial, o abastecimento de água advinda de reservas subterrâneas (HIRATA, 2006).

Assim como as águas superficiais, as águas subterrâneas também vêm sofrendo contaminação. As maiores causas de poluição têm sido associadas à ausência de redes de esgoto, ao lançamento de efluentes industriais diretamente no solo, às práticas convencionais de cultivo agrícola e, mais recentemente, à presença de cemitérios (MATOS, 2001; NEIRA et al., 2008).

Segundo Santos (2009), a contaminação conferida pelos cemitérios se assemelha à de aterros sanitários, pela grande quantidade de matéria orgânica e inorgânica que são



produzidas, com o agravante de ainda ter a presença de matéria orgânica contaminada por vírus, bactérias e substâncias químicas decorrentes de tratamentos de saúde, que podem colocar em risco o meio ambiente e a saúde pública. Porém, a principal causa de contaminação ambiental pelos cemitérios é o líquido liberado intermitentemente pelos cadáveres em putrefação, denominado de necrochorume (COSTA SILVA; FILHO, 2008).

Diversos estudos estão sendo realizados sobre o potencial de contaminação do necrochorume, porém ainda pouco se sabe sobre as propriedades físico-químicas deste contaminante. A maioria dos estudos já realizados tem se preocupado, quase que exclusivamente, com a contaminação dos solos, das águas subterrâneas e superficiais por vírus, bactérias e metais. Os componentes químicos do necrochorume, como por exemplo a poliamina putrescina, praticamente não tem sido avaliada quanto ao seu potencial como poluente ambiental e quanto aos seus efeitos sobre os organismos expostos. Porém, esse contaminante é produzido em quantidade considerável no necrochorume e apresenta potencial tóxico reconhecido.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos pela exposição de diferentes organismos à diferentes concentrações de putrescina, podemos concluir:

- Para uma avaliação consistente dos efeitos biológicos de uma determinada substância, é necessário o uso de diferentes parâmetros de avaliação e de diferentes bioindicadores, considerando que cada organismo apresenta suas particularidades biológicas.
- A putrescina apresentou efeitos tóxicos para os diferentes organismos estudados, mesmo em concentrações bem menores que a correspondente a  $DL_{50}$  definida para ratas (436 mg/kg).
- As sementes de *A. cepa* expostas nas concentrações de 231,5, 138, 9 e 46,3 mg/kg não apresentaram boa qualidade para serem usadas em preparação citogenéticas e as expostas à concentração de 46,3 mg/kg exibiram C-tumores nas raízes.
- As células meristemáticas de *A. cepa* apresentaram um aumento na frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas (AC) nas raízes expostas a concentração de 23 mg/kg. A principal AC observada foi a aderência cromossômica, indicando uma ação aneugênica da putrescina.
- O ensaio de *Salmonella*/microssoma revelou que a putrescina é capaz de induzir atividade mutagênica nas linhagens TA 98 e TA 100, com presença da fração metabolizadora S9. Esse resultado indica que a metabolização da putrescina aumenta seu potencial em causar mutações tanto do tipo frameshift como por substituição de base no DNA.
- Para a determinação das concentrações citotóxicas da putrescina para células HepG2, foram realizados o teste de MTT e o teste de Redução da resazurina. Ambos os testes se apresentaram como boas ferramentas de análises da citotoxicidade desta substância, porém o teste de redução da resazurina se mostrou mais sensível, uma vez que detectou a citotoxicidade para a concentração de 324,1 mg/kg, não observada pelo teste do MTT.
- Na avaliação dos efeitos genotóxicos da putrescina em células HepG2, pelo ensaio do cometa, foram observadas que as concentrações referentes a 10 % e 50 % da  $DL_{50}$  foram genotóxicas para esta linhagem celular. Pelo ensaio de MN, foi possível observar aumento na frequência dos MNs para as concentrações de 10, 30 e 50 % da  $DL_{50}$ . Por outro lado, a indução de alterações nucleares, como brotos e pontes cromossômicas, foi observada apenas para a concentração de 70 %. Estes resultados sugerem que as diferentes concentrações de

putrescina podem desencadear distintos mecanismos de ação sobre o material genético de células de hepatocarcinoma humano.

- Os padrões de expressão gênica avaliados em células HepG2, demonstraram que a putrescina é capaz de induzir danos oxidativos, uma vez que os genes correspondentes às enzimas antioxidantes apresentaram expressões aumentadas de mRNAs.

