

---

**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  
P436e      Pereira, Franco Dani Campos  
              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

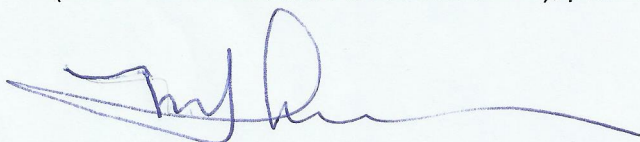
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

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

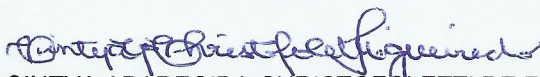
**AUTOR: FRANCO DANI CAMPOS PEREIRA**

**ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES**

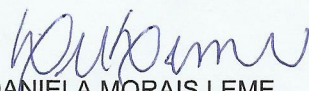
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES  
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. CINTYA APARECIDA CHRISTOFLETTI DE FIGUEIREDO  
Centro Universitário Herminio Ometto / UNIARARAS



Profa. Dra. DANIELA MORAIS LEME  
Departamento de Genética / Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. EDSON LUIS MAISTRO  
Departamento de Fonoaudiologia / Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília - UNESP



Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES  
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 tao 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 gavage, 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 potential 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 Sulfidrila
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.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Cemitérios como fonte de contaminação ambiental

Os cemitérios podem trazer sérias consequências ambientais, em particular na qualidade das águas subterrâneas, ocasionadas, pela infiltração das águas pluviais no solo contaminado com os compostos derivados da putrefação dos corpos, bem como pela própria percolação destes compostos (FOFONKA et al., 2006) (**figura 1**).



**Figura 1:** Esquemas de contaminação do solo e lençóis freáticos pelo necrochorume. Adaptado de Pacheco (2000).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), a instalação da maioria dos cemitérios é feita em terrenos de baixo valor econômico, sem a prévia avaliação geológica e hidrogeológica do local, o que pode refletir em uma maior probabilidade de contaminação (WHO, 1998; SILVA et al., 2006).

A principal causa de poluição promovida pelos cemitérios são os compostos derivados da putrefação dos corpos, denominado de necrochorume, que são liberados, principalmente, durante o primeiro ano do sepultamento (COSTA SILVA; FILHO, 2009). Esse processo de decomposição cadavérica depende de fatores intrínsecos e extrínsecos ao organismo. Como fatores intrínsecos, estão a idade, constituição corporal, flora intestinal e a causa da morte. Já os fatores extrínsecos estão relacionados com a temperatura, humidade, presença de insetos, vermes e outros organismos, assim como das características e composição do solo (OLIVEIRA et al., 2013).

Durante o processo de putrefação, os tecidos moles sofrem ações física, química e biológica e são transformados em gases, líquidos e minerais, formando uma massa putrescente de odor desagradável. A decomposição é dada, principalmente, pela ação de bactérias endógenas e exógenas, que fermentam a matéria orgânica, decompondo carboidratos, proteínas e lipídios (DENT et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013).

Um cadáver de aproximadamente 70 kg produz até 24 litros de gases variados e 30 litros de necrochorume, que é um líquido mais denso que a água (densidade 1,23 g/cm<sup>3</sup>), de cor castanho-acinzentada e de muito mau cheiro. O necrochorume é composto por 60 % de água, 30 % de substâncias mineralizadas e 10 % de substâncias orgânicas complexas (MARQUES SILVA, 1998; FELICIANI; ANDRADE; BERTOLOZZO, 2007). Dentre as substâncias orgânicas do necrochorume, proveniente da decomposição de proteínas, estão a diamina cadaverina (C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>), derivada do aminoácido lisina, e a poliamina putrescina (C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>), derivada do aminoácido ornitina. Essas duas aminas biogênicas apresentam odores muito desagradáveis, são altamente solúveis em água e geram íons amônia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), quando degradadas (ALMEIDA; MACEDO, 2005; MELO et al., 2010).

Os gases produzidos durante esse processo de decomposição são H<sub>2</sub>S (ácido sulfídrico), CH<sub>4</sub> (metano), NH<sub>3</sub> (amônia) e CO<sub>2</sub> (gás carbônico) (MATOS, 2001; PALMA; SILVEIRA, 2011). Almeida e Macedo (2005) afirmam que o odor exalado pelo cadáver em putrefação é causado por alguns destes gases e pela presença de mercaptanos, substância que contém sulfeto de hidrogênio ligado ao carbono. Outros poluentes também estão presentes, como os óxidos metálicos (Ti, Cr, Cd, Pb, Fe, Mn, Hg, Ni e outros), lixiviados dos adereços das urnas mortuárias e substâncias utilizadas na preparação dos corpos, durante os procedimentos funerários (SILVA, 1998).

Pacheco et al. (1991) constataram, em três cemitérios paulistas, a contaminação microbiológica do aquífero freático. Migliorini (1994) observou um aumento da concentração de íons e compostos nitrogenados nas águas subterrâneas próximas ao cemitério de Vila Formosa em São Paulo – SP. Pequeno Marinho (1998) também constatou a presença de bactérias e compostos nitrogenados no aquífero freático próximo ao cemitério de São João Batista em Fortaleza - CE. Silva (1995) investigou cerca de 600 cemitérios em todo o Brasil (75 % municipais e 25 % particulares) e observou uma incidência de 15 a 20 % de casos de contaminação do subsolo, devido ao necrochorume.

Uçisik e Rushbrook (1998) afirmam que cemitérios alocados em solos vulneráveis ou em solos com a capacidade depurativa excedida apresentam grandes chances de contaminação das águas subterrâneas. Diferentes relatórios afirmam que o necrochorume forma uma pluma

de contaminação salina, devido a sua viscosidade e densidade em relação a água. Essa pluma se espalha lentamente sob as covas na direção do gradiente hidráulico, contaminando solos, águas superficiais e águas subterrâneas (OLIVEIRA et al., 2013).

## 2.2. Poliaminas

Segundo Giroto et al. (2010), o termo amina refere-se, quimicamente, a bases orgânicas derivadas da amônia. Na biologia, o termo está relacionado a compostos formados ou degradados durante os processos metabólicos normais dos seres vivos, apresentando diferentes funções fisiológicas e por isso chamadas de “aminas bioativas” ou aminas biogênicas. As aminas são classificadas de acordo com o número de grupos amínicos em: monoaminas (tiramina e feniletilamina); diaminas (histamina, serotonina, triptamina e cadaverina) e poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) (GIROTO et al., 2010).

As poliaminas são moléculas alifáticas, lineares e de baixo peso molecular, encontradas em todos os organismos vivos e são responsáveis pela modulação de várias funções fisiológicas (RAMANI et al., 2014). Dentre as funções fisiológicas dependentes dos níveis intracelulares das poliaminas estão o crescimento dos organismos, a diferenciação celular e os processos apoptóticos (THOMAS; THOMAS, 2001; CRISS, 2003). Em quantidades fisiológicas, elas regulam a replicação do DNA e a transcrição do RNA (IGARASHI; KASHIWAGI, 2000; WALLACE et al., 2003), estabilizam membranas e agem como mensageiros intracelulares (GUGLIUCCI, 2004). Porém, segundo Moinard et al. (2005) e Bach et al. (2012), altas concentrações de poliaminas podem ser tóxicas, pois facilitam a morte celular, por mecanismos oxidativos.

Estes mecanismos oxidativos acontecem por meio do catabolismo das poliaminas, processo este que ativa poliaminas oxidases, que agem regulando negativamente os níveis intracelulares destas moléculas. Este processo produz ácido gama-aminobutírico, 3 acetamidopropanal, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e amônia. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e aldeídos derivados da amônia, produzidos durante a degradação das poliaminas, promovem estresse oxidativo e morte celular (THOMAS; THOMAS, 2001; PEGG, 2013).

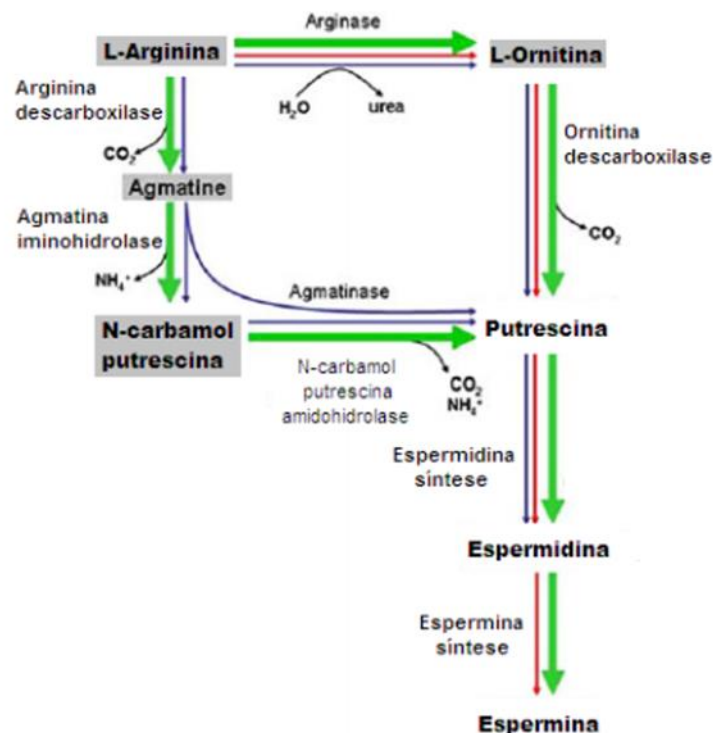
Os níveis intracelulares de poliaminas são fortemente regulados por processos de biossíntese, catabolismo e/ou transporte. Essa regulação é feita por meio de mecanismos altamente especializados a nível de transcrição, tradução e degradação de proteínas envolvidas nestas vias, que são estimuladas pelas concentrações intracelulares de poliaminas. Estas características são altamente conservadas em todos os organismos vivos, indicando que

a regulação dos níveis destas moléculas é crítica para a sobrevivência celular (MILLER-FLEMING et al., 2015).

### 2.3. Putrescina

Dentre as substâncias produzidas pela decomposição cadavérica, a putrescina (1,4 diaminobutano) é encontrada em grandes quantidades. De acordo com Svensson (2012), a putrescina é uma poliamina muito importante nos processos fisiológicos, por se tratar de uma molécula precursora para outras duas poliaminas, a espermidina e a espermina, ambas importantíssimas no processo de proliferação celular.

A Putrescina é uma poliamina formada a partir do aminoácido ornitina, por meio de uma reação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase (OCD). A ornitina, por sua vez, é originada da clivagem do aminoácido arginina, por uma reação catalisada pela arginase (MORGAN et al., 1998) (**figura 2**).



**Figura 2:** Via de biossíntese das poliaminas. Adaptado de Soda (2011).

Devido à importância na fisiologia celular, os níveis de poliaminas são regulados nas células e tecidos por meio de biossíntese, catabolismo e absorção. Porém, Ladero et al. (2010) destacaram que após administração oral de putrescina em animais de laboratório, foram observados efeitos adversos como taquicardia, insuficiência cardíaca e hipotensão.

Testes com putrescina marcada radioativamente com carbono 14 [ $^{14}\text{C}$ ] revelaram que o tempo necessário para a absorção da substância por via gastrointestinal, disseminação sistêmica e detecção na corrente sanguínea é de apenas 30 minutos. A rápida absorção induziu um aumento de enzimas que transformam a putrescina em outras poliaminas, o que revelou a necessidade de se controlar a ingestão de tal substância (BARDOCZ et al., 1995; SEILER; RAUL, 2007).

Estudos tem revelado que poliaminas estão fortemente ligadas ao aparecimento de neoplasias do intestino. Existem cada vez mais evidências de que a putrescina e a espermidina tem um papel importante na promoção da transformação maligna. Células de câncer colorretal apresentam níveis maiores de poliaminas que os tecidos adjacentes ou que o tecido normal equivalente, destacando a possível importância da putrescina exógena no seu desenvolvimento (GERNER; MEYSKENS, 2004).

Til et al. (1997), avaliaram, por meio de administração oral em ratos Wistar machos e fêmeas, a toxicidade aguda e subaguda de cinco aminas biogênicas, entre elas a putrescina. Os animais de ambos os sexos, tratados com 5000 ppm de putrescina, tiveram a média do peso corporal e ingestão alimentar diminuídas. Neste experimento ainda foi observado que a atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) e o peso relativo do cérebro foram ligeiramente aumentados nas fêmeas do grupo expostos.

Shelepov et al. (1990) observaram mudanças rápidas e significativas no metabolismo de carboidratos e lipídios. Para baixas doses de putrescina, administrada oralmente (30  $\mu\text{mol}/100\text{g}$ ), foram observados efeitos semelhantes àqueles induzidos pelo glucagon e adrenalina. Para doses mais elevadas (60 – 120  $\mu\text{mol}/100\text{g}$ ), foram observados aumento nas reservas de glicogênio, redução acentuada nos níveis de ácidos graxos não esterificados e lipídios totais, semelhantes aos efeitos combinados da insulina com glicocorticóides. Estes resultados sugerem que o nível aumentado desta poliamina no sangue pode produzir alterações entre os carboidratos e o metabolismo lipídico.

Um estudo realizado em frangos alimentados por 14 dias com diferentes quantidades de putrescina revelou que a concentração de 0,2 % desta substância aumenta a taxa de crescimento da ave, quando comparados ao grupo controle. Já as concentrações iguais ou superiores a 0,4 % promovem um acúmulo desta poliamina em órgãos como fígado, rim e músculos e as concentrações de 0,8 % e 1,0 % são tóxicas para esses organismos testados (SMITH, 1990).

Os estudos de Erez (2002) mostram que o acúmulo intracelular excessivo de putrescina, como resultado de uma maior absorção a partir do meio ou por aumento da síntese

intracelular, provoca apoptose. Para o mesmo autor, os locais exatos em que as poliaminas interagem com os sinais apoptóticos são pouco conhecidos. No entanto, algumas observações estão relacionadas com a capacidade das poliaminas modularem e bloquearem os vários tipos de canais iônicos. Em células de hepatoma de rato, a putrescina exógena induziu um aumento no nível intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Em células T CD4, diferentemente das células T CD8 a putrescina inibiu a ação da concanavalina-A, uma molécula indutora do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , demonstrando que o efeito desempenhado pela putrescina pode ser dependente da especialização celular e tipo celular (THOMAS et al., 1993).

## **2.4. Principais tipos de bioensaios para estudos de toxicidade**

### **2.4.1. Bioensaios com plantas**

Bioensaios com plantas são considerados sensíveis e mais fáceis de serem realizados, quando comparados aos experimentos que utilizam animais (FERNANDES et al., 2007). Atualmente, o sistema-teste *A. cepa* é amplamente utilizado em bioensaios por serem de fácil realização, de rápida obtenção dos resultados, de baixo custo e favorável para a avaliação de substâncias promotoras de danos cromossômicos e de alterações no ciclo mitótico, devido às condições cromossômicas específicas como cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ) (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Grant (1982) e Caritá e Marin-Morales (2008) descrevem *A. cepa* como um sistema teste de rotina, eficiente para avaliar o potencial genotóxico de substâncias químicas, por apresentar sensibilidade e boa correlação com sistemas teste de mamíferos. Outra planta muito utilizada em bioensaios é a *Tradescantia ssp.* Esta espécie apresenta apenas seis pares de cromossomos grandes, que são facilmente observáveis em células da ponta da raiz e do tubo polínico em desenvolvimento. Ensaios realizados com essa espécie podem ser excelentes para avaliação de danos citogenéticos induzidos por químicos (GRANT, 1982; ANSOAR RODRIGUEZ et al., 2015). Plantas deste gênero podem ser usadas como bioindicadoras de mutagenicidade, por meio de testes do micronúcleo em células meióticas (Trad-MCN) (MISIK et al., 2011) e em pelos estaminais (Trad-SHM) (MA et al., 1994).

### **2.4.2. Bioensaios *In vitro***

Os bioensaios *in vitro* podem ser realizados com microrganismos, como bactérias e fungos, com enzimas, proteínas e linhagens celulares mantidas em cultura. Essa técnica

permite prever a toxicidade de uma substância para os seres vivos em geral e também, especificamente, para os seres humanos (BEDNARCZUK et al., 2010).

Entre essas técnicas, as culturas celulares vêm apresentando grande aplicação em estudos de genotoxicidade, mutagenicidade e no estudo do câncer. Ensaios *in vitro* têm contribuído para o melhor entendimento de processos que causam perturbações nas interações celulares e que levam ao desenvolvimento de neoplasia, assim como para identificar agentes carcinogênicos (MACHADO et al., 2005). As principais vantagens do uso de culturas de células é a possibilidade de controlar as condições de experimentação; analisar parâmetros independentes, conforme o interesse da pesquisa; realizar um elevado número de testes em um intervalo de tempo reduzido; reduzir tanto os ensaios realizados com animais como os custos da experimentação animal. Por outro lado, ainda existem muitas desvantagens como: perda de características fenotípicas, sistema biológico fora do ambiente natural, ausência de sinais sistêmicos importantes no organismo (SIGMA, 2008). Atualmente, diversas linhagens celulares estão disponíveis, sendo muitas delas já usadas em ensaios toxicológicos.

Existe um consenso geral de que testes *in vitro* são úteis para a identificação de agentes genotóxicos e mutagênicos. Porém, como esses ensaios podem induzir a resultados positivos que, aparentemente, não conferem riscos carcinogênicos reais para os organismos, se torna necessário, para a maior confiabilidade dos efeitos observados, a complementação desses dados obtidos *in vitro* com ensaios realizados *in vivo* (THYBAUD et al., 2007).

### **2.4.3. Bioensaios *In vivo***

A experimentação animal na pesquisa científica tem contribuído para o desenvolvimento da ciência e tecnologia, promovendo ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e tratamento de enfermidades que acometem os seres humanos. Animais de várias espécies têm sido utilizados como organismo teste, mas camundongo e ratos são os mais utilizados e conhecidos para este fim (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Desde o século XIX, quando os camundongos foram introduzidos em estudos de laboratório, eles se transformaram em um dos mais importantes animais experimentais. Isto se deve às características desses organismos para experimentação, tais como baixo custo e facilidade de manutenção de plantéis, ciclo de vida curto, semelhança fisiológica com o organismo humano, dentre outras vantagens. A utilização de ratos em pesquisas científicas é posterior ao uso de camundongos, mas hoje os ratos são os animais de laboratório mais comumente utilizados. Isso se deve ao fato desses organismos, além de apresentarem fácil manejo e

observação, possuírem volumes maiores de fluídos corporais, o que se mostra mais adequado para a avaliação de mais parâmetros com os mesmos animais, e a possibilidade de obtenção de linhagens especiais, por meio de seleção genética, caracterizando-se, assim, em um organismo muito útil em pesquisas específicas (ANDERSEN et al., 2004; NETTO, 2006).

O meio científico tem promovido diversas discussões sobre alternativas viáveis para a substituição do uso de animais em experimentação científica. A tendência mundial, hoje, é de se reavaliar o número de animais realmente necessários para o desenvolvimento dos experimentos *in vivo*. Essas ações tiveram início com o surgimento de um programa internacionalmente conhecido como 3Rs (Reduction, Refinement and Replacement: redução, refinamento e substituição), que objetiva, diminuir o número de animais experimentados, minimizar a dor e o sofrimento e buscar melhores alternativas para a realização de experimentação *in vivo* (CAZARIN et al., 2004).

### **2.5. Estudos de exposição sistêmica, por meio de avaliações hematológicas e bioquímicas**

As alterações de alguns parâmetros biológicos específicos em modelos experimentais animais podem estar relacionados com efeitos terapêuticos e/ou toxicológicos. Entre os parâmetros mais utilizados em pesquisa toxicológica, estão os valores bioquímicos e hematológicos, por estes serem de grande importância para a determinação dos efeitos induzidos por tratamento farmacológicos (PETTERINO; ARGENTINO-STORINO, 2006).

Uma grande vantagem no uso destes parâmetros toxicológicos é o fato deles fornecerem informações sobre os efeitos biológicos dos poluentes e indicações dos seus mecanismos de ação, diferente das avaliações químicas, que apenas permitem a quantificação desses poluentes no ambiente. Os parâmetros hematológicos são considerados indicadores fisiohistopatológicos sistêmicos e, conseqüentemente, um importante fator para o diagnóstico do status estrutural e funcional do animal, após a exposição a uma dada substância tóxica (ADHIKARI et al., 2004).

Estes parâmetros, tanto bioquímicos quanto os hematológicos, podem ser usados na identificação de sinais iniciais de danos sobre o animal experimentado e, assim, se caracterizarem em indícios de uma intervenção, antes dos efeitos prejudiciais irreversíveis tornarem-se inevitáveis. Eles também fornecem informações sobre as relações causa/efeito da exposição aos xenobióticos, com a vantagem de serem bioindicadores rápidos para esta análise (MARTINEZ, 2006).



Parâmetros sanguíneos como: hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular, concentração de hemoglobina corpuscular podem ser usados, em situações específicas, como biomarcadores de efeitos tóxicos (VAN DER OOST et al., 2003).

Os testes de função hepática destacam-se entre os parâmetros avaliados, uma vez que o fígado é o principal órgão de detoxificação dos organismos. Os testes bioquímicos de rotina incluem as dosagens de bilirrubinas, albumina, Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Fosfatase Alcalina (FA) e proteínas totais (MOTTA, 2009).

A função renal pode ser avaliada pela capacidade dos glomérulos filtrarem a creatinina sérica. Os valores séricos aumentados deste composto orgânico nitrogenado, indicam a deterioração da função renal (KIRSZTAN, 2007).

Os ratos Wistar são os modelos animais mais comumente utilizados em ensaios de toxicidade e em avaliações pré-clínicas, embora as disponibilidades dos valores de referência para esta linhagem ainda sejam limitadas (ORLANDINE, 2012).

O uso de condições ideais e padronizadas para o desenvolvimento dos experimentos é de extrema importância para a obtenção dos resultados. Boas condições no desenvolvimento experimental permitem uma interpretação adequada dos dados, podendo inferir se as alterações observadas, seguramente, estão relacionadas com a administração da substância testada. Vale lembrar, que variáveis como a idade e sexo dos animais podem interferir nos resultados dos exames hematológicos e bioquímicos (PAINA, 2007).

## **2.6. Avaliação do potencial genotóxico de substâncias químicas**

O termo genotoxicidade se refere a alterações que um determinado agente promove no material genético de um organismo. Essas alterações podem ser decorrentes, por exemplo, de lesões nas fitas de DNA, síntese de DNA não programada e trocas entre cromátides-irmãs. Os efeitos genotóxicos podem ser transitórios, quando são susceptíveis de reparo, diferentemente dos mutagênicos, que caracterizam alterações permanentes no conteúdo ou estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD et al., 2002).

Obe et al. (2002) afirmam que diferentes bioensaios, realizados com diferentes organismos experimentais (ratos, camundongos, bactérias, fungos, plantas, cultura de células humanas e de outros mamíferos) são usados para detectar danos no material genético, promovidos por ação de substâncias tóxicas. Esses ensaios também permitem reconhecer as potencialidades genotóxica das substâncias.

De acordo com Luvizutto et al. (2008), a toxicidade de uma substância pode ser determinada por meio de aplicação de diferentes técnicas (*in vitro e in vivo*), realizadas com

diferentes organismos (uni e pluricelulares) e diferentes vias de exposição, para que contemple a grande diversidade e complexidade de respostas biológica. Neste contexto, quando o alvo do estudo é buscar resultados que se aproximem mais das respostas dos seres humanos, os organismos mais frequentemente usados são os mamíferos, por estes terem uma maior identidade fisiológica com o homem.

Segundo Dallegrave (2006), os estudos da genotoxicidade de xenobióticos são importantes, porque permitem avaliar os efeitos hereditários deletérios ou letais para todos os organismos nativos de um determinado local, incluindo os seres humanos. Esses efeitos são dependentes de características como a forma e a quantidade de exposição, natureza química e condições do ambiente. É importante ressaltar que a exposição crônica, dada por baixas doses, é acumulativa e também pode induzir tais danos genéticos (BENACHOUR et al., 2007; ZHAO et al., 2009).

Testes genotóxicos são rotineiramente realizados para identificar substâncias químicas que apresentam potenciais genotóxicos capazes de induzirem processos mutagênicos e carcinogênicos nas células germinativas. Com relação à identificação de compostos genotóxicos potencialmente cancerígenos, são selecionados testes padrões, para caracterizar dois tipos de danos genéticos: mutações nos genes e danos cromossômicos. Porém, para se entender o modo de ação de uma substância ou para a certificação da sua atividade, é necessário o desenvolvimento de uma bateria de testes adicionais aos testes inicialmente desenvolvidos (THYBAUD et al., 2007). Desta forma, os testes de genotoxicidade têm como objetivo detectar a quantidade de danos nucleares e avaliar os resultados, no contexto da sobrevivência da célula (KRISCH-VOLDERS, 1997).

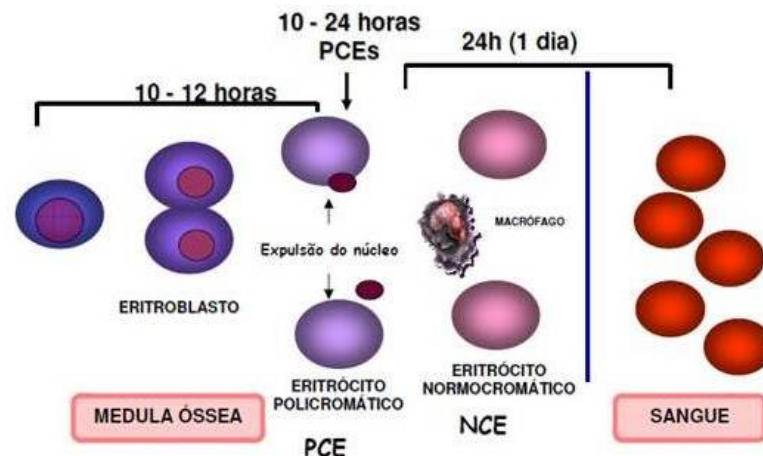
Um dos testes mais utilizados para a análise da genotoxicidade de determinados compostos é o ensaio do cometa, também conhecido como ensaio de eletroforese em gel de célula única (SCGE, do inglês “single cell gel electrophoresis”). As vantagens do teste do cometa sobre outros testes, para a avaliação de genotoxicidade, são: a sua simplicidade de realização; a sua sensibilidade; e a obtenção de resultados rápidos, que permitem a quantificação e detecção de quebras de DNA e danos em sítios álcali-lábeis, *in vivo* e *in vitro*, realizados com um pequeno número de células (CHRISTOFOLETTI et al., 2009; COLLINS, 2004). Este teste também pode ser utilizado em monitoramento ambiental, toxicidade de agentes isolados, ecotoxicologia e estudos clínicos, para avaliar os danos que um determinado agente físico ou químico possa promover no DNA (SPEIT et al., 2009).

Outro ensaio amplamente utilizado para se avaliar a potencialidade genotóxica de substâncias, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é o ensaio do micronúcleo. Os micronúcleos (MN)

podem ser induzidos por vários fatores, como estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos nos checkpoints do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA (BONASSI et al., 2007). Essas estruturas também podem aparecer após o processo de divisão celular, como resultado de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou de perdas de cromossomos inteiros, que não se associaram ao fuso mitótico, portanto não segregaram adequadamente para as células filhas. Na telófase, estes materiais genéticos (fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros) serão envolvidos por membrana, formando uma estrutura semelhante a um pequeno núcleo. Assim, o MN pode representar tanto uma alteração cromossômica estrutural como uma alteração numérica (RIBEIRO et al., 2003; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

Os testes *in vivo* oferecem maiores informações sobre as condições experimentais, tais como o metabolismo, a farmacocinética e os processos de reparo do DNA (KRISHNA, HAYASHI, 2000; MAISTRO, 2014). O teste do MN em medula óssea de roedores é bastante usado para a detecção de agentes clastogênicos (promotores de quebras cromossômicas) e aneugênicos (relacionados com efeitos sobre as fibras do fuso). O teste se caracteriza em avaliar se o agente testado promoveu alterações celulares em eritrócitos policromáticos anucleados, que decorreram em formação de MN, ou relacionar a presença de um MN a um dano cromossômico recente. Por ser de fácil identificação e ter distribuição bem definida, os resultados obtidos com o teste do MN, *in vivo*, fornecem fortes evidências da genotoxicidade sistêmica do composto químico, avaliado sob condições experimentais apropriadas (RIBEIRO et al., 2003).

Durante a maturação das células da linhagem eritrocitária na medula óssea, o núcleo principal é expelido do eritrócito nucleado, mas o MN fica retido no citoplasma da célula. A análise de MN em eritrócitos é realizada em eritrócitos policromáticos (PCEs, eritrócitos jovens) (**figura 3**).



**Figura 3:** Formação dos eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromático (NCE) na medula óssea. O eritroblasto, durante seu processo de maturação, dá origem ao eritrócito policromático (eritrócito imaturo no qual o núcleo foi expulso), que sofre maturação, transformando-se em eritrócito normocromático (maduro), que atinge a corrente sanguínea (adaptado de RIBEIRO et al., 2003).

Diversos estudos comprovaram a eficácia do teste do MN como indicador de danos citogenéticos em células cancerígenas. O aumento da frequência de MN é indicativo de elevação das taxas de mutações, o que está relacionado com o desenvolvimento de neoplasias (CARVALHO et al., 2002). A avaliação da frequência de MN em linfócitos de sangue periférico é extensivamente realizada em epidemiologia molecular e em citogenética, para avaliar a presença e a extensão dos danos cromossômicos nas populações humanas expostas a agentes genotóxicos ou para estimar o perfil de susceptibilidade genética do organismo a um dado agente tóxico. A alta confiabilidade e o baixo custo da técnica contribuíram para o sucesso mundial e adoção deste biomarcador em estudos de danos genéticos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BONASSI et al., 2007; MAISTRO, 2014).

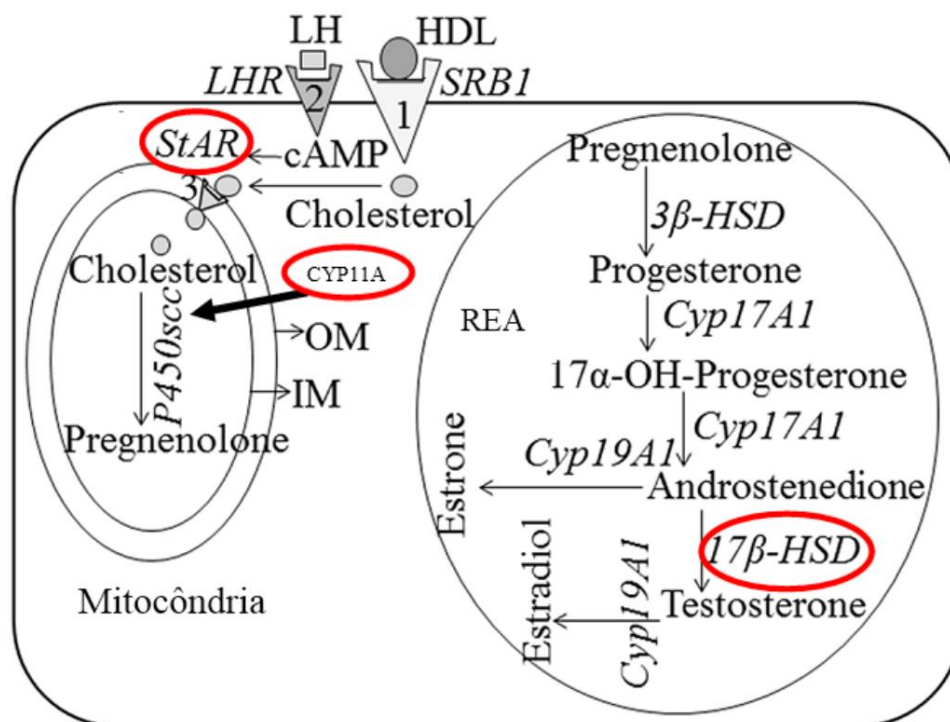
### 2.7. Efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutor

Sabendo que o sistema reprodutor é suscetível a mudanças quando exposto a substâncias tóxicas, contaminantes ambientais e a medicamentos, podemos definir toxicidade reprodutiva por qualquer alteração da função normal dos componentes e funcionamento fisiológico do sistema reprodutor. As avaliações de risco sobre o potencial de uma substância causar efeitos sobre o sistema reprodutor são realizadas com base em informações obtidas de estudos com humanos. Na falta destas informações, são usados dados obtidos de experimentação animal. São inúmeros os agentes tóxicos capazes de causar danos reprodutivos tanto em humanos quanto em animais (BUFALO, 2007).

Os primeiros relatos de riscos ambientais para a função reprodutiva masculina surgiram na década de 70, quando trabalhadores expostos, ocupacionalmente, ao nematocida 1,2-dibromo-3-cloropropano (DBCP) apresentaram severos prejuízos na espermatogênese (SLUTSKY et al., 1999). Desde então, uma maior atenção tem sido dada aos efeitos tóxicos das substâncias químicas sobre os testículos, onde a maioria dos estudos tem demonstrado que esses efeitos provêm do estresse oxidativo, sofrido pelos espermatozóides. Estes apresentam em sua membrana uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados que sofrem danos peroxidativos, induzindo a formação de EROs, que são uma das maiores causas da redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozóides (ALVAREZ; MORAES, 2006).

Existem cada vez mais evidências de que as substâncias químicas introduzidas no ambiente são capazes de afetar o sistema endócrino dos seres vivos. As enzimas envolvidas na via de biossíntese de esteroides são alvos importantes para ação de vários produtos químicos que perturbam o sistema endócrino. Os efeitos sobre a biossíntese de esteroides podem resultar em um prejuízo nos índices de reprodução, alterações na diferenciação sexual e no crescimento e desenvolvimento de certos tipos de tumores (SANDERSON, 2006).

A síntese de testosterona é mediada pelo hormônio luteinizante (LH), que é produzido e secretado pela hipófise. A exposição das células de Leydig ao LH causa um aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e adenilato ciclase. A primeira etapa da esteroidogênese se dá pela transferência do colesterol de fora da membrana mitocondrial para o interior da membrana da mitocôndria, onde é clivado em pregnenolona, que é um processo mediado pela proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein). A metabolização do colesterol em pregnenolona, que ocorre dentro da mitocôndria, depende de uma reação de clivagem da cadeia lateral do colesterol, catalisada pela proteína CYP11A. A pregnenolona formada sai da mitocôndria e é desidrogenada na posição 3- $\beta$ , pela enzima 3  $\beta$ -HSD. A pregnenolona e a progesterona são hidroxiladas pela enzima P450c17 no retículo endoplasmático, enzima esta que também cliva a ponte de carbono 17, 20, convertendo a 17-hidroxipregnenolona em dehidroepiandrosterona e a 17-hidroxiprogesteroa em androstenediona. A 17-ceto-redutase e a 17  $\beta$ -HSD, outra enzima do retículo endoplasmático, reduz a dehidroepiandrosterona em androstenediol e a androstenediona em testosterona (**figura 4**). Alterações nessas etapas podem comprometer a secreção de testosterona e, conseqüentemente, a função reprodutiva dos animais (DOMENICE et al., 2002; BLAHA et al., 2006; KILARKAJE, 2014).



**Figura 4:** Biossíntese de testosterona nas células de Leydig, mostrando a via enzimática da transformação do colesterol em testosterona (adaptado de KILARKAJE, 2014).

Todo esse processo ocorre nas células de Leydig, localizadas no interstício dos túbulos seminíferos dos testículos, que são responsáveis pela produção de cerca de 95 % da testosterona circulante no homem adulto. Essas células apresentam complexo de Golgi bem desenvolvido adjacente ao núcleo; mitocôndrias abundantes, variando de forma e tamanho; citoplasma acidófilo com áreas claras, correspondentes às gotículas de lipídeos; grande quantidade de retículo endoplasmático liso e rugoso; peroxissomos e lisossomos (CARVALHO et al., 2005).

Os efeitos adversos de vários contaminantes ambientais sobre a função reprodutiva, tem sido motivo de muita preocupação nos últimos anos (MATHUR; D'CRUZ, 2011). A maioria dos químicos ambientais são compostos hormonalmente ativos que atingem o sistema endócrino e causam anomalias reprodutivas (CRAVEDI et al., 2007). Descobertas recentes sobre reprodução humana têm mostrado que a infertilidade pode afetar de 15 a 20 % dos casais em países industrializados, dados superiores aos índices obtidos no início dos anos 60. Um estudo de metanálise realizado por Carlsen et al. (1992) mostrou uma diminuição mundial de quase 50 % na contagem de espermatozoides de homens adultos, entre os anos de 1940 e 1960.

Substâncias químicas que atingem o sistema endócrino estão entre as maiores ameaças ambientais conhecidas. Ao imitar hormônios naturais, estes compostos químicos podem

interagir com o sistema endócrino e exercer efeitos tóxicos. Numerosos estudos têm demonstrado a interação dessas substâncias com receptores hormonais dos testículos, que interferem com a proliferação e diferenciação de células espermatogênicas (SARADHA; MATHUR, 2006).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

A putrescina é uma substância química encontrada no necrochurume e que, ocasionalmente, pode causar contaminações ambientais e colocar em risco a saúde dos seres vivos. O objetivo deste trabalho foi produzir e compilar a maior quantidade possível de informações sobre seu potencial toxicológico, para diferentes sistemas biológicos (*in vitro* e *in vivo*) e descrever o mecanismo de ação de diferentes concentrações testadas.

#### 3.2. Objetivos específicos

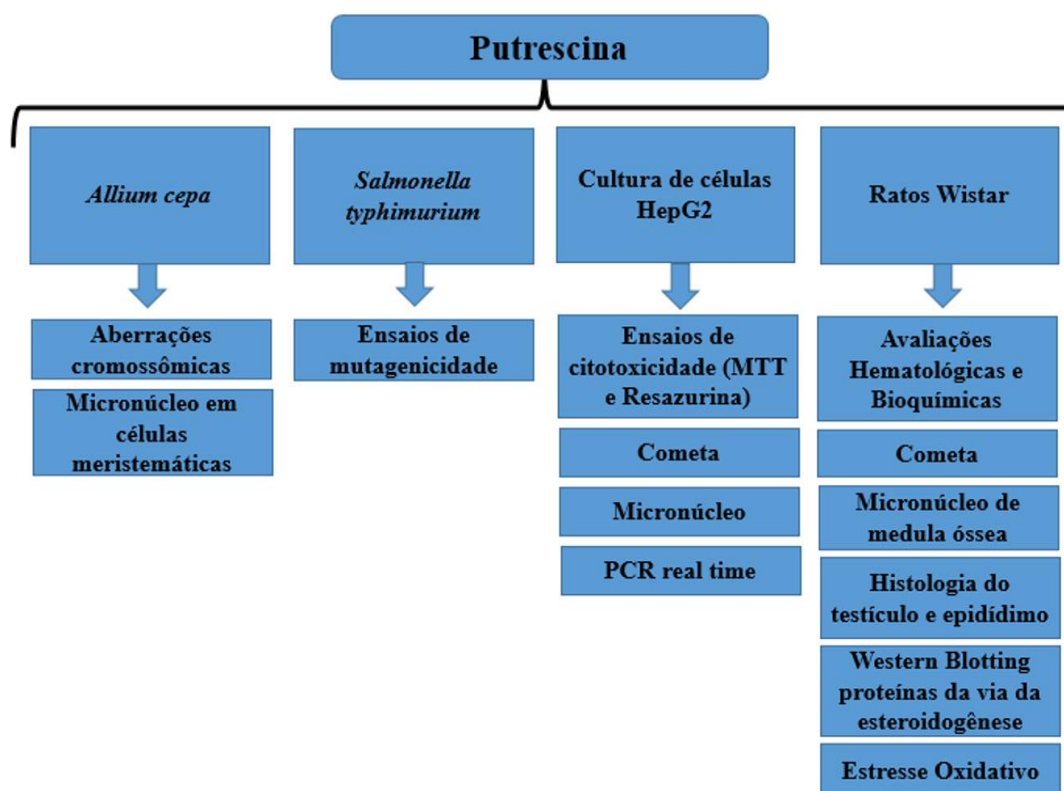
- Avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da putrescina, por meio da realização de ensaios com diferentes concentrações, em células meristemáticas de *A. cepa*;
- Estimar a mutagenicidade de diferentes concentrações de putrescina, por meio do teste de Ames realizado com as linhagens TA 98 e TA 100 de *S. Typhimurium*, com e sem ativação metabólica;
- Determinar as concentrações citotóxicas de putrescina para células HepG2, por meio do teste de MTT e do teste de redução da resazurina;
- Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos da putrescina, por meio do ensaio do cometa e do teste de micronúcleos, em células HepG2;
- Avaliar as alterações no padrão de expressão de genes envolvidos nas vias de metabolização de xenobióticos, reparo do DNA e estresse oxidativo, em células HepG2;
- Analisar os efeitos tóxicos da putrescina em ratos Wistar, por meio de análises hematológicas, bioquímicas e biométricas;
- Investigar o potencial genotóxico e mutagênico da putrescina, por meio do ensaio do cometa realizado com células sanguíneas e do teste de micronúcleo em medula óssea de ratos Wistar;
- Analisar os efeitos da putrescina sobre a produção de espermatozóides, em testículos e epidídimos de ratos Wistar;



- Analisar alterações na expressão proteica de proteínas envolvidas na via de produção da testosterona, por meio de western blotting;
- Investigar as alterações morfológicas, morfométricas e estereológicas em testículo de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de putrescina;
- Analisar os níveis de estresse oxidativo em testículos e epidídimos de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de putrescina.

#### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

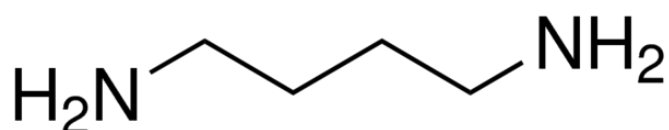
Os materiais e métodos serão apresentados de acordo com os organismos testes utilizados. A **figura 5**, sintetiza todos os testes e avaliações realizadas com os diferentes organismos teste.



**Figura 5:** Organismos teste e experimentos realizados com putrescina

##### 4.1 Substância química avaliada

Para o desenvolvimento dos ensaios, foi utilizada a poliamina putrescina (1,4-Diaminobutano, fórmula molecular C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>, peso molecular 88,15 g/mol, CAS No. 110-60-1, Sigma-Aldrich, com pureza de 99,0 %). Todos os experimentos foram desenvolvidos utilizando concentrações de exposição inferiores a DL<sub>50</sub> oral estabelecida para ratas (463 mg/kg), conforme informações disponíveis na ficha de segurança do produto. A fórmula estrutural da substância está representada na **figura 6**.



**Figura 6:** Fórmula estrutural da putrescina.

As concentrações de putrescina avaliadas nos diferentes bioensaios estão apresentadas na tabela abaixo (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Concentrações utilizadas para os diversos bioensaios, em relação à DL<sub>50</sub> de putrescina para ratas.

Bioensaios	Concentrações testadas nos diferentes organismos e bioensaios											
<i>Allium cepa</i>												
% da DL50	~0,16%	~0,32%	~0,65%	~1,3%	~3%	~4%	~5%	10%	30%	50%		
mg/kg	0,75	1,5	3	6	13	18	23	46,3	138,9	231,5		
Ames												
% da DL50	0,1 %	1%	5%	10%	30%	50%	70%					
mg/kg	0,46	4,63	23,15	46,3	138,9	231,5	324,1					
Ensaio de citotoxicidade (MTT e Resazurina) HepG2												
% da DL50	10%	20%	30%	45%	50%	60%	70%	80%	85%	90%	95%	100%
mg/kg	46,3	92,6	138,9	185,2	231,5	277,8	324,1	370,4	393,55	416,7	439,85	463
Cometa, Micronúcleo e PCR real time HepG2												
% as DL50	10%	30%	50%	70%								
mg/kg	46,3	138,9	231,5	324,1								
Bioensaios com Ratos Wistar												
% da DL50	10%	30%	50%									
mg/kg	46,3	138,9	231,5									

## 4.2 Bioensaio com *A. cepa*

### 4.2.1 Exposição das sementes de *A. cepa*

Sementes de *A. cepa* (Baia Periforme) foram colocadas para germinar em placas de Petri forradas com papel filtro umedecidos com as concentrações de putrescina: **0,75 mg/kg, 1,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 8 mg/kg, 13 mg/kg, 18 mg/kg, 23 mg/kg, 46,3 mg/kg, 138,9 mg/kg, 231,5 mg/kg**. O controle negativo foi umedecido com água Mili-Q e o controle positivo umedecido com uma solução aquosa de Metil metanossulfonato (MMS –  $4 \times 10^{-4}$ ).

Após germinação, radículas com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v) e mantidas em geladeira, onde permaneceram até a sua utilização na confecção das lâminas.

### 4.2.2 Teste de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*

As análises citológicas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Grant (1982), com algumas modificações. As raízes foram submetidas a uma hidrólise ácida em HCl

1N a 60 °C, durante 9 minutos, seguida de uma lavagem em água destilada. Os meristemas foram submetidos ao reativo de Schiff durante duas horas e, na sequência, foram confeccionadas das lâminas. A região meristemática foi recoberta com lamínula e, suavemente, esmagada com uma gota de Carmim Acético (2 %). Em seguida, as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas foram montadas com resina sintética. Foram confeccionadas 10 lâminas para cada concentração e analisadas um mínimo de 500 células/lâmina. Foram considerados os diferentes tipos de aberrações cromossômicas, em diferentes fases do ciclo celular. As perdas, aderências, pontes e atrasos cromossômicos e também os brotos nucleares foram usados na avaliação da genotoxicidade e a presença de quebras cromossômicas e micronúcleos como indicativos de mutagenicidade. Os resultados das diferentes concentrações foram comparados com os dados do controle negativo, pelo teste de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 Teste de Ames

#### 4.3.1 Linhagens de *Salmonella typhimurium*

Para a realização do teste de Ames, foram utilizadas duas linhagens bacterianas: TA 98 (detecta mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura e apresenta uma mutação no gene responsável pela síntese da histidina do tipo hisD3052) e a linhagem TA 100 (detecta mutação do tipo substituição de pares de bases e apresenta uma mutação no gene responsável pela síntese da histidina do tipo hisG46). Ambas as linhagens apresentam mutação *rfa*, que aumenta a permeabilidade da parede de polissacarídeos bacteriana, facilitando a entrada de moléculas maiores para o interior da célula; deleção do gene *uvrB* ( $\Delta$ uvrB), que impede o reparo por excisão; e o plasmídeo PKM101 (Apr), o qual apresenta o gene *mucAB*, que confere resistência a ampicilina, por favorecer o reparo pós-replicação do tipo sujeito a erros, além de contribuir para um aumento da taxa de mutação espontânea e induzida (MARON; AMES, 1983; MOTELMANS; ZEIGER, 2000).

#### 4.3.2 *Salmonella*/microsoma – Teste de Ames

As linhagens TA 98 e TA 100 de *S. typhimurium* foram colocadas em caldo nutriente, para crescerem em incubadora shaker a 37 °C, por 16 horas. Em seguida, para os ensaios sem ativação metabólica (-S9), foram adicionados 100  $\mu$ L de cada linhagem celular em tubos de cultura contendo 500  $\mu$ L de tampão fosfato e 100  $\mu$ L das diferentes concentrações de putrescina. Para os ensaios com presença de ativação metabólica (+S9), o tampão fosfato foi

substituído por 500 µL de mistura S9 [água destilada estéril, tampão fosfato 0,2 M, NADP 0,1 M, glicose-6-fosfato 1,0 M, solução de sais (KCl 1,65 M e MgCl<sub>2</sub> 0,4M) e fração S9 (Sistema microsomal S9, Moltox)]. O controle positivo (CP) foi realizado da mesma forma que os ensaios com os tratamentos, porém o volume correspondente às concentrações da putrescina foram substituídos pela substância usada como CP, conforme segue: óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) (Sigma, CAS No. 56- 57-5), na concentração de 0,05 µg/µL, para os testes realizados na ausência de ativação metabólica e o 2-aminoantraceno (2AA) (Sigma, CAS No. 613-13-8), na concentração de 0,25 µg/µL, para os testes realizados na presença de ativação metabólica.

Para o CN, foram adicionados 100 µL de cada linhagem de bactéria em tubos de cultura contendo 500 µL de tampão fosfato ou de mistura S9 e 100 µL de água mili-Q (solvente utilizado para diluir a amostra). Os tubos contendo as misturas foram pré-incubados em banho-maria a 37 °C, por 30 minutos. Em seguida, o seu conteúdo, acrescido de 2 mL de ágar de superfície, foi vertido em placas de Petri estéreis, contendo ágar mínimo solidificado. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 66 horas. Cada teste foi realizado em triplicata. Os CP foram realizados em duplicata e o CN, em quintuplicata.

Para a análise de mutagenicidade, as colônias de bactérias revertentes foram contadas manualmente e expressas em média ± desvio padrão. O potencial mutagênico foi avaliado pela quantificação do número de colônias revertentes em cada placa. Os dados foram avaliados pelo software SALANAL (Salmonella Assay Analysis 1.0), selecionando os modelos de Bernstein ou linear. As concentrações foram consideradas mutagênicas, quando o resultado estatístico do teste ANOVA ( $p < 0,05$ ) e da regressão linear ( $p < 0,05$ ) foram significativos. Os resultados foram expressos pelo número de revertentes/miligrama da amostra testada.

#### **4.4 Bioensaios com células de hepatocarcinoma humano (HepG2)**

##### **4.4.1 Cultura de células de hepatocarcinoma humano (HepG2)**

As células de hepatocarcinoma humano (HepG2), obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (Duque de Caxias, RJ, Brasil), foram cultivadas em meio MEM (Meio Mínimo Eagle Essencial) com 100U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco, Nova Zelândia), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil). As células foram mantidas em frascos de cultura descartáveis de 25 cm<sup>2</sup> em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub>, a 37 °C.

Para os testes de cometa e de micronúcleo, foram utilizados PBS como controle negativo e uma solução aquosa de Metil Metano Sulfonato - MMS ( $4 \times 10^{-2}$  M) para o controle positivo.

#### **4.4.2 Teste de citotoxicidade do MTT (Brometo de Tiazolil azul de Tetrazólio)**

O teste do MTT foi realizado em placas 96 poços (fundo chato). Foram semeadas, aproximadamente,  $2,34 \times 10^4$  células por poço, em um volume total de 100  $\mu$ L de meio com soro. As placas foram incubadas por um período de 24 horas e, após este período, o meio foi retirado e um novo meio de cultura (sem soro) foi adicionado, juntamente com os tratamentos nas suas diferentes concentrações, em um volume final de 200  $\mu$ L. O controle positivo (CP) foi realizado com Triton X-100, diluído em meio de cultura sem soro, na concentração de 1% e o controle negativo (CN) realizado apenas em meio de cultura sem soro. Foram testadas doze diferentes concentrações de putrescina, por um período de 24 horas. Para finalização do teste, foram adicionados 150  $\mu$ L de MTT em cada poço da placa, seguido da incubação por um período de 4 horas, a 37 °C. Na sequência, foi descartada a solução de MTT e foi adicionado, em cada poço, 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram lidas em espectrofotômetro com leitor de microplaca, filtro de 540 nm (Aparelho Multiskan FC – ThermoScientific). No ensaio de MTT foram testadas 12 diferentes concentrações, estabelecidas a partir da DL50 (463 mg/kg para ratas) de putrescina. Foram realizados ensaios com 100 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % e 10 %.

#### **4.4.3 Teste de citotoxicidade com redução da resazurina**

Para a realização do teste de citotoxicidade com resazurina, foram semeadas células HepG2 em placas de 96 poços, contendo 100  $\mu$ L de meio com soro. O teste foi realizado de acordo com O'Brien et al. (2000), como segue. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C, o meio de cultura foi retirado e 200  $\mu$ L de meio de cultura contendo as diferentes concentrações de putrescina foram adicionados nos poços correspondentes à cada concentração. O CP e CN foram os mesmos utilizados para o teste de MTT. As células foram expostas por 24 horas à putrescina e, na sequência, os tratamentos foram descartados. Foram adicionados, em cada poço da placa, 200  $\mu$ L de Resazurina (44  $\mu$ M), preparada em meio de cultura. A placa foi incubada por 4 horas à 37 °C e a leitura foi realizada em fluorímetro Infinite® 200 pro microplate readers (TECAN, Mannedorf, Suíça), configurado com  $\lambda = 560$  nm de excitação e  $\lambda = 590$  nm de emissão. As concentrações avaliadas foram as mesmas que no teste de MTT. As concentrações que apresentaram viabilidade celular menor que 80% foram consideradas citotóxicas.

#### 4.4.4 Ensaio do cometa

As células foram cultivadas em condições ideais (37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub>), por 24 h. Em seguida, foram submetidas aos tratamentos por um período de 24 horas (um ciclo celular completo), com as concentrações de putrescina referentes a 10, 30, 50 e 70 % da DL<sub>50</sub>. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas com 500 µL de Tripsina 0,5 % por 5 minutos, para desprendimento celular. Decorrido este tempo, o processo foi interrompido pela adição de 5 mL de meio de cultura completo. As suspensões celulares foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 1500 rpms, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, reservando-se apenas 0,5 mL da solução, onde o pellet foi ressuspendido. A viabilidade celular foi avaliada pelo método da coloração com Azul de Trypan (GIBCO), onde 20 µL de suspensão celular, de cada tratamento, foram misturados com 20 µL de corante a 0,4 % e analisados em microscópio de luz em objetiva de 40x. Foram contabilizadas as quantidades de células viáveis (brancas) e inviáveis (coradas em azul). Os índices de viabilidade celular foram obtidos considerando-se as porcentagens de células viáveis do total de células analisadas, aceitando-se o limite mínimo de 80 % de células viáveis, para o prosseguimento do experimento. A solução celular foi passada por uma seringa de insulina estéril de 1 mL, para obtenção de células isoladas. Em seguida, uma alíquota de 20 µL de suspensão celular foi misturada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% a 37 °C e, rapidamente, gotejada sobre lâminas secas previamente cobertas com agarose normal, 1,5 %. As lâminas foram feitas em réplicas e mantidas a 4 °C, por 20 minutos. As lamínulas foram removidas cuidadosamente e as lâminas foram imersas em solução de lise gelada (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 8 g de NaOH, 890 mL de água destilada), pH 10, no escuro, a 4 °C, por 1 hora.

Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese e cobertas com uma solução tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, com pH>13), descansando por 20 minutos, para a desnaturação do DNA. A corrida eletroforética foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300 mA (~ 0.8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas, durante 15 minutos, em tampão de neutralização (0,4 M de tris-HCL, pH 7.2). As lâminas foram fixadas por 10 minutos em etanol absoluto. No ato da análise microscópica, as lâminas foram coradas, individualmente, com 50 µL de Gel red (0,02 mg/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência Olympus, objetiva de 40x, filtro B - 34 (excitação: λ = 420-490 nm, barreira: λ = 520 nm). Foram contabilizados 100 nucleóides por lâmina, totalizando 600 nucleóides por tratamento. Os danos no DNA foram estimados por 3 parâmetros:

intensidade de DNA, comprimento e momento da cauda, avaliados pelo software Comet Assay IV (Perspective Instruments, Bury Saint Edmunds, Reino Unido).

#### **4.4.5 Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese**

Para o teste do micronúcleo realizado com células mantidas em cultura, foi utilizada a técnica descrita por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações, como segue: as células (total de  $5 \times 10^5$  por frasco) foram cultivadas por um ciclo celular completo (24 horas), antes da adição dos tratamentos. Em seguida, foi adicionado o meio de cultura contendo as devidas concentrações de putrescina, para uma exposição de 24 horas. Após o período de exposição, as células foram lavadas por duas vezes com tampão PBS, seguido da adição de 5 mL de meio de cultura completo com citocalasina B (concentração final de  $3 \mu\text{g/mL}$ ), onde permaneceram por mais 28 horas. Posteriormente, as células foram coletadas, tratadas com solução hipotônica (citrato de sódio 1 %) e fixadas com formol (40 %) e Carnoy (etanol-ácido acético 3:1 – v:v). As lâminas para análise foram preparadas gotejando algumas gotas da cultura celular sobre lâminas limpas, geladas e contendo um filme de água. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa 5 %, por 8 minutos. Os testes foram realizados em triplicata. Foram contabilizadas 1.000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração, por réplica, totalizando 3.000 células contadas por tratamento. Foram identificados e contabilizados os micronúcleos, as pontes nucleoplasmáticas e os brotos nucleares (FENECH, 2000). A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Tukey  $p < 0,05$ .

#### **4.4.6 Cálculo do índice de divisão nuclear (IDN)**

O índice de divisão nuclear (IDN) foi calculado baseando-se no número de células mono, bi, tri e tetranucleadas encontradas num total de 500 células contadas por tratamento. Esse índice fornece uma medida de estado proliferativo das células viáveis. O Cálculo foi feito de acordo com a expressão:  $\text{IDN} = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$ . Onde M1-M4 representam os números de células com 1, 2, 3 e 4 ou mais núcleos, e o N é o número total de células contadas (EASTMOND; TUCKER, 1989).



#### 4.4.7 Análises moleculares: extração de RNA e perfil de expressão gênica

As células foram expostas como nos ensaios anteriores e, após as 24 horas de exposição, foram tripsinizadas, coletadas, lavadas por três vezes com PBS e centrifugadas até completa lavagem do meio de cultura e da tripsina. Os RNAs foram extraídos com Tri Reagente<sup>®</sup> (Sigma, St Louis, EUA). A qualidade e a concentração dos RNAs foram analisadas em NanoVue<sup>™</sup> Plus Spectrophotometer (GE Healthcare). O cDNA foi sintetizado, a partir de 250 ng de RNA total, com o kit High-Capacity cDNA reverse Transcription (Applied Biosystems<sup>™</sup>), em um volume final de 20 µL. Foram selecionados genes relacionados à metabolização, aos danos no DNA e ao estresse oxidativo. Todos os iniciadores foram desenhados por meio do programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), utilizando as sequências depositadas no banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (**Tabela 2**).

**Tabela 2:** Genes e sequências dos iniciadores utilizados nos ensaios de expressão gênica

Nome dos genes	Gene	Identificação do gene	Sequencia direta (5' - 3')	Sequencia reversa (5' - 3')	Tamanho do amplicon (Pb)
<b>Síntese de poliaminas</b>					
Ornitina descarboxilase	OCD	4953	CCCAGCGTTGGACAAATACT	TCCATAGACGCCATCATTCA	205
<b>Estresse oxidativo</b>					
Superóxido dismutase 1	SOD1A	6647	AGGGCATCATCAATTTTCGAG	GTGAGGACCTGCACTGGTAC	146
Catalase	CAT	847	CGTGCTGAATGAGGAACAGA	AGTCAGGGTGGACCTCAGTG	119
Glutationa Peroxidase	GPx1	2876	TTGACATCGAGCCTGACATC	ACTGGGATCAACAGGACCAG	185
Glutationa Redutase	GSR	2936	ATCCATATGCAGGGACTTGG	GTAGGGTGAATGGCGACTGT	110
<b>Metabolismo de xenobióticos</b>					
Citocromo P450, família 1	CYP1A1	1543	TTCCCTGATCCTTGTGATCC	GGAGATTGGGAAAAGCATGA	109
Glicuronil transferase	UGT1A1	54658	GTGCCTTTATCACCCATGCT	GCTTTGCATTGTCCATCTGA	108
<b>Danos no DNA</b>					
Reparo por Excisão	ERCC1	2072	CTACAGCCAGTGCATCTCCA	CTCCTGAAACAAGGCACCTC	112
Núclease APEX	APEX1	328	ATATTGCTTCGGTGGGTGAC	GCTCTGTCCTGAGCTCATCC	115
Chechpoint Quinase1	CHEK1	1111	CGCTCCCAACACGGAGTTCC	TCACAGTCGGTGAAGCAGAG	119
<b>Housekeeping</b>					
B-actina	$\beta$ -act	60	CGGGACCTGACTGACTAC	CTCCTTAATGTCACGCAC	87

O PCR em tempo real foi realizado em aparelho StepOne Plus® System (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos). As reações realizadas em placas de 96 poços, foram montadas para um volume final de 10 µL, sendo 0.75 µM de iniciadores, 2 µL de cDNA diluído 10 vezes e 5 µL de SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix (Applied Biosystems™). As condições para PCR foram: Denaturação inicial e ativação enzimática por 10 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min. As alterações na expressão gênica foram determinadas usando a β-actina como gene de referência (housekeeping). O método de comparação utilizado foi CT ( $\Delta\Delta CT$ ). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

#### **4.5 Bioensaios com ratos Wistar**

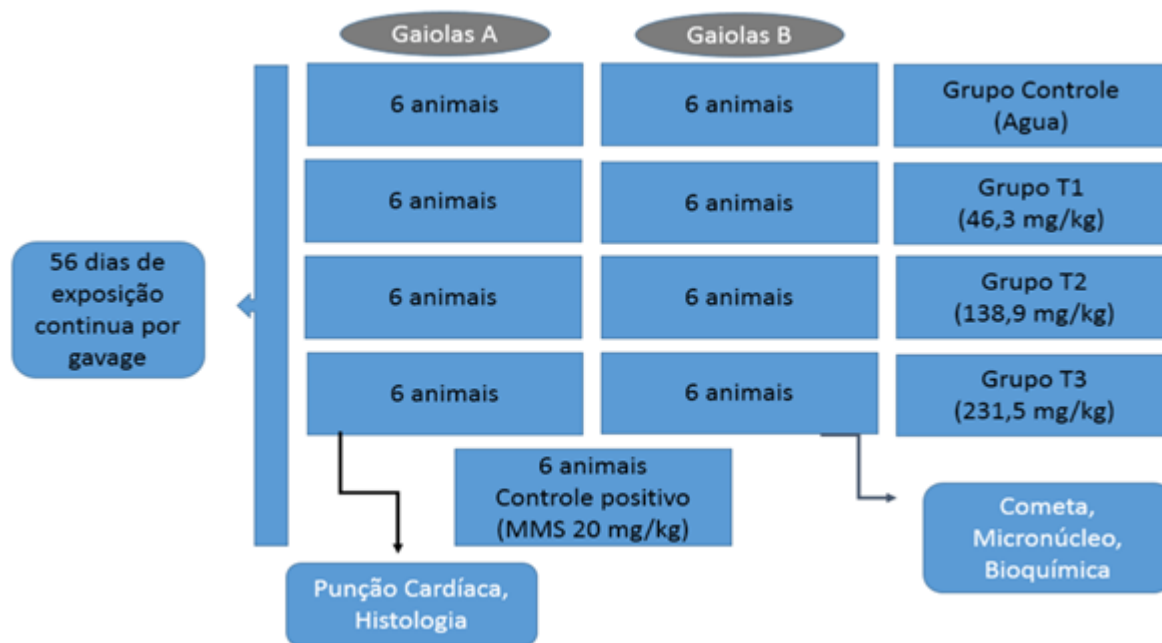
##### **4.5.1 Animais experimentais e delineamento experimental**

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 54 ratos Wistar machos adultos, com peso inicial em torno de 250 g. O tratamento dos animais foi realizado no centro de experimentação animal da Fundação Hermínio Ometto (FHO-UNIARARAS), que possui amplo espaço, ótimas instalações e condições experimentais para o desenvolvimento dos ensaios. Os animais permaneceram em temperatura controlada de 25 °C, umidade do ar a 60 %, ciclos claro/escuro de 12 horas e água e ração purina *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da FHO-UNIARARAS (Protocolo nº 024/2013) e foi conduzido de acordo com as diretrizes éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

As concentrações testadas de putrescina foram definidas a partir de referência contida na ficha de informações de segurança do produto (Sigma-Aldrich), que aponta uma  $DL_{50}$  oral para ratazanas de 463 mg/kg. As concentrações de uso foram definidas em 10 % (T1- 46,3 mg/kg), 30 % (T2- 138,9 mg/kg) e 50 % (T3- 231,5 mg/kg) da  $DL_{50}$ .

Os animais foram divididos em quatro grupos de 12 indivíduos, distribuídos em gaiolas A e B, com seis animais em cada. O grupo controle (n=12) recebeu apenas água filtrada e os três grupos tratados T1, T2 e T3 (n=12) receberam, em cada um dos tratamentos, uma das concentrações citadas acima. Além disso, foi feito um grupo controle positivo (n=6), para o teste de micronúcleo e ensaio do cometa, cujos animais receberam o MMS (20 mg/kg), 24 horas antes da eutanásia. Os animais foram pesados semanalmente e o volume administrado foi calculado de acordo com o peso de cada animal. A substância foi administrada via gavagem, por um período de 56 dias, tempo necessário para completar o ciclo

completo da espermatogênese (RUSSELL et al., 1990), uma vez que foram avaliadas as funções reprodutivas dos animais. O delineamento experimental pode ser visto de forma esquemática na **Figura 7**.



**Figura 7:** Delineamento experimental do experimento realizado com ratos Wistar

#### 4.5.2 Coleta de sangue caudal, após 15 e 30 dias de exposição

O sangue dos animais foi coletado por punção caudal, após 15 e 30 dias de exposição. Foram retirados, aproximadamente, 600  $\mu$ L de sangue, que foram armazenados em tubos de centrifuga de 1,5  $\mu$ L. Logo na sequência, foram feitas as lâminas para o ensaio do cometa e o restante do sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos, para separação do soro que foi utilizado para dosagens bioquímicas de glicemia, colesterol e triglicérides.

#### 4.5.3 Eutanásia e coleta de materiais biológicos

Ao final de 56 dias de exposição, os animais foram submetidos a dois procedimentos: Animais das caixas A: o sangue desses animais foi coletado por punção cardíaca e, na sequência, eles foram perfundidos para obtenção de material para análises histológicas; Animais das caixas B: nesses indivíduos, o sangue, coletado por punção cardíaca, foi usado nas análises bioquímicas e hematológicas e no ensaio do cometa, os testículos e epidídimos, usados para as análises bioquímicas e a medula óssea para o teste de micronúcleo. Os animais, anestesiados com solução de Xilazina (Rompun® - Bayer S.A. – 20 mg/mL) e Cetamina (Ketalar® - Parke, Davis & Co.- 50 mg/mL), foram submetidos à labarotomia

medial, seguido da expansão da cavidade torácica, para expor o coração para a realização da punção cardíaca, que foi realizada com uma seringa de 5 mL. Em seguida, o sangue foi acondicionado em tubos à vácuo, previamente identificados e armazenados a 4 °C.

Após a punção cardíaca, foi introduzida uma cânula na artéria renal, conectada a um sistema de perfusão e realizada uma secção no átrio direito, para a realização da drenagem da solução. A perfusão foi realizada, inicialmente com uma solução salina heparinizada 1%, seguida de solução de glutaraldeído 4%, paraformolaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por aproximadamente 30 minutos. Todos os órgãos foram pesados individualmente para análise estatística.

#### **4.5.4 Sangue para análises hematológicas e bioquímicas**

O sangue foi coletado em tubos adequados para cada análise. O sangue destinado à análise do hemograma foi coletado em tubos com tampa roxa, contendo o anticoagulante EDTA, e o sangue para análises bioquímicas foi coletado em tubos com tampa vermelha e sem anticoagulante. As amostras foram encaminhadas para o laboratório de análises clínicas CEDIVET – Centro de Diagnostico Veterinário, localizado na cidade de Rio Claro, Rua 5, nº 2768, CEP 13504-0493.

Os Parâmetros hematológicos avaliados foram: hemograma completo (contagem de hemácias, concentração de Hemoglobina (He), Hematócrito (Ht), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHVM), leucócitos totais, bastonetes, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, bastonetes, monócitos e plaquetas.

Nas análises bioquímicas foram determinados os valores de proteínas totais, creatinina, uréia, Fosfatase Alcalina (FA), Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST) e testosterona total.

#### **4.5.5 Dosagem de glicemia e colesterol nas amostras de sangue dos ratos submetidos a 15, 30 e 56 dias de exposição**

As dosagens bioquímicas de glicemia, colesterol total, HDL e triglicérides foram realizadas com os kits comerciais Bioliquid® (Laborclin, Paraná, Brasil), utilizados de acordo com as indicações do fabricante. A leitura das análises foi feita por espectrofotometria, utilizando o leitor de placas ASYS- Expert Plus- Analítica.

#### 4.5.6 Ensaio do cometa com células sanguíneas.

Para o ensaio do cometa, 240 µL de agarose de baixo ponto de fusão foram misturados a alíquotas de 40 µL de amostra sanguínea, separadas por animal e por grupo. 140 µL desta mistura foram pipetados sobre as lâminas previamente preparadas e, na sequência, cobertas por uma lamínula. O procedimento do ensaio do cometa foi realizado igual ao item (4.4.4).

Os nucleóides foram classificados, visualmente de acordo com a migração dos fragmentos em: classe 0 - nucleóides sem dano; classe 1 - nucleóides ligeiramente danificado; classe 2 - nucleóides com danos médios; classe 3 - nucleóides altamente danificado e classe 4 – nucleóides com pequena cabeça e com todo DNA na cauda (COLLINS et al., 1997). Os resultados foram apresentados de acordo com a frequência de danos avaliada em cada uma das classes de cometa, em número total de células danificadas e em índice de danos por grupo (ID) (BRANCO et al., 2015), calculado pela equação:  $NC_0 \times 0 + NC_1 \times 1 + NC_2 \times 2 + NC_3 \times 3 + NC_4 \times 4 = DI$  onde NC é o número de nucleóides observados em cada classe e os números, as classes correspondentes.

#### 4.5.7 Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores

A técnica utilizada para o estudo de MN em células de medula óssea foi descrita por Schimid (1975), com modificações, descritas a seguir: Os animais foram dissecados com pinça e tesoura de dissecação, para a retirada do fêmur. O osso foi limpo, com a retirada dos tecidos a ele aderidos, e as epífises foram seccionadas. Com o uso de uma seringa, foi introduzido no canal medular 1 mL de soro fetal bovino (CULTILAB, Campinas, Brasil) para lavar (por 3 vezes) e retirar, completamente, o conteúdo das células do canal medular. As amostras de medula óssea foram dispostas em um tubo de centrífuga, contendo 2 mL de soro fetal bovino e centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos. Retirado o sobrenadante, o material foi ressuspensão em 1 mL de soro fetal e homogeneizado, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Foi depositada sobre uma lâmina uma gota da suspensão celular e realizada a distensão do material medular (RIBEIRO et al., 2003). As distensões foram colocadas em estufa a 37° C, por aproximadamente 2 horas e, em seguida, foram flambadas em chama de lamparina, para fixação. A coloração foi realizada deixando as lâminas por três minutos em solução pura de Wright. Posteriormente, foram lavadas com água e colocadas, por 1 mim, em solução de Wright mais tampão fosfato pH 7.0 (1:1 v:v), lavadas novamente em água e colocadas, por 10 mim, em uma mistura de tampão fosfato, água destilada e Giemsa (10:10:1). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, para retirada do excesso de corante. Foram analisados, para cada animal, 4000 eritrócitos policromáticos (EPCs) e contados quantos deles

se apresentavam micronucleados. As lâminas foram codificadas e analisadas em teste cego, ao microscópio de luz visível, com objetiva de imersão. Os dados foram tabulados, usando o programa Graphpad Prism 6.0 e submetidos ao teste ANOVA e Tukey, com grau de significância de 5%. Os resultados foram apresentados em frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) para 4000 eritrócitos policromáticos (PCEs) por animal. A substância testada pode ser considerada mutagênica quando produz aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência de EPCMNs, em relação ao controle negativo (RIBEIRO et al., 2003).

#### **4.5.8 Análises dos testículos e epidídimos**

##### **4.5.8.1 Biometria**

Os testículos previamente fixados (gaiolas A) foram dissecados para a retirada da albugínea. Este procedimento permitiu obter o peso real do parênquima testicular, referente a porção funcional dos testículos. Com base nos pesos corporais dos animais e no peso dos testículos dissecados, foi obtido o índice gonadossomático (IGS), calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{IGS} = \text{MG (massa total das gônadas)} / \text{MC (massa corporal dos animais)} \times 100$$

Para os epidídimos, foi calculado, o índice epididimossomático (IES), que foi expresso pela relação entre o peso do corpo do animal e o peso do epidídimo ( $\text{IES} = (\text{peso do epidídimo (g)} / \text{peso corpóreo (g)}) \times 100$ ).

##### **4.5.8.2 Contagem dos espermatozoides nos testículos e epidídimos**

Os testículos e epidídimos dos animais que não foram perfundidos (gaiolas B), foram congelados e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para serem individualmente analisados posteriormente. Para a contagem de espermatozóides nos testículos, foi retirada a albugínea. Os mesmos foram pesados e triturados em homogeneizador IKA T-18, marca (Biovera), com 5 mL de solução salina (STM) (0,9 % NaCl e 0,05 % Trinton X-100). Deste homogenato, foram retirados 100  $\mu\text{L}$  e diluídos em 900  $\mu\text{L}$  de STM. Já os epidídimos foram divididos em cabeça/corpo e cauda e, cada fragmento, foi pesado e triturado. A cabeça/corpo foi homogeneizada com 1 mL de STM, para cada 200 g e a cauda homogeneizada com 1 mL, para cada 100 g. Esta diluição foi feita na proporção de 50  $\mu\text{L}$  para 950  $\mu\text{L}$  de STM. A contagem dos espermatozóides em ambos os órgãos, foi feita em duplicata e em câmara de Neubauer, sendo que entre cada campo, de cada câmara contada, a diferença teria que ser

menor que 10% e entre a contagem das duas câmaras a diferença teria que ser menor que 20%.

#### **4.5.8.3 Produção espermática diária (PDE) e cálculo do transito espermático**

A produção espermática diária (PDE) foi calculada dividindo o número total de espermátides/espermatozoides do testículo por 6,1 dias, período este que corresponde ao tempo de duração da maturação das espermátides, que ocorre nos túbulos seminíferos, no passo 19 do estágio VIII (ROBB et al., 1978). O trânsito dos espermatozoides foi calculado, dividindo o número de espermatozoides  $\times 10^6$  pelo peso do parênquima e, depois pela PDE. Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste estatístico ANOVA, com pós-teste Tukey, para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

#### **4.5.8.4 Western Blotting para análise de expressão proteica**

Para a avaliação das proteínas CYP11A1, 17 B-HSD e StAR, fragmentos de testículo foram homogeneizados, por 30 segundos, em tampão de extração para imunoprecipitado, para a extração proteica. O extrato foi centrifugado a 1500 rpm a 4° C, por 45 min, para a remoção do material insolúvel. Alíquotas do sobrenadante foram tratadas com tampão Laemmli contendo 10 mM de DTT (Ditiotreitol) e 40  $\mu$ g de proteínas foram utilizadas na corrida em SDS-PAGE 12 %, em aparelho minigel (Miniprotean). Após a corrida, as proteínas foram eletrotransferidas (a 0,8 mA/cm<sup>2</sup>) do gel para a membrana de nitrocelulose (0,45  $\mu$ ). Esta foi incubada por duas horas em solução bloqueadora, para diminuir as ligações inespecíficas das proteínas. Na sequência as membranas foram incubadas por 4 horas com os anticorpos específicos: anti-CYP11A1 (ab175408-abcam), anti-17BHSD (M-174: sc-32 872 – Santa Cruz Biothnology) e anti- StAR (ab180804-abcam) previamente diluídos (1:100) na solução de bloqueio (leite em pó desnatado a 1%). A membrana foi submetida a lavagens com solução de TBS-T (tris-HCl, ph 8.0, contendo 150 mM de NaCl e 0,05 % de Twenn 20) e, em seguida, incubada com o anticorpo secundário anti-igG de coelho (ab97051-abcam), diluído 1:5000 em solução de bloqueio, por duas horas a temperatura ambiente. As membranas foram reveladas no fotodocumentador Syngene G:BOX. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria, no programa do fotodocumentador Gene Tools.

#### **4.5.9 Quantificação de estresse oxidativo nos testículos e epidídimos**

##### **4.5.9.1 Quantificação de proteínas totais**

Para a determinação de proteínas totais, foi preestabelecida uma curva de calibração, a partir de diferentes concentrações de albumina 22 %. Foram homogeneizados em tampão



fosfato 0,1 M, pH 7,4, por meio do homogeneizador de tecidos modelo IKA T-18, marca (Biovera), um testículo e um epidídimo inteiros. As proteínas foram quantificadas pelo método de biureto, e a leitura das absorvâncias foram feitas em 540 nm. Os valores obtidos foram inseridos na equação da reta preestabelecida e foi determinada a concentração proteica para cada tecido (GORNALL et al., 1949).

#### **4.5.9.2 Avaliação da atividade da Catalase (CAT)**

Os ensaios para dosagem da atividade da CAT foram conduzidos de acordo com o método de Aebi (1974). Foi adicionando 0,1 mg de proteínas em 2 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 100 µL de peróxido de hidrogênio 10 volumes. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio foi monitorada espectrofotometricamente por 2 minutos e 30 segundos, em intervalos de 30 segundos por meio da variação da absorvância em 240 nm. A atividade foi expressa em unidades de absorvância/minuto.

#### **4.5.9.3 Avaliação da atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de autooxidação do pirogalol, conforme descrito por Marklund e Marklund (1974). O ensaio foi desenvolvido com 0,1 mg de proteína, 2 mL de tampão TRIS- HCl, 25 mM com EDTA 1 mM, pH 8,5 e 200 µL de pirogalol 15 mM. A solução foi incubada a 25 °C por 10 minutos. Após a incubação, foram adicionados 200 µL de HCl 1N, para cessar a reação. A absorvância foi lida em 440 nm. Uma unidade de SOD foi determinada como a quantidade de enzima que inibiu a oxidação do pirogalol em 50 %. A atividade foi expressa em unidades de absorvância/minuto.

#### **4.5.9.4 Avaliação da atividade da Glutathione-S-transferase (GST)**

A atividade da GST foi avaliada seguindo o método de Habig et al. (1974). A mistura analisada foi constituída de 2,7 mL de tampão fosfato, 400 µL de GSH 0,1 mM, 400 µL de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 0,1 mM e 1 mg de proteína. O aumento na absorvância foi medido a 340 nm por 5 minutos com 1 minuto de intervalo. O resultado foi expresso como absorvância/minuto.

#### **4.5.9.5 Determinação dos níveis de Glutathione reduzida (GSH)**

Os níveis de GSH foram quantificados, utilizando-se o tecido homogeneizado com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 segundo os procedimentos descritos por Ellman (1959). Foi adicionado 5 mg de proteínas ao mesmo volume de ácido tricloroacético (TCA 20 %, EDTA 1 mM). A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos, em temperatura ambiente, para

precipitação das proteínas. Em seguida, foi centrifugada por 5 minutos a 3500 rpm, e 100 µL do sobrenadante foi misturado em 2 mL de tampão TRIS- HCl 25 mM, com EDTA 1 mM, pH 8.2. A absorbância foi lida em 412 nm, imediatamente após a adição de 20 µL DNTB 10 mM e uma segunda leitura foi realizada, após 15 minutos do início. Os níveis de GSH foram calculados por meio da equação  $(\text{Absfinal} - \text{Absinicial}) \times 1,57 \text{ (mM)}$  (ALLAMEH et al., 1997).

#### **4.5.10 Obtenção do material para análises histológicas**

Os fragmentos dos testículos e epidídimos foram fixados sob refrigeração, por 24 horas, imersos na mesma solução utilizada na perfusão dos animais. Logo após a fixação, as amostras de tecido foram transferidas para solução tampão fosfato de sódio 10 % (0,1 M, pH 7.4), onde permaneceram por mais 24 horas. Em seguida foram submetidas à desidratação em concentrações crescentes de álcool (70 %, 80 %, 90 % e 95 %), com trocas sucessivas a cada trinta minutos. Após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em resina glicol metacrilato (Leica) e seccionados na espessura de 3 µm, em micrótomo Sorvall JB-4/Bio Rad, com navalhas de vidro.

##### **4.5.10.1 Coloração com Hematoxilina – Eosina**

As lâminas contendo as secções histológicas dos tecidos foram oxidadas pela hematoxilina de Mayer durante 10 minutos. Na sequência, foram lavadas por 5 minutos em água corrente e contra-coradas pela eosina aquosa, durante 5 minutos, sendo novamente lavadas em água corrente. Foram clarificadas com xilol e montadas em resina Permount.

##### **4.5.11 Histoquímica**

A detecção da presença, frequência e distribuição dos componentes proteicos e dos polissacarídeos nos testículos e epidídimos foram submetidos fragmentos de tecidos às técnicas histoquímicas descritas a seguir.

##### **4.5.11.1 PAS para detecção de polissacarídeos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1983)**

A coloração ácida periódico-Schiff (PAS – Periodic acid Schiff) é um método utilizado para marcação de glicoconjugados, como o glicogênio nos tecidos. A reação do PAS oxida, seletivamente, os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que interage com o reativo de Schiff e produz uma cor púrpura-magenta. Geralmente, esse reativo é usado com um corante básico de contraste, como a hematoxilina (SANTOS et al., 2000). As secções

histológicas foram oxidadas em ácido periódico 0.4 %, por 10 min e, na sequência, foram lavadas rapidamente em água destilada e submetidas ao reativo de schiff, durante 1 h no escuro. Posteriormente, foram passadas por três lavagens em água sulfurosa (3 min cada banho) e, a seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente, por 30 minutos. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris, por 40 segundos, e novamente lavadas em água corrente por mais 5 minutos. Logo após, foram montadas em resina Permount.

