

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 24/08/2024.

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

**ANÁLISE DOS EFEITOS DE ASSOCIAÇÕES DAS AMINAS
BIOGÊNICAS CADAVERINA E PUTRESCINA
SOBRE CULTURA DE FIBROBLASTO DE ANFÍBIOS E
CÉLULAS HEPÁTICAS HUMANAS,
CULTIVADAS EM SISTEMA 2D**

LETÍCIA ROCHA GONÇALVES

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

**ANÁLISE DOS EFEITOS DE ASSOCIAÇÕES DAS AMINAS
BIOGÊNICAS CADAVERINA E PUTRESCINA
SOBRE CULTURA DE FIBROBLASTO DE ANFÍBIOS E
CÉLULAS HEPÁTICAS HUMANAS,
CULTIVADAS EM SISTEMA 2D**

LETÍCIA ROCHA GONÇALVES

Orientadora: Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

G635a Gonçalves, Letícia Rocha

Análise dos efeitos de associações das aminas biogênicas cadaverina e putrescina sobre cultura de fibroblasto de anfíbios e células hepáticas humanas, cultivadas em sistema 2D / Letícia Rocha Gonçalves. -- Rio Claro, 2022

169 f. : il., tabs., fotos

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

Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales

1. Citogenotoxicidade. 2. Impactos ambientais da COVID-19. 3. Linhagem Speedy. 4. Linhagem HepG2/C3A. 5. Necrochorume. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ANÁLISE DOS EFEITOS DE ASSOCIAÇÕES DAS AMINAS BIOGÊNICAS CADAVERINA E PUTRESCINA SOBRE CULTURA DE FIBROBLASTO DE ANFÍBIOS E CÉLULAS HEPÁTICAS HUMANAS, CULTIVADAS EM SISTEMA 2D

AUTORA: LETÍCIA ROCHA GONÇALVES

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

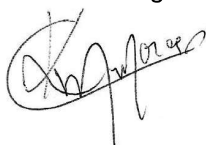
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



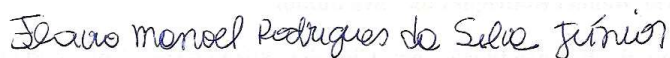
Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES (Participação Virtual) Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro



Prof. Dr. EDSON LUIS MAISTRO (Participação Virtual) Departamento de Fonoaudiologia / FFC - Unesp



Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES (Participação Virtual) Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro



Prof. Dr. FLAVIO MANOEL RODRIGUES DA SILVA JÚNIOR (Participação Virtual) Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Rio Grande



Prof. Dr. MATHEUS MANTUANELLI ROBERTO (Participação Virtual) UNIRARAS / Fundação Hermínio Ometto

Rio Claro, 24 de agosto de 2022]

Dedico esse trabalho ao meu irmão
Luizinho e a minha prima Julinha
pelo legado de amor, luta, coragem
e fé (*in memoriam*).

Agradecimentos

À inteligência suprema – Deus - pela oportunidade de aprender tanto nessa etapa da existência que é a vida.

Aos meus pais, Cecília e Luís Carlos, aos meus irmãos Luizinho, Leandro e Lenita, aos meus sobrinhos queridos Yara, Luís Carlos, Matheus e Filipe e a todos os outros membros da minha família pelas vibrações positivas e pelo amor que nos enlaça. Em especial às minhas amadas avós, Júlia e Leonor.

Ao Fábio, por ser meu parceiro para todas as horas. Obrigada por tantas boas vibrações e alegrias compartilhadas.

À minha orientadora Profa. Dra. Marin por toda confiança em mim depositada, por me receber de braços abertos no seu grupo de pesquisa e pelo imenso carinho que conduz seu excelente trabalho. Que bom tê-la junto comigo nessa etapa tão importante que é o doutorado. Entre meus erros, acertos, aprendizados e erros de novo, num ciclo intenso, eu tive o privilégio de receber suas orientações, com humildade, respeito, lágrimas, sorrisos, abraços e até comilanças. Obrigada por me inspirar!

À Adriana (Dri) por toda dedicação e parceria com o laboratório de Mutagênese Ambiental. Obrigada por tanto Dri!