- Os genes correspondentes às enzimas envolvidas na via de reparo do DNA, *ERCC1* e *CHEK1* aumentaram, significativamente, nas células expostas às concentrações de 10 e 50 %. Para essas mesmas concentrações de putrescina foi observada uma super expressão do gene *APEX1*. Esses resultados corroboram com os dados de índices de danos no DNA, observados pelo ensaio do cometa, e indicam que, mesmo com o aumento na expressão destes genes, as células não foram capazes de reparar os danos no DNA, o que pôde ser confirmado pelo aumento na frequência de MNs.

- Foram observadas pelas análises hematológicas e bioquímicas, realizadas em ratos Wistar, alterações em diferentes parâmetros relacionados a essas análises. Os índices colesterolêmicos foram os mais afetados. Desta forma podemos inferir que a putrescina provoca alterações nestes índices, sendo capaz de induzir perturbações na ligação entre os carboidratos e o metabolismo de lipídios. Todas as concentrações testadas promoveram alterações em um conjunto de marcadores, revelando a complexidade desta substância ao interagir com os componentes celulares.

- A genotoxicidade da putrescina em ratos Wistar foi avaliada pelo ensaio do cometa, com 15, 30 e 56 dias de exposição. Os resultados indicaram um maior potencial genotóxico para a menor concentração testada (46,3 mg/kg), desde o primeiro período avaliado. De acordo com os resultados observados, os danos no DNA foram constantes e acumulativos e todas as concentrações foram genotóxicas para 56 dias de exposição.

- Foi observado aumento nos índices de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPCMN), apenas para a concentração de 46,3 mg/kg. Desta forma, podemos inferir que esta concentração foi a mais genotóxica para os animais expostos.

- Em relação aos parâmetros reprodutivos, a substância avaliada apresentou uma resposta dose-dependente, onde a maior concentração (231,5 mg/kg) foi a mais deletéria. A produção diária de espermatozoides diminuiu, significativamente, nas concentrações de 138, 9 e 231,5 mg/kg, refletindo no número de espermatozoides presentes nos testículos e nos epidídimos.

- A expressão proteica de importantes enzimas da via de produção de testosterona (CYP11A1, 17  $\beta$ -HSD e StAR) apresentaram seus níveis diminuídos em ambos os grupos avaliados. Isto refletiu na produção de testosterona sérica, que também diminuiu em ambos os grupos.

- A putrescina induziu sérios efeitos deletérios sobre o sistema reprodutor de ratos Wistar machos, indicando que esta substância apresenta riscos para as funções reprodutiva dos animais expostos a ela.

Diante de tantos efeitos biológicos observados pela exposição de diferentes bioindicadores a diferentes concentrações de putrescina, podemos inferir que essa substância tem uma alta toxicidade para os seres vivos, devendo ser considerada perigosa para o meio biológico. Por meio desse estudo, pode-se também concluir que a presença desta substância no ambiente, deve ser considerada de grande risco ambiental.