#### **4.5.11.2 Azul de bromofenol, para detecção de proteínas (PEARSE, 1985)**

As secções histológicas foram coradas com azul de bromofenol, por duas horas à temperatura ambiente. Na sequência reagiram com ácido acético 0.5 % por 5 minutos e, logo depois, lavadas em água corrente, por 15 minutos. As lâminas já coradas foram passadas, rapidamente, em solução de álcool butílico terciário e secas ao ar livre, para serem diafanizadas e montadas em resina Permount.

#### **4.5.12 Análise morfométrica e estereológica dos testículos e células de Leydig**

As secções obtidas dos testículos foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio a 1 %. Este material foi utilizado para obtenção da morfometria e estereologia testicular (MONTEIRO et al., 2008). As lâminas obtidas foram examinadas e analisadas em microscopia de luz. Foram fotodocumentadas as imagens histológicas mais representativas de cortes de testículo, coradas com azul de toluidina. As análises morfométricas e estereológicas foram processadas, utilizando o software Image Pro Plus versão 6.0 (Media Cybernetics).

##### **4.5.12.1 Morfometria dos túbulos seminíferos**

Os diâmetros tubulares médios dos túbulos seminíferos foram obtidos por animal a partir da mensuração, ao acaso, de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam o contorno mais circular possível em aumento de 200x. Nas mesmas secções, foram mensuradas a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada de forma diametralmente oposta em 4 diferentes pontos desde a túnica própria até o lúmen tubular também em aumento de 200x.

##### **4.5.12.2 Determinação das proporções volumétricas (%) e volumes (mL) dos componentes do espaço intersticial**

Estas proporções foram estimadas a partir da projeção de uma grade contendo 494 pontos sobre imagens do espaço intersticial dos testículos, capturadas em campos aleatórios, em um aumento de 1000x. Para cada animal, foram analisadas diferentes secções, até

completar 3000 pontos. Os elementos quantificados no espaço intersticial foram: células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófagos e tecido conjuntivo. O volume de cada componente do parênquima testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume total líquido do parênquima testicular. O valor deste último foi obtido por meio dos pesos dos testículos (sem a túnica albugínea) fixados. Segundo França (1991), como a densidade do testículo é em torno de 1 (1,03 a 1,04), a massa testicular será considerada igual ao seu volume.

#### **4.5.12.3 Diâmetro e volume das células de Leydig**

Foram estimados o diâmetro médio de 30 células de Leydig por animal, para cada grupo experimental. Os valores foram obtidos por meio da média entre duas medidas diametrais, obtidas de forma opostas. O volume nuclear dessas células foi calculado, aplicando a seguinte fórmula:

Volume nuclear =  $\frac{4}{3}\pi R^3$ , onde R é o raio do núcleo das células de Leydig, obtido com a medida dos diâmetros.

## **5 RESULTADOS**

**Artigo 1: Avaliação toxicogenética da putrescina para *Allium cepa* e *Salmonella typhimurium***

**Artigo 2: Potencial genotóxico da putrescina e alteração na expressão de genes envolvidos em mecanismos de toxicidade na linhagem celular de hepatocarcinoma humano HepG2**

**Artigo 3: Toxicidade da poliamina putrescina em ratos Wistar machos**

**Artigo 4: Danos no DNA de ratos Wistar induzidos pela poliamina putrescina**

**Artigo 5: Avaliação dos efeitos reprodutivos em ratos wistar induzidos pela poliamina putrescina**

## Artigo 1

### Avaliação toxicogenética da putrescina para *Allium cepa* e *Salmonella typhimurium*

Franco Dani Campos-Pereira, Raquel Vaz Hara, Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo

Maria Aparecida Marin-Morales

#### Highlights

- A putrescina é uma das substâncias produzidas durante o processo de decomposição cadavérica.
- A genotoxicidade da putrescina foi avaliada em células meristemáticas de *Allium cepa* e em linhagens de *Salmonella*.
- Putrescina induziu aumento na frequência de Aderências cromossômicas e micronúcleos em *Allium cepa*.
- Putrescina foi mutagênica para as linhagens TA 98 e TA 100 de *Salmonella*, após ativação metabólica.

#### Resumo

A putrescina é uma poliamina que desempenha importantes funções fisiológicas em diferentes células e em diferentes organismos. Esta poliamina também está presente no necrochorume, que é o líquido produzido durante o processo de decomposição cadavérica. Desta forma, a putrescina pode se caracterizar em um agente responsável por contaminações de solo e de recursos hídricos. Essa contaminação ocorre por percolação ou escoamento do necrochorume no solo, principalmente em áreas de cemitérios, podendo atingir tanto os recursos hídricos subterrâneos como superficiais. Diante da carência de informações a respeito dos efeitos dessa substância como contaminante ambiental, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico e mutagênico desta poliamina, por meio de testes realizados com células meristemáticas de *Allium cepa* e com a bactéria *Salmonella typhimurium* (linhagens TA 98 e TA 100). Nas células meristemáticas de *A. cepa*, foi observado aumento significativo de micronúcleos e de aberrações cromossômicas (principalmente aderências cromossômicas) em células expostas à concentração de 23 mg/kg de putrescina. Pelo teste de Ames, pode-se observar efeitos mutagênicos para as linhagem TA 98 e TA 100, na presença de ativação

metabólica. Esses resultados apontam para uma ação genotóxica e mutagênica da putrescina e alertam quanto o seu potencial como contaminante ambiental.

**Palavras-chave:** Poliaminas, aberrações cromossômicas, micronúcleo, teste de ames, aderência cromossômica, mutagenicidade.

## 1. Introdução

Qualquer substância pode ser prejudicial aos seres vivos, porém a sua toxicidade é dependente de uma série de fatores, tais como dose, tempo e rotas de exposição, gênero, estágio reprodutivo, idade, saúde e nutrição, estilo de vida, sensibilidade, genética e exposição a outros químicos (SMITH HOUSE, 2014). Assim, para que se tenham informações suficientes da toxicidade de uma substância, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos com as mais diversas abordagens.

A elevada quantidade de substâncias químicas desconhecidas que vem sendo introduzida no ambiente anualmente, vem alterando a composição dos ecossistemas (águas, solos e ar) e colocando em risco a sobrevivência dos seres vivo e a saúde humana. Muitos dos químicos ambientais ainda não possuem informações sobre os efeitos tóxicos para a biota exposta e, conseqüentemente, para a saúde humana (ZAGATO; BERTOLLETTI, 2006). Um dos principais e mais perigosos efeitos dos poluentes ambientais, é a sua possibilidade de interagir com o material genético dos organismos e alterar a constituição química das biomoléculas, o que pode desencadear sérios comprometimentos, associados a patologias como cânceres e doenças degenerativas (FENECH, 2008; PHILLIPS; ARLT, 2009). Tais químicos, têm chamado a atenção de agências governamentais e da comunidade científica, por, contribuírem com o aumento das taxas de mutagênese ambiental (CALAFAT et al., 2006).

Dentro deste contexto, os cemitérios têm se destacado como fonte poluidora de ambientes (OLIVEIRA et al., 2013; CAŁKOSIŃSKI et al., 2015). De acordo com Santos (2009), a contaminação conferida pelos cemitérios se assemelha à de aterros sanitários, pela grande quantidade de matéria orgânica e inorgânica que são produzidas, intermitentemente. Além disso, o problema de contaminação por cemitérios é agravado, porque, na maioria das vezes, os terrenos destinados à sua implantação não passaram por avaliação geológica e hidrogeológica adequada.

A principal causa de contaminação ambiental ocasionada pelos cemitérios é o resíduo líquido gerado pela decomposição cadavérica, que pode se infiltrar no solo, contaminando essa malha ambiental, ou ainda atingir corpos d'águas superficiais e subterrâneos, por escoamento ou por percolação, respectivamente (COSTA SILVA; FILHO, 2008; ZYCHOWSKI, 2012). Dentre as substâncias químicas produzidas pela decomposição cadavérica, destaca-se a poliamina putrescina ( $C_4H_{12}N_2$ ), uma amina biogênica formada a partir da clivagem do aminoácido arginina por uma reação catalisada pela enzima arginase (RHEE et al., 2007). De acordo com Pegg (2009) e Michael (2016), a putrescina é uma poliamina muito importante nos processos fisiológicos, por se tratar de uma molécula precursora para outras duas poliaminas, a espermidina e a espermina, ambas importantíssimas no processo de proliferação celular. Devido a sua importância na fisiologia celular, os níveis de aminas biogênicas são regulados nas células e tecidos por meio de biossíntese, catabolismo e absorção, mas uma fonte exógena de poliaminas, poderia alterar a homeostasia do organismo (WALLACE et al., 2003; IGARASHI; KASHIWAGI, 2010). Existem evidências de que as poliaminas tem um papel importante na promoção da transformação maligna. Células de câncer colorretal, por exemplo, apresentam níveis maiores de poliaminas que as células saudáveis, destacando uma possível importância da putrescina exógena no desenvolvimento tumoral (GERNER, MEYSKENS, 2004).

Considerando a presença de putrescina no ambiente, destaca-se a importância de estudos que possam avaliar, os efeitos genotóxicos e mutagênicos desse composto sobre os organismos, por esta se caracterizar em um poluente ambiental. Para isso são necessários o uso de ensaios que sejam capazes de responder as potencialidades tóxicas das substâncias, mesmo quando estas se apresentam em baixas concentrações (KLOBUCAR et al., 2003; FRENZILLI et al; 2009).

Bioensaios com plantas apresentam vantagens para serem realizados em avaliações ambientais, pois são considerados sensíveis e de fácil realização, quando comparados aos bioensaios que utilizam animais (FERNANDES et al., 2007). Este sistema-teste é amplamente utilizado em monitoramento de contaminações ambientais, por ser um teste de resposta rápida, de baixo custo e favorável na avaliação de danos cromossômicos e alterações no ciclo mitótico, devido à presença de boas condições cromossômicas, como cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ) (LEME, MARIN-MORALES, 2009). Grant (1982) e Caritá, Marin-Morales (2008) descrevem *A. cepa* como um eficiente sistema teste de rotina, para avaliar o potencial genotóxico de substâncias químicas, devido à sua sensibilidade e boa correlação com sistemas teste de mamíferos.



O ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsossoma (teste de Ames) foi projetado, especificamente, para detectar o potencial mutagênico induzido por compostos químicos. Este ensaio é utilizado e reconhecido mundialmente por agências reguladoras, para registro, certificação e liberação de novos produtos químicos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). White e Claxton (2004) relataram que este teste também pode ser aplicado para detectar compostos perigosos em amostras de água, solo e efluentes, pois fornecem dados importantes para a caracterização de riscos ecológicos de ambientes contaminados.

Frente ao exposto acima, este trabalho visou a caracterização dos efeitos genotóxicos e mutagênicos da putrescina, avaliada por meio de ensaios de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* e do teste de Ames, realizado com *Salmonella typhimurium*.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Substância e concentrações utilizadas

Para o desenvolvimento dos ensaios, foi utilizada a poliamina putrescina (1,4-Diaminobutano, fórmula molecular  $C_4H_{12}N_2$ , peso molecular 88,15 g/mol, CAS-Number 110-60-1, Sigma-Aldrich, com pureza de 99,0%). Todas as concentrações testadas foram definidas abaixo da  $DL_{50}$  oral para ratazanas de (463 mg/kg - informação contida na ficha de segurança do produto). As concentrações utilizadas estão dispostas na **tabela 1**.

**Tabela 1:** Concentrações de putrescina utilizadas nos ensaios realizados com o sistema-teste *A. cepa* e nos testes de Ames.

Bioensaios	Concentrações (mg/kg) e a correspondência com % da $DL_{50}$									
<i>A. cepa</i>										
% da $DL_{50}$	~0,16%	~0,32%	~0,65%	~1,8%	~3%	~4%	~5%	10%	30%	50%
mg/kg	0,75	1,5	3	8	13	18	23	46,3	138,9	231,5
<i>Ames</i>										
% da $DL_{50}$	0,1%	1%	5%	10%	30%	50%	70%			
mg/kg	0,46	4,63	23,15	46,3	138,9	231,5	324,1			

### 2.2. Bioensaios com *A. cepa*

As sementes de *A. cepa* (variedade Baia Periforme) foram colocadas para germinar em placas de Petri, forradas com papel filtro, embebidos com as concentrações definidas na **Tabela 1**. Os controles foram realizados da mesma forma, porém embebidos com água Mili-

Q, para o controle negativo, e com solução aquosa de metanossulfonato de metila (MMS –  $4 \times 10^{-4}$ ), para o controle positivo.

Após a germinação, quando as radículas atingiram aproximadamente 1,5 cm de comprimento, uma parte das sementes foi coletada e fixada em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v).

### **2.3. Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em Células Meristemáticas de *A.***

#### ***cepa***

Para as análises citológicas, as raízes foram submetidas a uma hidrólise ácida em HCl 1N a 60° C, durante 8 minutos, seguida de uma lavagem em água destilada. Os meristemas foram submetidos ao reativo de Schiff durante duas horas e na sequência as lâminas foram confeccionadas. A região meristemática foi recoberta com lamínula e suavemente esmagada com uma gota de Carmim Acético (2%). Em seguida, as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e, na sequência montadas, permanentemente, em resina sintética. Foram confeccionadas 10 lâminas para cada concentração e analisadas um mínimo de 500 células/lâmina. Foram considerados os diferentes tipos de aberrações cromossômicas, em diferentes fases do ciclo celular. As perdas, aderências cromossômicas, pontes, atrasos e brotos nucleares foram usados na avaliação da genotoxicidade e a presença de quebras cromossômicas e micronúcleos foram considerados como indicativo de mutagenicidade. Todas as concentrações foram comparadas ao controle negativo e os resultados analisados pelo teste de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

### **2.4. Linhagens de *Salmonella typhimurium***

Para a realização do teste de Ames, foram utilizadas duas linhagens bacterianas: TA 98 (que detecta mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura e apresenta uma mutação no gene responsável pela síntese da histidina do tipo hisD3052) e a linhagem TA 100 (que detecta mutação do tipo substituição de pares de bases e apresenta uma mutação no gene responsável pela síntese da histidina do tipo hisG46). Ambas as linhagens apresentam mutação rfa, que aumenta a permeabilidade da parede de polissacarídeos bacteriana, facilitando a entrada de moléculas maiores para o interior da célula; deleção do gene uvrB ( $\Delta$ uvrB), que impede o reparo por excisão; e o plasmídeo PKM101 (Apr), o qual apresenta o gene mucAB, que confere resistência a ampicilina, por favorecer o reparo pós-replicação do

tipo sujeito a erros, além de contribuir para um aumento da taxa de mutação espontânea e induzida (MARON; AMES, 1983; MOTELMANS, ZEIGER, 2000).

### **2.5. *Salmonella*/microsoma – Teste de Ames**

As linhagens TA 98 e TA 100 de *S. typhimurium* foram colocadas em caldo nutriente para crescer em incubadora shaker a 37° C, por 16 horas. Em seguida, para os ensaios sem ativação metabólica (-S9), foram adicionados 100 µL de cada linhagem celular em tubos de cultura contendo 500 µL de tampão fosfato e 100 µL das diferentes concentrações de putrescina. Para os ensaios com presença de ativação metabólica (+S9), o tampão fosfato foi substituído por 500 µL de mistura S9 [água destilada estéril, tampão fosfato 0,2 M, NADP 0,1 M, glicose-6-fosfato 1,0 M, solução de sais (KCl 1,65 M e MgCl<sub>2</sub> 0,4M) e fração S9 (Sistema microsomal S9, Moltox)]. O controle positivo (CP) foi realizado da mesma forma que os ensaios com os tratamentos, porém o volume correspondente às concentrações da putrescina foram substituídos pela substância usada como CP, conforme segue: óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) (Sigma, CAS No. 56- 57-5), na concentração de 0,05 µg/µL, para os testes realizados na ausência de ativação metabólica e o 2-aminoantraceno (2AA) (Sigma, CAS No. 613-13-8), na concentração de 0,25 µg/µL, para os testes realizados na presença de ativação metabólica.

Para o CN, foram adicionados 100 µL de cada linhagem de bactéria aos tubos de cultura contendo 500 µL de tampão fosfato ou de mistura S9 e 100 µL de água mili-Q (solvente utilizado para diluir a amostra). Os tubos contendo as misturas foram pré-incubados em banho maria a 37° C, por 30 minutos. Em seguida, o seu conteúdo, acrescido de 2 mL de ágar de superfície, foi vertido em placas de Petri estéreis, contendo ágar mínimo solidificado. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C, por 66 horas. Cada teste foi realizado em triplicata. Os CP foram realizados em duplicata e o CN, em quintuplicata.

Para a análise de mutagenicidade, as colônias de bactérias revertentes foram contadas manualmente e expressas em média ± desvio padrão. O potencial mutagênico foi avaliado pela quantificação do número de colônias revertentes em cada placa. Os dados foram avaliados pelo software SALANAL (Salmonella Assay Analysis 1.0), selecionando os modelos de Bernstein ou linear. As concentrações foram consideradas mutagênicas quando o resultado estatístico do teste ANOVA ( $p < 0,05$ ) e da regressão linear ( $p < 0,05$ ) foram significativos. Os resultados foram expressos pelo número de revertentes/miligrama da amostra testada.

### 3. Resultados

#### 3.1. Bioensaios com *A. Cepa*

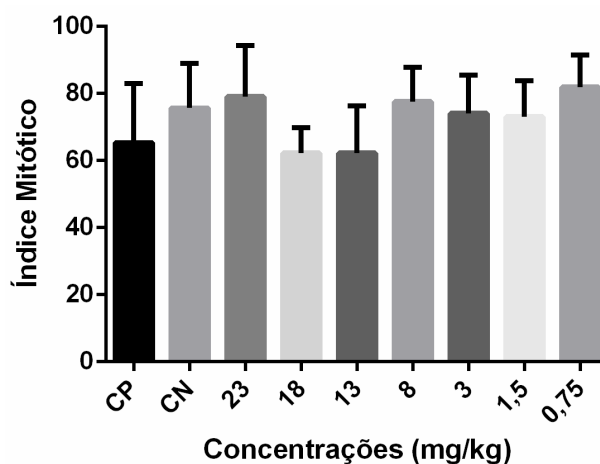
Por meio das análises citogenéticas, foi possível avaliar os efeitos das diferentes concentrações de putrescina sobre o material genético das raízes de *A. cepa*.

Os bioensaios realizados com as maiores concentrações testadas de putrescina (231,5 mg/kg, 138,9 mg/kg e 46,3 mg/kg) inibiram a germinação das sementes. Um segundo bioensaio foi realizado de forma descontínua, sendo as sementes levadas a germinação em água e, após a emergência das radículas, foram expostas às diferentes concentrações. Foi observado o crescimento das raízes, mas não foi possível preparações adequadas para análise microscópicas das lâminas preparadas. As raízes expostas a concentração de 46 mg/kg apresentaram uma hiperplasia da região meristemática, diferentemente das demais concentrações analisadas (**Figura 1**).



**Figura 1:** Protuberância (destacado pelas setas) nas regiões meristemáticas das raízes de *A. cepa* expostas a concentração de 46,3 mg/kg.

Para as demais concentrações (0,75, 1,5, 3, 6, 13, 18 e 23 mg/Kg), foi possível confeccionar e analisar as lâminas das regiões meristemáticas. O índice mitótico, caracterizado pela porcentagem de células meristemáticas em divisão, não apresentou diferença significativa entre estas concentrações (**figura 2**). O índice de aberrações cromossômicas foi significativo, apenas, para a concentração de 23 mg/kg e, dentre as alterações encontradas, a mais comum foi a aderência cromossômica. Nesta mesma concentração também foi observado aumento significativo na quantidade de micronúcleos, em relação aos resultados do controle negativo (**Tabela 2**).



**Figura 2:** Índice Mitótico de células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações de putrescina.

### 3.2. Avaliação da mutagenicidade pelo ensaio de Salmonella/microsoma – Teste de Ames

A **tabela 3** apresenta os resultados obtidos com o teste de Ames, realizado com as linhagens TA 98 e TA 100, com e sem fração metabolizadora. Pelo teste ANOVA, os resultados obtidos com a linhagem TA 98, sem sistema de metabolização, não se mostram significativamente diferentes entre as concentrações testadas. Porém, para os ensaios realizados com esta mesma linhagem (TA 98), mas com ativação metabólica, houve indução de mutagenicidade. As amostras não foram mutagênicas para a linhagem TA 100 sem fração metabolizadora. No entanto, após ativação metabólica, as amostras também apresentaram potencial mutagênico.

**Tabela 2:** Frequência de aberrações cromossômicas, índice de genotoxicidade e índice de mutagenicidade, usados como indicativo de potencial genotóxico e mutagênico para células de *A. cepa*, expostas a diferentes concentrações de putrescina.

Tratamentos	CN	CP	0,75 mg/kg	1,5 mg/kg	3 mg/kg	8 mg/k	13 mg/kg	18 mg/kg	23 mg/kg
<b>Broto Nuclear</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,19±0,62	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<b>Aderência</b>	0,60±0,72	0,35±0,59	0,00±0,00	0,19±0,41	0,18±0,37	0,48±0,50	0,38±0,49	0,81±0,73	<b>3,21±2,01*</b>
<b>Ponte</b>	0,08±0,25	0,44±0,76	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,30
<b>Perda</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,31	0,10±0,32	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<b>Célula Poliplóide</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,31	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<b>Índice de Genotoxicidade</b>	0,68±0,68	0,78±0,77	0,10±0,31	0,29±0,47	0,28±0,45	0,67±0,65	0,38±0,49	0,81±0,73	<b>3,31±2,01*</b>
<b>Indicativo Mutagenicidade</b>	0,19±0,40	12,91±2,91	0,09±0,30	0,79±1,45	0,27±0,60	0,76±0,98	0,75±1,08	0,41±0,54	<b>1,57±0,66*</b>

CN: Controle Negativo; CP: Metanossulfonato de metila (MMS); \* estatisticamente significativo (p<0,05)

**Tabela 3:** Mutagenicidade de diferentes concentrações de putrescina sobre o sistema teste *Salmonella/microsoma* – teste de Ames, com e sem fração metabolizadora S9 (+S9, -S9).

Concentrações (mg/kg)	Número de colônias revertentes (Média ± DP)			
	TA 98		TA 100	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9
<b>Controle Negativo<sup>1</sup></b>	24.80±3.03	44.00±1.83	214.25±11.00	150.00±10.52
<b>0,1%</b>	26.00±4.24	32.00±2.65	175.33±35.02	150.00±16.37
<b>1%</b>	29.00±4.69	30.33±7.02	167.00±12.53	148.67±11.15
<b>5%</b>	25.00±3.83	33.33±2.08	155.33±15.04	155.00±10.00
<b>10%</b>	29.25±2.06	26.00±4.00	186.33±27.47	174.00±6.24
<b>30%</b>	26.50±5.69	39.00±18.00	199.33±18.50	175.33±13.22
<b>50%</b>	30.25±0.96	39.67±11.37	180.67±38.28	184.67±29.02
<b>70%</b>	33.75±3.95	48.33±7.64	197.33±23.01	148.67±11.50
<b>Potência Mutagenica<sup>2</sup></b>	<b>925,63±28,88<sup>3</sup></b>	<b>186,81±72,20</b>	<b>Negativo</b>	<b>728,36±184.60</b>

1- Controle negativo (Água ultrapura 100 µL/placa). 2- Potência mutagênica é calculada por meio de uma regressão linear da curva dose-resposta, considerando que essa regressão é sempre proporcional à potência, expressa quantitativamente em número de revertentes/g de putrescina.

3- Indicativo de mutagenicidade (ANOVA não foi significativo).

#### 4. Discussão

Muitas cidades têm relatado problemas de contaminação ambiental ocasionados por cemitérios, onde o principal contaminante é o necrochorume, um líquido produzido pela decomposição cadavérica. Eventualmente, este líquido pode percolar no solo, alcançar e contaminar os lençóis freáticos ou ainda escoar pela superfície, contaminando águas superficiais (PACHECO et al., 1991; COSTA SILVA, FILHO, 2008). Esta substância é rica em uma série de compostos químicos, dentre os quais está a putrescina, uma poliamina que desempenha importantes funções fisiológicas, em diferentes células e em diferentes organismos (DENT et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013).

Pouco se sabe sobre os efeitos dessa substância como contaminante ambiental, mas o presente trabalho apresenta informações inéditas sobre esse potencial ecotoxicogenético e mutagênico da putrescina.

Os ensaios de aberrações cromossômicas são considerados ótimos parâmetros de monitoramento dos danos causados por substâncias químicas sobre o material genético. O sistema teste *A. cepa* se mostra muito sensível para avaliações de genotoxicidade e mutagenicidade de químicos e apresenta uma boa correlação, quando comparado a outros sistemas teste (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

As maiores concentrações testadas neste trabalho, inibiram a germinação das sementes de *A. cepa*, sugerindo que a substância, nestas concentrações, apresenta efeito tóxico e citotóxico para a espécie. A partir destes resultados, foram testadas concentrações menores, dentre as quais apenas a concentração de 23 mg/kg induziu aumento significativo nos índices de genotoxicidade e de indução de MN. Em relação ao índice mitótico (IM), não foram observadas alterações significativas entre as concentrações mais baixas testadas. Fernandes et al. (2007) relatam que alterações no IM caracterizam um bom parâmetro para determinar os efeitos citotóxicos das substâncias tóxicas.

As raízes expostas a concentração de 46,3 mg/kg apresentaram uma hiperplasia das regiões meristemáticas. Alguns autores denominaram esta malformação de C-tumor, já relatado também em estudos com herbicidas clorofenoxiacéticos como o 2,4-D, 2,4,5-T e MCPA (CROKER, 1953; FISKESJÖ; LASSEN; RENBERG, 1981; ATEEQ et al., 2002). Grossmann (2003) afirmou que o estímulo constante do metabolismo da planta, causado por altas doses de herbicidas auxínicos, inibem o crescimento apical das raízes e induzem o crescimento anormal em posições inadequadas, resultando em inchaço e deformações. A putrescina, nesta concentração, pode ter agido de forma semelhante aos herbicidas citados acima.



Em *A. cepa*, é possível observar alterações cromossômicas nas diferentes fases do ciclo celular e, de acordo com o tipo de alteração encontrada, definir qual o mecanismo de ação (aneugênica ou clastogênica) do agente tóxico avaliado (VIDAKOVIC-CIFREK et al., 2002). Fenech (2000) relata que a ação aneugênica acontece quando uma determinada substância age promovendo inativação de constituintes celulares como, por exemplo, no fuso mitótico, cuja inativação pode causar perda de cromossomos inteiros. Para o mesmo autor, a ação clastogênica se caracteriza pela ação da substância diretamente sobre a molécula de DNA, induzindo quebras cromossômicas durante a divisão celular.

Nas células expostas à putrescina, foram observadas poucas aberrações cromossômicas, sendo as aderências cromossômicas, as mais frequentes. De acordo com Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2009), isto se deve a um efeito aneugênico e está associado a falhas na formação do fuso mitótico. Segundo Grant (1982), as aderências cromossômicas resultam de empacotamentos impróprios das cromátides, fazendo com que os cromossomos fiquem ligados entre si, por meio de pontes subcromatídicas. Estas aberrações representam uma alta toxicidade do agente indutor do dano, tendo, de maneira geral, efeitos irreversíveis para a célula, levando-a à morte. Fernandes (2005), afirma ainda que um aumento da contração cromossômica poderia promover as aderências cromatídicas e cromossômicas. Marcano et al. (2004) relataram que essas aderências poderiam originar pontes e quebras cromossômicas, que persistiriam até a telófase. Os resultados obtidos no presente estudo divergem da literatura, pois não foram observadas pontes e quebras em número significativo. O resultado sugere que, a exposição contínua a putrescina leva a um efeito aneugênico, o que sugere a capacidade desta poliamina em interferir no fuso mitótico.

Os micronúcleos (MN) encontrados na concentração de 23 mg/kg demonstram uma ação mutagênica do composto. A formação destas estruturas ocorre devido a danos, reparados erroneamente ou não reparados nas células em processo de divisão, cujas estruturas derivadas dos danos são facilmente observáveis nas células filhas, como uma estrutura similar ao núcleo principal, mas com tamanho mais reduzido. Portanto, a presença de MN é decorrente de algumas aberrações cromossômicas, como perdas e quebras cromossômicas, ou ainda por ação aneugênica, dada pela inativação total dos fusos mitóticos, que promove poliploidização dos cromossomos. Neste caso, o material genético excedente é expulso do núcleo principal, sob a forma de MN, na tentativa de restaurar a condição normal de ploidia da célula (FERNANDES et al., 2007).

Nossos resultados corroboram os estudos de Gomurgen et al. (2005), que encontraram efeitos semelhantes para as poliaminas putrescina, espermina e espermidina, quando

expuseram raízes de bulbos de *A. cepa* às concentrações de 0,01 mM, 1 mM e 2 mM, em intervalos de tempo de 12, 24 e 48 horas. Os resultados obtidos pelos autores foram semelhantes aos do presente trabalho, tendo as aderências cromossômicas como principais alterações encontradas, para todas as poliaminas estudadas e em todos os períodos avaliados. Assim, podemos afirmar que a putrescina tem uma ação aneugênica, capaz de induzir aderências cromossômicas e MNs.

No presente estudo, o teste de Ames foi realizado com as linhagens TA 98 e TA 100, que são as cepas mais utilizadas para estudos de mutagênese ambiental (SILVA JUNIOR, VARGAS, 2009). Neste estudo, foi observado um efeito mutagênico para a linhagem TA 98 e TA 100, na presença de S9, indicando que a putrescina é capaz de induzir mutações após metabolização. Os resultados significativos, para ambas as linhagens, indicam que a substância, após metabolização, pode promover mutações do tipo frameshift (TA 98) e, mesmo sem metabolização induzir mutações por substituição de pares de base (TA 100) (MARON; AMES, 1983).

A avaliação de danos no DNA fornece respostas importantes, quanto aos efeitos de substâncias tóxicas, uma vez que as mutações são eventos cruciais a serem considerados nos processos carcinogênicos (FENECH, 2008). O ensaio de *Salmonella*/microsoma apresenta uma alta correlação dos resultados com o ensaio de carcinogenicidade em roedores e é reconhecido, internacionalmente, por sua eficiência na avaliação da mutagenicidade de compostos químicos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Considerando o potencial mutagênico da putrescina, avaliado por meio do ensaio de *Salmonella*/microsoma, observa-se que os resultados obtidos no presente estudo corroboram os resultados encontrados por Pillai e Shankel (1997). De acordo com estes autores, foram utilizados de 50 a 400 µg/mL de putrescina para avaliar o potencial antimutagênico desta substância, contra a ação do ácido metanossulfônico. Para isso foi utilizada a linhagem celular TA 100, sem a fração metabolizadora. Os resultados indicaram que o nível das mutações induzidas diminuiu na presença de putrescina.

No presente trabalho, a única linhagem de *Salmonella* em que a putrescina não apresentou potencial mutagênico foi a TA 100 sem fração metabolizadora, a mesma utilizada por Pillai e Shankel. Desta forma, essa linhagem de *Salmonella*, sem a ativação do sistema de metabolização pela fração S9, parece não ser indicada para avaliar os efeitos da putrescina, pois, em ambos os estudos realizados com essa linhagem, não houve indução de danos, quando sem ativação metabolizadora, provavelmente, porque os danos diretos induzidos pela substância sejam por eventos que promovem deslocamento do quadro de leitura (mutação

frameshift) e não por substituição de bases. Já após metabolização, os metabólitos formados parecem exibir potencial mutagênico tanto por excisão ou adição de bases, como por substituição de bases do DNA.

Como os estudos com putrescina, sob a ótica de contaminante ambiental, são escassos, o presente estudo traz dados inéditos e comprobatórios sobre os efeitos deste químico para os seres vivos. Os dados obtidos com os ensaios realizados neste estudo, certamente, contribuirão para uma melhor compreensão e informação dos perigos dessa substância e, conseqüentemente, sobre os possíveis efeitos ambientais perigosos que os cemitérios possam promover sobre os organismos vivos e sobre a saúde humana.

## 5. Conclusão

Pelos resultados obtidos, é possível afirmar que a putrescina apresenta um potencial genotóxico e mutagênico. Ambos os organismos expostos apresentaram resultados positivos, em relação às alterações no material genético. Em *A. cepa*, foram observados aumento significativo de aderências cromossômicas (indicativo de ação aneugênica) e micronúcleos (indicativo de mutagenicidade). Em relação ao teste de Ames, o potencial mutagênico foi observado nas linhagem TA 98 e TA 100, com fração metabolizadora, indicando que a metabolização da putrescina aumenta seu potencial de causar mutações no DNA. A linhagem TA 100, sem sistema de metabolização, não se mostrou mutagênica para a putrescina, mostrando que essa linhagem não parece ser indicada para estudos de impactos ambientais promovidos por amins biogênicas. Estes resultados alertam sobre o potencial mutagênico da putrescina e confirmam o potencial de contaminação ambiental desta substância. Segundo os dados obtidos neste estudo, são necessárias ações que avaliem, detalhadamente, as condições geológicas, hidrológicas e biológicas dos locais a serem destinados a implantação de novos cemitérios, bem como uma vistoria rigorosa dos cemitérios já implantados.

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo número: 2013/08279-4) pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa e a técnica Adriana Correa pelo auxílio no teste de Ames.

## 7. Referências Bibliográficas

- ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, M.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 514, n. 1–2, p. 105–113, 2002.
- CALAFAT, A. M.; YE, X.; SILVA, M. J.; et al. Human exposure assessment to environmental chemicals using biomonitoring. *International Journal of Andrology*. **Anais**. v. 29, p.166–171, 2006.
- CAŁKOSIŃSKI, I.; PŁONECZKA-JANECZKO, K.; OSTAPSKA, M.; et al. Microbiological analysis of necrosols collected from urban cemeteries in Poland. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 169573, 2015.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722–725, 2008.
- COSTA SILVA, R. W. C.; FILHO, W. M. Cemitérios como Áreas Potencialmente Contaminadas. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais** –, v. 9, n. 9, p. 26–35, 2008.
- CROKER, B. H. Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid on Mitosis in *Allium cepa*. **Botanical Gazette**, v. 114, n. 3, p. 274–283, 1953.
- 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.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation research**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 2000.
- FENECH, M. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 410, p. 185–216, 2008.
- 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. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.
- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009.
- FISKESJÖ, G.; LASSEN, C.; RENBERG, L. Chlorinated phenoxyacetic acids and chlorophenols in the modified *Allium* test. **Chemico-biological interactions**, v. 34, n. 3, p. 333–44, 1981.
- FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 80–92, 2009.

GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 10, p. 781–792, 2004.

GÖMÜRGEN, A. N.; MUTLU, F.; BOZCUK, S. Effects of Polyamines (Putrescine, Spermidine and Spermine) on Root Tip Mitosis and Chromosomes in *Allium cepa* L. **CYTOLOGIA**, v. 70, n. 2, p. 217–224, 2005.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation research**, v. 99, n. 3, p. 273–91, 1982.

GROSSMANN, K. Mediation of Herbicide Effects by Hormone Interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 22, n. 1, p. 109–122, 2003. Springer-Verlag.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 1, p. 39–51, 2010.

KLOBUČAR, G. I. V.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPEŠ, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic Toxicology**, v. 64, n. 1, p. 15–23, 2003.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental research**, v. 94, n. 2, p. 221–6, 2004.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation research**, v. 113, n. 3–4, p. 173–215, 1983.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation research**, v. 455, n. 1–2, p. 29–60, 2000.

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.

PACHECO, A.; MENDES, J. M. B.; MARTINS, T.; HASSUDA, S.; KIMMELMANN, A. A. Cemeteries - A Potential Risk to Groundwater. **Water Science and Technology**, v. 24, n. 11, 1991.

PEGG, A. E. Mammalian polyamine metabolism and function. **IUBMB Life**, v. 61, n. 9, p. 880–894, 2009.

PHILLIPS, D. H.; ARLT, V. M. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. **EXS**, v. 99, p. 87–110, 2009.

PILLAI, S. P.; SHANKEL, D. M. Polyamines and their potential to be antimutagens. **Mutation research**, v. 377, n. 2, p. 217–24, 1997.

RHEE, H. J.; KIM, E.-J.; LEE, J. K. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 4, p. 685–703, 2007.

SILVA JÚNIOR, F. M. R. DA; VARGAS, V. M. F. Using the Salmonella assay to delineate the dispersion routes of mutagenic compounds from coal wastes in contaminated soil. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, n. 2, p. 116–123, 2009.

VIDAKOVIĆ-CIFREK; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPE, D. Cytogenetic Damage in Shallot (*Allium cepa*) Root Meristems Induced by Oil Industry &quot;High-Density Brines&quot;. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 284–291, 2002.

WALLACE, H. M.; FRASER, A. V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochemical Journal**, v. 376, n. 1, p. 1–14, 2003.

WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2–3, p. 227–345, 2004.

ŻYCHOWSKI, J. Impact of cemeteries on groundwater chemistry: A review. **CATENA**, v. 93, p. 29–37, 2012.

## Artigo 2

### **Potencial genotóxico da putrescina e alteração na expressão de genes envolvidos em mecanismos de toxicidade na linhagem celular de hepatocarcinoma humano HepG2**

Franco Dani Campos-Pereira, Raquel Vaz Hara, Letícia Bulascochi Cagnoni, Leticia Ramos, Karen Cristiane Martinez de Moraes, Maria Aparecida Marin-Morales

#### **Highlights**

- A putrescina é uma das substâncias produzidas durante a decomposição cadavérica.
- O perfil de genotoxicidade da putrescina foi estudado em cultura de células HepG2.
- Concentrações não citotóxicas foram capazes de induzir danos genotóxicos.
- Genes envolvidos na via de reparo do DNA apresentaram maior expressão em células expostas a putrescina.

#### **Resumo**

As poliaminas são moléculas responsáveis por diversas funções na fisiologia celular. Dentre essas moléculas, uma das que mais se destacam é a putrescina por ser a precursora de duas outras poliaminas: a espermina e a espermidina. A manutenção da homeostasia celular é garantida por níveis fortemente regulados dessas poliaminas. A decomposição cadavérica produz um líquido rico em substâncias químicas, dentre elas, a putrescina. Esse líquido percola no solo e atinge as águas subterrâneas, conferindo um risco à biota do local contaminado e também à saúde humana. A poluição por cemitérios tem proporcionado a inserção de putrescina no ambiente. Nesse estudo foram testadas concentrações não citotóxicas de putrescina para células HepG2. A estabilidade genômica foi avaliada pelo ensaio do cometa e pelo teste de micronúcleo. Foi também avaliada a potencialidade de alteração no perfil de expressão de diferentes genes. Os resultados obtidos mostraram que a putrescina apresenta um potencial genotóxico, comprovado pelo aumento de danos no DNA, aumento na frequência de micronúcleos e alteração nos genes envolvidos no controle do estresse oxidativo e na resposta de danos ao DNA.

**Palavras-chave:** Poliaminas, ensaio do cometa, teste de micronúcleo, necrochorume, PCR em tempo real

## 1. Introdução

As poliaminas (PAs) são moléculas alifáticas lineares de baixo peso molecular, compostas por uma, duas ou três cadeias de carbono flexíveis conectadas por átomos de nitrogênio (TETI et al., 2002). Estas moléculas realizam diversas funções relacionadas ao crescimento e diferenciação celular, tais como síntese e estabilidade do DNA, regulação da transcrição, regulação dos canais iônicos e fosforilação de proteínas (RUSSELL, 1983; SODA, 2011). Devido à sua importância na fisiologia celular, os níveis dessas moléculas são fortemente regulados nas células e tecidos, por meio de complexos mecanismos de biossíntese, catabolismo, absorção, degradação e excreção (WALLACE et al., 2003; IGARASHI; KASHIWAGI, 2010). Estes mecanismos são altamente conservados em células procarióticas e eucarióticas, indicando que a regulação nos níveis de PAs são essencialmente importantes para a sobrevivência celular (IGARASHI; KASHIWAGI, 2009; MILLER-FLEMING et al., 2015).