Aos BFF, Cleitinho, Laís e Nadinha, por todas as discussões científicas, desabafos, momentos felizes e de desespero compartilhados.

Aos meus amigos, Adriana (Dri), Beto, Brenda, Cami Pansa, Cleiton (Cleitinho), Laís, Letícia Gigeck (baby), Nádia, Marcinha e a Maria Gabriela, os quais não soltam minha mão. Que bom tê-los comigo.

A todos do Lab de Mutagênese Ambiental, Ana Zullo, Bairral, Dânia, Franco, Gabrielly, Jaque Pira, Jaques, Letícia Gonçalves, Letícia Rosa, Mariana, Matheus, Matheus Mantuanelli, Michele, Patrícia Sinohara (Pati), Paulinha, Sérgio, Thays, Thomas, aos trigêmeos (Gabriel, Giovanna e Kemellyn) e ao William (Will) por todo conhecimento, suporte e alegria compartilhados.

Aos meus amigos, professores e funcionários do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, em especial ao grupo do projeto Primeiro Passos na Ciência I, II, III e IV e ao grupo do Bio Cel Mol por todo aprendizado e amizade compartilhados.

Ao Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro e ao Laboratório de Mutagênese Ambiental (LMA) por fornecerem toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Aos coautores do primeiro capítulo dessa tese pela parceria de excelência!

Ao Prof. Dr. Augusto, Dr. Fernando e a Ma. Letícia Tamborlim do Laboratório de Biotecnologia da FCA – Unicamp / Limeira, SP pela parceria e por todo conhecimento compartilhado, que com certeza renderá bons frutos.

Ao Prof. Dr. Fernando do Laboratório de Biologia Molecular da Uniararas por compor mais uma parceria nessa tese e por todo conhecimento compartilhado.

Ao Instituto Adolfo Lutz da cidade de Rio Claro / SP, junto ao Comitê UNESP COVID-19 de Rio Claro / SP pela parceria diante da pandemia da COVID-19, que tanto têm auxiliado o sistema público de 26 municípios da região de Rio Claro / SP. Também, por todo conhecimento e trabalhos compartilhados até os dias atuais.

Ao Instituto Adolfo Lutz da cidade de Rio Claro / SP por todas as oportunidades profissionais, confiança e amizade, gratidão infinita à diretora Andressa e equipe.

A toda família Gonçalves de Oliveira e Geromel pelo apoio, amizade e alegria compartilhados.

Às minhas amigas Eloisa (Elô), Fany Roberta e toda família Braghin, pela amizade linda que cultivamos.

A todos os meus professores por todos os ensinamentos. Desde a graduação eu me deparo com o encantamento e luta de mestres e doutores pela Ciência, todos me inspiraram e me tornaram parte desse time.

A todos os cientistas brasileiros, graduandos, pós-graduando e professores / pesquisadores que lutam pela Ciência diante da falta de investimento na área.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Como doutoranda tive o presente divino de ter tanta gente boa comigo. Essa tese representa um tanto de cada um que me acompanhou, direta ou indiretamente, nesse processo intenso da minha vida como pós-graduanda. Agora eu paro e observo... e *uau*, tanta coisa boa eu estou colocando na minha bagagem que *tá aí*, um tempo que eu repetiria sim! Gratidão a todos e vamos lá!

“Vencer a si próprio é a maior das vitórias”

Platão.