Este trabalho teve como objetivo reunir a maior quantidade de informações possíveis relacionadas ao potencial tóxico da putrescina, uma vez que existem poucos e limitados estudos sobre a ação biológica dos compostos químicos presentes no necrochorume. Esperamos com essas informações contribuir para um maior conhecimento sobre os impactos causados pela contaminação proporcionada pelos cemitérios, alertando sobre os perigos que esta contaminação representa para o meio ambiente e para a saúde pública. No entanto, para avaliar corretamente os riscos ambientais, é necessário determinar com precisão, quais seriam as quantidades de putrescina presente no solo e/ou na água e qual a meia vida desta substância, nas mais variadas malhas e condições ambientais.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, S.; SARKAR, B.; CHATTERJEE, A.; MAHAPATRA, C. T.; AYYAPPAN, S. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 58, n. 2, p. 220–6, 2004.
- AEBI, H. Catalase. In: BERGMAYER, H. V. (Ed.) **Methods in Enzymatic Analysis**, vol. 2. Academic press, New York, pp. 674–684, 1974.
- ALMEIDA, A. M.; MACEDO, J. A. B. Parâmetros Físico-Químicos de Caracterização de Contaminação do Lençol Freático por Necrochorume. In: Seminário de Gestão Ambiental – Um Convite a interdisciplinariedade, 1, 2005, Juiz de Fora.
- ALMEIDA, F. R.; ESPINDULA, J. C.; VASCONCELOS, U.; CALAZANS, G. M. T. Evaluation of the microbial contamination occurrence in the aquifer under várzea cemetery in Recife city, Brazil. **Águas Subterrâneas**, v. 20, n. 2, p.19-26, 2006.
- ANA - Agência Nacional de Águas Disponibilidade e Demanda de Recursos Hídricos no Brasil. **Caderno de Recursos Hídricos**. 2007. Agência Nacional de Águas. Disponível em <<http://www.ana.gov.br/sprtew/2/2-ANA.swf>>. Acesso em 01 de abril 2013.
- ANDERSEN, M. L. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP. 2004. 167 p
- ANSOAR RODRÍGUEZ, Y.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO, J.; et al. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438–42, 2015.
- AUGER, J.; KUNSTMANN, J. M.; CZYGLIK, F.; JOUANNET, P. Decline in Semen Quality among Fertile Men in Paris during the Past 20 Years. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 5, p. 281–285, 1995.
- BACH, B.; LE QUERE, S.; VUCHOT, P.; GRINBAUM, M.; BARNAVON, L. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine instability during wine sample storage. **Anal Chim Acta**, v. 732, p. 114–119, 2012.
- BAKER, J. R. The histochemical recognition of lipine. **Q J Microsc Sci**, v. 87, p. 441– 470, 1946.
- BARDOCZ, S.; DUGUID, T.J.; BROWN, D.S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A.; WHITE, A.; RALPH, A. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. **Br J Nutr**, v. 73, p. 819–29, 1995.
- BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n. 2. P. 43-50, 2010.
- BENACHOUR, N.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; SERALINI, G.-E. Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 222, n. 2, p. 129–40, 2007.

BLÁHA, L.; HILSCEROVÁ, K.; MAZUROVÁ, E.; et al. Alteration of steroidogenesis in H295R cells by organic sediment contaminants and relationships to other endocrine disrupting effects. **Environment International**, v. 32, n. 6, p. 749–757, 2006.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625–31, 2007.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302–310, 1978.

BUFALO, A.C. Antidepressivo *Hypericum perforatum* L. sobre o sistema reprodutivo masculino de ratos Wistar. 2007. 82p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Farmacologia) - Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CARITA, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluent contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72, p. 722-725, 2008.

CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 305, n. 6854, p. 609–13, 1992.

CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Manole, 2005. 450 p.

CARVALHO, M. B. DE; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. J. F.; et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 317–322, 2002.

CCE - Comissão das Comunidades Europeias. 2003. **Proposta de Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho Relativa à Protecção das Águas Subterrâneas Contra a Poluição**. Bruxelas: 2003.

Disponível em:

<<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2003:0550:FIN:PT:DOC>> Acesso em: 08 abr. 2013.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C. S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. **Genetics and molecular biology**, v. 32, n. 1, p. 155–8, 2009.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–61, 2004.

COSTA SILVA, R. W.; FILHO, W. M. Cemitérios como áreas potencialmente contaminadas. **Revista brasileira de Ciências ambientais**, n. 9, p. 26-35, 2008.

CRAVEDI, J.-P.; ZALKO, D.; SAVOURET, J.-F.; MENUET, A.; JÉGOU, B. Le concept de perturbation endocrinienne et la santé humaine. **médecine/sciences**, v. 23, n. 2, p. 198–204, 2007.

CRISS, W.E. A review of Polyamines and Cancer. **Turk J Med Sci**, v. 33, p. 195-205, 2003.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation research**, v. 521, n. 1-2, p. 121–35, 2002.