As PAs são sintetizadas a partir do aminoácido ornitina, por meio de uma reação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase (OCD), que é a enzima limitante da taxa de biossíntese de poliaminas (DENG et al., 2008; PALMER; WALLACE, 2010; RAMANI et al., 2014). A ornitina é transformada em putrescina (1,4 diaminobutano), que é uma molécula precursora de outras duas PAs (espermina e espermidina). A conversão da putrescina sintetizada em espermina e espermidina se dá por meio da ação de duas aminopropiltransferases distintas, a espermina sintase e a espermidina sintase (RAMANI et al., 2014, PEGG, 2016). O controle da expressão de OCD é altamente afetado pelos níveis de PAs, onde o excesso de PAs promove, rapidamente, uma maior degradação da OCD. Por outro lado, a ausência de PAs promove uma estabilização nos níveis desta enzima (PERSON, 2009).

Atualmente, uma das maiores preocupações da humanidade tem sido manter a integridade e qualidade das fontes de águas subterrâneas utilizadas para abastecimento. As maiores causas de poluição dos ambientes aquático estão associadas à ausência de redes de esgoto, ao lançamento de efluentes industriais diretamente nos rios e no solo e ao uso indiscriminado de agroquímicos (MATOS, 2001). Mais recentemente, tem-se levantado uma outra fonte poluidora de solo e água, conferida pelas atividades necrológicas, como, por



exemplo, as presentes em cemitérios. Porém, embora as fontes de contaminação mencionadas anteriormente tenham recebido grande atenção dos pesquisadores nos últimos anos, muito pouco se sabe sobre o efeito dos cemitérios na química ambiental (AMUNO, 2013). Contudo, Costa Silva e Filho (2008) e Żychowski (2012) citam que os cemitérios apresentam grande risco de contaminação ambiental, devido a produção intermitente de um líquido derivado da decomposição cadavérica, denominado de necrochorume. O necrochorume apresenta uma densidade de  $1.23\text{g/cm}^3$  e é composto por 60% de água, 30% de substâncias mineralizadas e 10% de substâncias orgânicas. Durante a degradação dessas substâncias orgânicas, são geradas aminas biogênicas, como a diamina cadaverina ( $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2$ ) e a poliamina putrescina ( $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2$ ), ambas altamente solúveis em água (DENT et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2012).

Testes com putrescina marcada radioativamente com carbono 14 [ $^{14}\text{C}$ ] revelaram que o tempo necessário para a absorção da substância por via gastrointestinal, disseminação sistêmica e detecção na corrente sanguínea é de apenas 30 minutos. A rápida absorção induz a um aumento de enzimas que transformam a putrescina em outras poliaminas, o que revelou a necessidade de se controlar a ingestão de tal substância (BARDOCZ et al., 1995; SEILER; RAUL, 2007). A contaminação das águas subterrâneas pelo necrochorume pode representar uma fonte exógena de putrescina para os organismos que fazem uso desta água. Como não existem dados na literatura referentes à toxicidade ambiental desta substância, fica intrínseca a necessidade de estudos que visem esta temática.

Os ensaios desenvolvidos com culturas de células permitem avaliar a citotoxicidade de xenobiontes e, assim, estimar os impactos biológicos que uma dada substância possa promover no meio biológico a ela exposto. Células tumorais da linhagem HepG2, isoladas de hepatocarcinoma humano têm sido muito utilizadas em testes que avaliam a toxicidade de substâncias químicas para humanos, pois apresentam a maioria das características citológicas preservadas (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003), como os sistemas enzimáticos de metabolização celular, enzimas de fases I e II que participam da ativação e detoxificação de vários compostos, além de poderem demonstrar, com maior fidelidade, os efeitos tóxicos dos metabólitos resultantes de substâncias às quais o homem pode estar exposto (UHL et al., 2000).

Diante disso, nosso objetivo foi definir as concentrações não citotóxicas de putrescina, para avaliar, por meio do ensaio do cometa e do teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese, os efeitos genotóxicos e mutagênicos respectivos desta poliamina; avaliar a modulação da expressão gênica de genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos, na

resposta a danos no DNA e no estresse oxidativos; e a influência da putrescina na instabilidade genômica de células HepG2, por meio de ensaios de PCR em tempo real (qRT-PCR).

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Cultura celular e substância testada

A cultura celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) foi obtida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (Duque de Caxias, RJ, Brasil). As células foram cultivadas em meio MEM (Meio Mínimo Eagle Essencial) com 100U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco, Nova Zelândia), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil) e incubadas em frascos de cultura descartáveis de 25 cm<sup>2</sup> em estufa BOD a 37°C, com 5% de CO<sup>2</sup>.

Nos ensaios de citotoxicidade, realizados em placas de 96 poços, foram utilizadas 2,34x10<sup>4</sup> células por poço. Nos ensaios do cometa, do micronúcleo e do PCR em tempo real (qRT-PCR) foram utilizadas 5x10<sup>5</sup> células por frasco, cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> e incubadas por 24 horas.

A substância testada foi a poliamina putrescina (1,4-Diaminobutano, fórmula molecular C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>, peso molecular 88,15 g/mol, CAS-No: 110-60-1- Sigma-Aldrich, com pureza de 99,0%). Para a determinação das concentrações não citotóxicas da putrescina, foram realizados os testes de MTT e de redução da resazurina, ambos ensaios que avaliam a citotoxicidade de um agente químico

Nos ensaios de citotoxicidade foram testadas 12 diferentes concentrações, estabelecidas a partir da DL<sub>50</sub> (463 mg/kg para ratazanas) de putrescina. Foram realizados ensaios com 100 %, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% e 10%. Os valores correspondentes em mg/kg estão representados na **tabela 1**.

**Tabela 1:** Concentrações utilizadas para os ensaios de genotoxicidade, em relação à DL<sub>50</sub> de putrescina para ratazanas.

Concentrações testadas nos ensaios de genotoxicidade (mg/kg)												
%	100%	95%	90%	85%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
mg/kg	463	439,85	416,7	393,55	370,4	324,1	277,8	231,5	185,2	138,9	92,6	46,3

## 2.2. Teste de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)

O teste do MTT foi realizado de acordo com Mosmann (1983). As células foram semeadas em placas de 96 poços, em um volume de 100 µL de meio com soro. A placa foi incubada por um período de 24 horas, para que houvesse a adesão das células na superfície dos poços e, após este período, o meio foi retirado e foi adicionado 200 µL de um novo meio de cultura (sem soro), contendo as concentrações a serem testadas. O controle positivo (CP) foi realizado com 1% de Triton X-100, diluído em meio de cultura sem soro. O controle negativo (CN), foi realizado apenas com meio de cultura sem soro. As células foram expostas a putrescina por um período de 24 horas. Em seguida, o meio foi descartado e foram adicionados 150 µL de MTT ( $1 \times 10^{-6}$  mg/ml). A placa foi incubada por um período de 4 horas à 37° C. Na sequência, foi descartada a solução de MTT e foi adicionado, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço. As placas foram analisadas imediatamente em espectrofotômetro com leitor de microplaca, filtro de 540 nm (Multiskan™ FC Microplate Photometer – Thermo Fisher Scientific).

A viabilidade celular foi avaliada com base na comparação entre as células expostas as diferentes concentrações e as células do controle negativo (CN). As concentrações com viabilidade abaixo de 80% foram consideradas citotóxicas.

## 2.3. Teste de redução da Resazurina

As células HepG2 foram semeadas em placas de 96 poços contendo 100 µL de meio com soro e o teste foi realizado de acordo com O'Brien et al. (2000). A placa foi incubada por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C e, então, o meio de cultura foi retirado e 200 µL das diferentes concentrações de putrescina foram adicionadas aos poços correspondentes à cada concentração. O controle positivo (CP) e negativo (CN) foram os mesmos utilizados para o teste de MTT. As células foram expostas por 24 horas e, na sequência, os tratamentos foram descartados. Foram adicionados em cada poço da placa 200 µL de Resazurina (44 µM), preparada em meio de cultura. A placa foi incubada por 4 horas à 37 °C e a leitura foi realizada em fluorímetro Infinite® 200 pro microplate readers (TECAN, Männedorf, Suíça), configurado com  $\lambda = 560$  nm de excitação e  $\lambda = 590$  nm de emissão. Concentrações com viabilidade celular menores que 80% foram consideradas citotóxicas.

## 2.4. Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000). As células foram mantidas em condições ideais de cultivo e expostas a quatro

diferentes concentrações (324.1, 231.5, 138.9, 46.3 mg/kg para ratazanas, correspondentes a 70, 50, 30 e 10% da  $DL_{50}$  de putrescina). Essas concentrações, não citotóxicas, foram definidas pelos testes de citotoxicidade. O controle negativo foi realizado com a adição de PBS no meio de cultura e o controle positivo com uma solução de MMS ( $4 \times 10^{-4}$  M, Sigma-Aldrich, CAS-No: 66-27-3). Todas as exposições foram realizadas em triplicata. As células foram expostas à putrescina por 24 horas e, na sequência, o meio de cultura contendo os tratamentos foi retirado e os frascos lavados duas vezes com 5 mL de PBS. Os frascos foram tripsinizadas com 500  $\mu$ L de tripsina 0,5 %, por 5 minutos, para desprendimento celular. As suspensões celulares foram transferidas para tubos de centrífuga de 15 mL e centrifugadas a 1500 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 0,5 mL de meio de cultura. A solução celular foi passada por uma seringa de 1 mL para obtenção de células isoladas.

Uma alíquota de 20  $\mu$ L de suspensão celular foi misturada com 120  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% a 37 °C e, rapidamente, gotejada sobre lâminas previamente cobertas com agarose normal, 1,5 %. As lâminas, feitas em réplicas, foram levadas a geladeira a 4° C, por 20 minutos. As lamínulas foram removidas, cuidadosamente, e as lâminas imersas em solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 8 g de NaOH, pH 10) por 1 hora, mantidas em geladeira a 4° C, no escuro. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese e cobertas com uma solução tampão (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH>13), onde permaneceram por 20 minutos para a desnaturação do DNA. A eletroforese foi realizada em 39 V e 300 mA por 20 min. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas em tampão de neutralização (tris-HCL 0,4 M, pH 7.2) e fixadas, por 10 min., em etanol absoluto. As lâminas foram coradas com 50  $\mu$ L de Gel red® (0,02 mg/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência Leica, objetiva de 40x, filtro B - 34 (excitação:  $\lambda = 420-490$  nm, barreira:  $\lambda = 520$  nm). Foram contabilizados 100 nucleóides por lâmina, totalizando 600 nucleóides por tratamento. Os danos no DNA foram estimados por 3 parâmetros: intensidade de DNA, comprimento e momento da cauda, avaliados pelo software Comet Assay IV (Perspective Instruments, Bury Saint Edmunds, Reino Unido).

Em paralelo ao ensaio do cometa, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método de Azul de Trypan (Gibco, Nova Zelândia). Para isso, 10  $\mu$ L de suspensão celular de cada tratamento foram misturados com 10  $\mu$ L de corante a 0,4 % e analisados em microscópio de luz em objetiva de 40x. Foram contabilizadas as células viáveis (brancas) e inviáveis (coradas em azul). Os índices de viabilidade celular foram obtidos considerando-se as porcentagens de

células viáveis do total de células analisadas. Foi estabelecido o limite mínimo de 80 % de células viáveis (ZWOLAK, 2014).

### **2.5. Teste do Micronúcleo com bloqueio de citocinese**

Para o teste do micronúcleo, foi utilizada a técnica descrita por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações descritas a seguir: Os ensaios foram realizados em triplicata e as células foram expostas por 24 horas às quatro diferentes concentrações, como descrito no ensaio do cometa. Após este período, as células foram lavadas com tampão PBS, seguido da adição de 5 mL de meio de cultura completo com citocalasina B (3 µg/mL, Sigma, Cas-No: 14930-96-2), onde permaneceram por 28 horas. Posteriormente, as células foram coletadas, tratadas com solução hipotônica (citrato de sódio 1%) e fixadas com formol (40%) e Carnoy (etanol-ácido acético 3:1 – v:v). As lâminas foram preparadas gotejando algumas gotas da cultura celular sobre lâminas limpas, geladas e contendo um filme de água. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 8 minutos. O teste foi realizado em triplicata e foram contabilizadas 1.000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração, totalizando 3.000 células por tratamento. Foram identificados e contabilizados os micronúcleos (MN), as pontes nucleoplasmáticas (PN) e os brotos nucleares (BN) (FENECH, 2000).

O índice de divisão nuclear (IDN) foi calculado de acordo com o número de células mono, bi, tri e tetra nucleadas, contabilizadas em um total de 1500 células por tratamento. Esse índice fornece uma medida de estado proliferativo das células viáveis. O cálculo foi realizado de acordo com a expressão:  $IDN = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$ , onde M1-M4 representam os números de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, e o N é o número total de células contadas (EASTMOND; TUCKER, 1989).

### **2.6. Análises moleculares: extração de RNA e perfil de expressão gênica**

As células foram expostas como no ensaio anterior e, após as 24 horas de exposição, foram tripsinizadas, coletadas, lavadas por três vezes com PBS e centrifugadas até completa lavagem do meio de cultura e da tripsina. Os RNAs foram extraídos com Tri Reagente® (Sigma, St Louis, EUA). A qualidade e a concentração dos RNAs foram analisadas em NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare). O cDNA foi sintetizado a partir de 250 ng de RNA total, com o kit High-Capacity cDNA reverse Transcription (Applied Biosystems™) em um volume final de 20µL. Foram selecionados genes relacionados à metabolização,

aos danos no DNA e ao estresse oxidativo. Todos os iniciadores foram desenhados por meio do programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), utilizando as sequências depositadas no banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (**Tabela 2**).

O PCR em tempo real foi realizado no aparelho StepOne Plus® System (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos). As reações realizadas em placas de 96 poços, foram montadas para um volume final de 10 µL sendo 0.75 µM de iniciadores, 2µL de cDNA diluído 10 vezes e 5µL de SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix (Applied Biosystems™). As condições para PCR foram: Denaturação inicial e ativação enzimática por 10 min, à 95° C, seguidos de 40 ciclos de 95° C por 15 s, 60° C por 1 min. As alterações na expressão gênica foram determinadas usando a β-actina como gene de referência (housekeeping) e o método de comparação utilizado foi CT ( $\Delta\Delta CT$ ). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

### **2.7. Análises estatísticas**

Todos os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão (SD). A normalidade foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk, que mostrou distribuição normal dos dados obtidos. Os ensaios do cometa, o teste de MN, o Índice de divisão nuclear (IDN) e as análises de expressão gênica foram analisadas pelo teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, para múltipla comparação entre os grupos. Todos os dados foram analisados pelo programa Graphpad Prism 6.0.

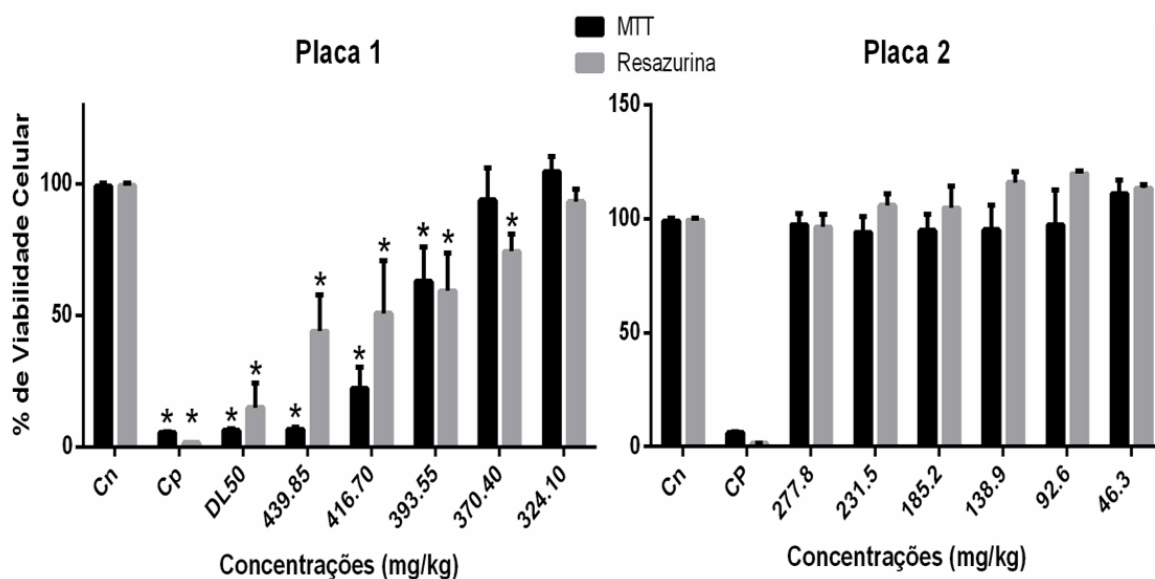
**Tabela 2:** Genes e sequências dos iniciadores utilizados nos ensaios de expressão gênica.

Nome dos genes	Gene	Identificação do gene	Sequencia direta (5' - 3')	Sequencia reversa (5' - 3')	Tamanho do amplicon (Pb)
<b>Síntese de poliaminas</b>					
Ornitina descarboxilase	OCD	4953	CCCAGCGTTGGACAAATACT	TCCATAGACGCCATCATTCA	205
<b>Estresse oxidativo</b>					
Superóxido dismutase 1	SOD1A	6647	AGGGCATCATCAATTTTCGAG	GTGAGGACCTGCACTGGTAC	146
Catalase	CAT	847	CGTGCTGAATGAGGAACAGA	AGTCAGGGTGGACCTCAGTG	119
Glutationa Peroxidase	GPx1	2876	TTGACATCGAGCCTGACATC	ACTGGGATCAACAGGACCAG	185
Glutationa Redutase	GSR	2936	ATCCATATGCAGGGACTTGG	GTAGGGTGAATGGCGACTGT	110
<b>Metabolismo de xenobióticos</b>					
Citocromo P450, família 1	CYP1A1	1543	TTCCCTGATCCTTGTGATCC	GGAGATTGGGAAAAGCATGA	109
Glicuronil transferase	UGT1A1	54658	GTGCCTTTATCACCCATGCT	GCTTTGCATTGTCCATCTGA	108
<b>Danos no DNA</b>					
Reparo por Excisão	ERCC1	2072	CTACAGCCAGTGCATCTCCA	CTCCTGAAACAAGGCACCTC	112
Núclease APEX	APEX1	328	ATATTGCTTCGGTGGGTGAC	GCTCTGTCCTGAGCTCATCC	115
Chechpoint Quinase1	CHEK1	1111	CGCTCCCAACACGGAGTTCC	TCACAGTCGGTGAAGCAGAG	119
<b>Housekeeping</b>					
B-actina	$\beta$ -act	60	CGGGACCTGACTGACTAC	CTCCTTAATGTCACGCAC	87

### 3. Resultados

#### 3.1. Ensaios de citotoxicidade da putrescina

O potencial citotóxico da putrescina foi avaliado por meio do teste de MTT e do ensaio de redução da resazurina em células HepG2 expostas por de 24 horas a esta poliamina. Para o teste de MTT, as concentrações de 463 mg/kg (referente a DL50 de ratazanas) e as concentrações de 439.85, 416.7, 393.55 mg/kg foram citotóxicas para as células HepG2. Já para ensaio de redução da resazurina, tanto as concentrações citotóxicas pelo MTT como a concentração de 370.4 mg/kg se apresentaram citotóxicas para essas células. Os resultados foram bem semelhantes para ambos os testes, mas foi possível inferir que o ensaio de resazurina foi mais sensível que o do MTT. Desta forma, foi possível estabelecer as concentrações não citotóxicas que seriam testadas para os demais testes. Foram escolhidas as concentrações de 324.10, 231.5, 138.9 e 46.3, correspondentes a 70, 50, 30 e 10% da DL<sub>50</sub> de ratazanas. Os resultados estão demonstrados na **figura 1**.



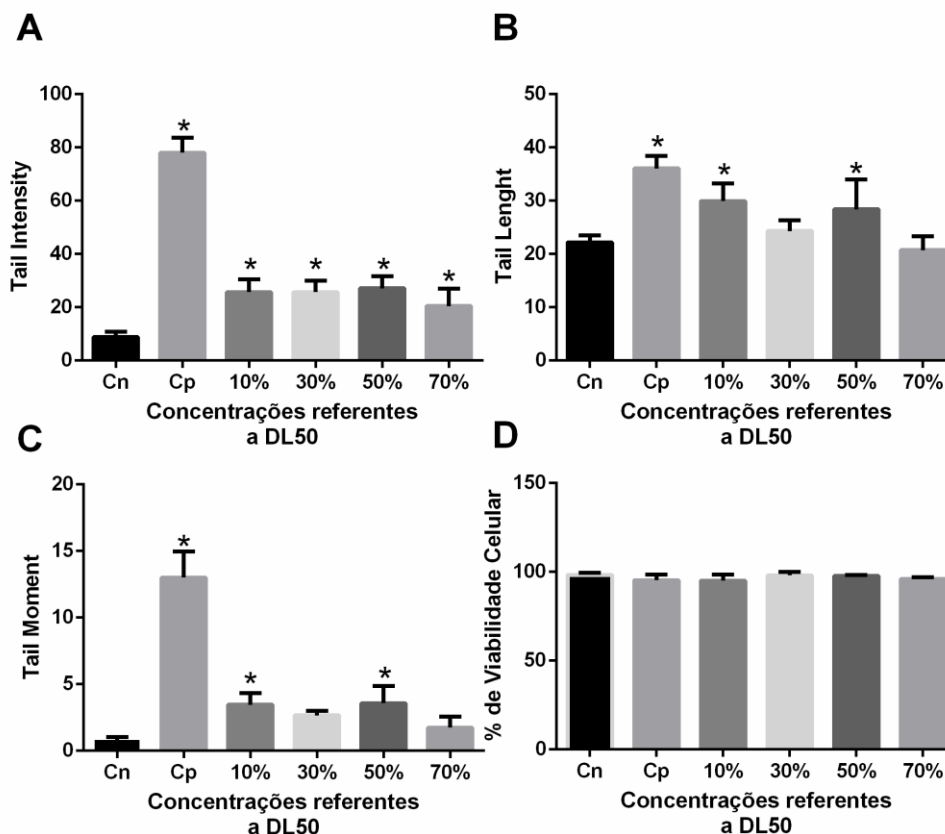
**Figura 1:** Viabilidade celular, avaliada pelos testes de MTT e Resazurina, em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de putrescina. \*correspondem as concentrações citotóxicas (viabilidade celular menor que 80%).

#### 3.2. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado com as concentrações não citotóxicas estabelecidas nos ensaios de citotoxicidade. Foram utilizadas as concentrações correspondentes a 70, 50, 30 e 10% da DL<sub>50</sub> para ratazanas, já conhecida para a putrescina. Os danos no DNA foram estimados por 3 parâmetros: intensidade de DNA, comprimento e momento da cauda. Os resultados estão apresentados na **figura 2**. Junto ao ensaio do cometa, foi realizado o ensaio



de viabilidade celular com o Azul de Trypan, demonstrado na letra D da **figura 2**. De acordo com os resultados obtidos, todas as concentrações foram significativas para o critério intensidade da cauda. Em relação ao comprimento da cauda, os resultados foram significativos para as concentrações de 10 e 50 % da DL<sub>50</sub>. Resultados semelhantes foram observados para o momento da cauda. Não foram observadas diferenças significativas no ensaio de viabilidade celular.



**Figura 2:** Efeitos genotóxicos observados pelo ensaio do cometa em células HepG2. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. \*correspondente a valores estatisticamente significativos ( $P < 0.05$ ).

### 3.3. Teste do Micronúcleo com bloqueio de citocinese (MN)

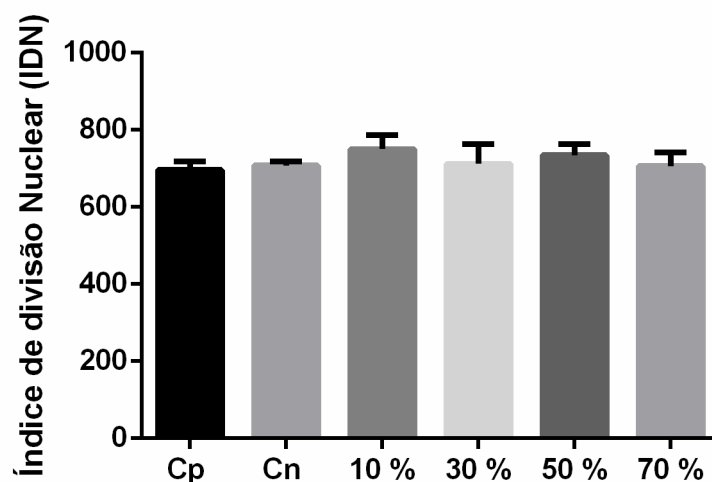
A atividade genotóxica da putrescina foi avaliada em células HepG2, por meio do teste do MN. As células foram expostas às mesmas concentrações do ensaio do cometa, 70, 50, 30 e 10% da DL<sub>50</sub>. Após 24 horas de exposição, houve um aumento da frequência de MN em células binucleadas para as concentrações de 10, 30 e 50 %. As frequências de alterações nucleares (brotos e pontes) aumentaram de forma significativa, apenas para a maior concentração testada (70%) (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Valores representados por frequência de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares (Brotos e pontes nucleoplasmáticas) em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de putrescina.

Concentrações	MN	Brotos	Pontes
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Controle Negativo	2.09±0.17	1.30±0.10	0.37±0.12
Controle Positivo	<b>8.02±1.94*</b>	<b>2.99±0.43*</b>	<b>2.13±1.13*</b>
10 %	<b>6.13±0.56*</b>	1.76±0.30	1.27±0.29
30 %	<b>6.89±1.13*</b>	2.12±0.32	0.93±0.40
50 %	<b>6.40±0.80*</b>	2.06±0.55	1.13±0.06
70 %	4.88±0.65	<b>3.55±1.01*</b>	<b>3.09±0.72*</b>

Os resultados foram expressos em média± desvio padrão MN = Micronúcleos. \*são estatisticamente significativos – P<0,05 (ANOVA/Tukey, P< 0.05).

O efeito citostático da putrescina foi avaliado pelo índice de divisão nuclear (IDN) e nenhuma concentração testada apresentou resultado significativo (**figura 3**).



**Figura 3:** Influência das diferentes concentrações de putrescina (10, 30, 50 e 70%) nos índices de divisão nuclear de células HepG2 expostas por 24 horas. Nenhum resultado foi significativo.

### 3.4. Efeitos da putrescina sobre a expressão de mRNA

Os efeitos da putrescina sobre a expressão gênica foram analisados em células HepG2 expostas por 24 horas às concentrações de 324,1, 231,5, 138,9 e 46,3 mg/kg, referentes a 70, 50, 30 e 10 % da DL<sub>50</sub> de putrescina para ratazanas. Os valores representativos, referentes as quantificações de expressão, foram normalizados com o gene da b-actina e comparados com o grupo controle negativo **Tabela 4**.

O gene da *OCD* apresentou níveis aumentados de expressão nas concentrações de 10, 50 e 70%. Os genes relacionados ao estresse oxidativo apresentaram níveis de expressões bem distintos entre as diferentes concentrações. *SODIA* foi mais expresso na concentração de 10%, enquanto que *CAT* aumentou apenas na concentração de 70 %. *GPXI* teve um aumento de expressão na concentração de 50 %, enquanto *GSR* aumentou em 10 e 70%. Os genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1* e *UGT1A1*) foram mais expressos nas maiores concentrações e os de reparo de danos no DNA, principalmente o *APEXI*, foram mais expressos na concentração de 10 e 50 %.

**Tabela 4:** Perfil de expressão de genes relacionados a via de síntese da putrescina, estresse oxidativo, metabolismo de xenobióticos e de respostas a danos no DNA de células HepG2, expostas a diferentes concentrações de putrescina. Os resultados foram normalizados com o gene endógeno da b-actina.

Mecanismo envolvido	Gene	Concentrações				
		Controle	10 %	30 %	50 %	70 %
Síntese de Poliaminas						
	OCD	0.052±0.002	<b>0.094±0.006*</b>	0.041±0.002	<b>0.206±0.012*</b>	<b>0.242±0.030*</b>
Estresse Oxidativo						
	SOD1A	0.044±0.004	<b>0.209±0.016*</b>	0.020±0.002	0.032±0.000	0.062±0.002
	CAT	0.007±0.000	0.006±0.000	0.004±0.001	0.007±0.001	<b>0.057±0.009*</b>
	GPx1	0.064±0.004	0.133±0.026	0.071±0.016	<b>0.338±0.079*</b>	0.113±0.013
	GSR	0.008±0.000	<b>0.017±0.001*</b>	0.010±0.001	0.006±0.001	<b>0.012±0.000*</b>
Metabolismo de Xenobióticos						
	CYP1A1	0.001±0.000	<b>0.002±0.000*</b>	0.001±0.000	<b>0.002±0.000*</b>	<b>0.003±0.000*</b>
	UGT1A1	0.002±0.000	0.001±0.000	0.002±0.000	<b>0.005±0.001*</b>	0.002±0.000
Danos no DNA						
	ERCC1	0.002±0.000	<b>0.008±0.001*</b>	0.002±0.000	<b>0.009±0.000*</b>	0.003±0.000
	APEX1	0.063±0.005	<b>0.105±0.002*</b>	0.053±0.005	<b>0.111±0.014*</b>	<b>0.030±0.004*</b>
	CHEK1	0.001±0.000	<b>0.003±0.000*</b>	0.001±0.000	<b>0.002±0.000*</b>	0.001±0.000

Os resultados foram expressos em média±desvio padrão. \*são estatisticamente significativos – P<0,05 (ANOVA/Tukey, P< 0.05).

#### 4. Discussão

A contaminação ambiental proporcionada por cemitérios está fortemente ligada a produção do necrochorume, líquido proveniente da decomposição cadavérica e rico em substâncias químicas, como as aminas biogênicas cadaverina e putrescina (DENT et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2012). O necrochorume pode, eventualmente, contaminar o solo, águas superficiais (por escoamento) e águas subterrâneas (por percolação), se caracterizando em um risco à saúde humana (COSTA SILVA; FILHO, 2008; ZYCHOWSKY, 2012). Esse tipo de contaminação representaria uma fonte exógena de putrescina para os organismos que fazem uso destas águas contaminadas. Como essa substância desempenha grande importância para a biossíntese das poliaminas, um aumento na sua biodisponibilidade pode representar grandes alterações na fisiologia celular (BARDOCZ et al., 1995; GAO et al., 2013; KIBE et al., 2014). Diante da falta de estudos relacionados à contaminação ambiental associada a putrescina, este trabalho avaliou, por meio dos testes do cometa e do MN, realizados com cultura de células HepG2, quais poderiam ser os efeitos genotóxicos desta substância, bem como através de análises de transcrição gênica, a identificação das vias potencialmente envolvidas na toxicidade da putrescina.

O ensaio do cometa vem sendo cada vez mais utilizado como teste de genotoxicidade em biomonitoramento de exposições ocupacionais e ambientais (MOLLER, 2006). Diante disso, foram avaliados neste trabalho, pelo ensaio do cometa, três parâmetros distintos de genotoxicidade, como a intensidade, o comprimento e o momento da cauda para células HepG2 submetidas à exposição à putrescina. Ambos os parâmetros indicaram ação tóxica da putrescina para o material genético de células HepG2 expostas às concentrações de 10 e 50% desta poliamina. Existem algumas divergências em relação a qual o melhor parâmetro de análise utilizado para este fim, entretanto, muitas pesquisas assumem o momento da cauda como medida mais estatisticamente significativa, pelo fato de ser uma combinação de medidas entre a intensidade de DNA na cauda e o comprimento da cauda (OLIVE; DURAND, 2005; MOZAFFARIHE et al., 2008; SUNJOG et al., 2013).

O ensaio do cometa em condições alcalinas detecta danos primários no DNA, rupturas em fita dupla e simples e sítios álcali-lábeis, que muitas vezes são passíveis de reparo (SINGH et al., 1988; DHAWAN et al., 2008). Diante disso, a associação de outra técnica ao teste do cometa pode fornecer informações mais consistentes sobre o mecanismo de ação da substância testada (MALUF, 2004). O ensaio MN é uma técnica bem estabelecida em genética toxicológica, pois proporciona estratégias adicionais de avaliação dos danos genéticos (FENECH et al., 2011; MAISANABA et al., 2016). Este ensaio permite a

identificação de substâncias que agem nas células em divisão celular, causando nas mesmas, danos cromossômicos estruturais e numéricos. Com este ensaio, é possível identificar, além de MN, outras anomalias nucleares como pontes nucleoplasmáticas (PN) e brotos nucleares (BN) (FENECH, 2006; FENECH et al., 2011).

As células expostas à putrescina apresentaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos para as concentrações de 10, 30 e 50 %, enquanto que as frequências de PN e BN aumentaram, significativamente, apenas para a maior concentração testada (70%). Por meio destes resultados é possível inferir que diferentes concentrações de putrescina podem desencadear mecanismos de ação distintos sobre o material genético de células HepG2.

Os MN observados nas células submetidas às menores concentrações foram originados de cromossomos inteiros, fragmentos cromossômicos acêntricos ou, fragmentos de cromátides acêntricas que não se ligaram corretamente às fibras do fuso, durante o processo de divisão cromossômica. Uma pequena proporção desses micronúcleos pode ser formada por rupturas na dupla fita de DNA, mas isso só ocorre quando os níveis de danos são maiores que a capacidade de reparo da célula (FENECH et al., 2011). Um outro mecanismo descrito está relacionado à excisão de bases danificadas ou incorporadas de forma incorreta. Se esse processo não acontece de forma completa, pode ocasionar uma ruptura na molécula de DNA, promovendo a formação de MNs (FENECH; NEVILLE, 1992).

A exposição à maior concentração de putrescina avaliada induziu aumento na frequência de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares. De acordo com Thomas et al. (2003), as PN são indicativas de rearranjos cromossômicos originadas de cromossomos dicêntricos e cromossomos em formato de anel. Elas fornecem evidências de rupturas na molécula de DNA, provocadas por problemas nos processos de reparo (FENECH, 2006). A formação de PN tem sido constantemente encontrada em exposições decorrentes a oxidantes endógenos, radiação ionizante e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (FENECH et al, 2011).

Os brotos nucleares podem ser originados de amplificação do material genético. Algumas substâncias químicas atuam sobre os constituintes celulares, interrompendo a migração dos cromossomos para os polos das células, durante o processo de divisão celular, o que, conseqüentemente, induz poliploidização. Esse material genético em excesso é eliminado do núcleo na forma de brotos nucleares (SHIMIZU et al., 1998; SHIMIZU et al., 2000; FERNANDES et al. 2007; FENECH et al., 2011).

Em complementação aos resultados obtidos com os ensaios clássicos de avaliação da genotoxicidade da putrescina, foram realizados estudos de expressão gênica, para tentar identificar as vias moleculares potencialmente envolvidas na toxicidade desta substância.

O gene da OCD (ornitina descarboxilase) foi monitorado na intenção de observar a via de biossíntese das poliaminas. Essa enzima é o fator limitante, que controla a conversão de ornitina em putrescina, por meio de uma reação de descarboxilação (RAMANI et al., 2014). Os resultados dos ensaios de expressão gênica mostraram um aumento expressivo de mRNA de OCD nas concentrações de 50 e 70 % (50% -  $0.206 \pm 0.012$ ; 70%  $0.242 \pm 0.030$ ), em relação ao teste controle ( $0.052 \pm 0.002$ ). Altas concentrações de putrescina deveriam induzir uma diminuição na expressão de OCD, uma vez que ela é altamente afetada pelos níveis de PAS (PERSON, 2009), exatamente o contrário do que foi observado. Determinadas condições fisiológicas podem influenciar na regulação dessa enzima por meio de Guanosina trifosfato, sugerindo que mecanismos de regulação alostérica ou modificações pós-traducionais atuam de forma regulatória sobre esta enzima (COFFINO, 2001).

Quantidades elevadas de poliaminas ativam mecanismos catabólicos nas células, que são capazes de gerar um aumento excessivo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (PEGG et al., 2013). Essa molécula é considerada como um forte agente citotóxico, cujos níveis devem ser minimizados através da ação de enzimas de defesa antioxidantes (HALLIWELL et al., 2000). Além disso, o  $H_2O_2$  é considerado um precursor de radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), que é reconhecido como um dos radicais livres mais reativos (ALZOGHAIBI, 2013). Isso pode desencadear um distúrbio entre a produção de radicais livres e defesas antioxidantes, caracterizando em um estresse oxidativo celular (BETTERIDGE, 2000). Diante disso, foram monitoradas a expressão de genes relacionados a via de estresse oxidativo. Foram avaliados os genes das enzimas SOD, CAT, GPx, que induziram um aumento na expressão de seus mRNA, de forma distinta entre as diferentes concentrações testadas. As maiores variações foram no aumento da expressão do gene *SOD1A*, na concentração de 10 %, e no gene da *GPx1*, na concentração de 50%. Esses resultados indicam estresse oxidativo e podem estar associados com a indução de danos no DNA, corroborando os resultados do ensaio do cometa e do MN.

Nesse estudo também foram avaliados genes envolvido na via de metabolização de xenobióticos, por meio da expressão do mRNA da *CYP1A1* e da *UGT1A1*. Foram observados aumento significativo para o *CYP1A1* nas concentrações 10, 50 e 70 %. Essa enzima atua na fase I de metabolização e faz parte da família do Citocromo p450, que é responsável pelo metabolismo de compostos endógenos e xenobióticos, como drogas e contaminantes

ambientais (ZANGER; SCHWAB, 2013). O mRNA correspondente a enzima Glicuronil transferase (*UGT1A1*) também aumentou, significativamente, na concentração de 50 %. Esta é uma enzima que atua na fase II de metabolização. Elas catalisam a transferência de ácido glicurônico para grupos hidroxila, carboxila ou grupos amínicos de compostos químicos, que, na maioria das vezes, atuam transformando compostos hidrofóbicos em metabolitos solúveis em água, processos esses essenciais para a eliminação de substâncias tóxicas dos organismos (ODA et al., 2015). Esses resultados mostram que a putrescina altera a expressão de genes envolvidos nas vias de metabolização, tanto de fase I quanto de fase II.

Também foram analisados a expressão de genes *ERCC1*, *APEX1* e *CHEK1*, correspondentes a enzimas envolvidas nos processos de reparo do DNA. A expressão de *ERCC1* e *CHEK1* aumentaram significativamente nas células expostas às concentrações de 10 e 50% corroborando com os índices de danos no DNA observados pelo ensaio do cometa. Estes resultados, demonstraram que células com maiores danos nas moléculas de DNA apresentam expressão aumentada para genes envolvidos nos processos de reparo. O complexo enzimático ERCC1-XPF é o componente central do reparo de excisão de nucleotídeos (REN), que pode também atuar em outros processos celulares, como o reparo de ligações cruzadas (Crosslink) e os reparos de quebras de fitas duplas (double-strand break) (MCNEIL; MELTON, 2012). O gene *CHEK1*, codifica uma quinase de controle específica, que regula o ponto de checagem G2/M, impedindo que as células danificadas se dividam (MAUGERI-SACCA et al., 2013; PATIL et al., 2013). Os resultados referentes ao gene *APEX1*, mostraram uma super expressão nas células expostas as concentrações de 10 e 50 %, enquanto que a concentração de 70% levou a uma redução da sua expressão. O gene *APEX1*, codifica a principal endonuclease de sítios apurínicos/pirimídicos e atua na via de excisão de bases (BER) danificadas (MAHJABEEN et al., 2013).

Com base em todos os resultados obtidos, fica evidente o potencial genotóxico e mutagênico da putrescina. A intensidade dos danos promovidos pela substância superou a capacidade de reparo do DNA das células HepG2. Esse material genético danificado foi observado na forma de micronúcleos em células binucleadas. Esse trabalho avaliou os efeitos genotóxicos da putrescina, uma das moléculas biológicas de grande importância nas funções celulares, e mostrou a necessidade do desenvolvimento de trabalhos que sejam realizados com amostras ambientais, para que seja estimado os riscos reais de contaminação proporcionadas por cemitérios.



## 5. Conclusão

Os resultados *in vitro* obtidos no presente estudo, demonstram um potencial genotóxico de concentrações não citotóxicas de putrescina e indicam que os ensaios de cometa e o teste de MN são ferramentas eficientes e complementares para avaliação dos efeitos toxicogenéticos em células HepG2. A putrescina também interfere na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e relacionados à sinalização de danos no DNA. Estes resultados alertam para uma maior atenção a este tipo de contaminação e reforçam a necessidade de uma maior compreensão e atenção para os impactos proporcionados por cemitérios alertando sobre a necessidade de realização de estudos mais diversificados e mais abrangentes sobre esse tipo de contaminação ambiental.