RESUMO

A problemática ambiental promovida pelo desenvolvimento da sociedade humana é um dos grandes desafios do século XXI. Dentre as principais fontes antrópicas de contaminação ambiental, estão os cemitérios. O principal contaminante desses ambientes é um líquido tóxico, derivado da putrefação cadavérica, denominado de necrochorume. Neste líquido são encontrados contaminantes químicos orgânicos e inorgânicos e biológicos, altamente prejudiciais à saúde humana, à biota endêmica (incluindo à vida animal) e ao ambiente adjacente. O potencial tóxico do necrochorume é, principalmente, devido às substâncias orgânicas presentes em sua composição, como as aminas biogênicas, cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). Ambas, são naturalmente sintetizadas por praticamente todos os seres vivos em concentrações micromolares e apresentam funções essenciais nos processos de diferenciação, crescimento e morte celular dos organismos. Contudo, em altas concentrações têm potencial citogenotóxico e até carcinogênico. Todos os compostos gerados durante a decomposição dos corpos podem contaminar o solo e os recursos hídricos (águas subterrâneas e superficiais) podendo persistir no ambiente por tempos variáveis, o que confere um alto potencial contaminante para o necrochorume. Por toda essa problemática somada ao aumento no número de mortes pela pandemia da COVID-19, torna-se necessário o desenvolvimento de mais estudos de ampla abordagem dos impactos do necrochorume sobre a saúde ambiental. No presente estudo, foram consultadas bases de dados científicos eletrônicos (NCBI); publicações de agências governamentais (por exemplo, ARPEN, Brasil); agências ambientais (por exemplo, OMS, OurWorldInData.org); sites confiáveis disponíveis gratuitamente (por exemplo, CNN); e revistas científicas relacionadas ao tema, para levantar informações sobre os impactos de contaminantes de cemitérios sobre a biota e saúde humana, bem como os impactos da pandemia na geração desses contaminantes. Foram desenvolvidos ainda estudos do potencial tóxico de associações das duas aminas biogênicas (CAD e PUT) presentes no principal contaminante de cemitérios (necrochorume), para melhor avaliar o modo de ação conjunta dessas substâncias. Linhagens celulares de anfíbio e de seres humanos foram expostas a diferentes associações dessas aminas, para avaliação da citogenotoxicidade e do potencial mutagênico (ensaios da resazurina, cometa e micronúcleo) das mesmas. Foi também avaliado, com as mesmas linhagens celulares, o perfil do ciclo celular, por citometria de fluxo, e o indicativo de morte das células, pela fragmentação do DNA da

associação de CAD e PUT. A linhagem HepG2/C3A ainda foi submetida aos ensaios de avaliação da expressão gênica, para os genes relacionados a via de estresse oxidativo (CAT, SOD1A1, GSTM4, GSR), metabolismo de xenobiontes (CYP1A1), reparo do DNA (ERCC e CHECK1), morte celular (p53 e c-MyC) e apoptose (caspase 3 e caspase 9) (dados adicionais). Os resultados obtidos com a linhagem celular *Speedy* indicaram citotoxicidade para as associações de maiores concentrações de CAD (20 e 10%) e PUT (10 e 0,1%), igualmente para as associações com 20% de CAD e com 10% de PUT, independente da concentração da bioamina associada. Em baixas concentrações, as aminas testadas induziram efeito aneugênico sobre as células *Speedy*, quando em exposição por 24 h. Já para as exposições celulares de 48h, a concentração mais alta das aminas (CAD 20% e PUT 10%) induziu fragmentação do DNA e parada do ciclo celular na fase S. Assim, os efeitos tóxicos, para a linhagem celular *Speedy*, foi tempo dependente da exposição. Em relação à linhagem celular HepG2/C3A, as associações de CAD e PUT no tempo de 24 h de exposição indicaram genotoxicidade e indicativo de potencial mutagênico por efeitos de origem aneugênica e clastogênica para todas as concentrações testadas CAD (20 e 30%), associada a PUT (10 e 30%) e ainda nessas mesmas concentrações foi observado uma diminuição na expressão dos genes CHECK1, CAT, GSTM4, GSR, CYP1A, p53, c-MyC, caspase 3 e caspase 9 e aumento da expressão dos genes ERCC1 para CAD (20 e 30%) associada a PUT (10%) e SOD1A para CAD (20%) e PUT (30%). Análises em citômetro de fluxo indicaram fragmentação no DNA no tempo de 24h e 48h de exposição para a concentração de CAD (30%) e PUT (70%). Essas informações comprovam os perigos das aminas presentes no necrochorume, tanto à saúde como ao ambiente, portanto alertam sobre os impactos negativos das contaminações de áreas cemiteriais. Os ensaios com as células *Speedy* e HepG2/C3A mostraram que as aminas biogênicas aqui avaliadas são potencialmente genotóxicas e com potencial mutagênico para diferentes vertebrados, indicando que podem desencadear problemas à saúde de trabalhadores, visitantes, da população e de todo ecossistema que vive no entorno de cemitérios.