- DENT, B. B.; FORBES, S. L.; STUART, B. H. Review of human decomposition processes in soil. **Environmental Geology**, v. 45, n. 4, p. 576–585, 2004.
- DOMENICE, S.; COSTA, E. M. F.; CORRÊA, R. V.; MENDONÇA, B. B. Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação Sexual. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 433–443, 2002.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, p. 70–77, 1959.
- EREZ, O. Putrescine Activates Oxidative Stress Dependent Apoptotic Death in Ornithine Decarboxylase Overproducing Mouse Myeloma Cells. **Experimental Cell Research**, v. 281, n. 1, p. 148–156, 2002.
- EREZ, O.; GOLDSTAUB, D.; FRIEDMAN, J.; KAHANA, C. Putrescine Activates Oxidative Stress Dependent Apoptotic Death in Ornithine Decarboxylase Overproducing Mouse Myeloma Cells. **Exp Cell Res**, v. 281, p. 148-156, 2002.
- FALKENMARK, M. Water usability degradation – economist wisdom or societal madness? **Water International**, v. 30, n. 2, 136-146, 2005.
- FELICIONI, F.; ANDRADE, F. F. A.; BORTOLOZZO, N. **A ameaça dos Mortos: Cemitérios põem em risco a qualidade das águas subterrâneas**. Maxprint, São Paulo. 2007, 68 p.
- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pest Biochem Physiol**, v. 88, p. 252–259, 2007.
- FOFONKA, L.; KUNT, P. da C. Cemitérios: potenciais fontes geradoras de impactos ambientais. <<http://www.revistaeea.org/pf.php?idartigo=976>> Acessado em:29 de agosto de 2016.
- GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p.781-792, 2004.
- GIROTO, J. M.; MASSON, M. L.; HARACEMIV, S. M. C. Biogenic amines in sausages and other foods. **Braz J Food Technol**, v. 13, n.1, p. 1-10, 2010.
- GRANT, W. F. Chromosome aberrations assay in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat Res**, v. 99, p. 273-291, 1982.
- GUGLIUCCI, A. Polyamines as clinical laboratory tools. **Clin Chim Acta**, v. 344, n. 1-2, p. 23–35, 2004.
- HIRATA, R. **Recursos hídricos subterrâneos: caminhos para a sustentabilidade de um recurso estratégico**. 2006. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/gsi/saei/paginas/Brasilia2006SAG.pdf>>. Acesso em 01 de abril 2013.
- IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 271, n. 3, p. 559–564, 2000.
- KILARKAJE, N. Effects of combined treatment of  $\alpha$ -tocopherol, l-ascorbic acid, selenium and zinc on bleomycin, etoposide and cisplatin-induced alterations in testosterone synthesis pathway in rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 1175–1189, 2014.
- KILARKAJE, N. Effects of combined treatment of  $\alpha$ -tocopherol, l-ascorbic acid, selenium and zinc on bleomycin, etoposide and cisplatin-induced alterations in testosterone synthesis pathway in rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 1175–1189, 2014.

- KIRSCH-VOLDERS, M. Towards a validation of the micronucleus test. **Mutation research**, v. 392, n. 1-2, p. 1-4, 1997.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; et al. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 8, p. 873-99, 2011.
- KIRSZTAJN, G. M. Avaliação do ritmo de Filtração Glomerular. **Jornal Brasileiro Patologia Med.**, v. 3, p. 257-264, 2007.
- KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation research**, v. 455, n. 1-2, p. 155-66, 2000.
- LADERO, V.; CALLES-ENRIQUEZ, M.; FERNANDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, n. 2, p. 145-156, 2010.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* Test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Res**, v. 682, p. 71-81, 2009.
- LUVIZUTTO, J. F.; SILVA, P. R. P.; SOLANO, M. L. M.; CAMARGO, J. L. V. Estudo da toxicidade oral de 90 dias (doses repetidas) do lodo de estação de tratamento de esgoto (LETE) em ratos Wistar. Doutorado – Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2008.
- MA, T. H.; CABRERA, G. L.; CHEN, R.; GILL, B.S.; SANDHU, S. S.; VANDENBERG, A. L.; SALAMONE, M. F. Tradescantia micronucleus bioassay. **Mutation Research**, v. 310, p. 221-230, 1994.
- MACHADO, C. M.; SCHENKA, A.; VASSALLO, J.; et al. Morphological characterization of a human glioma cell line. **Cancer cell international**, v. 5, n. 1, p. 13, 2005.
- MAISTRO, E. L. The *in vivo* rodent micronucleus test. **Genotoxicity and DNA repair: Methods in pharmacology and toxicology**, Chapter 6, p. 103-113, 2014.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, p. 469-474, 1974.
- MARTINEZ, C. B. R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Silva-Souza, A. T. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA, 2006, p. 43-62.
- MATOS, B. A. **Avaliação da ocorrência e do transporte de microrganismos no aquífero freático do cemitério de Vila Nova Cachoeirinha, município de São Paulo**. 2001. 113 f. Tese (Doutorado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- MATHUR, P. P.; D'CRUZ, S. C. The effect of environmental contaminants on testicular function. **Asian journal of andrology**, v. 13, n. 4, p. 585-91, 2011.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C., MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Gen and Mol Bio**, v. 29, p. 148-158, 2006.