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo número 2013/08279-4) pelo apoio financeiro concedido para realização desta pesquisa.

## 7. Referências Bibliográficas

- Bardócz, S., Duguid, T.J., Brown, D.S., Grant, G., Pusztai, A., White, A., Ralph, A., 1995. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br. J. Nutr.* 73, 819–28.
- Betteridge, D.J., 2000. What is oxidative stress? *Metabolism.* 49, 3–8.
- Coffino, P., 2001. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 188–194.
- Costa Silva, R.W., Filho, W.M., 2008. Cemitérios como áreas potencialmente contaminadas. *Rev. Bras. Ciências Ambient.* 9, 26–35.
- Dent, B.B., Forbes, S.L., Stuart, B.H., 2004. Review of human decomposition processes in soil. *Environ. Geol.*
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009. Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol. Toxicol.*
- Eastmond, D.A., Tucker, J.D., 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13, 34–43.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455, 81–95.

- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P., 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*.
- Fenech, M., Neville, S., 1992. Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 19, 27–36.
- Fenech, M., 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 600, 58–66.
- Gao, J.-H., Guo, L.-J., Huang, Z.-Y., Rao, J.N., Tang, C.-W., 2013. Roles of cellular polyamines in mucosal healing in the gastrointestinal tract. *J. Physiol. Pharmacol.* 64, 681–93.
- Halliwell, B., Clement, M.V., Long, L.H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 486, 10–13.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K., 1999. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem. J.* 344 Pt 3, 633–642.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K., 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 39–51.
- Kibe, R., Kurihara, S., Sakai, Y., Suzuki, H., Ooga, T., Sawaki, E., Muramatsu, K., Nakamura, A., Yamashita, A., Kitada, Y., Kakeyama, M., Benno, Y., Matsumoto, M., 2014. Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. *Sci. Rep.* 4, 681–683.
- Miiller, P., 2005. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96, 1–42.
- Maisanaba, S., Hercog, K., Ortuño, N., Jos, Á., Žegura, B., 2016. Induction of micronuclei and alteration of gene expression by an organomodified clay in HepG2 cells. *Chemosphere* 154, 240–248.
- Maluf, S.W., 2004. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clin. Chim. Acta.*
- McMillian, M.K., Li, L., Parker, J.B., Patel, L., Zhong, Z., Gunnett, J.W., Powers, W.J., Johnson, M.D., 2002. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biol. Toxicol.* 18, 157–173.
- McNeil, E.M., Melton, D.W., 2012. DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. *Nucleic Acids Res.* 40, 9990–10004.

- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., Ralser, M., 2015. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J. Mol. Biol.* 427, 3389–3406.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Natarajan, A.T., Darroudi, F., 1991. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis* 6, 399–403.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421–6.
- Oda, S., Fukami, T., Yokoi, T., Nakajima, M., 2015. A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 30, 30–51.
- Olive, P.L., Durand, R.E., 2005. Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytom. Part A*.
- Oliveira, B., Quinteiro, P., Caetano, C., Nadais, H., Arroja, L., Ferreira da Silva, E., Senos Matias, M., 2013. Burial grounds' impact on groundwater and public health: an overview. *Water Environ. J.* 27, 99–106.
- Palmer, A.J., Wallace, H.M., 2010. The polyamine transport system as a target for anticancer drug development, in: *Amino Acids*. Springer Vienna, pp. 415–422.
- Patil, M., Pabla, N., Dong, Z., 2013. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Pegg, A.E., 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*.
- Persson, L., 2009. Polyamine homeostasis. *Essays Biochem.* 46, 11–24.
- Ramani, D., De Bandt, J.P., Cynober, L., 2014. Aliphatic polyamines in physiology and diseases. *Clin. Nutr.*
- Russell, D.H., 1983. Clinical relevance of polyamines. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 18, 261–311.
- Seiler, N., Raul, F., 2007. Polyamines and the intestinal tract., *Critical reviews in clinical laboratory sciences*.
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Wahl, G.M., 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J. Cell Biol.* 140, 1307–20.

- Shimizu, N., Shimura, T., Tanaka, T., 2000. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 448, 81–90.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Soda, K., 2011. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30, 95.
- Sunjog, K., Kolarević, S., Hoberger, K., Gacić, Z., Knezević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., Lenhardt, M., 2013. Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking differences. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 4879–4885.
- Teti, D., Visalli, M., McNair, H., 2002. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–21.
- Uhl, M., Helma, C., Knasmüller, S., Knasmüller, S., 2000. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat. Res. Toxicol. ...* 468, 213–225.
- Valentin-Severin, I., Le Hegarat, L., Lhuguenot, J.-C., Le Bon, A.-M., Chagnon, M.-C., 2003. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 536, 79–90.
- Wallace, H.M., Fraser, A. V, Hughes, A., 2003. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* 376, 1–14.
- Zanger, U.M., Schwab, M., 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* 138, 103–141.
- Zwolak, I., 2016. Comparison of three different cell viability assays for evaluation of vanadyl sulphate cytotoxicity in a Chinese hamster ovary K1 cell line. *Toxicol. Ind. Health* 32, 1013–1025.
- Zychowski, J., 2012. Impact of cemeteries on groundwater chemistry: A review. *Catena.*

## Artigo 3

### Toxicidade da poliamina putrescina em ratos Wistar machos

Franco Dani Campos-Pereira, Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar, Letícia de Sousa Franco, Guilherme Andrade Alves, Raíssa Ferraz Curtolo, Letícia Cristina Gonçalves, Raquel Vaz Hara, Maria Aparecida Marin-Morales

#### Highlights

- Os cemitérios apresentam grande potencial como contaminante ambiental.
- O necrochorume é a principal causa da contaminação ambiental proporcionada pelos cemitérios.
- A poliamina putrescina é uma das substâncias produzidas pela decomposição cadavérica.
- As poliaminas desempenham grande importância nos processos celulares fisiológicos.

#### Resumo

Os cemitérios têm se despontado mundialmente, como grandes poluidores ambientais, embora essa atividade poluidora seja ainda muito negligenciada pelos órgãos ambientais competentes. Nestes locais são produzidas e acumuladas grande quantidade de compostos químicos provenientes da decomposição cadavérica, tanto de origem orgânica como inorgânica, que apresentam um alto potencial poluidor, além de agentes biológicos, como vírus e bactérias, que persistem por muito tempo nesses ambientes. O líquido produzido pela decomposição dos corpos, denominado de necrochorume, é constituído por água e pelos produtos derivados dessa decomposição, dentre eles a poliamina putrescina, que é uma substância que também apresenta importantes funções fisiológicas para os organismos vivos. Esse é um estudo pioneiro, que tem como objetivo buscar informações sobre os efeitos tóxicos potenciais desta substância. Para isso, foram utilizados neste estudo ratos Wistar, expostos por 56 dias consecutivos a concentrações de 46.3, 138.9 e 251.5 mg/kg, referentes, a 10%, 30% e 50 % da DL<sub>50</sub> de putrescina. Foram avaliados marcadores hematológicos, bioquímicos e biométricos, a fim de estabelecer a maior quantidade de informações possíveis sobre o potencial tóxico da substância. Os animais expostos apresentaram vários parâmetros alterados, entre eles alterações nos pesos de órgãos (fígado, rim, pulmão, vesícula seminal e prostata), alterações

nos índices hematológicos (aumento de células vermelhas, plaquetas e células do sistema imunológico) e nos parâmetros bioquímicos, como distúrbios nos índices glicêmicos e colesterolêmicos. Os parâmetros avaliados se mostraram bastante eficientes no monitoramento dos efeitos sistêmicos da putrescina, revelando, nas condições testadas, o potencial toxicológico da mesma. Esses resultados alertam para o possível potencial ecotoxicológico dessa substância e indicam a necessidade do desenvolvimento de estudos ambientais com esse químico.

**Palavras-Chave:** parâmetros bioquímicos, parâmetros hematológicos, peso relativo necrochorume, potencial ecotoxicológico

## 1. Introdução

A poluição dos recursos hídricos pode ser proveniente de diversas atividades antrópicas, dentre elas as que ocorrem em cemitérios (NEIRA et al., 2008; USLU et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012; ŻYCHOWSKI, 2012). Os cemitérios têm se destacado quanto ao seu potencial de contaminação ambiental, como alertado pela Organização Mundial da Saúde (WHO) que destaca que a instalação da maioria dos cemitérios é realizada sem a prévia avaliação geológica e hidrogeológica do local, podendo colocar em risco a qualidade das águas superficiais e subterrâneas do seu entorno, tanto pela contaminação por substâncias químicas (orgânicas e inorgânicas), como por microrganismos patogênicos (WHO, 1998). A principal causa de contaminação ambiental pelos cemitérios é a produção intermitente de um líquido derivado de processos de decomposição cadavérica, denominado de necrochorume (COSTA SILVA; FILHO, 2008; OLIVEIRA et al., 2012).

O necrochorume é um composto rico em substâncias químicas, dentre elas a putrescina (1,4 diaminobutano), uma poliamina resultante da decomposição dos aminoácidos, que, normalmente, desempenha importantes funções fisiológicas nos organismos (DENT et al, 2004; OLIVEIRA et al., 2012). A putrescina é um polication orgânico presente em todas as células eucariotas e é de grande importância para os processos fisiológicos por ser uma molécula precursora de duas outras poliaminas, a espermidina e a espermina, ambas importantíssimas no processo de proliferação celular (SVENSSON, 2012; PEGG, 2016). Essa poliamina pode interagir com moléculas de DNA, RNA, proteínas e lipídeos e regular atividades como a transcrição do RNA, tradução de proteínas e seu processamento pós-traducionais (PARK; IGARASHI, 2013).

As poliaminas estão fortemente ligadas ao aparecimento de neoplasias de intestino, com evidências, cada vez mais fortes, de que a putrescina e a espermidina tenham um papel importante na promoção da transformação maligna. Células de câncer colorretal apresentam níveis maiores de poliaminas que os tecidos adjacentes ou que o tecido normal equivalente, destacando a possível importância da putrescina exógena no seu desenvolvimento (GERNER; MEYSKENS, 2004).

Como a putrescina presente no necrochorume pode, eventualmente, causar contaminação ambiental tanto pelo seu espalhamento como percolação no solo, ela tem a potencialidade de atingir as águas superficiais e os lençóis freáticos. Como pouco se sabe sobre os efeitos dessa substância como contaminante ambiental, é muito importante o desenvolvimento de estudos que possam trazer informações sobre a via sistêmica de atuação desta poliamina sobre os organismos. Entre os parâmetros mais utilizados em pesquisas toxicológicas, estão as avaliações bioquímicas e hematológicas, por serem importantes para a determinação dos efeitos das substâncias sobre um organismo exposto (PETTERINO; ARGENTINO-STORINO, 2006). A grande vantagem do uso destes parâmetros em ecotoxicologia é, além de estimar os efeitos biológicos dos poluentes, obter indicativos sobre os seus mecanismos de ação, diferente dos estudos químicos, que possibilitam, apenas, a quantificação dos compostos no ambiente. Os parâmetros hematológicos são considerados indicadores fisiohistopatológicos sistêmicos e, conseqüentemente, constituem um importante diagnóstico do status estrutural e funcional do animal exposto à substância avaliada (ADHIKARI et al., 2004). Nesse contexto, o presente trabalho avaliou diferentes parâmetros biométricos, hematológicos e bioquímicos, em testes *in vivo* realizado com ratos Wistar, para esclarecer/conhecer os possíveis efeitos da putrescina sobre a fisiologia de um organismo a ela exposto.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Substâncias Química

Para o desenvolvimento dos ensaios, foram utilizadas diferentes concentrações da poliamina putrescina (1,4-Diaminobutano, fórmula molecular  $C_4H_{12}N_2$ , peso molecular 88,15 g/mol, CAS. No 110-60-1, Sigma-Aldrich, com pureza de 99,0%). As concentrações testadas foram definidas a partir de referência contida na ficha de informações de segurança do produto, que aponta uma DL50 oral para ratas de 463 mg/kg. Foram definidas as

concentrações de 10 % da DL50 (T1- 46,3 mg/kg), 30% (T2- 138,9 mg/kg) e 50% (T3- 231,5 mg/kg).

## **2.2. Animais e desenho experimental**

Para a realização do experimento foram utilizados 24 ratos Wistar machos adultos, com 120 dias de idade e peso inicial em torno de 300-350g, instalados no centro de experimentação animal da Fundação Hermínio Ometto (FHO-UNIARARAS). Os animais foram mantidos em temperatura controlada (25° C), umidade do ar de 60% e ciclos claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração purina *ad libitum*.

Os animais foram divididos em quatro grupos, com seis animais cada. O grupo controle recebeu apenas água filtrada e os três grupos expostos T1, T2 e T3 receberam, em cada um dos tratamentos, uma das concentrações citadas anteriormente. Os animais foram pesados semanalmente e o volume administrado foi calculado, de acordo com o peso de cada animal. A substância foi administrada via gavagem, por um período crônico de 56 dias consecutivos. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da FHO-UNIARARAS (Protocolo nº 024/2013) e os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## **2.3. Coleta de materiais biológicos**

Amostras de sangue foram coletadas por meio de punção caudal aos 15 e 30 dias de exposição. Foram retirados aproximadamente 600 µL de sangue, que foram armazenados em tubos de 1,5 µL e, posteriormente, centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos. Após a separação, o soro foi utilizado nas dosagens bioquímicas. No fim do período de 56 dias, os animais foram anestesiados com solução de Xilazina (Rompun® - Bayer S.A. – 20 mg/mL) e Cetamina (Ketalar® - Parke, Davis & Co.- 50 mg/mL), submetidos a labarotomia medial e expansão da cavidade torácica, para expor o coração e realizar a punção cardíaca com uma seringa de 5 mL. Em seguida, as amostras sanguíneas foram transferidas para tubos específicos, para cada tipo de análise a ser realizada. O sangue para o hemograma foi coletado em tubos contendo o anticoagulante EDTA e o sangue para análises bioquímicas foi coletado em tubos sem o referido anticoagulante. Os órgãos foram retirados e pesados, para posterior análise morfométrica.

## **2.4. Dados Biométricos**



Para as análises morfométricas, foram pesados fígado, rins, pulmão, baço, adrenais, testículos, epidídimo, vesícula seminal e próstata ventral. O peso relativo dos órgãos foi calculado pela fórmula:  $RW = \text{peso do órgão} / \text{peso corpóreo} \times 100$  (da SILVA et al., 2015).

### **2.5. Análises hematológicas**

As amostras sanguíneas foram encaminhadas para o laboratório de análises clínicas CEDIVET – Centro de Diagnostico Veterinário, localizado na cidade de Rio Claro, São Paulo, Brasil ([www.cedivet.com.br](http://www.cedivet.com.br)).

Os parâmetros hematológicos avaliados foram: contagens total de glóbulos vermelhos, contagem de leucocitos totais, hemoglobina, hematócrito, volume hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos.

### **2.6. Análises bioquímicas**

As dosagens bioquímicas de glicemia, colesterol total (CHOL), lipoproteínas de alta densidade (HDL) e de triglicérides (TRGL) foram realizadas aos 15, 30 e 56 dias de exposição, nas dependências do laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, por meio dos kits comerciais Bioliquid® (Laborclin, Paraná, Brazil), utilizados de acordo com as instruções do fabricante. A leitura das análises foi realizada por espectrofotometria, utilizando o leitor de placas ASYS- Expert Plus- (Analítica). Os parâmetros bioquímicos: proteínas totais, creatinina, uréia, fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) foram analisados somente nas amostras de 56 dias de exposição e o soro foi encaminhado para quantificação também no laboratório veterinário CEDIVET (Rio Claro, São Paulo, Brasil).

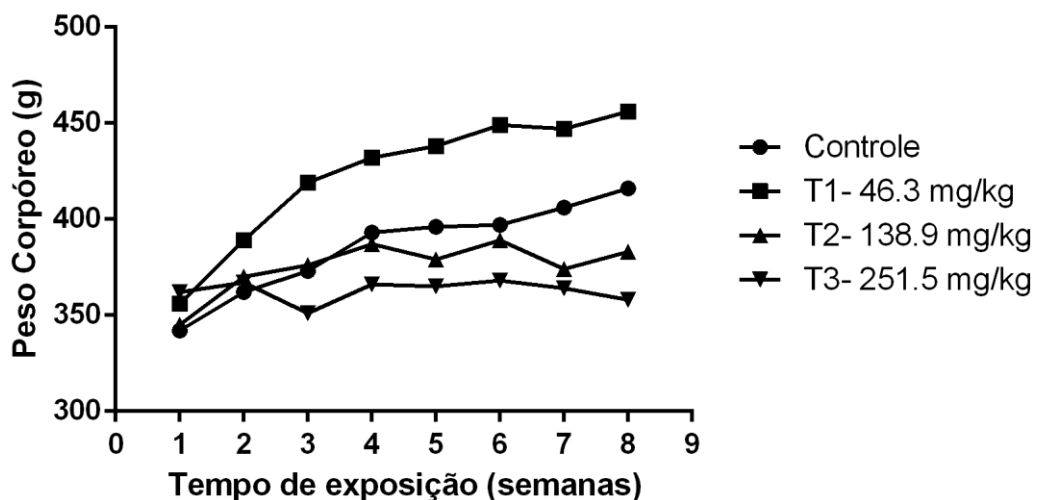
### **2.7. Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão (SD). A normalidade foi realizada pelo teste de Shapiro-wilk, apresentando distribuição paramétrica e não paramétrica. Os dados paramétricos foram analisados com ANOVA e pós teste de Tukey para comparações múltiplas. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's, para comparação entre os diferentes grupos experimentais. Todos os dados foram analisados pelo programa Graphpad Prism 6.0.

### 3. Resultados

#### 3.1. Observações gerais

Os animais do grupo T3 (231,5 mg/kg) apresentaram algumas alterações fisiológicas e de comportamento, como poliúria, vocalização anormal (chiados) ao respirar e secreção nos focinhos. Os animais do grupo T2 (138,9 mg/kg) também apresentavam vocalização anormal ao respirar, mas em menor intensidade. Ambos os grupos (T2 e T3) não apresentaram aumento significativo em ganho de peso ao longo das 8 semanas de tratamento. A diferença na evolução do ganho de peso deste grupo fica bem evidente, quando os resultados foram comparados com a média de peso dos outros grupos. Os animais do grupo T1 (46,3 mg/kg) apresentaram ganho de peso e nenhum sinal de intoxicação. Os animais do grupo controle apresentaram taxa crescente de ganho de peso, como pode ser observado na **figura 1**.



**Figura 1:** Efeitos da administração de putrescina sobre o peso corpóreo dos animais (média).

#### 3.2. Peso absoluto e relativo dos órgãos

Após a eutanásia, os órgãos foram coletados e pesados, individualmente. Na **tabela 1**, estão representados os valores médios e desvio padrão do peso absoluto e peso relativo dos órgãos. A análise estatística indicou que o grupo T3 apresentou índices significativos de alteração nos valores médios do peso em mais órgãos, quando comparado aos demais grupos. Para o grupo T1, o fígado e os rins dos animais do grupo T1 exibiram um aumento

significativo tanto do peso absoluto como relativo. Foi observado para o grupo T3, que os pulmões aumentaram de peso, mas o baço, próstata ventral e vesícula seminal exibiram uma redução do peso absoluto e relativo. A análise macroscópica dos órgãos não revelou diferença visível entre eles.

**Tabela 1:** Efeitos da administração oral de putrescina sobre o peso absoluto (g) e o peso relativo dos órgãos (peso do órgão/peo do animalx100) de ratos Wistar expostos por 56 dias consecutivos.

Orgãos	Valores absolutos				Valores relativos			
	Controle	(46.3 mg/kg)	(138.9 mg/kg)	(231.5 mg/kg)	Control	(46.3 mg/kg)	(138.9 mg/kg)	(231.5 mg/kg)
<b>Fígado</b>	12.38±3.10	<b>16.45±1.42*#</b>	12.62±1.07	11.20±3.42	2.95±0.5	<b>3.64±0.37*</b>	<b>3.30±0.30*</b>	3.15±0.28
<b>Rins</b>	3.24±0.23	<b>4.08±0.46*#</b>	3.14±0.28	2.80±0.85	0.79±0.09	<b>0.90±0.07*</b>	0.82±0.07	0.79±0.07
<b>Pulmão</b>	2.32±0.72	3.13±1.13	2.51±0.84	<b>3.57±0.63*</b>	0.56±0.15	0.70±0.31	0.65±0.17	<b>1.07±0.40*</b>
<b>Baço</b>	1.04±0.24	1.12±0.16	1.02±0.14	<b>0.62±0.39*</b>	0.25±0.03	0.24±0.04	0.27±0.03	<b>0.16±0.05*</b>
<b>Adrenal</b>	0.05±0.01	0.05±0.00	0.05±0.00	<b>0.08±0.01*#</b>	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	<b>0.02±0.00*#</b>
<b>Testiculos</b>	3.48±0.13	3.54±0.24	3.72±0.44	2.90±1.23	0.84±0.09	0.77±0.08	0.97±0.06	0.81±0.27
<b>Epidídimos</b>	0.99±0.08	1.10±0.09	1.10±0.07	0.77±0.30	0.24±0.04	0.23±0.01	0.30±0.03	0.22±0.09
<b>Vesícula seminal</b>	1.65±0.49	1.89±0.41	1.29±0.27	<b>0.69±0.62*</b>	0.40±0.12	0.39±0.09	0.33±0.06	<b>0.17±0.10*#</b>
<b>Prostata ventral</b>	0.55±0.16	0.51±0.10	<b>0.40±0.14*</b>	<b>0.21±0.09*#</b>	0.13±0.03	0.11±0.03	0.11±0.05	<b>0.06±0.03*#</b>

Valores representados em média±desvio padrão. ANOVA 1 parametro, pós teste de Tukey.

\*Valores significativos em relação ao grupo controle P<0,05.

#Valores significativos em relação a outros grupos P<0,05.

### 3.3. Resultados das análises hematológicas

Os resultados observados nas análises hematológicas são apresentados na **tabela 2**. Parâmetros como hemoglobina, hematócrito, VCM, eosinófilos, monócitos e basófilos não sofreram alterações significativas. A quantidade de RBC aumentou significativamente nos grupos expostos às concentrações de 43.6 e 138.9 mg/kg. A contagem de leucócitos totais, para a concentração de 138.9 mg/kg (T2), teve um aumento significativo de 30% em relação ao controle. A HCM e CHCM diminuíram significativamente nos grupos T1 e T2, quando comparados aos resultados obtidos no grupo controle e no grupo T3. As plaquetas aumentaram significativamente em T2 (34%), mas já foi possível observar um aumento intermediário em T1 (22%), quando comparados com os resultados do grupo controle. Os neutrófilos tiveram uma redução significativa em T1 (53%) e em T2 (24%) e um aumento significativo em T3 (43%). Os linfócitos sofreram aumento significativo de 92% e 62%, respectivamente para T1 e T2, quando comparados ao grupo controle.

### 3.4. Resultados bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos avaliados nesse estudo, foram os marcadores de função hepática, função renal e proteínas totais circulantes (**Tabela 3**). Os valores de ALT não sofreram diferenças estatisticamente significativas. Embora os níveis de AST tenham aumentado em todos os grupos expostos à putrescina, os resultados só foram estatisticamente significativos para o grupo T1 (29%) e para o grupo T3 (82%). Os índices de ALP, aparentemente, diminuíram em todos os grupos tratados, sendo significativo em T1 e T3, quando comparados com o grupo controle. Dos marcadores de função renal, a creatinina se manteve inalterada e a ureia diminuiu significativamente em T3. O índice de proteínas totais não apresentou nenhuma alteração.

#### 1.1 Dosagem de glicemia, total colesterol, HDL e Triglicérides

Os níveis de glicemia, colesterol total, HDL e triglicérides foram avaliados em três períodos (15, 30 e 56 dias). Aos 15 dias de exposição, os níveis de colesterol total, HDL e triglicérides diminuíram significativamente, em relação ao grupo controle, apenas para o grupo T1. Para os 30 dias de exposição, os níveis de glicemia diminuíram significativamente em todos os grupos expostos. Ao final do experimento, os níveis de HDL diminuíram para os grupos T1 e T2 e os triglicérides aumentou para o grupo T1. Os demais resultados não apresentaram diferenças significativas (**Tabela 4**).

**Tabela 2:** Parâmetros hematológicos de ratos Wistar expostos a putrescina de forma oral por 56 dias consecutivos.

Parâmetros Hematológicos	Controle	(46.3 mg/Kg)	(138.9 mg/kg)	(231.5 mg/kg)	Valores de P
<b>Hemácias</b> (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> ) <b>b</b>	6.39 ± 0.38	<b>8.38 ± 0.76 c (31%)</b>	<b>8.61 ± 0.47 c (35%)</b>	6.45 ± 0.61	0.0007
<b>Leu. Totais</b> (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) <b>a</b>	8.60 ± 1.46	10.13 ± 0.87	<b>11.25 ± 0.97 c (30%)</b>	9.37 ± 0.32	0.0203
<b>Hemoglobina</b> (gr/dL) <b>b</b>	16.08 ± 0.75	15.56 ± 0.48	15.28 ± 0.26	16.33 ± 1.97	NS
<b>Hematocrito</b> (%) <b>b</b>	48.03 ± 0.86	47.85 ± 1.15	48.44 ± 0.59	44.17 ± 4.80	NS
<b>VCM</b> (fL) <b>b</b>	73.36 ± 5.38	67.18 ± 1,41	66.1 ± 1.52	75.15 ± 4.74	NS
<b>HCM</b> (pg) <b>a</b>	25.10 ± 2.75	<b>18.84 ± 2.94 c</b>	<b>17.67 ± 2.11 c</b>	23.65 ± 1.91	0.0033
<b>CHCM</b> (%) <b>a</b>	33.38 ± 2.63	<b>24.03 ± 1.5 c</b>	<b>26.07 ± 1.95 c</b>	33.23 ± 3.12	0.0001
<b>Plaquetas</b> (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) <b>a</b>	659.00 ± 69.18	<b>805.00 ± 81.54 (22%)</b>	<b>885.67 ± 78.50 c (34%)</b>	695.00 ± 62.23	0.0060
<b>Neutrófilos</b> (x10 <sup>3</sup> /μL) <b>a</b>	53.60 ± 1.82	<b>25.25 ± 6.02 c d (53%)</b>	<b>40.75 ± 7.89 c d (24%)</b>	<b>77.00 ± 4.24 c d (43%)</b>	0.0001
<b>Eosinófilos</b> (x10 <sup>3</sup> /μL)	0.67 ± 1.63	0	0	0	NS
<b>Linfócitos</b> (x10 <sup>3</sup> /μL) <b>a</b>	36 ± 4.62	<b>69.25 ± 7.25 c (92%)</b>	<b>58.5 ± 9.98 c (62%)</b>	29.33 ± 17.90	0.0009
<b>Monócitos</b> (x10 <sup>3</sup> /μL) <b>a</b>	8 ± 5.06	7.25 ± 0.96	4.33 ± 3.51	8.50 ± 2.12	NS
<b>Basófilos</b> (x10 <sup>3</sup> /μL)	0	0	0.2 ± 0.45	0	NS

Valores representados por média±desvio padrão (n= 6 animais por grupo). **a** - ANOVA 1 parâmetro (Teste de Tukey); **b** - Kruskal-wallis, pós teste de Dunn's **c**- valores significativos em relação ao controle (diminuíram ou aumentaram em relação ao controle) **d**- significativo em relação a todos os grupos. Resultados foram considerados significativos para p<0.05. Os valores em % mostram a variação que foi encontrada nos diferentes grupos quando comparados ao grupo controle. VCM (volume corpuscular médio), HCM (Hemoglobina corpuscular média) e CHCM (Concentração de hemoglobina corpuscular média).

**Tabela 3:** Efeitos da administração de putrescina por via oral em ratos Wistar expostos por 56 dias consecutivos.

Parâmetros Bioquímicos	Controle	(46.3 mg/Kg)	(138.9 mg/kg)	(231.5 mg/kg)	Valores de P
ALT u/L	41.75±4.27	40.40±6.23	43.40±5.77	48.00±4.58	NS
AST u/L	127.25±8.10	<b>164.50±20.53 c (29%)</b>	143.75±12.97	<b>231.33±24.09 d (82%)</b>	0.0413
ALP u/L	92.25±10.14	<b>78.20±21.67 c</b>	80.40±7.30	<b>73.00±.00 c</b>	0.0084
Creatinina mg/dL	0.80 ±0	0.72±0.04	0.75±0.12	0.73±0.06	NS
Ureia mg/dL	43.25±2.63	45.0±2.55	44.50±3.15	<b>36.00±3.00 d</b>	0.0230
Proteínas totais g/dL	6.32±0.13	6.28±0.40	6.36±0.15	6.10±0.95	NS

Valores representados em média±desvio padrão (n= 6 animais por grupo). Os resultados estatísticos foram determinados por ANOVA, pós teste de Tukey. **c-** valores significativos em relação ao controle; **d-** significativo em relação a todos os grupos. Resultado foram considerados significativos para p<0.05. Os valores em % mostram a variação encontrada nos diferentes grupos em relação ao grupo controle. ALT (alanina aminotransferase) AST (aspartato aminotransferase) e ALP (fosfatase alcalina).

**Table 4:** Avaliação dos efeitos da poliamina putrescina nos índices glicêmicos e colesterolêmicos

Dias de Exposição	Parâmetros Bioquímicos	Controle	(46.3 mg/kg)	(138.9 mg/kg)	(251.5 mg/kg)
15 dias	Glicose (mg/dL)	88.96±12.82	97.21±10.10	73.92±8.15	71.52±15.06
	CHOL (mg/dL)	155.40±22.71	<b>130.94±6.19*</b>	140.60±2.35	153.89±6.24
	HDL (mg/dL)	91.86±24.21	<b>46.83±5.61*</b>	82.70±5.33	76.66±18.64
	TRGL (mg/dL)	129.29±52.40	<b>79.66±9.27*</b>	92.66±3.32	113.51±9.93
30 dias	Glucose (mg/dL)	88.74±18.13	<b>50.82±15.77*</b>	<b>45.35±9.63*</b>	<b>46.70±12.77*</b>
	CHOL (mg/dL)	181.66±24.08	167.92±23.18	168.00±19.93	162.94±19.97
	HDL (mg/dL)	91.86±7.59	95.90±10.91	88.23±12.95	94.85±12.26
	TRGL (mg/dL)	93.21±26.45	72.85±19.38	73.96±14.62	71.09±16.30
56 dias	Glucose (mg/dL)	89.11±31.26	65.61±24.00	65.37±52.79	93.03±34.05
	CHOL (mg/dL)	182.26±23.56	180.75±18.47	195.85±10.18	184.53±28.06
	HDL (mg/dL)	101.78±43.93	<b>37.61±9.56*</b>	<b>39.10±23.69*</b>	67.28±17.51
	TRGL (mg/dL)	84.36±14.58	<b>122.21±14.58*</b>	98.32±28.37	54.91±22.34

Valores representados em média±desvio padrão (n=6 animais por grupo). CHOL (Colesterol), TRGL (Triglicerídeos). Os resultados estatísticos foram determinados por ANOVA, pós teste de tukey. \*Resultados significativos para p<0,05.

#### 4. Discussão

A substância putrescina é reconhecida pelas importantes funções fisiológicas que desempenha em diferentes células e em diferentes organismos (HOET; NOMERY, 2000; COBURN, 2009; PEGG, 2009; IGARASHI; KASHIWAGI, 2010), mas esta substância é também produzida durante o processo de putrefação dos organismos. Estudos desenvolvidos por Dent et al. (2004), Almeida e Macedo (2005), Costa Silva e Filho (2008), Oliveira et al. (2012) relatam a presença desta poliamina no necrochorume, o líquido produzido pela decomposição dos corpos nos cemitérios convencionais, e alertam sobre o potencial deste composto contaminar solo, águas superficiais e águas subterrâneas.

De acordo com os resultados observados neste estudo, nos testes desenvolvidos com animais expostos às diferentes concentrações de putrescina, não foi possível estabelecer uma curva dose resposta, quando comparados ao grupo controle. Todas as concentrações testadas causaram algum tipo de alteração na homeostase dos animais, evidenciando a complexidade dos mecanismos de ação desta substância. Os dados obtidos no presente estudo, corroboram as citações de Coburn (2009). Este autor afirmou que muitas das relações que envolvem efeitos mediados pelas poliaminas, em diferentes cascatas de transdução de sinais, ainda são mal compreendidas, devido à complexidade de ativação dos diferentes sistemas de sinalização, que, muitas vezes, são difíceis de serem determinadas experimentalmente.

As alterações fisiológicas relacionadas ao sistema respiratório (dificuldade de respirar, vocalização anormal (chiados) e secreção nos focinhos), observadas nos animais tratados com



a concentração de 138,9 mg/kg e, mais severamente, para os tratados com a concentração de 231,5 mg/kg, podem estar relacionadas com a sensibilidade das células epiteliais dos alvéolos pulmonares à putrescina. De acordo com Hoet e Nemery (2000), os pneumócitos do tipo II são dotados de um sistema de captação de poliaminas mais complexo que outros tipos celulares, podendo induzir um acúmulo de putrescina no pulmão. O acúmulo de poliaminas naturais neste órgão têm sido relatado em várias espécies de mamíferos, como ratos, hamster, coelhos e humanos (OREFFO et al., 1991; SOKOL et al., 1992; JONES et al., 1992; HOET et al., 1995; BABAL et al., 2000). Os estudos de Ghisalberti et al. (2016) também mostram que um aumento na biossíntese das poliaminas pode agravar doenças obstrutivas das vias aéreas, por meio da diminuição da síntese do óxido nítrico (NO), o que proporciona um efeito broncoconstritor.

No presente estudo, foram avaliados índices hematológicos para estimar os possíveis efeitos da putrescina sobre as células do sangue, visto que avaliações hematológicas são eficientes ferramentas de análise sistêmica, do organismo (ARIKA et al., 2016). Nossos dados mostram que houve uma correlação entre os efeitos significativos de aumento no número de hemácias, com a diminuição dos índices de HCM and CHCM, observadas para as concentrações de 46,3 e 138,9 mg/kg.

Arika et al. (2016) observaram que desordens renais e, principalmente, pulmonares, podem ocasionar, respectivamente, secreção inapropriada de eritropoietina e hipoxemia crônica. Como resultado, ocorre um aumento na produção de eritropoietina e distúrbios mieloproliferativos, o que pode ocasionar um aumento na atividade da medula óssea e, conseqüentemente, aumento na produção de células vermelhas. Os índices de HCM e CHCM são parâmetros utilizados para definir a concentração de hemoglobina no sangue e estão relacionados à capacidade de transporte de oxigênio. Níveis reduzidos destes parâmetros refletem a diminuição da oxigenação dos tecidos, apontando para uma hipóxia tecidual (MAHMOUD, 2013). Esses resultados hematológicos se correlacionam com os sinais clínicos dos animais expostos a diferentes concentrações de putrescina, o que permite inferir que as complicações no sistema respiratório afetam os parâmetros hematológicos relacionados às células vermelhas.

Em relação as células brancas, foram observados aumento significativo no número de linfócitos, para as concentrações de 46.3 e 138.9 mg/kg. Estas células são consideradas bons marcadores de inflamação, assim o aumento no seu número pode estar associado a processos inflamatórios (CURBELO et al., 2017). Por outro lado, nossas análises mostram que, para as mesmas concentrações, houve uma redução no número de neutrófilos que, de acordo com

Arika et al., (2016), está associada a um efeito de toxicidade direta ocasionado pela substância testada.

Ainda entre os marcadores hematológicos, as plaquetas apresentaram aumento significativo nos ratos expostos as concentrações de 46,3 e 138,9 mg/kg. Schmid et al. (2015) evidenciaram que o aumento das plaquetas é mediado pelo aumento da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$ . Estas células são extremamente sensíveis a qualquer alteração física/química no sangue, sendo capazes de responder, prontamente, a uma grande variedade de estímulos. Essas respostas rápidas visam minimizar os possíveis efeitos das perdas sanguíneas, o reconhecimento e ataque de partículas estranhas e à modulação de respostas inflamatórias (PAES LEME et al., 2006). As poliaminas são capazes de alterar potenciais de membrana e modificar as concentrações de cálcio circulantes, interferindo, desta forma, nos índices plaquetários (COBURN, 2009).

Para obter informações detalhadas sobre a toxicidade da putrescina no fígado e no rim dos animais expostos, foram realizadas quantificações bioquímicas de marcadores de função renal e hepática. Para os marcadores de função renal não foram observadas alterações significativas. Entretanto, os marcadores hepáticos AST e ALP tiveram seus valores aumentados e diminuídos, respectivamente, para os ratos tratados com as concentrações de 46.3 e 231.5. Ramaiah (2007) afirmam que a AST não é exclusiva dos hepatócitos, ela é observada em diferentes tecidos como músculo e glóbulos vermelhos, indicando que o aumento deste marcador não necessariamente significa injúria hepática. Além disso, a AST possui isoformas citosólicas e mitocondriais. Em ratazanas, 80% delas são mitocondriais, o que pode, com o aumento deste parâmetro, significar um comprometimento celular mais intenso. Os valores de ALP podem sofrer alterações devido à dieta e, desta forma, não se caracteriza como um marcador confiável de colestase hepática. De acordo com Ramaiah (2007) uma maior atividade de ALP é encontrada na mucosa intestinal de ratos se comparado ao fígado.

Foram analisados os índices glicêmicos e colesterolêmicos nos períodos de 15, 30 e 56 dias do experimento, a fim de entender os efeitos da putrescina sobre estes parâmetros. Nos primeiros 15 dias de exposição, foi observada uma diminuição nos níveis de colesterol total, HDL e triglicerídeos, para os indivíduos tratados com a concentração de 46,3 mg/kg. Aos 30 dias de exposição, todas as concentrações apresentaram diminuição dos índices glicêmicos. Nas análises de 56 dias, os ratos expostos a concentração de 46,3 e 189,8 mg/kg apresentaram níveis de HDL diminuídos.

Nossos resultados corroboram os achados de Shelepov et al. (1990), que afirmaram que a administração intraperitoneal de 60 e 120  $\mu\text{mol}/100\text{g}$  de putrescina induziu hipoglicemia e redução dos níveis de ácidos graxos não esterificados e de lipídios totais.

Richelsen et al. (1989), estudaram os efeitos de 10 mM das poliaminas putrescina, espermina e espermidina em culturas de adipócitos isolados de ratos. Esses autores observaram que todas as poliaminas estudadas inibiram a lipólise, por meio da ativação de fosfodiesterases que hidrolisam o AMPc (adenosina monofostato policíclico). Desta forma, concluíram que as poliaminas podem estar envolvidas nos mecanismos fisiológicos de regulação dos triacilglicerídeos presentes nos adipócitos, podendo, assim, agir no metabolismo inicial de lipídeos.

A redução dos índices glicêmicos, observada para todas as concentrações testadas com 30 dias de exposição, pode estar relacionada com a similaridade de ação que as poliaminas espermina e espermidina tem com a glicose (LOCKWOOD et al., 1971; LOCKWOOD, EAST, 1974). Os estudos realizados por Pegg (2016) demonstraram que o aumento de putrescina pode induzir maior atividade enzimática da espermidina e da espermina sintase e, assim, promover o aumento da espermina e espermidina nas células. Frente aos relatos anteriores, podemos inferir que a exposição a putrescina, realizada em nosso estudo, pode ter induzido um aumento dessas duas outras poliaminas e refletido, diretamente, sobre os índices glicêmicos. Como estes resultados foram observados apenas para os testes de 30 dias de exposição, os organismos podem ter acionado mecanismos compensatórios, reguladores dos níveis de glicose circulante, o que pode ser comprovado pela normalização dos índices glicêmicos observados nos testes de 56 dias de exposição.

De acordo com estas informações e com os resultados observados neste estudo é possível inferir que a putrescina provoca alterações nos índices colesterolêmicos, sendo capaz de induzir perturbações na ligação entre os carboidratos e o metabolismo de lipídios. Desta forma, podemos associar o discreto ganho de peso, observado nos animais expostos a maior concentração de putrescina, com as perturbações observadas no metabolismo de lipídios, embora os parâmetros bioquímicos não indiquem grandes alterações. Resultados semelhantes foram descritos por Til et al. (1997), em que os animais expostos a diferentes concentrações de poliaminas, dentre elas a putrescina, apresentaram efeitos adversos relacionados ao peso corporal.