Palavras-chave: citogenotoxicidade; citometria de fluxo; expressão gênica; impactos ambientais da COVID-19; linhagem HepG2/C3A; linhagem *Speedy*; necrochorume.

ABSTRACT

The environmental crisis caused by the societal developments of humans is one of the great challenges of the 21st century. Cemeteries are one of the main anthropogenic sources of environmental contamination. The main contaminant from cemeteries is a toxic liquid derived from cadaveric putrefaction called cemetery leachate. This liquid contains organic and inorganic chemical contaminants which are highly detrimental to human health, to endemic biota (including animal life), and to the adjacent environment. The toxic potential of cemetery leachate is mainly due to the organic substances present in its composition, such as the biogenic amines cadaverine (CAD) and putrescine (PUT). Both substances are naturally synthesized by almost all living beings in micromolar concentrations and they are essential to the processes of differentiation, growth, and cell death of organisms. However, in high concentrations, they can be their cytogenotoxic and even carcinogenic potential. All of the compounds generated during the decomposition of the bodies can contaminate the soil and water resources (ground and surface water), can persist in the environment for varying lengths of time o que confere um alto potencial contaminante para o necrochorume. Because these serious problems add ao increase in the number of deaths from the COVID-19, became necessary to develop more studies with broader scopes on the impacts of cemetery leachate on environmental health. The present study consulted electronic scientific databases (NCBI); publications from government agencies (e.g. ARPEN, Brazil); environmental agencies (e.g. WHO, OurWorldInData.org); freely available trusted websites (e.g. CNN); and scientific journals related to the topic in order to gather information on the impacts of contaminants from cemeteries on biota and human health, as well as the impacts of the pandemic on the generation of these contaminants. Studies on the toxic potential of associations of the two biogenic amines (CAD and PUT) present in the main contaminant of cemeteries (cemetery leachate) were also carried out, in order to better evaluate the joint mode of action of these substances. Amphibian and human cell lines were exposed to different associations of these amines, in order to evaluate their cytogenotoxicity and mutagenic potential (resazurin, comet, and micronucleus assays). The cell cycle profile was evaluated using flow cytometry, and the indication of cell death was also evaluated using the fragmentation of the association DNA of CAD and PUT on the same cell lines. The HepG2/C3A lineage was submitted to gene expression evaluation assays on genes related to the oxidative stress pathway (CAT, SOD1A1, GSTM4, GSR), xenobiont

metabolism (CYP1A1), DNA repair (ERCC and CHECK1), cell death (p53 and c-MyC) and apoptosis (caspase 3 and capsase 9) (additional data). The results obtained with *Speedy* cell lineage indicated cytotoxicity for the associations with the highest concentrations of CAD (20 and 10%) and PUT (10 and 0.1%), equally for the associations with 20% of CAD and with 10% of PUT, regardless of the concentration of the associated bioamine. At low concentrations, the tested amines induced an aneugenic effect on *Speedy* cells when exposed for 24 h. For cell exposures of 48h, the highest concentration of amines (CAD 20% and PUT 10%) induced DNA fragmentation and cell cycle arrest in S phase. Thus, the toxic effects for the *Speedy* cell line were time exposure dependent. In relation to the HepG2/C3A cell line, at 24 h of exposure, the associations of CAD and PUT indicated genotoxicity with an indication of mutagenic potential may be of both aneugenic and clastogenic origin, for all concentrations tested CAD (20 and 30%), associated PUT (10 and 30%). And even at these same concentrations, a decrease in the expression of the genes CHECK1, CAT, GSTM4, GSR, CYP1A, p53, c-MyC, caspase 3 and capsase 9 was observed and an increase in the expression of the ERCC1, for CAD (20 and 30%) associated with to PUT (10%), and SOD1A genes, for CAD (20%) and PUT (30%). Flow cytometer analysis indicated DNA fragmentation at 24h and 48h exposure time for the concentration of CAD (30%) and PUT (70%). This study provides information that proves the dangers of the amines present in cemetery leachate, both to health and to the environment, therefore sounding an alert about the negative impacts of the contamination of cemetery areas. The study also shows that molecular assays, such as gene expression, undertaken using the, may help to better understand the effects of the biogenic amines in cemetery leachate. Assays with *Speedy* HepG2/C3A cell lines showed that the biogenic amines evaluated here are potentially genotoxic and have mutagenic potential for humans, indicating that they can trigger health problems for workers, visitors, the population and de todo ecossistema living around cemeteries.