- MELO, D. B. G.; TUDOR, F.; BERNARDINO, V. N. Cemitérios Sustentáveis. In: Feira Tecnológica do Centro Paula Souza – FETEPS 2010, 4., 2010, Campinas.
- MIGLIORINI, R. B. **Cemitérios como fonte de poluição em aquíferos: estudo do cemitério Vila Formosa na bacia Sedimentar de São Paulo**. 1994. 74 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- MILLER-FLEMING, L.; OLIN-SANDOVAL, V.; CAMPBELL, K.; RALSER, M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 21, p. 3389–3406, 2015.
- MIRANDA, J. B.; SILVA, H. K. P. Avaliação da contaminação por metais pesados nas áreas estuarinas de Pernambuco: Uma revisão bibliográfica. **Cientec**, v. 3, n. 1, p. 110-123, 2011.
- MISÍK, M.; MA, T.-H.; NERSESYAN, A.; et al. Micronucleus assays with Tradescantia pollen tetrads: an update. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 215–21, 2011.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; DE BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clin Nutr**, v. 24, n. 2, p. 184–197, 2005.
- MORGAN, D. M. L. Methods in molecular biology. In: MORGAN, D. (Ed.), **Polyamine protocols**. Human Press Inc., Totowa, NJ, p. 1–30, 1998.
- MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório**. 5 ed. Porto Alegre: editora Médica Missau, 2009.
- NECKEL, A.; COSTA, C.; NUNES MARIO, D.; et al. Environmental damage and public health threat caused by cemeteries: a proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. **Revista Brasileira de Gestão Urbana (Brazilian Journal of Urban Management) urbe**.
- NEIRA, D. F.; TERRA, V. R.; PRATTE- SANTOS, R.; BARBIERI, R. Impactos do necrochorume nas águas subterrâneas do cemitério de Santa Inês, Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, v.6, p. 36-41, 2008.
- NETTO, S. M. Animais de laboratório. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia. Fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 46-52
- OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R. K.; et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v. 504, n. 1-2, p. 17–36, 2002.
- OLIVEIRA, B.; QUINTEIRO, P.; CAETANO, C.; et al. Burial grounds' impact on groundwater and public health: an overview. **Water and Environment Journal**, v. 27, n. 1, p. 99–106, 2013.
- ORLANDINI, L. F. **Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos wistar expostos à amônia por inalação**. 2012. 67 p. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias – Patologia Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- PACHECO, A. et al. Cemeteries – a potencial risk to groundwater. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 24, n.11. p. 97-104, 1991.
- PAINA, F. A. **Alterações hematológicas e hemostáticas induzidas pela clofazimina e claritromicina em ratos**. 2007. 131 p. Dissertação (Mestrado em Biociências aplicado à Farmácia)- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

- PALMA, S. R.; SILVEIRA, D. D. A saúde ecologicamente correta: a educação ambiental e os problemas ambientais em cemitério. **Revista Eletronica do PPGEAmb-CCR/UFSM**, v. 2, p. 262 - 274, 2011.
- PEGG, A. E. Toxicity of Polyamines and Their Metabolic Products. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 12, p. 1782–1800, 2013.
- PEQUENO MARINHO, A. M. C. **Contaminação de aquíferos por instalação de cemitérios: estudo de caso do cemitério São João Batista**. 1998. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.
- PETTERINO, C.; ARGENTINO-STORINO, A. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 57, n. 3, p. 213–9, 2006.
- RAMANI, D.; DE BANDT, J. P.; CYNOBER, L. Aliphatic polyamines in physiology and diseases. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 14-22, 2007.
- REBOUÇAS, A. C. Águas doce no mundo e no Brasil. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. (Eds.) **Águas doces no Brasil: Capital ecológico, uso e conservação**. São Paulo: Escrituras, 1999, 717p.
- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Editora da Ulbra, 2003. 355 p.
- ROBB, G. W., AMANN, R. P., KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **J Reprod Fert**, v. 54, p. 103-107, 1978.
- RUSSELL, L. D. et al., Mammalian spermatogenesis. In: RUSSEL, L.D., GRISWOLD, M.D. (Eds.) **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. Cache River Press, Clearwater, pp. 1–38. 1990.
- SANDERSON, J. T. The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. **Toxicological Sciences**, v. 94, n. 1, p. 3–21, 2006.
- SANTOS, J. M. M. **Índice de qualidade de água subterrânea aplicado em área de aquíferos cristalinos com uso agrícola: Bacia do Rio São Domingos – RJ**. 2009. 140 f. Tese (Doutorado em Geologia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- SARADHA, B.; MATHUR, P. P. Effect of environmental contaminants on male reproduction. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, n. 1, p. 34–41, 2006.
- SEILER, N.; RAUL, F. Polyamines and intestinal tract. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 44, p. 365–411, 2007.
- SHELEPOV, V. P.; CHEKULAEV, V. A.; PASHA-ZADE, G. R. Effect of putrescine on carbohydrate and lipid metabolism in rats. **Biomed Sci**, v. 1, p. 591-596, 1990.
- SIGMA. **Fundamental Techniques in cell culture laboratory Handbook**. 2 ed. 2008.
- SILVA, L. M. Cemitérios: fonte potencial de contaminação dos aquíferos livres. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HIDROLOGIA SUBTERRÂNEA, 4, 1998, Montevideo.
- SILVA, L. M. Os Cemitérios na Problemática Ambiental. In: SINCESP & ACEMBRA: Seminário Nacional “Cemitérios e Meio Ambiente”, 1, 1995, São Paulo.