Em experimentos de toxicologia, a comparação entre o peso dos órgãos nos diferentes grupos de animais expostos e não expostos, tem sido considerado um importante indicador para avaliação dos efeitos das substâncias químicas no organismo (MICHAEL et al., 2007;

SELLERS et al., 2007; PIAO et al., 2013). Os estudos de Piao et al. (2013) mostram que a combinação entre os pesos absolutos e os pesos relativos (proporção entre peso do órgão/peso do corpo) proporcionam maior confiabilidade para a interpretação dos resultados. O uso do peso relativo permite a normalização de variações relacionadas às diferenças de pesos corporais dos animais tratados.

No presente estudo, foram observadas alterações no peso dos órgãos nos diferentes grupos expostos a putrescina. O fígado e os rins apresentaram ganho de peso, tanto absoluto quanto relativo, para a menor concentração testada, enquanto que órgãos como a vesícula seminal, próstata ventral e baço tiveram seu peso diminuído para a maior concentração estudada. Os pulmões e as adrenais apresentaram aumento de peso nos animais expostos à maior concentração. Sellers et al. (2007) sugerem que alterações no peso do fígado e dos rins estão diretamente relacionadas às alterações provocadas pela exposição a substâncias testadas. Para o fígado, essa alteração pode estar associada à hipertrofia hepatocelular, provocada por indução de enzimas hepáticas e proliferação de peroxissomos. No rim, a alteração no peso está diretamente relacionada a toxicidade renal, que provoca hipertrofia tubular e nefropatias crônicas progressivas. Alterações nos pesos de órgão reprodutivos, como a próstata ventral e a vesícula seminal, estão associadas a efeitos decorrentes da modulação da sinalização androgênica e estrogênica, o que afeta, diretamente, as atividades reprodutivas. Alterações em órgãos endócrinos, como as adrenais, estão associadas à hipertrofia ou hiperplasia celular, decorrentes de estresse. É importante ressaltar que as alterações nos pesos dos órgãos são importantes parâmetros toxicológicos, mas, quando acompanhadas de avaliações histopatológicas, fornecem informações ainda mais detalhadas sobre os efeitos tóxicos das substâncias testadas (SELLERS et al., 2007).

Os efeitos de substâncias testadas podem se dar de forma rápida ou, muitas vezes, de forma mais lenta, causando alterações na função e estrutura dos tecidos afetados. Desta forma, o monitoramento de marcadores hematológicos, bioquímicos e biométricos conferem importantes parâmetros de avaliação sobre os efeitos de substâncias tóxicas, fornecendo pistas relacionadas aos seus mecanismos de ação.

## 5. Conclusão

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a exposição crônica a concentrações, elaboradas com quantidades inferiores da DL50 de putrescina promoveram uma série de alterações nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e nos pesos de diversos órgãos dos organismos. Ainda foi possível concluir que não existe um efeito dose-

resposta para essa substância, pelo menos nas concentrações aqui testadas. Todas as concentrações testadas promoveram alterações em um conjunto de marcadores distintos, revelando a complexidade desta substância ao interagir com os componentes celulares. Estes resultados alertam quanto ao potencial tóxico da putrescina, mostrando a necessidade da realização de mais estudos com esse químico, para que se possam melhor avaliar o potencial dessa substância como contaminante ambiental.

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem a professora Eliete Luciano, e a técnica Clarice Sibuya do Laboratório de Biodinâmica, UNESP – Rio Claro pelo suporte técnico na realização das análises bioquímicas de glicemia e colesterol e a técnica Renata Barbieri do laboratório de micromorfologia da FHO-UNIARARAS por toda ajuda dispensada. Um agradecimento especial a FAPESP (Processo número 2013/08279-4) pelo apoio financeiro concedido.

## 7. Referências Bibliográficas

- Adhikari, S., Sarkar, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C.T., Ayyappan, S., 2004. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 220–6.
- Almeida, A.M., Macedo, J.A.B., 2005. Parâmetros Físico-Químicos de Caracterização de Contaminação do Lençol Freático por Necrochorume. In: *Seminário de Gestão Ambiental- Um Convite a interdisciplinaridade*. <http://followscience.com/content/228216/artigo-parametros-fisico-quimicos-de-caracterizacao-da-contaminacao-do-lencol/> (accessed 04.04.2017).
- Arika, W., Nyamai, D., Musila, M., Ngugi, M., Njagi, E., 2016. Hematological Markers of In Vivo Toxicity. *J. Hematol. Thromboembolic Dis.* 4.
- Babal, P., Manuel, S.M., Olson, J.W., Gillespie, M.N., 2000. Cellular disposition of transported polyamines in hypoxic rat lung and pulmonary arteries. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L610-7.
- Coburn, R.F., 2009. Polyamine effects on cell function: Possible central role of plasma membrane PI(4,5)P2. *J. Cell. Physiol.* 221, 544–551.
- Costa Silva, R.W., Filho, W.M., 2008. Cemitérios como áreas potencialmente contaminadas. *Rev. Bras. Ciências Ambient.* 9, 26–35.
- Curbelo, J., Luquero Bueno, S., Galván-Román, J.M., Ortega-Gómez, M., Rajas, O., Fernández-Jiménez, G., Vega-Piris, L., Rodríguez-Salvanes, F., Arnalich, B., Díaz, A., Costa, R., de la Fuente, H., Lancho, Á., Suárez, C., Ancochea, J., Aspa, J., 2017.

Inflammation biomarkers in blood as mortality predictors in community-acquired pneumonia admitted patients: Importance of comparison with neutrophil count percentage or neutrophil-lymphocyte ratio. *PLoS One* 12, e0173947.

da Silva, R.O., Andrade, V.M., Bullé Rêgo, E.S., Azevedo Dória, G.A., Santos Lima, B. dos, da Silva, F.A., de Souza Araújo, A.A., de Albuquerque Júnior, R.L.C., Cordeiro Cardoso, J., Zanardo Gomes, M., 2015. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. *J. Ethnopharmacol.* 170, 66–71.

Dent, B.B., Forbes, S.L., Stuart, B.H., 2004. Review of human decomposition processes in soil. *Environ. Geol.* 45, 576–585.

Gerner, E.W., Meyskens, F.L., 2004. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* 4, 781–792.

Ghisalberti, C.A., Borzì, R.M., Cetrullo, S., Flamigni, F., Cairo, G., 2016. Soft TCPTP Agonism—Novel Target to Rescue Airway Epithelial Integrity by Exogenous Spermidine. *Front. Pharmacol.* 7, 147.

Hoet, P.H., Lewis, C.P., Dinsdale, D., Demedts, M., Nemery, B., 1995. Putrescine uptake in hamster lung slices and primary cultures of type II pneumocytes. *Am. J. Physiol.* 269, L681-9.

Hoet, P.H., Nemery, B., 2000. Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L417-33.

Igarashi, K., Kashiwagi, K., 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 39–51.

Jones, H.E., Blundell, G.K., Wyatt, I., John, R.A., Farr, S.J., Richards, R.J., 1992. The accumulation of pentamidine into rat lung slices and its interaction with putrescine. *Biochem. Pharmacol.* 43, 431–437.

Lockwood, D.H., East, L.E., 1974. Studies of the insulin-like actions of polyamines on lipid and glucose metabolism in adipose tissue cells. *J. Biol. Chem.* 249, 7717–7722.

Lockwood, D.H., Lipsky, J.J., Meronk, F., East, L.E., 1971. Actions of polyamines on lipid and glucose metabolism of fat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 601–607.

Mahmoud, A.M., 2013. Hematological alterations in diabetic rats - Role of adipocytokines and effect of citrus flavonoids. *EXCLI J.* 12, 647–57.

Michael, B., Yano, B., Sellers, R.S., Perry, R., Morton, D., Roome, N., Johnson, J.K., Schafer, K., Pitsch, S., 2007. Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-Rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory Guidelines and a Survey of Current Practices. *Toxicol. Pathol.* 35, 742–750.

Neira, D.F., Terra, R., Pratte-Santos, R., Barbiéri, R.S., 2008. Impacts of the leachate in the Santa Inês cemetery subterranean waters, Espírito Santo, Brazil. *Nat. line* 6, 36–41.

- Oliveira, B., Quinteiro, P., Caetano, C., Nadais, H., Arroja, L., Ferreira da Silva, E., Senos Matias, M., 2013. Burial grounds' impact on groundwater and public health: an overview. *Water Environ. J.* 27, 99–106.
- Oreffo, V.I.C., John, R.A., Richards, R.J., 1991. Diamine uptake by rat lung type II cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 41, 1209–1215.
- Paes Leme, F.O., Wurzinger, L.J., Vasconcelos, A.C., Alves, G.E.S., 2006. Ativação de plaquetas de equinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 58, 149–157.
- Park, M.H., Igarashi, K., 2013. Polyamines and Their Metabolites as Diagnostic Markers of Human Diseases. *Biomol. Ther. (Seoul)*. 21, 1–9.
- Pegg, A.E., 2016. Functions of Polyamines in Mammals. *J. Biol. Chem.* 291, 14904–14912.
- Pegg, A.E., 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61, 880–894.
- Petterino, C., Argentino-Storino, A., 2006. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 213–219.
- Piao, Y., Liu, Y., Xie, X., 2013. Change trends of organ weight background data in sprague dawley rats at different ages. *J. Toxicol. Pathol.* 26, 29–34.
- Ramaiah, S.K., 2007. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1551–1557.
- Richelsen, B., Pedersen, S.B., Hougaard, D.M., 1989. Characterization of antilipolytic action of polyamines in isolated rat adipocytes. *Biochem. J.* 261, 661–665.
- Schmid, E., Yan, J., Hosseinzadeh, Z., Almilaji, A., Shumilina, E., Kuro-O, M., Borst, O., Gawaz, M., Lang, F., 2015. Up-regulation of megakaryocytic Na (+) /Ca(2+) exchange in klotho-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 177–82.
- Sellers, R.S., Mortan, D., Michael, B., Roome, N., Johnson, J.K., Yano, B.L., Perry, R., Schafer, K., 2007. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. *Toxicol. Pathol.* 35, 751–755.
- Shelepov, V.P., Chekulaev, V.A., Pasha-Zade, G.R., 1990. Effect of putrescine on carbohydrate and lipid metabolism in rats. *Biomed. Sci.* 1, 591–596.
- Sokol, P.P., Longenecker, K.L., Kachel, D.L., Martin, W.J., 1993. Mechanism of Putrescine Transport in Human Pulmonary Artery Endothelial Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 60–66.
- Svensson, K., 2012. Mechanistic studies on the role of polyamines and microvesicles in tumor growth and hypoxia-mediated angiogenesis. <https://lup.lub.lu.se/search/ws/files/4071587/2294184.pdf> (accessed 04.04.2017).

Til, H.P., Falke, H.E., Prinsen, M.K., Willems, M.I., 1997. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food Chem. Toxicol.* 35, 337–348.

Uslu, A., Bari, E., Erdoan, E., 2009. Ecological concerns over cemeteries. *African J. Agric. Res. Spec. Rev.* 4, 1505–1511.

WHO – World Health Organization, 1998. The impact of cemeteries on the environment and public health: an introductory briefing.

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/108132/1/EUR\\_ICP\\_EHNA\\_01\\_04\\_01\(A\).pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/108132/1/EUR_ICP_EHNA_01_04_01(A).pdf)  
(accessed 04.04.2017).

Żychowski, J., 2012. Impact of cemeteries on groundwater chemistry: A review. *CATENA* 93, 29–37.



## Artigo 4

### Danos no DNA de ratos Wistar induzidos pela poliamina putrescina

Franco Dani Campos-Pereira, Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar, Letícia de Sousa Franco, Guilherme Andrade Alves, Raíssa Ferraz Curtolo, Letícia Cristina Gonçalves, Raquel Vaz Hara, Maria Aparecida Marin-Morales

#### Highlights

- As poliaminas estão presentes em todas as células eucarióticas e desempenham atividades importantes nos processos celulares e fisiológicos.
- O necrochorume produzido pela decomposição cadavérica é a principal causa de contaminação ambiental por cemitérios.
- A putrescina é uma das moléculas constituintes do necrochorume.
- A exposição contínua a 46,3 mg/kg de putrescina causou danos constantes e progressivo no material genético de ratos Wistar.
- A concentração de 46,3 mg/kg induziu aumento na frequência de EPCMNs em medula óssea de ratos Wistar, certificando potencial mutagênico.

#### Resumo

A principal causa da poluição ambiental proporcionada pelos cemitérios é o líquido produzido pela decomposição cadavérica. Esse líquido é conhecido como necrochorume e é composto por água, sais minerais e substâncias orgânicas complexas, dentre as quais a poliamina putrescina. Como praticamente não existem informações sobre o potencial desta substância como contaminante ambiental, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico da putrescina. Para tanto, ratos Wistar foram expostos por 56 dias consecutivos às concentrações de 46,3, 138,9 e 231,5 mg/kg, referentes, a 10%, 30% e 50 % da DL<sub>50</sub> de putrescina. O efeito genotóxico da substância foi avaliado por meio do ensaio do cometa em células de sangue periférico de ratos, em 15, 30 e 56 dias de exposição. O efeito mutagênico foi avaliado pelo teste de micronúcleo em medula óssea no final do experimento (56 dias). Os resultados demonstraram que todas as concentrações testadas tiveram efeitos sobre os ratos, mas a concentração de 46,3 mg/kg foi a mais genotóxica para todos os períodos testados. A

menor concentração também induziu aumento de células micronúcleadas na medula óssea, indicando que a putrescina é capaz de causar instabilidade genética nos animais.

**Palavras-chave:** ensaio do cometa; teste de micronúcleo; interação com DNA; efeito genotóxicos; potencial mutagênico

## 1. Introdução

Diferentes fontes de contaminação agridem constantemente o meio ambiente. Dentre estas fontes, os cemitérios, que foram por muito tempo negligenciados quanto ao seu potencial poluidor, merecem hoje destaque, principalmente, quanto a sua potencialidade de contaminar águas subterrâneas (PACHECO et al., 1991). A principal causa de contaminação ambiental pelos cemitérios é o líquido liberado intermitentemente durante o processo de putrefação dos cadáveres, denominado de necrochorume (COSTA SILVA; FILHO, 2008). Oliveira et al. (2012) e Fineza (2008) afirmam que, devido a viscosidade e densidade do necrochorume em relação a água, as plumas de contaminação se espalham lentamente em direção ao gradiente hidráulico, atingindo grandes distâncias e contaminando, além do solo e águas superficiais, os lençóis freáticos e aquíferos. O necrochorume é constituído por 60% de água, 30% de minerais e 10% de substâncias orgânicas complexas, dentre elas a poliamina putrescina (OLIVEIRA et al., 2013).

A decomposição cadavérica se inicia pelo processo de autólise seguido de putrefação e, é nesta fase, que os tecidos moles sofrem decomposição por bactérias e enzimas e se transformam em gases, líquidos e sais minerais (DENT et al., 2004). Dentre as substâncias que são produzidas pela decomposição cadavérica, uma das que mais se destacam quanto as suas funções biológicas é a putrescina.

A putrescina (1,4 diaminobutano) é uma poliamina, muito importante nos processos fisiológicos, por se tratar de uma molécula precursora para outras duas poliaminas, a espermidina e espermina, ambas muito importantes nos processos de proliferação celular (PEGG, 2009; MICHAEL, 2016). Thomas e Thomas (2001) e Nowotarski et al. (2013) afirmam que as poliaminas têm papel importante no crescimento e diferenciação celular, além de destacada ação no controle de processos apoptóticos. Em quantidades fisiológicas, elas regulam a replicação do DNA e a transcrição do RNA (IGARASHI; KASHIWAGI, 2000; WALLACE et al., 2003), estabilizam membranas e agem como mensageiros intracelulares (GUGLIUCCI, 2004). Porém, os trabalhos de Moinard et al. (2005) e Bach et al. (2012) trazem que altas concentrações de poliaminas podem ser tóxicas, sendo capazes de induzir

morte celular por mecanismos oxidativos. Battaglia et al. (2013) descreve que o catabolismo das poliaminas produz peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), substância esta que é capaz de danificar o DNA e outros componentes celulares. Por esse motivo, os níveis intracelulares de poliaminas são controlados por vias metabólicas altamente reguladas. Contudo, esses mecanismos são muito sensíveis e podem ser alterados tanto por variações ambientais como por estresse orgânico.

O aumento nos níveis de poliaminas está fortemente ligado ao aparecimento de neoplasias (CASERO; MARTON, 2007). Gerner e Meyskens (2004) relatam que existem evidências de que a putrescina exerça papel importante na promoção da transformação maligna. De acordo com estes autores, células de câncer colorretal apresentam níveis maiores de poliaminas que os tecidos adjacentes ou que o tecido normal equivalente, destacando a possível importância da putrescina exógena no seu desenvolvimento.

Os estudos de genotoxicidade de xenobióticos trazem informações importantes, quanto às diferentes sensibilidades do material genético dos organismos, dentre eles o do homem, a um dado poluente (DEARFIELD, 2002). Esses efeitos podem ser dependentes de características como concentração da substância, natureza química e condições ambientais. Também é importante ressaltar que exposições crônicas a baixas doses de uma substância com potencial acumulativo, pode induzir danos no material genético do organismo exposto (BENACHOUR et al., 2007; ZHAO et al., 2009). Os efeitos genotóxicos podem ser transitórios, ou seja, são susceptíveis de reparo, diferentemente dos mutagênicos, que se caracterizam em alterações permanentes no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD et al., 2002).

A avaliação da genotoxicidade por métodos *in vivo* geralmente é realizada pela associação do ensaio do cometa com o teste de micronúcleo em medula óssea, por esses ensaios serem considerados endpoints complementares e eficientes na determinação dos efeitos toxicogênicos de substâncias químicas (RECIO et al., 2010; VAZQUES, 2010; ROTHFUSS et al., 2011). Embora os estudos *in vitro* sejam importantes para caracterizar a toxicidade de uma substância, Rothfuss et al. (2011) destacam que os estudos *in vivo* são essenciais para estimar os riscos reais de uma substância. As condições que ocorrem *in vivo*, em termos de exposição e metabolismo, são mais aplicáveis aos seres humanos do que as condições avaliadas em testes desenvolvidos com culturas de células.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos toxicogênicos da putrescina, por meio do ensaio de cometa realizado com células sanguíneas e por meio do teste do micronúcleo, em células de medula óssea de ratos Wistar.

Os resultados dessa avaliação poderão contribuir com informações relevantes quanto ao potencial poluidor do necrochorume, mais especificamente o da putrescina. Esses resultados poderão servir de base para avaliações de outros parâmetros genéticos, que possam caracterizar os reais perigos da contaminação promovida por cemitérios; contribuir com as ações dos órgãos gestores de meio ambiente, quanto às decisões de liberação de novas áreas para implantação de cemitérios ou de monitoramentos de cemitérios já instalados; diminuir impactos ao meio ambiente e, assim, melhorar a saúde pública.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Delineamento experimental**

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da FHO-UNIARARAS (Protocol nº 024/2013) e conduzido de acordo com as diretrizes éticas do Comitê de ética em pesquisa animal brasileiro (COBEA). O experimento foi realizado no centro de experimentação animal da Fundação Hermínio Ometto (FHO-UNIARARAS), onde 25 ratos Wistar machos adultos, com 120 dias de idade, foram mantidos em temperatura controlada (25° C), umidade do ar de 60% e ciclos claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração purina *ad libitum* durante todo o período experimental. Os animais foram divididos em cinco grupos de cinco animais cada. O grupo controle (Co) recebeu apenas água filtrada; o grupo controle positivo (Pc) recebeu água filtrada e, na véspera da eutanásia, uma dose de metanossulfonato de metila (MMS); e os três grupos experimentais T1, T2 e T3 receberam, em cada um dos tratamentos, uma concentração de putrescina em solução aquosa.

### **2.2 Administração dos tratamentos**

Foram selecionadas e testadas três diferentes concentrações da poliamina putrescina (1,4-Diaminobutano, peso molecular 88,15 g/mol, CAS-No: 110.60.1 - Sigma-Aldrich, com pureza de 99,0%), definidas a partir da DL<sub>50</sub> oral para ratazanas de 463 mg/kg: 10 % da DL<sub>50</sub> (T1- 46,3 mg/kg), 30% (T2- 138,9 mg/kg) e 50% (T3- 231,5 mg/kg). Para o teste de micronúcleo, o controle positivo utilizado foi o metanossulfonato de metila (MMS - Sigma, St. Louis, MA, USA), na concentração de 20 mg/kg, aplicado 24 h antes da eutanásia (KURIYAMA et al., 2005). Os animais utilizados no estudo apresentavam-se com peso corpóreo em torno de 300-350 mg. O volume das substâncias testadas (putrescina e MMS) foi administrado de acordo com o peso corpóreo de cada animal. A substância foi administrada via gavagem, por um período de 56 dias consecutivos.

### 2.3 Coleta das amostras

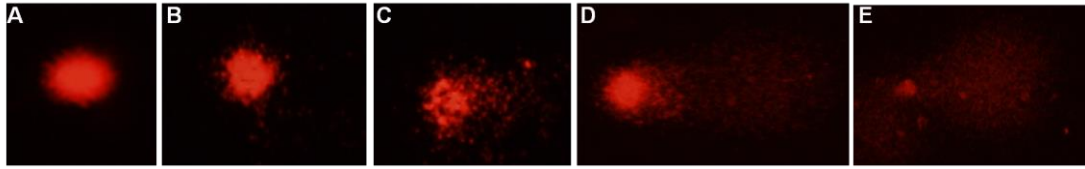
Amostras de sangue foram obtidas por meio de punção caudal (15 e 30 dias) e por punção cardíaca (56 dias), com uma seringa de 5 mL. Para a punção cardíaca, os animais foram anestesiados com solução de Xilazina (Rompun® - Bayer S.A. – 20 mg/mL) e Cetamina (Ketalar® - Parke, Davis & Co.- 50 mg/mL), submetidos a labarotomia medial e expansão da cavidade torácica, para expor o coração para a realização da coleta. Na sequência, os animais foram dissecados, para a retirada do fêmur e obtenção de células da medula óssea, a serem usadas no teste de micronúcleo. Imediatamente após a coleta, o sangue foi utilizado no preparo das lâminas do ensaio do cometa.

### 2.4 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), seguido de algumas modificações. Alíquotas de 40 µL de cada amostra sanguínea foram misturadas a 240 µL de agarose de baixo ponto de fusão (low melting point - LMP - 37° C). As suspensões sanguíneas foram aplicadas sobre lâminas previamente preparadas com agarose normal (normal melting point - NMP) e recobertas com lamínulas, para posterior refrigeração à 4° C por 20 minutos. As lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM de Tris, 1% de Triton X-100, 10% DMSO, pH 10), por 1 hora a 4 ° C, no escuro. As lâminas foram colocadas horizontalmente, lado a lado em uma cuba de eletroforese, onde foi adicionado, cuidadosamente, uma solução tampão (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, com pH>13) até cobrir as lâminas, por 20 minutos, para a desnaturação do DNA. A corrida eletroforética foi realizada sobre refrigeração por 20 minutos a 39 V e 300 mA. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas por 15 minutos em tampão de neutralização (0,4 M de tris-HCL, pH 7,2) e fixadas por 10 min em etanol absoluto. As lâminas foram coradas com GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) e analisadas em microscópio de fluorescência Olympus BX60 (excitação:  $\lambda = 420-490$  nm, barreira:  $\lambda = 520$  nm) em objetiva de 40x. Foram analisados 100 nucleóides por lâminas, duas lamínas por animal. Os nucleóides foram classificados visualmente de acordo a migração dos fragmentos em: classe 0 - nucleóides sem dano; (classe 1) – nucleóide ligeiramente danificado; classe 2 - nucleóide com danos médios; classe 3 - nucleóide altamente danificado e classe 4 - nucleóide com todo DNA na calda e uma pequena cabeça (COLLINS et al., 1997) (**Figura 1**).

Os resultados foram apresentados de acordo com a frequência de danos avaliada em cada uma das classes de cometa, em número total de células danificadas e em Índice de Danos

por grupo (DI) (BRANCO et al., 2015), calculado por meio da seguinte equação:  $DI = NC0x0 + NC1x1 + NC2x2 + NC3x3 + NC4x4$ , onde NC é o número de nucleóides observados em cada classe.



**Figura 1:** Nucleóides exemplificados de acordo com a proposta de Collins et al. (1997) A: classe 0; B: classe 1; C: classe 2; D: classe 3; E Classe 4.

### 2.5 Teste do Micronúcleo em medula óssea

A técnica utilizada para o estudo de MN em células de medula óssea foi descrita por Schmid (1975), e realizada de acordo com a OEDC (2016). O fêmur dos animais foi dissecado e as epífises foram seccionadas. O Canal medular foi lavado com 1 mL de soro fetal bovino (FBS) (CULTILAB), para retirada completa do conteúdo medular. As amostras de medula foram centrifugadas a 1000 RPMs por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet homogeneizado em 1 mL de FBS novo. Uma gota da suspensão celular foi depositada sobre uma lâmina e realizada a distensão do material medular (MAISTRO, 2014; CAMPOS-PEREIRA et al., 2017). As distensões celulares foram colocadas em estufa a 37° C, por aproximadamente 2 horas e, em seguida, fixadas por flambagem em chama de lamparina. As células foram coradas com solução de Wright e Giemsa's. As lâminas foram codificadas e analisadas em teste cego, ao microscópio de luz, na objetiva de imersão (100x). Para determinar o potencial clastogênico/aneugênico da putrescina, foram contabilizados 4000 eritrócitos policromáticos (EPCs) por animal e quantificados os que apresentavam micronúcleos (EPCMNs). Para a avaliação do efeito citotóxico da substância, foi calculada a razão EPC/ENC (eritrócitos normocromáticos), contabilizados em 500 eritrócitos de animal (GOLLAPUDI; MCFADDEN, 1995). A substância testada pode ser considerada mutagênica quando induz aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados, em relação ao controle negativo (MANSOUR et al., 2008; CAMPOS-PEREIRA et al., 2012).

### 1.2 Estatística

Todos os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão (SD). A comparação dos resultados foi realizada de acordo com o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Como os resultados do cometa apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste ANOVA, pós teste de Tukey. Os dados de frequência de MN e a relação EPC/ENC não apresentaram distribuição normal sendo, por esta razão, utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e Dunn's multiple comparisons test. Todos os dados foram analisados pelo programa Graphpad Prism 6.0, considerando a significância para  $p < 0,05$ .

## 2. Resultados

### 2.1 Ensaio do Cometa

O potencial genotóxico da putrescina foi avaliado em células sanguíneas de sangue periférico, cujas amostras foram coletadas por punção na veia caudal, para os ensaios de 15 e 30 dias, e cardíaca, para o ensaio de 56 dias. O efeito genotóxico desta substância foi observado nos três tempos avaliados e os resultados da frequência de danos e da quantidade total de células com danos estão apresentados na **tabela 1**. A concentração de 46.3 mg/kg apresentou potencial genotóxico para os três períodos avaliados. As demais concentrações (138,9 e 231,5 mg/kg) foram genotóxicas apenas para o período de 56 dias de exposição. Estes resultados sugerem que a exposição contínua à putrescina aumenta os efeitos genotóxicos induzidos por essa substância nos animais expostos. Os resultados dos índices de dano no DNA estão apresentados na **figura 2**.

O valor do índice de danos obtido pela concentração de 43,6 mg/kg em 56 dias de exposição foi maior inclusive que o obtido pelo controle positivo (MMS). Uma das possibilidades é que o MMS foi administrado apenas por 24 horas e a putrescina administrada de maneira crônica, por 56 dias, intensificando, desta maneira, o possível efeito sobre o material genético dos animais.

### 2.2 Teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores

Os efeitos clastogênicos e aneugênicos da putrescina foram analisados pelo teste do micronúcleo (formação de eritrócitos policromáticos micronucleados na medula óssea dos animais expostos). O número de EPCMNs aumentou significativamente no grupo exposto a menor concentração testada (46,3 mg/kg = T1). Esses resultados demonstram que a putrescina pode induzir instabilidade genética nos animais expostos, mesmo em baixas concentrações.

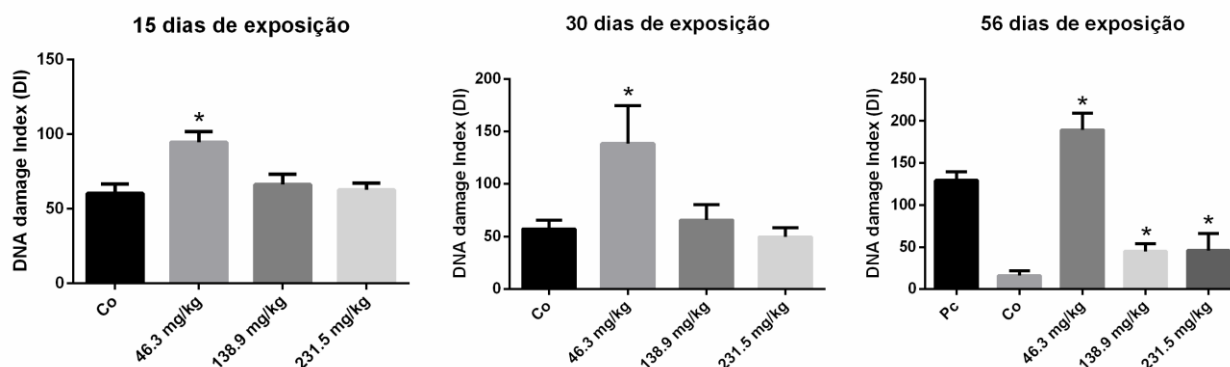
Em relação a frequência de EPC/ENC, não foi observada nenhuma alteração significativa, indicando que não houve um efeito citotóxico para os eritrócitos (**Tabela 2**).

**Tabela 1:** Genotoxicidade da putrescina para sangue periférico de ratos Wistar, avaliada por meio do ensaio do cometa.

Dias de exposição	Concentrações de putrescina	Frequência de células em cada classe de cometa (Média ± DP)					Total de células com danos <sup>1</sup>
		Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	
15 dias	Co	51.80±3.37	44.60±3.98	3.20±1.47	0.20±0.4	0	48.00±3.35
	46.3 mg/kg	40.80±2.79	28.60±1.02	26.80±1.33	3.60±1.36	0.40±0.49	<b>59.40±2.87*</b>
	138.9 mg/kg	59.20±3.31	30.80±2.48	7.40±1.50	2.60±0.8	0	40.80±3.31
	231.5 mg/kg	60.60±2.42	30.40±2.33	6.60±1.62	2.00±0.63	0	39.00±2.61
30 dias	Co	48.80±7.46	45.00±5.39	5.80±3.49	0.20±0.45	0	51.00±6,32
	46.3 mg/kg	30.60±8.94	25.20±8.47	24.80±4.75	18.60±8.16	2.00±1.90	<b>70.60±8,24*</b>
	138.9 mg/kg	55.40±6.12	29.00±2.83	12.40±3.50	4.00±1.90	0	45.40±6.56
	231.5 mg/kg	61.40±4.45	29.80±5.93	6.40±2.4	2.40±2.19	0	38.60±4.45
56 dias	Co	86.66±3.72	9.83±4.54	2.83±1.47	1±1.55	0	11.60±4,27
	46.3 mg/kg	26.33±3.58	10.50±7.29	21.50±7.96	40.33±9.43	1.83±1.99	<b>75.40±3.47<sup>a</sup></b>
	138.9 mg/kg	69.83±5.82	18.33±4.85	9.83±4.41	2.67±2.27	0.17±0.32	<b>28.80±5.98<sup>a</sup></b>
	231.5 mg/kg	70.17±6.68	17.17±4.54	8.50±2.17	3.33±4.46	0.50±1.22	<b>29.50±7.97<sup>a</sup></b>
	<b>Controle Positivo<sup>2</sup></b>	23.10±6.12	42.30±6.90	18.60±3.60	14.40±3.72	1.70±1.25	<b>77.00±6.45*</b>

1-Total de células com danos (Classe 1+2+3+4). 2- Controle positivo foi realizado com MMS, exposto por 24 horas antecedentes a eutanásia. a- p < 0.0001; \* p<0.05.





**Figura 2:** Índices de danos no DNA de células sanguíneas de ratos Wistar avaliados durante os períodos de 15, 30 e 56 dias de exposição. Os índices foram calculados pela fórmula  $NC0 \times 0 + NC1 \times 1 + NC2 \times 2 + NC3 \times 3 + NC4 \times 4 = ID$  onde NC é o número de nucleóides observados em cada classe.

**Table 2:** Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCE-MN), observados em células de medula óssea de ratos Wistar (R) tratados com diferentes concentrações de putrescina.

Concentrações de putrescina	Número de EPCMN por animal					EPCMN Média±DP	EPC/ENC Média±DP
	R1	R2	R3	R4	R5		
Co	6	7	3	6	7	5.80±1.64	1.20±0.08
MMS	34	27	24	35	37	31.40±5.59*	1.24±0.11
46.3 mg/Kg	14	13	15	13	17	<b>14.40±1.67*</b>	1.31±0.15
138.9 mg/Kg	8	14	8	10	11	10.20±2.49	1.18±0.03
251.5 mg/Kg	10	10	12	9	11	10.40±1.14	1.30±0.06

Foram analisadas 4000 EPC por animal. Valores representados por média ± Desvio padrão. (n= 5 animais por grupo). Valores estatísticos determinados pelo teste Kruskal Wallis. \*Resultados significativos para  $p < 0.05$ . DP: Desvio Padrão; MMS: Metanossulfonato de metila (20 mg/kg).

### 3. Discussão

A putrescina é uma poliamina que desempenha importantes funções fisiológicas em diferentes células e em diferentes organismos (BATTAGLIA et al., 2013; PARK; IGARASHI, 2013; PEGG, 2016). Esta poliamina é produzida pela descarboxilação do aminoácido ornitina, constituindo um dos subprodutos do necrochorume, líquido produzido pela decomposição cadavérica. A putrescina, juntamente com a cadaverina, apresenta um alto potencial de contaminação ambiental, proporcionado pelas atividades orgânicas inerentes aos cemitérios (DENT et al., 2004; COSTA SILVA; FILHO, 2008; OLIVEIRA et al., 2013; CAMPOS-PEREIRA et al., 2016). No entanto, as informações sobre os efeitos dessa

substância como contaminante ambiental são restritas, pois não é conhecido, por exemplo, quanto a poliamina está biodisponível durante o processo de percolação do necrochorume no solo e nem o quanto dela pode atingir as águas subterrâneas. Diante disso, o presente trabalho avaliou, por meio de exposição crônica de ratos wistar a diferentes concentrações de putrescina, quais os possíveis efeitos toxicogênicos desta poliamina sobre as células de sangue periférico e de medula óssea dos organismos.

O uso de biomarcadores de genotoxicidade permitem detectar sinais precoces da ação de xenobióticos em diferentes organismos. O ensaio do cometa e o teste de micronúcleo são os ensaios biológicos mais frequentemente selecionados para estudos *in vivo* e *in vitro*. Esses ensaios, considerados de alta sensibilidade e de baixo custo, permitem avaliar as possíveis alterações que uma determinada substância possa promover no material genético dos organismos. Assim, a abordagem conjunta destes dois biomarcadores de genotoxicidade garantem uma maior fidelidade dos resultados e, conseqüentemente, um melhor conhecimento da ação biológica da substância estudada (SEVERI-AGUIAR et al., 2013; SCHAUMBURG et al., 2016).

No presente trabalho, o ensaio do cometa foi realizado com leucócitos de sangue coletado por punção na veia caudal (coletas de 15 e 30 dias) e por punção cardíaca (coleta de 50 dias), expostos a três diferentes concentrações de putrescina (43,6; 138,9 e 231,5 mg/kg). A concentração de 43,6 mg/kg foi genotóxica para os três períodos avaliados. As concentrações de 138,9 e 231,5 mg/kg se mostraram genotóxicas, apenas para os testes de 56 dias de exposição (**figura 2**).

Estes resultados alertam para o perigo de contaminações com essa substância, uma vez que em baixas concentrações, ela já pode induzir efeitos danosos tanto à biota local como ao homem, principalmente àqueles expostos ocupacionalmente a solos ou a águas contaminadas com essa substância. Como o necrochorume tem produção intermitente em áreas de cemitérios, a putrescina pode representar uma fonte contínua de contaminação para o ambiente, com conseqüências danosas para a saúde ambiental. Ainda de acordo com os resultados obtidos, a menor concentração avaliada apresentou um efeito crescente no índice de dano no DNA, em relação ao tempo de exposição, demonstrando que a exposição contínua a essa substância pode intensificar seus efeitos genotóxicos.

As poliaminas têm grande importância para a manutenção, crescimento e função das células, atividades que estão relacionada a um amplo complexo de sistemas de transporte, absorção, síntese e catálise das células de mamíferos (HUANG et al., 2005). Pegg (2013) afirmam que quantidades elevadas de poliaminas ativam mecanismos de catabolismo celular,

capazes de gerar uma excessiva produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e de aldeídos reativos, sendo esses últimos derivados do metabolismo de aminoácidos, carboidratos, lipídios e aminas biogênicas. Os aldeídos estão envolvidos com um amplo espectro de processos bioquímicos, fisiológicos e farmacológicos naturais da célula. Contudo, Voulgaridou et al. (2011) afirmam que os aldeídos também podem estar envolvidos em processos de peroxidação lipídica, decorrentes, principalmente, da produção de malondialdeído (MDA). O MDA é um composto capaz de danificar as moléculas de DNA, tanto por formação de adutos exocíclicos como por adição de grupos aminas entre as bases do DNA (CADET et al., 2010). Essa informação é reforçada pelos relatos de Silerme et al. (2014) de que a formação de adutos no DNA podem estar relacionados com a adição de grupos aminos primários das poliaminas na posição C8 do radical guanina. Essas afirmações são corroboradas por Hidalgo e Zamora (2000), que afirmam que é possível estabelecer uma correlação entre aumento dos níveis de MDA e potencial genotóxicos de uma substância.

Ainda quanto à possibilidade das poliaminas induzirem efeitos toxicogenéticos, em células de mamíferos, Saminathan et al. (2002) e Huang et al., (2005) relatam que as poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) são moléculas carregadas positivamente e que, em condições fisiológicas ideais (concentração iônica e pH), podem se associar, por interações eletrostáticas, com macromoléculas que apresentem carga negativa, como DNA e RNA. Todos esses dados de literatura corroboram os resultados do ensaio do cometa realizado no presente estudo, que mostram que a putrescina apresenta um alto potencial genotóxico tempo de exposição dependente, mesmo em baixas concentrações, que pode ser decorrente da sua possível degradação em substâncias altamente reativas com as macromoléculas biológicas, como o DNA.

Uma outra contribuição deste trabalho foi a investigação *in vivo* do efeito aneugênico/clastogênico da poliamina putrescina, pelo teste do micronúcleo. Esse teste tem sido amplamente usado na avaliação do potencial genotóxico de substâncias, tanto em teste *in vitro* como *in vivo*, sendo que os testes *in vivo* são os que oferecem maiores informações sobre as condições experimentais, tais como o metabolismo, a farmacocinética, e a eficiência dos mecanismos de reparo da molécula do DNA (KRISHNA; HAYASHI, 2000; MAISTRO, 2014).

Os micronúcleos podem ser induzidos por vários fatores, como estresse oxidativo, defeitos nos checkpoints do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA, deficiência nutricional requerida como co-fatores do metabolismo do DNA e na maquinaria da segregação cromossômica (BONASSI et al., 2006).

Pelo ensaio do micronúcleo, foi observado um aumento significativo no número de EPCMNs nos animais expostos a concentração de 46,3 mg/kg. Estes dados corroboram os resultados do ensaio do cometa já apresentados, onde esta mesma concentração também apresentou um maior potencial genotóxicos para as células de sangue de ratos Wistar. Foi também observada a formação de micronúcleos pela putrescina em experimentos *in vitro* desenvolvidos por Campos-Pereira et al. (2016) com cultura de células HepG2. As células desta cultura foram expostas por um período de 24 horas às mesmas concentrações deste trabalho. Os autores observaram que, em todas as concentrações testadas, houve um aumento significativo no número de micronúcleos. Foram também observados, neste estudo, efeitos genotóxicos da putrescina para o organismo teste *Allium cepa*. Estes testes mostraram que houve um aumento no número de aberrações cromossômicas, principalmente aderências cromossômicas quando as radículas desta planta foram expostas a concentração de 23 mg/ml (CAMPOS- PEREIRA et al., 2015).

De acordo com as informações apresentadas, foi possível propor um mecanismo de ação da putrescina sobre o material genético, conforme proposto a seguir: A exposição à putrescina fez com que os níveis intracelulares de poliaminas aumentassem. Esse processo ativou as vias de catabolismo que controlam a homeostase celular, para reduzir os níveis dessas substâncias dentro das células. Os processos catabólicos promoveram um aumento do estresse oxidativos, caracterizado pelo aumento de produção de radicais livres, substâncias que têm o material genético como um de seus principais alvos.