- SILVA, R. W. DA C.; MALAGUTTI FILHO, W. O emprego de métodos geofísicos na fase de investigação confirmatória em cemitérios contaminados. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 327–336, 2009.
- SILVA, Valéria T. et al., Um olhar sobre as Necrópoles e seus Impactos Ambientais. Encontro ANPPAS, 3. 2006. Brasília.
- SLUTSKY, M.; LEVIN, J. L.; LEVY, B.S. Azoospermia and oligospermia among a large cohort of DBCP applicators in 12 countries. **Int J Occup Environ Health**, v. 5, p.116–122, 1999.
- SMITH, T. K. Effect of dietary putrescine on whole body growth and polyamine metabolism. **Proc Exp Biol Soc Med**, v. 194, p. 332-336, 1990.
- SODA, K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 30, n. 1, p. 95, 2011.
- SPEIT, G.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation research**, v. 681, n. 1, p. 3–12.
- SVENSSON, K. **Mechanistic studies on the role of polyamines and microvesicles in tumor growth and hypoxia- mediated angiogenesis**. 2012. 94 f. Faculty of Medicine Doctoral Dissertation. – Lund University, 2012.
- ÜÇİSİK, A. S.; RUSHBROOK, P. The Impact of Cemeteries on the Environment and Public Health an Introductory Briefing. **World Health Organization Regional Office for Europe**, Nancy Project Office, Denmark, 1998.
- THOMAS, T.; GUNNIA, U. B.; YURKOW, E. J.; SEIBOLD, J. R.; THOMAS, T. J. Inhibition of calcium signalling in murine splenocytes by polyamines: differential effects on CD4 and CD8 T-cells. **The Biochemical journal**, n. Pt 2, p. 375–81, 1993.
- THOMAS, T.; THOMAS, T. J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. **Cell Mol Life Sci**, v. 58, n. 2, p. 244–258, 2001.
- THOMAS, T.; THOMAS, T. J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 2, p. 244–258, 2001.
- THYBAUD, V.; AARDEMA, M.; CLEMENTS, J.; et al. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. **Mutation research**, v. 627, n. 1, p. 41–58, 2007.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.
- VASCONCELOS, U.; ANDRADE LIMA, M. A. G.; MEDEIROS, L. V.; CALAZANS, G. M. T. Evidência do antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* sobre bactérias indicadoras de contaminação fecal da água. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 140, p. 127-131, 2006.
- WALLACE, H. M.; FRASER, A. V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochem J**, v. 376, p. 1-14, 2003.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **EUR/HFA target 23: 1998** - The impact of cemeteries on the environment and public health. Denmark: WHO, 1998. 15 p.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006, 464p.

ZENG, H.; WU, J. Heavy metal pollution of lakes along the Mid-Lower reaches of the Yangtze river in China: Intensity, sources and spatial patterns. **Int J Environ Res Public Health**, v. 26, p. 793-807, 2013.

ZHAO, Z.; ZHANG, L.; WU, J.; FAN, C. Distribution and bioaccumulation of organochlorine pesticides in surface sediments and benthic organisms from Taihu Lake, China. **Chemosphere**, v. 77, n. 9, p. 1191–1198, 2009.