Desta forma, podemos inferir que os danos observados no material genético dos animais testados foram provocados pela indução de estresse oxidativo, decorrentes da ação de subprodutos derivados da degradação da putrescina, que incorreram em peroxidação lipídica. Outro mecanismo de ação pode ter sido desencadeado pela própria putrescina, devido a sua capacidade de se ligar à molécula de DNA e formar adutos que levam a quebras desta molécula.

#### **4. Conclusão**

Os danos genotóxicos e mutagênicos ocasionado pela exposição dos ratos à menor concentração de putrescina foram maiores que os induzidos pelas concentrações mais altas aqui testadas. Também foi observado que exposições contínuas à putrescina, mesmo em baixas concentrações, podem levar a maiores danos na molécula de DNA do organismo exposto, dados estes que alertam para o potencial genotóxico da substância.

Os danos promovidos pela putrescina podem ser decorrentes da capacidade tanto da substância como dos subprodutos de sua degradação interagirem com a molécula de DNA.

Esses resultados alertam para a preocupação de possíveis contaminações ambientais por essa substância, principalmente em ambientes de cemitério, uma vez que esse químico, nestes locais, pode ser liberado de forma contínua e em baixas concentrações.

No entanto, para avaliar corretamente os riscos ambientais, é necessário determinar, com precisão, os produtos de decomposição desta substância (tanto em termos da quantidade como da resistência dos poluentes), nas mais variadas malhas e condições ambientais.

## 5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Renata Barbieri Pulz do laboratório de micromorfologia da FHO-UNIARARAS pelo suporte técnico na realização dos experimentos e a Michele Berreta, Cleiton P. de Souza, Cristiane Talhiaferro e Leonardo Ramos Anacleto pela ajuda na realização do ensaio do cometa. Um agradecimento especial a FAPESP (Grant number 2013/08279-4) pelo apoio financeiro concedido.

## 6. Referências Bibliográficas

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. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 114–119, 2012.

BATTAGLIA, V.; DESTEFANO SHIELDS, C.; MURRAY-STEWART, T.; CASERO, R. A. Polyamine catabolism in carcinogenesis: potential targets for chemotherapy and chemoprevention. **Amino Acids**, v. 46, n. 3, p. 511–519, 2014.

BENACHOUR, N.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; SERALINI, G. Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination☆. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 222, n. 2, p. 129–140, 2007.

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. 625–631, 2006.

BRANCO, C. DOS S.; LIMA, É. D. DE; RODRIGUES, T. S.; et al. Mitochondria and redox homeostasis as chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEp-2 cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 108–118, 2015.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.-L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 1, p. 9–21, 2010.

CAMPOS-PEREIRA, F. D.; CAGNONI, L. B.; HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of toxicogenetics damages of the putrescine polyamine on HepG2 cell culture. **Toxicology Letters**, v. 259, p. S181–S182, 2016.

CAMPOS-PEREIRA, F. D.; GONÇALVES, L.; HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. Action of a polyamine putrescine in genetic material of *Allium cepa*. **Toxicology Letters**, v. 238, n. 2, p. S120–S121, 2015.

CAMPOS-PEREIRA, F. D.; LOPES-AGUIAR, L.; RENOSTO, F. L.; et al. Genotoxic effect and rat hepatocyte death occurred after oxidative stress induction and antioxidant gene downregulation caused by long term fluoride exposure. **Chemico-Biological Interactions**, v. 264, p. 25–33, 2017.

CAMPOS-PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, C. A.; PIGOSO, A. A.; et al. Early cytotoxic and genotoxic effects of atrazine on Wistar rat liver: a morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular study. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 78, p. 170–177, 2012.

CAMPOS-PEREIRA, F. D.; VEIGA-MENONCELLO, A. C. .; MARIN-MORALES, M. A. DNA damage induced by diet. In: G. D. . Severi-Aguiar; A. A. Alves (Orgs.); **Toxic Effects of Chemicals in Food, Chemical and Consumer Product Safety**, 2014. Kerala: Research Signpost.

CASERO, R. A.; MARTON, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 5, p. 373–390, 2007.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–151, 2008. Oxford University Press.

COLLINS, A.; DUŠINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; et al. Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, n. 2, p. 139–146, 1997.

COSTA SILVA, R. W. C.; FILHO, W. M. Cemitérios como Áreas Potencialmente Contaminadas. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais** –, v. 9, n. 9, p. 26–35, 2008.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; et al. 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. Springer-Verlag.

GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 10, p. 781–792, 2004. Nature Publishing Group.

GOLLAPUDI, B. B.; MCFADDEN, L. G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutation research**, v. 347, n. 2, p. 97–9, 1995.

- GUGLIUCCI, A. Polyamines as clinical laboratory tools. **Clinica Chimica Acta**, v. 344, n. 1–2, p. 23–35, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15149868>>. Acesso em: 8/4/2017.
- HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology letters**, v. 90, n. 2–3, p. 183–8, 1997.
- HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, v. 90, n. 2–3, p. 183–188, 1997.
- HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Modification of bovine serum albumin structure following reaction with 4,5(E)-epoxy-2(E)-heptenal. **Chemical research in toxicology**, v. 13, n. 6, p. 501–8, 2000.
- HUANG, Y.; PLEDGIE, A.; CASERO, R. A.; DAVIDSON, N. E. Molecular mechanisms of polyamine analogs in cancer cells. **Anti-cancer drugs**, v. 16, n. 3, p. 229–41, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15711175>>. Acesso em: 11/4/2017.
- IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 1, p. 39–51, 2010.
- 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.
- KURIYAMA, K.; YOKOI, R.; KOBAYASHI, K.; et al. A time-course characterization of male reproductive toxicity in rats treated with methyl methanesulphonate (MMS). **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 30, n. 2, p. 91–102, 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.
- MANSOUR, S. A.; MOSSA, A. H.; HEIKAL, T. M. Cytogenetics and hormonal alteration in rats exposed to recommended safe doses of spinosad and malathion insecticides. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 10, n. 1, p. 9–14, 2008.
- MICHAEL, A. J. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 29, p. 14896–903, 2016. American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; DE BANDT, J.-P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 24, n. 2, p. 184–97, 2005.
- MURRAY-STEWART, T. R.; WOSTER, P. M.; CASERO, R. A. Targeting polyamine metabolism for cancer therapy and prevention. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 19, p. 2937–2953, 2016.
- NOWOTARSKI, S. L.; WOSTER, P. M.; CASERO, R. A.; JR. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 15, p. e3, 2013. NIH Public Access.
- 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..

- OUAMEUR, A. A.; TAJMIR-RIahi, H.-A. Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 40, p. 42041–54, 2004. American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- PACHECO, A.; MENDES, J. M. B.; MARTINS, T.; HASSUDA, S.; KIMMELMANN, A. A. Cemeteries - A Potential Risk to Groundwater. **Water Science and Technology**, v. 24, n. 11, 1991.
- PEGG, A. E. Functions of Polyamines in Mammals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 29, p. 14904–14912, 2016.
- PEGG, A. E. Toxicity of Polyamines and Their Metabolic Products. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 12, p. 1782–1800, 2013.
- RECIO, L.; HOBBS, C.; CASPARY, W.; WITT, K. L. Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol. **The Journal of toxicological sciences**, v. 35, n. 2, p. 149–62, 2010.
- ROTHFUSS, A.; HONMA, M.; CZICH, A.; et al. Improvement of in vivo genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 723, n. 2, p. 108–120, 2011.
- SAMINATHAN, M.; THOMAS, T.; SHIRAHATA, A.; PILLAI, C. K. S.; THOMAS, T. J. Polyamine structural effects on the induction and stabilization of liquid crystalline DNA: potential applications to DNA packaging, gene therapy and polyamine therapeutics. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 17, p. 3722–31, 2002. Oxford University Press.
- SCHAUMBURG, L. G.; SIROSKI, P. A.; POLETTA, G. L.; MUDRY, M. D. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 71–78, 2016.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation research**, v. 31, n. 1, p. 9–15, 1975.
- SILERME, S.; BOBYK, L.; TAVERNA-PORRO, M.; et al. DNA-Polyamine Cross-Links Generated upon One Electron Oxidation of DNA. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 6, p. 1011–1018, 2014. American Chemical Society.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.
- TETI, D.; VISALLI, M.; MCNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 781, n. 1–2, p. 107–49, 2002.
- THOMAS, D. J. The Die Is Cast: Arsenic Exposure in Early Life and Disease Susceptibility. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 12, p. 1778–1781, 2013.



- 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.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000.
- VASQUEZ, M. Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**, v. 25, n. 2, p. 187–199, 2010. Oxford University Press.
- VOULGARIDOU, G.-P.; ANESTOPOULOS, I.; FRANCO, R.; PANAYIOTIDIS, M. I.; PAPPA, A. DNA damage induced by endogenous aldehydes: Current state of knowledge. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1, p. 13–27, 2011.
- WALLACE, H. M.; FRASER, A. V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochemical Journal**, v. 376, n. 1, p. 1–14, 2003.
- 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.

## Artigo 5

### **Avaliação dos efeitos reprodutivos em ratos wistar induzidos pela poliamina putrescina**

Franco Dani Campos-Pereira, Letícia de Sousa Franco, Raíssa Ferraz Curtolo,  
Guilherme Andrade Alves, Letícia Cristina Gonçalves, Raquel Vaz Hara,  
Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar; Maria Esméria Corezola do Amaral;  
Maria Aparecida Marin-Morales

#### **Highlights**

- A putrescina é uma poliamina que desempenha importantes funções fisiológicas nos organismos.
- A exposição a putrescina induziu uma diminuição na produção diária de espermatozoides em ratos Wistar.
- A expressão de enzimas da via da esteroidogênese foram diminuídas nos ratos expostos a putrescina
- A Putrescina induziu estresse oxidativo em testículos e epidídimos de ratos Wistar.

#### **Resumo**

O aumento na incidência de casos de infertilidade, anormalidades estruturais no aparelho reprodutor masculino, diminuição da qualidade espermática e aumento na incidência de câncer testicular, podem estar relacionados com o aumento de substâncias químicas com atividade endócrinas presentes no ambiente. Os cemitérios são fontes de contaminação ambiental de solos, águas superficiais e subterrâneas, que podem ter efeito sobre a biota local do ambiente contaminado e também sobre o homem. Essa contaminação é dada por um líquido produzido pela decomposição cadavérica, constituído de substâncias complexas, como a poliamina putrescina, que desempenha importantes funções fisiológicas nos organismos. Essa pesquisa monitorou os efeitos da putrescina sobre a função reprodutiva de ratos Wistar. Foram realizados ensaios com ratos adultos, divididos em três grupos experimentais (T1 = 46,3 mg/kg, T2 = 138,9 mg/kg e T3= 231,5 mg/kg), expostos por 56 dias consecutivos à

putrescina. Foram realizadas contagens espermáticas, avaliação da expressão de proteínas envolvidas na via da esteroidogênese, ensaios para avaliação de indução de estresse oxidativo e análises morfológicas dos testículos dos animais. A putrescina influenciou negativamente na produção espermática e na expressão das proteínas CYP11A1, 17 $\beta$ -HSD e StAR. Induziu estresse oxidativo e causou alterações morfológicas nos epidídimos e testículos. Esses resultados demonstram que a putrescina pode interferir sobre vários parâmetros reprodutivos e alertam para a importância desta substância como um perigoso contaminante ambiental.

**Palavras-chaves:** morfometria, contagem espermática, esteroidogênese, estresse oxidativo.

## 1. Introdução

A exposição dos seres vivos a uma grande variedade de poluentes ambientais tem sido, atualmente, uma das maiores preocupações científicas (MANFO et al., 2014). A Organização mundial da saúde (OMS) estima que cerca de 25% das doenças que acometem hoje a população humana está associada à exposição prolongada a contaminantes ambientais (WHO, 2016).

O sistema reprodutor masculino é altamente sensível aos xenobióticos. Essas substâncias podem atuar por vários mecanismos e em várias vias dos sistemas biológicos, como os sistemas reprodutivos, onde podem acarretar vários distúrbios, dentre eles a infertilidade. A espermatogênese, que é um processo contínuo de divisão e diferenciação celular, também pode ser afetada por agentes químicos, cuja consequência pode ser a baixa produção espermática e alterações morfológicas nos espermatozóides, alterações que podem culminar em infertilidade ou fertilidade diminuída. Por esse motivo, as contaminações ambientais tem sido motivo de muita preocupação nas últimas décadas (HAUSER; SOKOL, 2008; BONDE, 2010; WONG; CHENG, 2011; VECOLI et al., 2016).

Evidências científicas sugerem que uma resposta comum à exposição a tóxicos ambientais é a indução de estresse oxidativo nos testículos, efeito já observado em  $\leq 80\%$  dos homens inférteis clinicamente comprovados. (WONG; CHENG, 2011). A infertilidade não é apenas uma questão de saúde pública, mas também um problema social. Os crescentes índices de degradação do meio ambiente afetando as questões reprodutivas desencadeariam muitos prejuízos sociais, como a escassez de mão-de-obra refletindo numa sobrecarga da sociedade (DENG et al. 2016).

Dentro deste cenário de contaminação do meio ambiente, os cemitérios têm se destacado quanto a sua potencialidade de contaminar as águas superficiais e subterrâneas (PACHECO et al., 1991; ZYCHOSKY, 2012).

A principal causa de contaminação ambiental dos cemitérios é o líquido liberado, intermitentemente, durante o processo de putrefação dos cadáveres. A decomposição dos corpos consiste de fermentação de matéria orgânica por bactérias endógenas e exógenas, que decompõem carboidratos, proteínas e lipídeos (OLIVEIRA et al., 2013). Durante este processo, os tecidos moles são física, química e biologicamente transformados em gases, líquidos e minerais, formando uma massa putrescente de forte e desagradável odor, composta por 60% de água, 30% de minerais e 10% de substâncias orgânicas complexas (COSTA SILVA; FILHO, 2008; OLIVEIRA et al., 2013). Embora a composição dessa massa putrescente não seja completamente conhecida, sabe-se que entre os seus compostos químicos existem, pelo menos, duas aminas biogênicas, a diamina cadaverina ( $C_5H_{14}N_2$ ) e a poliamina putrescina ( $C_4H_{12}N_2$ ) (DENT et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013), que têm ação sobre os sistemas biológicos.

A putrescina é uma molécula precursora de outras duas poliaminas, a espermidina e espermina, ambas muito importantes nos processos de proliferação celular (PEGG, 2009; MICHAEL, 2016). Porém, alguns autores têm demonstrado que altas concentrações de poliaminas podem induzirem morte celular por mecanismos oxidativos (MOINARD et al., 2005; BACH et al., 2012). Battaglia et al. (2013) descreve que o catabolismo das poliaminas produz peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), substância esta que é capaz de danificar o DNA e outros componentes celulares, por meio da indução de estresse oxidativo.

Diante disso, o presente trabalho avaliou os efeitos adversos da putrescina sobre testículos e epidídimos de ratos Wistar, com o objetivo de entender seus efeitos sobre a capacidade reprodutiva, biossíntese de testosterona e efeitos histopatológicos, por meio de análises bioquímicas, morfométricas, histológicas e estereológicas.

## 2. Material e Métodos

### 8.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 48 indivíduos machos adultos, com peso inicial em torno de 250 g, mantidos durante o período experimental no Centro de Experimentação Animal da Fundação Hermínio Ometto (UNIARARAS). Os animais foram mantidos em temperatura controlada ( $25^\circ C$ ), umidade do ar de 60 % e ciclos claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam água e ração purina *ad libitum*. As concentrações de putrescina testadas neste estudo foram

definidas a partir da ficha técnica do produto (Sigma-Aldrich), que aponta uma DL<sub>50</sub> oral para ratas de 463 mg/kg. As concentrações de uso foram estabelecidas em 10% (T1- 46,3 mg/kg), 30% (T2- 138,9 mg/kg) e 50 % (T3 - 231,5 mg/kg) da DL<sub>50</sub>.

Os animais foram subdivididos em quatro grupos com 12 indivíduos cada e foram distribuídos em caixas A e B (6 indivíduos por caixa). Os animais das caixas A foram destinados para análises histológicas e coleta de sangue e os animais das caixas B destinados às coletas de órgãos, para avaliações bioquímicas e contagem de espermatozoides.

O grupo controle (Co) foi exposto apenas a água filtrada e os três grupos tratados T1, T2 e T3 (n=6 cada) expostos as concentrações correspondente a cada tratamento, conforme descrito acima. Os animais foram pesados semanalmente e o volume administrado da putrescina foi calculado de acordo com o peso corpóreo de cada animal. A substância foi administrada via gavagem, por um período de 56 dias, tempo necessário para completar o ciclo completo da espermatogênese (RUSSELL et al., 1990). O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da FHO/UNIARARAS com parecer nº 024/2013.

## **8.2 Eutanásia e coleta de materiais biológicos**

Os animais foram perfundidos, para coleta de material histológico e foram submetidos à punção cardíaca, para a coleta de sangue. Os Animais foram anestesiados com solução de Xilazina (Rompun® - Bayer S.A. – 20 mg/mL) e Cetamina (Ketalar® - Parke, Davis & Co. - 50 mg/mL), submetidos a laparotomia medial para a, expansão da cavidade torácica e, assim, expor o coração para a realização da punção cardíaca, com uma seringa de 5 mL. Após a punção cardíaca, foi introduzida uma cânula na artéria renal, conectada a um sistema de perfusão e realizada uma secção no átrio direito, para a realização da drenagem da solução. A perfusão foi realizada, inicialmente com uma solução salina heparinizada 1%, seguida de solução de glutaraldeído 4%, paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por aproximadamente 30 minutos. Os testículos e epidídimos foram coletados e pesados individualmente, para posterior análise estatística.

## **8.3 Quantificação de testosterona sérica**

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos e o soro separado em tubos de centrifuga de 1,5 mL, para serem encaminhados para o laboratório de análises clínicas (CEDIVET – Centro de Diagnostico Veterinário, localizado na cidade de Rio Claro, São Paulo, Brasil - [www.cedivet.com.br](http://www.cedivet.com.br)).

#### 8.4 Biometria

Os testículos, previamente fixados (obtidos dos animais das caixas A) foram dissecados para a retirada da albugínea. Este procedimento permitiu obter o peso real do parênquima testicular, referente a porção funcional dos testículos. Com base nos pesos corporais dos animais e no peso dos testículos dissecados, foi obtido o índice gonadossomático (IGS), calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{IGS} = \text{MG} / \text{MC} \times 100$$
 (MG = massa total das gônadas e MC = massa corporal dos animais).

Os índices epididimossomáticos (IES) dos epidídimos foram calculados pela fórmula:  
$$\text{IES} = (\text{peso do epidídimo} / \text{peso corpóreo}) \times 100.$$

#### 8.5 Contagem de espermatozóides nos testículos e epidídimos

Os testículos e epidídimos esquerdos dos animais, que não foram perfundidos (caixas B), foram congelados e armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para serem descongelados e analisados separadamente. Após o descongelamento do órgão, o mesmo foi, imediatamente, processado. Para a contagem de espermatozóides nos testículos, foi retirada a albugínea. Os testículos então, foram pesados e triturados em homogeneizador IKA T-18, marca (Biovera) com 5 mL de solução salina (STM) (0,9% NaCl e 0,05% Trinton X-100). Deste homogenato foram retirados 100  $\mu\text{L}$  e diluídos em 900  $\mu\text{L}$  de STM. Já os epidídimos foram divididos em cabeça/corpo e cauda e, cada parte, foi pesada e triturada separadamente. A cabeça/corpo foi homogeneizada com 1 mL de STM, para cada 200 g, e a cauda homogeneizada com 1 mL, para cada 100 g. Esta diluição foi feita na proporção de 50  $\mu\text{L}$  para 950  $\mu\text{L}$  de STM. A contagem dos espermatozóides, em ambos os órgãos, foi feita em duplicata, em câmara de Neubauer, sendo que entre cada campo, de cada câmara contada, a diferença foi menor que 10% e entre a contagem das duas câmaras a diferença foi menor que 20%.

#### 8.6 Produção espermática diária (PDE) e cálculo do trânsito espermático

A produção espermática diária (PDE) foi calculada, dividindo o número total de espermátides/espermatozóides do testículo por 6,1 dias, período este que corresponde ao tempo de duração da maturação das espermátides, que ocorre nos túbulos seminíferos, que corresponde ao passo 19 do estágio VIII (ROBB et al., 1978). O trânsito dos espermatozóides foi calculado, dividindo o número de espermatozóides  $\times 10^6$  pelo peso do parênquima e, depois pela PDE. Os resultados foram submetidos à análise estatística, utilizando o teste

estatístico ANOVA, com pós-teste Tukey para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

### **8.7 Análise de Western Blotting**

Para a avaliação das proteínas CYP11A1, 17 $\beta$ -HSD e StAR, fragmentos de testículo foram homogeneizados, por 30 segundos, em tampão de extração proteica. O extrato foi centrifugado a 1500 rpm, à 4 °C, por 45 min, para a remoção do material insolúvel. Alíquotas do sobrenadante foram tratadas com tampão Laemmli contendo 10 mM de DTT (Ditiotreitol) e 40  $\mu$ g de proteínas foram utilizadas na corrida em SDS-PAGE 12 %, em aparelho minigel (Miniprotean). Após a corrida, as proteínas foram eletrotransferidas (a 0,8 mA/cm<sup>2</sup>) do gel para a membrana de nitrocelulose (0,45  $\mu$ ). Esta foi incubada por duas horas em solução bloqueadora, para diminuir as ligações inespecíficas das proteínas. Na sequência as membranas foram incubadas por 4 horas com os anticorpos específicos: anti-CYP11A1 (ab175408-abcam), anti-17BHSD (M-174: sc-32 872 – Santa Cruz Biothnology) e anti- StAR (ab180804-abcam) previamente diluídos (1:100) na solução de bloqueio (leite em pó desnatado a 1%). A membrana foi submetida a lavagens com solução de TBS-T (tris-HCl, pH 8,0, contendo 150 mM de NaCl e 0,05 % de Twenn 20) e, em seguida, incubada com o anticorpo secundário anti-igG de coelho (ab97051-abcam), diluído 1:5000 em solução de bloqueio, por duas horas, à temperatura ambiente. As membranas foram reveladas no fotodocumentador Syngene G:BOX. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria, no programa do fotodocumentador Gene Tools.

### **8.8 Preparações Histológicas**

Os fragmentos de testículo e epidídimo foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em resina glicolmetacrilato (Leica) e seccionados na espessura de 3  $\mu$ m, em micrótomo Sorvall JB-4/Bio Rad. As observações morfológicas foram realizadas nos cortes corados com Hematoxilina-eosina (HE) e as citoquímicas nos cortes submetidos ao PAS (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1983) e azul de Bromofenol (PEARSE, 1985). O material corado com azul de toluidina 1% foi utilizado para obtenção da morfometria e estereologia testicular (MONTEIRO et al., 2008). As lâminas obtidas foram examinadas e analisadas em microscopia de luz.

## **8.9 Análise Morfométrica e Estereológica dos testículos**

As imagens histológicas de cortes de testículo, coradas com azul de toluidina, que se mostraram mais representativas, foram fotodocumentadas. As análises morfométricas e estereológicas foram processadas pelo software Image Pro Plus, versão 6.0 (Media Cybernetics).

### **2.8.1 Morfometria dos túbulos seminíferos**

O diâmetro tubular médio de cada animal foi obtido a partir de mensurações, ao acaso, de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam o contorno mais circular possível, quando observadas em aumento de 200x. As mesmas secções utilizadas para medição do diâmetro tubular foi também usada para mensurar a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada de forma diametralmente oposta, em 4 diferentes pontos, desde a túnica própria até o lúmen tubular, também em aumento de 200x.

### **2.8.2 Determinação das proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do espaço intersticial**

As proporções volumétricas dos componentes do espaço intersticial foram estimadas a partir da projecção de uma grade contendo 494 pontos sobre imagens do espaço intersticial dos testículos, capturadas em campos aleatórios, em um aumento de 1000x. Para cada animal, foram analisadas diferentes secções, até completar 3000 pontos. Os elementos quantificados no espaço intersticial foram: células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófagos e tecido conjuntivo. O volume de cada componente do parênquima testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado por eles no testículo e do conhecimento do volume total líquido do parênquima testicular. O valor deste último foi obtido por meio do peso de testículo sem albugínea fixado. Segundo França (1991), como a densidade do testículo é em torno de 1 (1,03 a 1,04), a massa foi considerada igual ao seu volume.

### **2.8.3 Diâmetro e volume dos núcleos das células de Leydig**

Foram estimados o diâmetro médio de 30 células de Leydig por animal, para cada grupo experimental. Os valores foram obtidos por meio da média entre duas medidas diametraes, obtidas de forma opostas. O volume nuclear dessas células foi calculado aplicando a seguinte forma:



Volume nuclear =  $4/3\pi R^3$ , onde R é o raio do núcleo das células de Leydig, obtido com a medida dos diâmetros.

#### **2.8.4 Quantificação de Estresse Oxidativo nos Testículos e Epidídimos**

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, em homogeneizador de tecidos modelo IKA T-18, marca (Biovera). As concentrações de proteínas foram estabelecidas pelo método de biureto, descrito por Gornall, 1949. A atividade da catalase (CAT) foi avaliada de acordo com Aebi (1974), usando o peróxido de hidrogênio como substrato. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pelo método de autooxidação do pirogalol descrito por Marklund e Marklund (1974). A atividade da Glutathione-S-transferase (GST) foi avaliada, seguindo o método de Habig et al. (1974) e os níveis de Glutathione Reduzida (GSH) foram quantificados, por meio dos procedimentos descritos por Ellman (1959).

### **3. Resultados**

#### **3.1. Parâmetros reprodutivos**

Para a determinação dos índices reprodutivos, foi necessário, primeiramente, a aferição do peso corpóreo dos animais experimentados. O grupo T2 e o T3 apresentaram diminuição significativa deste parâmetro, quando comparados ao grupo controle.

Em relação ao peso dos epidídimos, não foi observada nenhuma alteração significativa entre os ratos testados. Para o índice epididimossomático (IES), apenas o grupo tratado com a maior concentração (T3) apresentou aumento significativo. Em relação ao nº de espermatozoides no epidídimo, tanto na região da cabeça/corpo como na região da cauda, foi observada uma redução significativa nos grupos tratados, em relação ao grupo controle. O número de espermatozoides por grama de epidídimo, tanto na região da cabeça como na região da cauda, apresentou redução significativa nos grupos T2 e T3. Estes resultados permitiram inferir um efeito dose-resposta da putrescina, para esse parâmetro avaliado, pois o grupo tratado com a maior concentração (T3) apresentou a maior redução no número de espermatozoides/g do órgão, seguido pela concentração intermediária (T2) e depois pela menor concentração (T1).

O número de espermatozoides nos testículos e o número de espermatozoides/g de testículo também foi reduzido, significativamente, nos grupos expostos, confirmando o efeito dose-resposta, observado para o epidídimo.

A produção diária de espermatozóides (PDE) foi comprometida significativamente, em T2 e T3. O trânsito espermático na região da cabeça/corpo teve um aumento significativo, para a maior concentração testada. Pelos resultados obtidos, foi observado uma diminuição na produção diária de espermatozóides nos animais tratados com putrescina, com resultados significativos, em relação ao grupo controle, para os grupos T2 e T3, reforçando o efeito dose-resposta diretamente proporcional a concentração já registrado anteriormente. Todos estes resultados aqui apresentados estão apresentados na **Tabela 1**. De acordo com estes dados, podemos inferir que a putrescina, nestas concentrações testadas, causa um efeito negativo nestes órgãos e um provável comprometimento de suas funções.

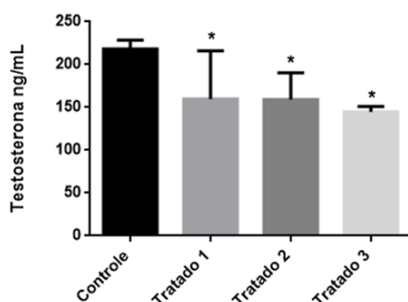
**Tabela 1:** Parâmetros reprodutivos obtidos após o tratamento com putrescina por 56 dias consecutivos.

<b>Parâmetros Avaliados</b>	<b>Grupo Controle (Co)</b>	<b>Grupo T1 (46,3 mg/Kg)</b>	<b>Grupo T2 (138,9 mg/kg)</b>	<b>Grupo T3 (231,5 mg/kg)</b>
<b>Peso corpóreo do animal (g)</b>	443,0 ± 24,26	440,8 ± 23,15	<b>398,3 ± 37,78 a</b>	<b>358,7 ± 50,53 a</b>
<b>Peso epidídimo direito (g)</b>	0,54 ± 0,055	0,57 ± 0,021	0,52 ± 0,06	0,56 ± 0,076
<b>Índice epididimossomático (IES)</b>	0,12 ± 0,013	0,13 ± 0,005	0,13 ± 0,013	<b>0,16 ± 0,003 a b</b>
<b>Cabeça/corpo</b>				
Nº esperm. X 10 <sup>6</sup> /epidídimo (g)	106,6 ± 14,23	<b>85,16 ± 11,72 a</b>	<b>71,30 ± 14,53 a</b>	<b>75,36 ± 6,02 a</b>
Nº esperm. X 10 <sup>6</sup> /g de epidídimo	425,62 ± 43,29	<b>392,29 ± 67,91 a</b>	<b>332,29 ± 73,50 a</b>	<b>273,75 ± 14,4 a c</b>
<b>Cauda</b>				
Nº esperm. X 10 <sup>6</sup> /órgão (g)	248,11 ± 25,75	<b>209,08 ± 30,21 a</b>	<b>143,41 ± 46,71 a c</b>	<b>136,73 ± 39,75 a c</b>
Nº esperm. X 10 <sup>6</sup> /g de órgão	1253,3 ± 118,56	1171,25 ± 154,60	<b>835,83 ± 265,58 a c</b>	<b>730,83 ± 106,25 a c</b>
<b>Peso testículo direito (g)</b>				
Nº de esperm. X 10 <sup>6</sup> /testículo (g)	167,20 ± 37,73	151,1 ± 11,60	<b>114,78 ± 17,32 a</b>	<b>78,62 ± 3,60 a b</b>
Nº de esperm. X 10 <sup>6</sup> /g de testículo	108,64 ± 29,53	86,90 ± 6,30	<b>71,24 ± 13,57 a</b>	<b>51,49 ± 3,09 a b</b>
<b>Produção Diária de Espm. (PDE)</b>	27,41 ± 6,34	24,77 ± 1,90	<b>18,81 ± 2,83 a</b>	<b>12,88 ± 0,59 a b</b>
<b>Trânsito cabeça/corpo</b>	4,03 ± 0,91	3,44 ± 0,49	3,85 ± 0,84	<b>5,84 ± 0,22 a b</b>
<b>Trânsito cauda</b>	9,56 ± 2,86	8,52 ± 1,73	7,72 ± 2,35	10,53 ± 2,53

Valores expressos em média ± desvio padrão. a= Significativo em relação ao controle; b- significativo em relação a todos os grupos; c- significativo em relação a T1; Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se ANOVA com pós-teste de Tukey para comparação dos grupos tratados com o grupo controle; g = grama.

### 3.2. Quantificação sérica de testosterona

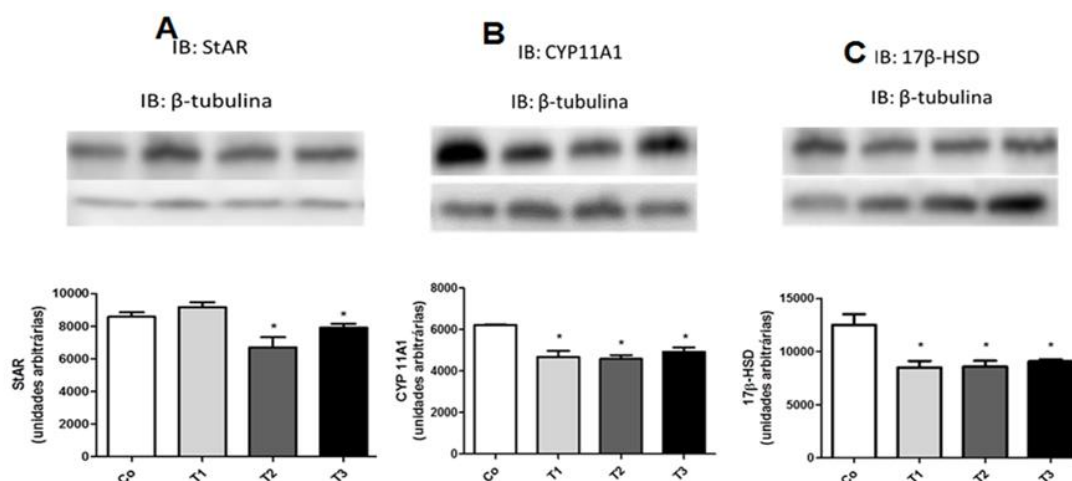
A testosterona sérica foi avaliada por meio de análises bioquímicas e os valores estão demonstrados na **Figura 1**.



**Figura 1:** Concentração de testosterona sérica nos diferentes grupos experimentais. Resultados expressos em média e desvio padrão. \* Valores estatisticamente significativos para  $p < 0,05$ .

### 3.3. Expressão proteica das proteínas da via da esteroidogênese

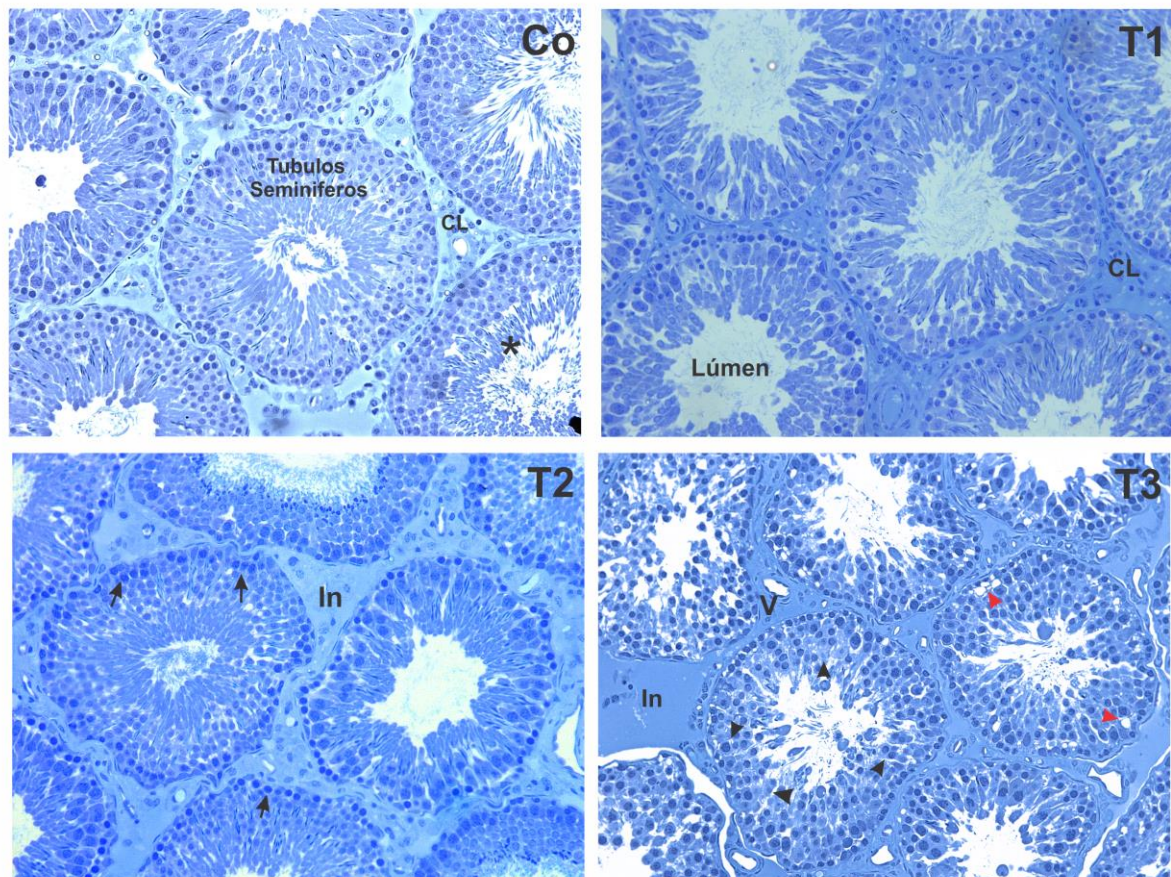
As expressões proteicas das proteínas StAR, CYP11A1 e 17  $\beta$ -HSD foram observadas por meio de Western Blotting. Os resultados demonstraram uma diminuição significativa na expressão da proteína StAR, nos grupos T2 e T3, enquanto que o T1 e os grupos controle não apresentaram diferenças significativas (**figura 2A**). Já na quantificação da proteína CYP11A1 e da proteína 17  $\beta$ -HSD, foi possível observar uma redução significativa nos três grupos tratados (T1, T2 e T3), quando comparados ao grupo controle (**figura 2B e 2C, respectivamente**).



**Figura 2:** Expressão das proteínas StAR, CYP11A1 e 17  $\beta$ -HSD em testículos de ratos expostos a putrescina. Blottins representativos e os resultados das análises estatísticas, sendo os valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*Diferença significativa de  $p < 0,05$   $n=4$ , **Co** (controle), **T1** (46,3 mg/kg/dia), **T2** (138,9 mg/kg/dia) e **T3** (231,5 mg/kg/dia).

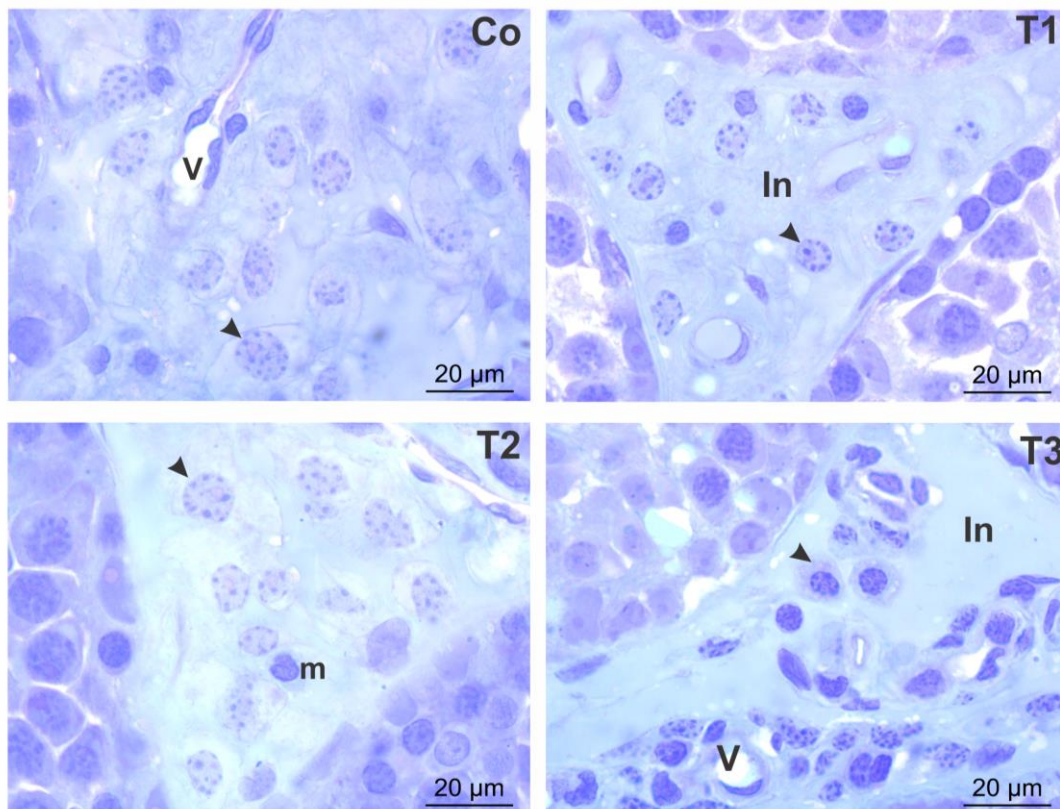
### 3.4. Análise histopatológica dos Testículos

Nas secções histológicas dos testículos, corados com azul de toluidina, foi possível observar que o grupo controle apresentou túbulos seminíferos com morfologia preservada e espermatogônias do tipo escura, na região periférica que margeia os túbulos. No espaço intersticial, foram registradas a presença de vasos sanguíneos e de células de Leydig distribuídas uniformemente, bem como também a presença de espermatozóides no lúmen dos túbulos (**Figura 3 Co**). Os grupos T1 e T2 não apresentaram diferenças morfológicas, quando comparado ao grupo controle. No grupo T3, foi possível observar desorganização do epitélio dos túbulos, com desprendimento de espermatócitos próximo ao lúmen. Foi observada a presença de vacúolos ao longo das extremidades dos túbulos e aparente diminuição na quantidade das células de Leydig no espaço intersticial (**Figura 3 T3**).



**Figura 3:** Fotomicrográficas de cortes histológicos dos túbulos seminíferos dos animais experimentais corados com azul de toluidina. (n = 6; Controle; T1 - 46,3 mg/kg; T2 - 138,9 mg/kg; e T3 - 231,5 mg/kg. **CL** = Células de Leydig, **asterisco** = espermatozoides, **seta** = espermatogônias, **In** = Interstício testicular, **V** = Vaso sanguíneo, **cabeça de seta preta** = espermatócitos, **cabeça de seta vermelha**= vacúolos. Aumento de 20x

As células de Leydig estão localizadas na região intersticial, situada entre os túbulos seminíferos. Esta área é caracterizada por ser uma região rica em vasos sanguíneos e espaços linfáticos. As células de Leydig do grupo T3 apresentaram diâmetro nuclear menor e uma granulação mais intensa que nos outros grupos (**figura 4-T3**).

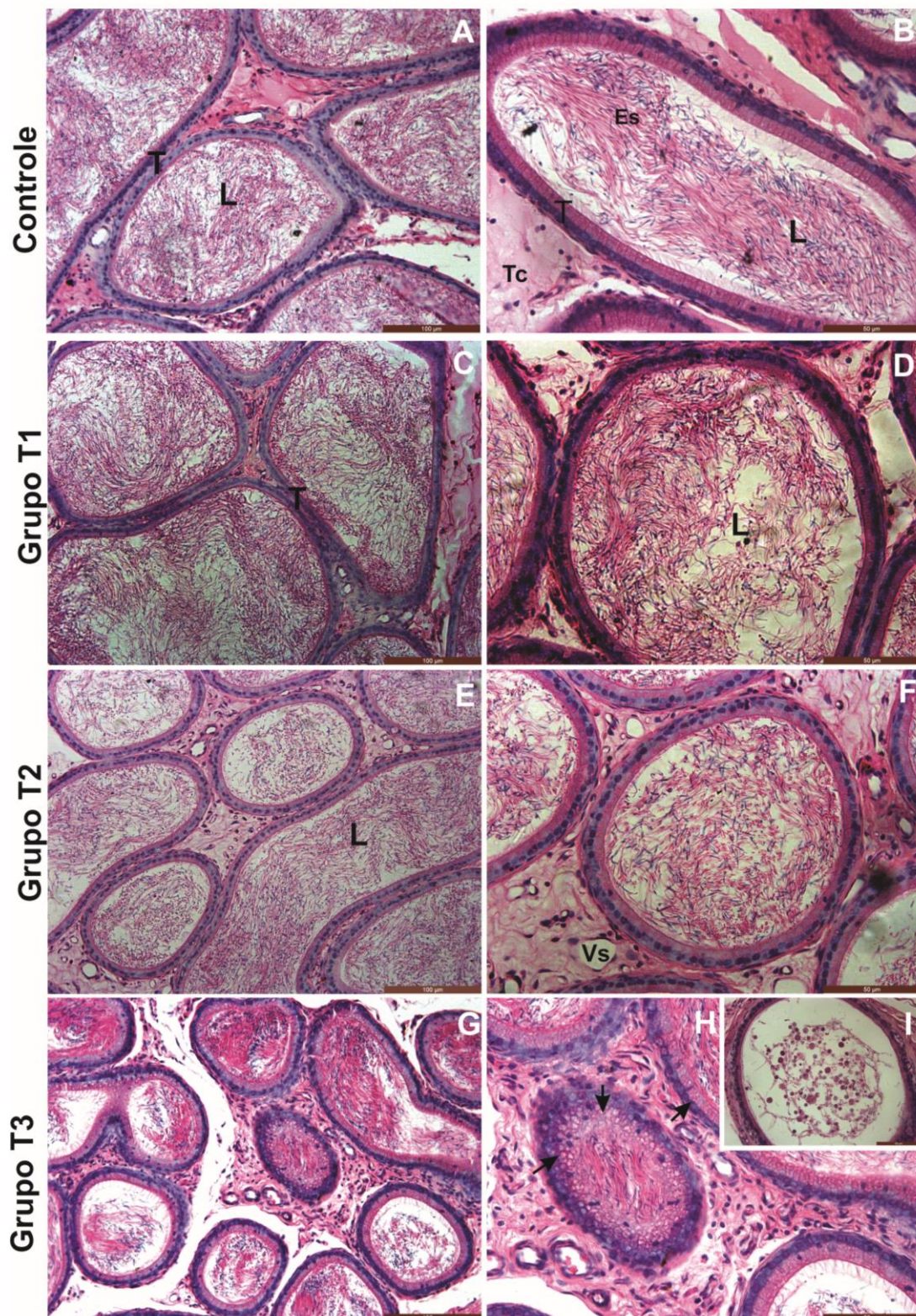


**Figura 4:** Secções histológicas do parênquima testicular de ratos Wistar corados com azul de toluidina. Imagens capturadas em aumento de 1000x. **V** = vaso sanguíneo, **In** = Região intersticial, **m** = macrófago, **cabeça de seta** = células de Leydig

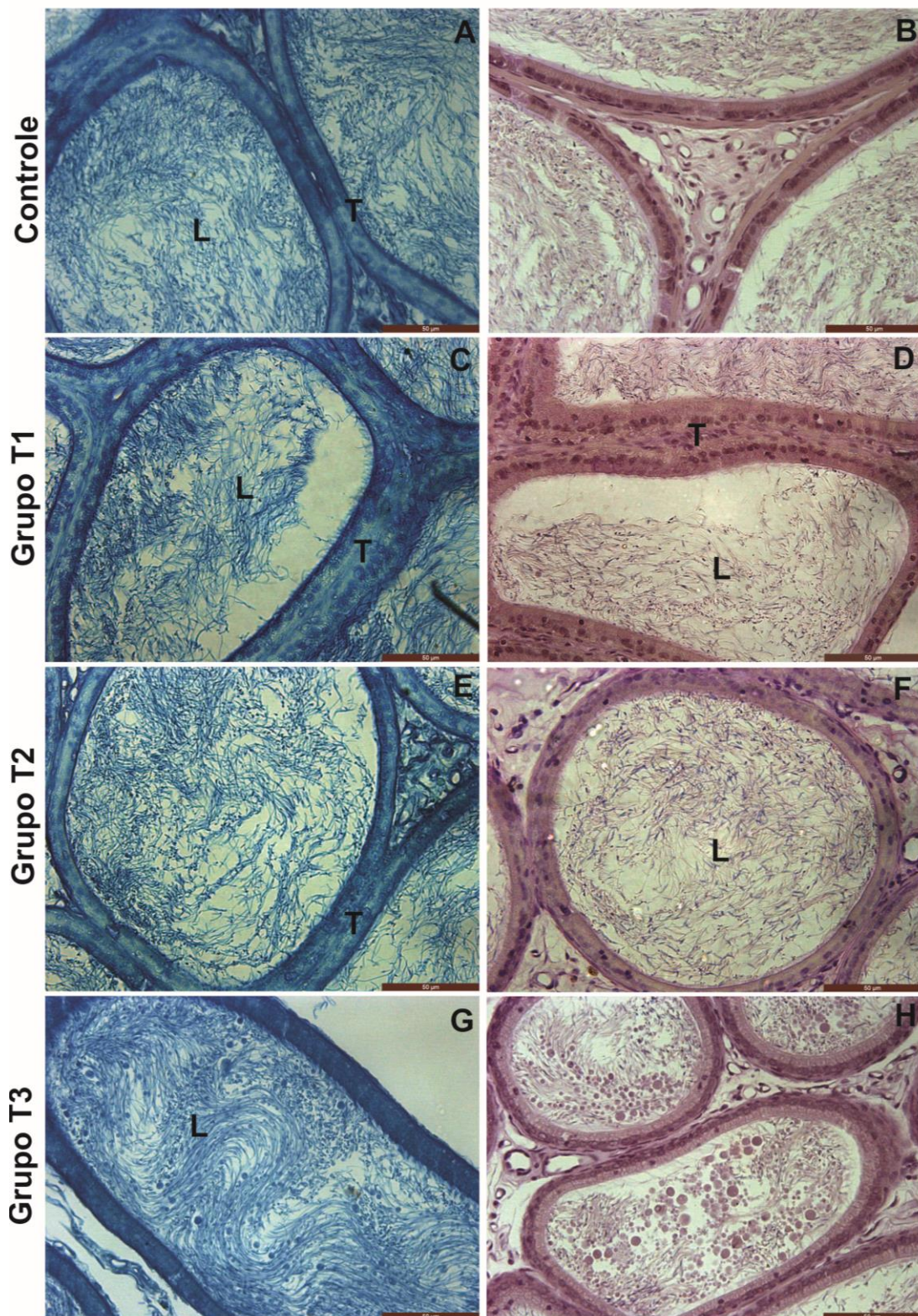
### 3.5. Análises Histopatológica dos Epidídimos

Nas secções histológicas dos ductos epididimários dos animais do grupo controle foi possível observar o tecido epitelial pseudo-estratificado, composto de células basais arredondadas e de células colunares com estereocílios voltados para a luz. No lúmen, foi observado a presença de espermatozoides misturados com secreções (**figura 5B**).

De acordo com as observações microscópicas, os animais do grupo T3 apresentaram maiores alterações, como a presença de vacúolos no tecido epitelial que reveste os ductos, além de desorganização no parênquima epididimário (**figura 5H**). Na luz dos ductos epididimários desse grupo exposto, foi verificada uma forte presença de restos das espermátides junto às secreções e espermatozóides (**figura 5I**). Nas marcações citoquímica com PAS e Azul de bromofenol, não foram observadas diferenças entre os grupos (**figura 6**).



**Figura 5:** Secções Histológicas de segmentos da cabeça do epidídimo de ratos Wistar submetidos a exposição a putrescina em diferentes concentrações e coradas com HE. (n = 6; Controle (A e B); Grupo 1 - 46,3 mg/kg (C e D); Grupo 2 - 138,9 mg/kg (E e F) e Grupo 3 - 231,5 mg/kg (G, H e I). **T** = epitélio do túbulo epididimário, **L** = Lúmen, **Es** = Espermatozoides, **Tc** = Tecido conjuntivo, **Vs** – Vaso sanguíneo, **Setas** = vacuolização do túbulo epididimário e em **I**, destaque para o lúmen dos ductos epididimários com desprendimento de espermátocitos.



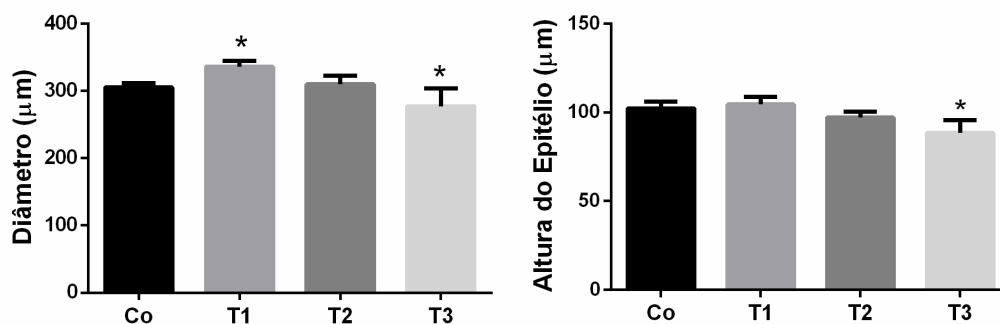
**Figura 6:** Secções Histológicas de segmentos da cabeça do epidídimo de ratos Wistar submetidos a exposição a putrescina marcadas com Azul de bromofenol (coluna da esquerda) e PAS (coluna da direita). (n = 6; Controle (A e B); Grupo 1 - 46,3 mg/kg (C e D); Grupo 2 - 138,9 mg/kg (E e F) e Grupo 3 - 231,5 mg/kg (G e H). T = epitélio do túbulo epididimário, L = Lúmen. Lúmen dos túbulos repletos de espermatozoides e em H, muitas células desprendidas.



### 3.6. Análise Morfométrica e Estereológica dos testículos

#### 3.6.1. Morfometria dos túbulos seminíferos

Os valores médios do diâmetro tubular e da altura do epitélio seminífero dos animais desta pesquisa encontram-se apresentados na **figura 7**. Foram encontrados valores significativos de aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos para o grupo T1, e diminuição para o grupo. Em relação à altura do epitélio seminífero, apenas o grupo T3 apresentou diferença significativa, com diminuição da altura, em relação ao grupo controle.



**Figura 7:** Diâmetro tubular e altura do epitélio dos túbulos seminíferos em testículos de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de putrescina, por 56 dias consecutivos. Valores expressos em média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ; Co = controle; T1 = 46,3 mg/kg; T2 = 138,9 mg/kg e T3 = 231,5 mg/kg). ANOVA, pós teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ ).

#### 3.6.2. Determinação das proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do espaço intersticial (mL)

As proporções volumétricas permitem avaliar, mais detalhadamente, a quantidade e volume de componentes do tecido que ocupam o parênquima testicular. Foram avaliados os parâmetros espaço linfático, células de Leydig, vasos sanguíneos e macrófagos, que totalizam 100% do espaço intersticial. Foram observadas uma diminuição significativa das proporções volumétricas das células de Leydig para os grupos T1 e T3 e diminuição significativa nos volumes dessas células, para o grupo T3 (**Tabela 2**).

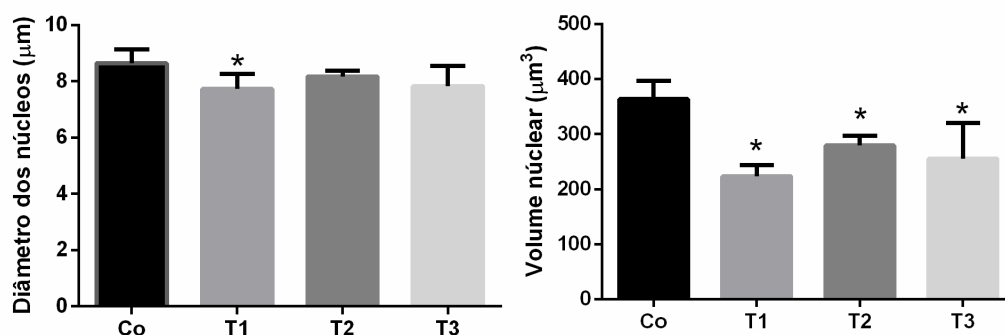
**Tabela 2:** Volume (ml) e proporção volumétrica (%) dos componentes do testículo de ratos adultos, expostos a diferentes concentrações de putrescina.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	Controle	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Espaço Linfático (%)	0.55 ± 0.05	0.59 ± 0.04	0.56 ± 0.04	0.60 ± 0.08
Espaço Linfático (mL)	0.90 ± 0.13	0.99 ± 0.10	0.98 ± 0.16	0.86 ± 0.03
Células de Leydig (%)	0.32 ± 0.02	<b>0.26 ± 0.04 *</b>	0.29 ± 0.03	<b>0.24 ± 0.03*</b>
Células de Leydig (mL)	0.52 ± 0.03	0.44 ± 0.07	0.51 ± 0.07	<b>0.33 ± 0.15*</b>
Vasos Sanguíneos (%)	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.11 ± 0.06
Vasos Sanguíneos (mL)	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.07	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.01
Macrófagos (%)	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.00
Macrófagos (mL)	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.06 ± 0.03

Valores expressos em média e desvio padrão. ANOVA, pós teste de Tukey. \* Valores significativos para  $P < 0,05$ .

### 3.6.3. Diâmetro e volume nuclear das células de Leydig

As análises morfométricas do diâmetro das células de Leydig permitiram verificar que houve uma diminuição significativa neste parâmetro, para o Grupo T1, enquanto que, para a avaliação do volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ ), todos os grupos expostos apresentaram células com volumes diminuídos. Por meio destes resultados, podemos inferir que a putrescina tem ação nas estruturas morfológicas das células de Leydig presentes no parênquima testicular (**figura 8**).



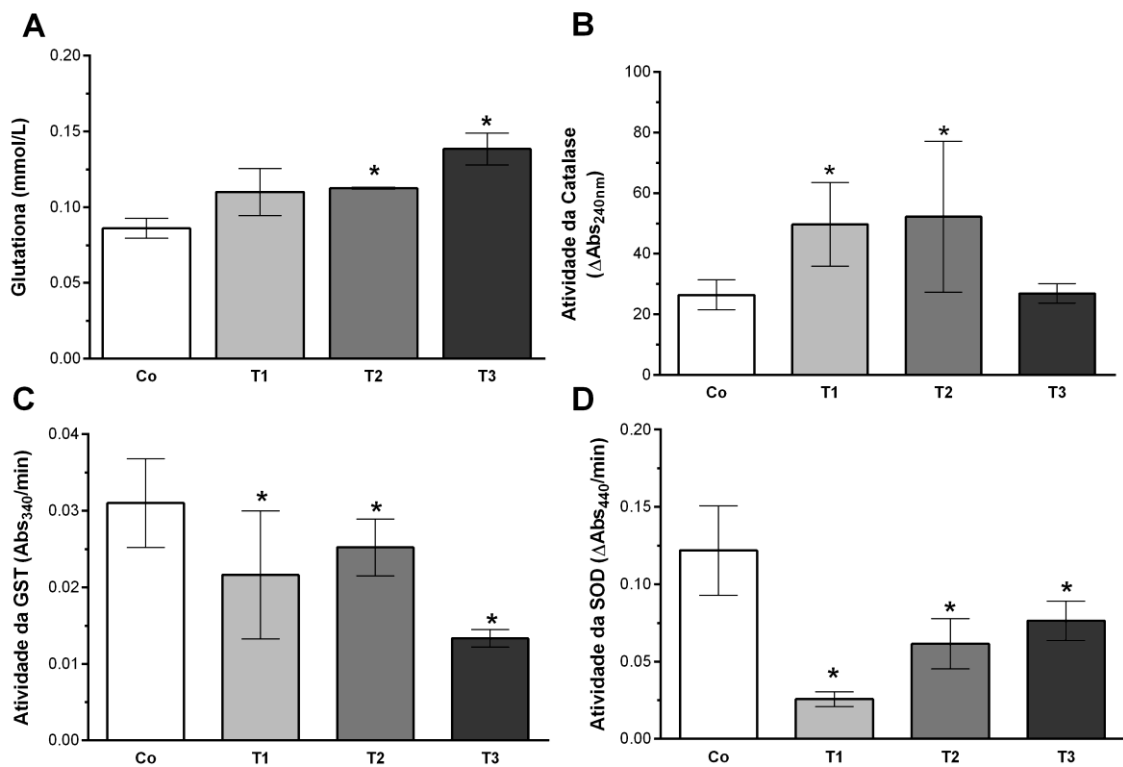
**Figura 8:** Diâmetro e volume nucleares das células de Leydig em testículos de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de putrescina, por 56 dias consecutivos. Valores expressos em média ± DP (n = 6; Co = controle; T1 = 46,3 mg/kg; T2 = 138,9 mg/kg e T3 = 231,5 mg/kg). ANOVA, pós teste de Tukey (\*  $p < 0,05$ ).

### 3.7. Quantificação do Estresse Oxidativo nos testículos e epidídimos

Foram avaliados, por meio de testes enzimáticos, o estresse oxidativo dos testículos e dos epidídimos. Foram quantificados a Glutathiona reduzida (GSH) e as atividades das enzimas antioxidantes, SOD, GST e CAT. Todos os resultados foram determinados por espectrofotometria.

#### 3.7.1. Estresse oxidativo no Testículo

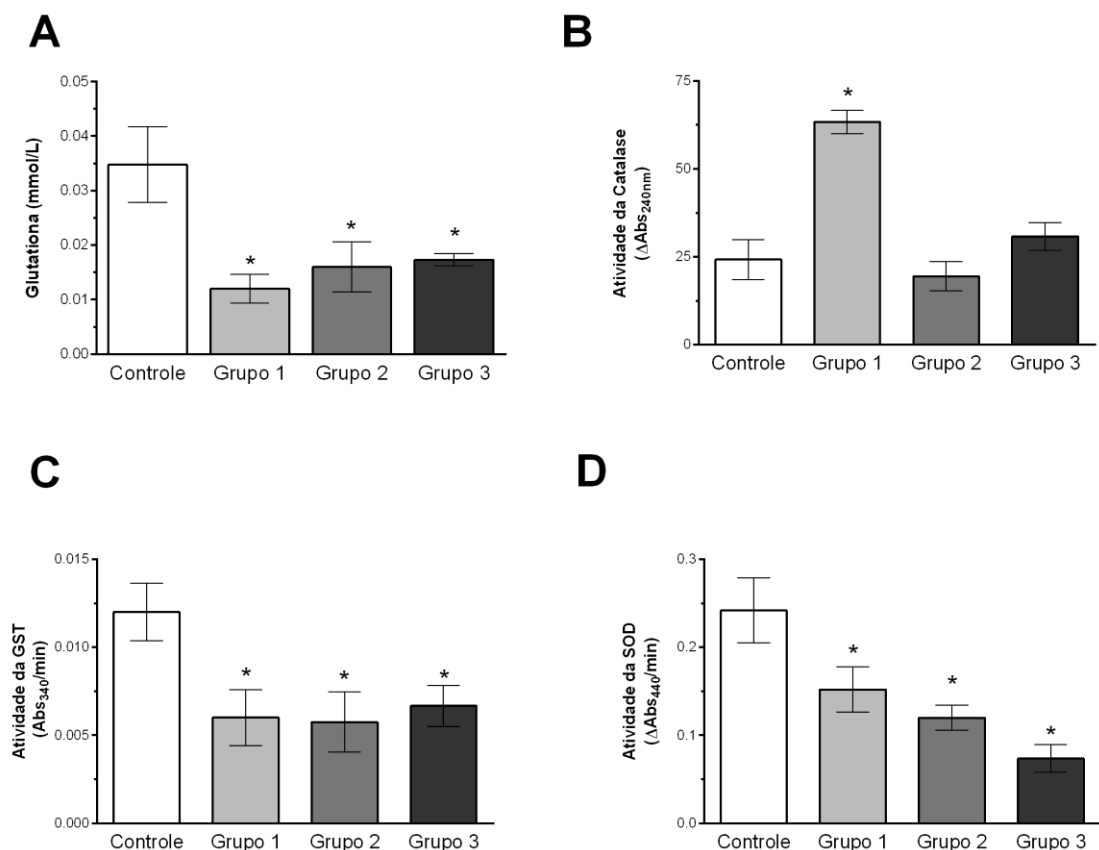
Em relação aos parâmetros bioquímicos estudados, foi observado um aumento significativo dos níveis de GSH nos Grupos T2 e T3. Embora tenha havido um aumento no Grupo T1, esse aumento não foi significativo (**Figura 9A**). A atividade da CAT se mostrou aumentada nos Grupos T1 e T2 (**Figura 9B**), enquanto que a atividade da GST e da SOD foram, significativamente, diminuídas em todos os grupos expostos (**Figura 9C e 9D**).



**Figura 9:** Parâmetros de estresse oxidativo em testículos de ratos Wistar expostos a putrescina, por 56 dias. Níveis de glutathiona reduzida (GSH) (A), atividade da enzima CAT (B), atividade da GST (C) e atividade da SOD (D). Valores expressos em média  $\pm$  DP (n = 6; Co = controle; Grupo T1 = 46,3 mg/kg; Grupo T2 = 138,9 mg/kg e Grupo T3 = 231,5 mg/kg). \*Diferença significativa em relação ao grupo controle com  $p < 0,05$  para todos os parâmetros.

### 3.7.2. Estresse oxidativo nos Epidídimos

Os valores encontrados na avaliação de estresse oxidativo nos epidídimos evidenciou uma forte indução de estresse, que causou uma depleção nas atividades enzimáticas das enzimas protetoras. Os níveis de GSH diminuíram, significativamente, em todos os grupos (**figura 10A**), assim como houve a redução significativa nas atividades da GST e da SOD (**figura 10C e D**). Foi observado aumento significativo da CAT, apenas para o Grupo T1 (**figura 10B**).



**Figura 10:** Parâmetros de estresse oxidativo em testículos de ratos Wistar expostos a putrescina, por 56 dias. Níveis de glutathiona reduzida (GSH) (**A**), atividade da enzima CAT (**B**), atividade da GST (**C**) e atividade da SOD (**D**). Valores expressos em média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ; Co = controle; Grupo 1 = 46,3 mg/kg; Grupo 2 = 138,9 mg/kg e Grupo 3 = 231,5 mg/kg). \*Diferença significativa em relação ao grupo controle com  $p < 0,05$  para todos os parâmetros.

## 4. Discussão

O sistema reprodutor masculino é muito sensível à ação de substâncias tóxicas e, por isso, é muito importante avaliar os efeitos dos xenobióticos sobre esses órgãos. Lima et al. (2012) afirmam que existem fortes indícios de que a alteração da qualidade do sêmen possa estar relacionada com a toxicidade ambiental.

Nossos resultados evidenciaram que tanto os testículos quanto os epidídimos foram afetados pela exposição à putrescina. A exposição dos testículos à agentes tóxicos, pode promover alterações na espermatogênese, bem como aumentar a indução de apoptose nas células germinativas, causando um efeito negativo no órgão, com diminuição na produção de espermatozoides (PANNOCCHIA et al., 2008).

De acordo com os parâmetros reprodutivos analisados, foi possível estabelecer um efeito dose-resposta da putrescina sobre os parâmetros reprodutivos. As maiores concentrações de putrescina promoveram a diminuição da produção e, conseqüentemente, da quantidade de espermatozoides nos testículos e nos epidídimos dos ratos expostos. Além disso, a putrescina foi capaz de induzir respostas histopatológicas no parênquima testicular, evidenciando alterações como vacuolização citoplasmáticas, degeneração de espermátides, células do epitélio seminífero liberadas no lúmen dos tubos, bem como a presença de espermátides arredondadas (células reprodutoras imaturas) livres na luz dos epidídimos.

Informações referentes ao transito espermático no epidídimo são importantes para a interpretação dos acontecimentos no processo de maturação dos espermatozoides. É durante esse trajeto que muitas características morfológicas fisiológicas e bioquímicas dos espermatozoides são modificadas (FERNANDES et al., 2008). Nossos resultados demonstraram um aumento no tempo de trânsito na cabeça do epidídimo, para a maior concentração testada. Resultados parecidos foram encontrados por Fernandes et al. (2003), que relataram uma diminuição no potencial de fertilidade dos espermatozoides em ratos tratados com dietilestilbestrol (DES).

Segundo Aly et al. (2012), a redução da espermatogênese se deve a inibição da atividade esteroidogênica. A diminuição da testosterona influencia, diretamente, as funções germinativas, uma vez que o processo de meiose requer altas concentrações de testosterona (STANBENFELD; EDQVIST, 1996). No presente trabalho os níveis séricos de testosterona diminuíram significativamente em todos os grupos tratados.

O processo de produção da testosterona nas células de Leydig é intermediado por diferentes enzimas. Inicialmente pela entrega do colesterol na membrana mitocondrial interna. Esse passo é mediado pela proteína reguladora StAR (MURUGESAN et al., 2007). Nossos resultados demonstraram uma diminuição na expressão desta proteína, sugerindo uma redução na entrada do colesterol na mitocôndria. A diminuição na expressão da Cyp11A1, observada neste estudo, sugere que a conversão do colesterol em pregnenolona está comprometida, uma vez que é essa enzima que catalisa a reação de clivagem da cadeia lateral do colesterol. A 17B-HSD também teve sua expressão diminuída, o que é um indicativo de redução e

comprometimento da secreção de testosterona, pois esta proteína é a que reduz a androstenediona em testosterona. Estes resultados sugerem que a putrescina pode atuar diretamente sobre as células de Leydig, diminuindo a produção de testosterona, por meio da inibição da expressão das enzimas esteroídogênicas. Murugesan et al. (2005) encontraram resultados semelhantes aos deste estudo, quando avaliaram os efeitos de Araclor 1254, também em ratos Wistar. Os autores associaram a diminuição da testosterona observada a uma diminuição nos receptores de LH nas células de Leydig. De acordo com esses autores, a diminuição desses receptores de superfície celular é induzida pelos elevados níveis de estresse oxidativo e peroxidação lipídica celular.

As avaliações de estresse oxidativo nos testículos e epidídimos são de extrema importância. De acordo com Vernet et al. (2004), as EROs têm impacto devastador sobre a atividade espermática. Quando produzidas em excesso elas, estimulam a fragmentação do DNA e podem levar a perda de função espermática, devido os danos peroxidativos na membrana plasmática das células germinativas. As membranas das células espermáticas contêm níveis elevados de ácidos graxos poli-insaturados, que conferem fluidez a estas células (SIKKA, 2004), deixando-as mais susceptível a ataques de radicais livres e, conseqüentemente, à peroxidação lipídica. Este processo diminui a fluidez da membrana e diminui a motilidade dos espermatozoides, reduzindo assim a sua capacidade para a fertilização (SELVAKUMAR et al., 2006).

Em relação ao estresse oxidativo, foi observada uma depleção das atividades enzimáticas da SOD, GST tanto nos testículos quanto nos epidídimos, que possivelmente sejam indicativas da forte ação dos radicais livres presentes nas células. Em relação aos níveis de GSH, foi observado um aumento desse tripeptídeo nos testículos dos grupos T1 e T2, também seguido de aumento da CAT. Essas enzimas desempenham papel protetor contra os radicais livres. Por outro lado, a diminuição observada para esta enzima no grupo T3, corrobora os nossos resultados histológicos, uma vez que o grupo T3 foi o que apresentou maior dano tecidual.

A diminuição da atividade da SOD pode promover um aumento na concentração do radical superóxido (VENSKE, 2010). Desta forma, as EROS podem se associar com outros átomos e formar outras espécies reativas (CARRERAS et al., 1994; GIASSON et al., 2002) como, por exemplo, o óxido nítrico, proveniente do metabolismo celular, que pode reagir com as espécies reativas do oxigênio (EROS) (principalmente com o radical superóxido), gerando peroxinitrito (OONO<sup>-</sup>) e radical hidroxila (OH<sup>-</sup>), um dos principais causadores de peroxidação lipídica (WELCH et al., 2002). Além disso, a diminuição da atividade da GST,

observada em todos os grupos expostos à putrescina, evidencia uma diminuição do mecanismo de defesa das células, refletindo na perda da capacidade de conjugar e inativar xenobióticos (SILVA, 2007).

Curiosamente, contaminantes ambientais geralmente induzem o estresse oxidativo, por meio da regulação negativa da produção de antioxidantes como as enzimas SOD, CAT e GPx, estimulando a produção excessiva de EROs (CHEN et al., 2011; WONG; CHENG, 2011), como o observado em nossos resultados.

Em relação aos resultados morfométricos e estereológicos, os animais do Grupo T1 apresentaram um aumento significativo no diâmetro tubular dos túbulos seminíferos, que, segundo Chieregatto (2005), é um indicativo de efeito estimulante da substância testada. Porém, os animais do Grupo T3 apresentaram diminuição do diâmetro tubular, bem como diminuição da altura do epitélio tubular, estando este resultado diretamente relacionado com a diminuição da taxa de fertilidade dos animais expostos (MALINI et al., 1999). As medidas do diâmetro e do volume nuclear das células de Leydig corroboram com a análise dos componentes do interstício, onde houve diminuição significativa nas proporções dessas células. Estudos realizados em vários animais, correlacionando estrutura e função das células de Leydig, têm demonstrado que alterações na síntese e secreção de testosterona não estão diretamente relacionados ao volume dessas células, mas sim a quantidade de retículo endoplasmático liso presente no seu citoplasma (EWING et al., 1979). Desta maneira, é importante uma avaliação ultraestrutural dessas células, para uma correta avaliação dos efeitos da putrescina, quanto a síntese e liberação de testosterona pelas células de Leydig.

Pelos resultados obtidos, podemos inferir duas possibilidades, de como a produção de testosterona é afetada pela exposição a putrescina. 1 - A putrescina pode promover estresse oxidativo, provocando uma diminuição nos receptores de LH das células de Leydig e, conseqüentemente, a alteração na via de produção da testosterona, conforme sugerido por Murugesan et al. (2005); 2 – A putrescina pode agir diretamente sobre os constituintes celulares das células de Leydig, como demonstrado pelas análises de expressão proteica e pelas alterações no diâmetro e volume nuclear, registrados neste trabalho para essas células. Os níveis testiculares de andrógenos dependem da capacidade das células de Leydig produzirem esteroides e do número de células presentes no interstício. Para um perfeito funcionamento da esteroidogênese, é necessária uma expressão coordenada de proteínas e enzimas esteróidogênicas, em resposta a estimulação hormonal (KOTULA-BALAC et al., 2011).

## 5. Conclusão

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que a putrescina afeta negativamente as atividades reprodutivas. Esta poliamina se mostrou capaz de alterar os parâmetros reprodutivos como produção de espermatozoides e regulação da expressão proteica de enzimas chave, na via de biossíntese de testosterona, além de causar modificações morfológicas e estruturais no parênquima do testículo e do epidídimo. Além disso a substância foi capaz de induzir estresse oxidativo nos tecidos analisados, o que interferiu, negativamente, nas atividades reprodutivas. Estes resultados ressaltam a importância de estudos que visem monitorar os efeitos tóxicos de xenobióticos sobre o sistema reprodutivo e ressaltam a importância de estudos com a putrescina, como um contaminante ambiental.

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo número 2013/08279-4); a Renata Barbieri Pulz, técnica do laboratório de micromorfologia da FHO-UNIARARAS pelo suporte técnico na realização dos experimentos e a Cristina Capucho, pelo auxílio nas contagens espermáticas.

## 7. Referências Bibliográficas

- ALY, H. A. A.; DOMÈNECH, Ò.; BANJAR, Z. M. Effect of nonylphenol on male reproduction: Analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 261, n. 2, p. 134–141, 2012.
- 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. *Analytica Chimica Acta*, v. 732, p. 114–119, 2012.
- BATTAGLIA, V.; DESTEFANO SHIELDS, C.; MURRAY-STEWART, T.; CASERO, R. A. Polyamine catabolism in carcinogenesis: potential targets for chemotherapy and chemoprevention. *Amino Acids*, v. 46, n. 3, p. 511–519, 2014.
- BONDE, J. P. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. *Asian Journal of Andrology*, v. 12, n. 2, p. 152–156, 2010.
- CARRERAS, M. C.; PARGAMENT, G. A.; CATZ, S. D.; PODEROSO, J. J.; BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS letters*, v. 341, n. 1, p. 65–8, 1994.
- CHEN, X.; AN, H.; AO, L.; et al. The combined toxicity of dibutyl phthalate and benzo(a)pyrene on the reproductive system of male Sprague Dawley rats in vivo. *Journal of Hazardous Materials*, v. 186, n. 1, p. 835–841, 2011.



CHIEREGATTO, L.C. Efeito do tratamento crônico com extratos de *Heteropterys afrodisiaca* O. Mach e *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellf. no testículo de ratos Wistar adultos. 2005. 67f. Tese (Mestrado em Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

COSTA SILVA, R. W. C.; FILHO, W. M. Cemitérios como Áreas Potencialmente Contaminadas. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais* –, v. 9, n. 9, p. 26–35, 2008.

DENG, Z.; CHEN, F.; ZHANG, M.; et al. Association between air pollution and sperm quality: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 663–669, 2016.

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.

EWING, L. L.; ZIRKIN, B. R.; COCHRAN, R. C.; et al. Testosterone Secretion by Rat, Rabbit, Guinea Pig, Dog, and Hamster Testes Perfused in Vitro: Correlation with Leydig Cell Mass\*. *Endocrinology*, v. 105, n. 5, p. 1135–1142, 1979.

FA, S.; POGRMIC-MAJKIC, K.; DAKIC, V.; et al. Acute effects of hexabromocyclododecane on Leydig cell cyclic nucleotide signaling and steroidogenesis in vitro. *Toxicology Letters*, v. 218, n. 1, p. 81–90, 2013.

FERNANDES, G. S. A.; ARENA, A. C.; FERNANDEZ, C. D. B.; et al. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology*, v. 23, n. 1, p. 106–112, 2007.

GIASSON, B. I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V. M.-Y.; TROJANOWSKI, J. Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free radical biology & medicine*, v. 32, n. 12, p. 1264–75, 2002.

HAUSER, R.; SOKOL, R. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertility and Sterility*, v. 89, n. 2, p. e59–e65, 2008.

KOTULA-BALAK, M.; POCHEC, E.; HEJMEJ, A.; DUDA, M.; BILINSKA, B. Octylphenol affects morphology and steroidogenesis in mouse tumor Leydig cells. *Toxicology in Vitro*, v. 25, n. 5, p. 1018–1026, 2011.

MALINI, T.; MANIMARAN, R. R.; ARUNAKARAN, J.; ARULDHAS, M. M.; GOVINDARAJULU, P. Effects of piperine on testis of albino rats. *Journal of ethnopharmacology*, v. 64, n. 3, p. 219–25, 1999.

MANFO, F. P. T.; NANTIA, E. A.; MATHUR, P. P. Effect of environmental contaminants on mammalian testis. *Current molecular pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 119–35, 2014.

MARTA APARECIDA PANNOCCCHIA; MARIA INÊS BORELLA; ANTONIO CARLOS MARTINS DE CAMARGO; JOYCE MEIRE GILIO; CARLOS ALBERTO DA SILVA. Effective strategy of the testis fixation in Wistar rat to evaluate the morphological and morphometric parameters of seminiferous epithelium. *ConScientiae Saúde*, v. 7, n. 2, p. 227–233, 2008.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; DE BANDT, J.-P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, v. 24, n. 2, p. 184–97, 2005.

MURUGESAN, P.; BALAGANESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K.; ARUNAKARAN, J. Effects of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) on steroidogenesis and antioxidant system in cultured adult rat Leydig cells. *Journal of Endocrinology*, v. 192, n. 2, p. 325–338, 2007.

MURUGESAN, P.; KANAGARAJ, P.; YUVARAJ, S.; et al. The inhibitory effects of polychlorinated biphenyl Aroclor 1254 on Leydig cell LH receptors, steroidogenic enzymes and antioxidant enzymes in adult rats. *Reproductive Toxicology*, v. 20, n. 1, p. 117–126, 2005.

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.

RUSSELL, L. D., et al. Histopathology of the testis. In: Russel L. L. D, Griswold M. D, (Eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press, p. 210-266, 1990.

SELVAKUMAR, E.; PRAHALATHAN, C.; SUDHARSAN, P. T.; VARALAKSHMI, P. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology*, v. 217, n. 1, p. 71–78, 2006.

SEVERI-AGUIAR, G. DE C.; PINTO, S.; CAPUCHO, C.; et al. Chronic intake of green propolis negatively affecting the rat testis. *Pharmacognosy Research*, v. 9, n. 1, p. 27, 2017.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of andrology*, v. 25, n. 1, p. 5–18.

SILVA, A. G.; MARTINEZ, C. B. R. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 23, n. 2, p. 185–192, 2007

STABENFELT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes – Fisiologia dos animais domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan, 2006. Cap. 35, p. 603-614.

VECOLI, C.; MONTANO, L.; ANDREASSI, M. G. Environmental pollutants: genetic damage and epigenetic changes in male germ cells. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 23, p. 23339–23348, 2016.

VENSKE, D. K. **Efeitos do consumo de uma dieta hiperpalatável e uma dieta hiperpalatável aquecida sobre parâmetros indicadores de resistência periférica à insulina, estresse oxidativo, defesa antiglicação e dano ao DNA em ratos Wistar**. 2010. 118 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

VERNET, P.; AITKEN, R. .; DREVET, J. . Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 216, n. 1–2, p. 31–39, 2004..

WELCH, K. D.; DAVIS, T. Z.; VAN EDEN, M. E.; AUST, S. D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free radical biology & medicine*, v. 32, n. 7, p. 577–83, 2002.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/deaths-attributable-to-unhealthy-environments/en/>> Acessado em 04 de maio 2017.

WONG, E. W. P.; CHENG, C. Y. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 32, n. 5, p. 290–299, 2011.

ŻYCHOWSKI, J. Impact of cemeteries on groundwater chemistry: A review. *CATENA*, v. 93, p. 29–37, 2012.

## 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*/microsoma 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 sustância 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.revistaea.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.