Keywords: cemetery leachate; cytogenotoxicity; environmental impacts of COVID-19; flow cytometry; gene expression; lineage HepG2/C3A; *Speedy* lineage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cemitério Campo da Paz Celestial de São Vicente-SP (vertical).....	25
Figura 2 - Cemitério da Saudade de Campinas-SP (horizontal tradicional).....	26
Figura 3 - Cemitério Memorial Campos Elíseos Ribeirão Preto – SP (Horizontal Parque).....	27
Figura 4 - Formação da cadaverina, a partir da descarboxilação da lisina pela enzima lisina descarboxilase.....	29
Figura 5 - Formação da putrescina, a partir da descarboxilação da L-arginina e da L-ornitina, pela enzima correspondentes.....	30
Figura 6 - Representação de um cometa (A e B) e de um micronúcleo (C).....	38
Figura 7 - Representação da técnica de citometria de fluxo, usada para análise do ciclo celular e de fragmentação de DNA.....	41
Figura 8 - Esquema representativo do ciclo celular.....	42
Figura 9: Representação das análises realizadas no Software Comet Assay IV.....	51
Figura 10 - Esquema representativo das alterações celulares consideradas na análise da proliferação celular do ensaio do MN.....	53
ARTIGO 2	
Figura 1 - Resultados do ensaio do cometa em células <i>Speedy</i> expostas em três diferentes concentrações de associações de CAD e PUT, previamente selecionadas no ensaio de resazurina.....	88
Figura 2 - Resultados das frequências de MN, brotos celulares e pontes intercelulares observadas em células <i>Speedy</i> expostas as associação T1, T2 e T3 de CAD e PUT....	90
Figura 3 - Análise de citometria de fluxo de fragmentação de DNA por coloração IP após tratamento com Cad e Put associadas em células <i>Speedy</i> (população de células subG0/G1).....	92
Figura 4 - Análise do ciclo celular (coloração IP) por citometria de fluxo após tratamento com Cad e Put associadas em células <i>Speedy</i>	93
Figura 5 - Análise de citometria de fluxo de fragmentação de DNA por coloração IP após tratamento com Cad e Put associadas em células <i>Speedy</i> (população de células subG0/G1).....	94
Figura 6 - Análise do ciclo celular (coloração IP) por citometria de fluxo após tratamento com Cad e Put associadas em células <i>Speedy</i>	95

ARTIGO 3

Figura 1 - Resultados do ensaio do cometa em células HepG2/C3A expostas em três diferentes concentrações de associações de CAD e PUT, previamente selecionadas no ensaio de resazurina.....118

Figura 2 - Alterações nucleares observadas no teste do MN, realizado com células HepG2/C3A expostas a diferentes associações das aminas biogênicas cadaverina e putrescina.....119

Figura 3 - Resultados das frequências de MN, brotos celulares e pontes intercelulares observadas em células HepG2/C3A expostas as associação T1, T2 e T3 de CAD e PUT.....121

DADOS ADICIONAIS

Figura 1 - Análise de citometria de fluxo de fragmentação de DNA por coloração IP após tratamento com Cad e Put em células HepG2/C3A (população de células subG0/G1).....149

Figura 2 - Análise de citometria de fluxo de fragmentação de DNA por coloração IP após tratamento com Cad e Put associadas em células HepG2/C3A (população de células subG0/G1).....151

Figura 3 - Análise de citometria de fluxo de fragmentação de DNA por coloração IP após tratamento com Cad e Put associadas em células HepG2/C3A (população de células subG0/G1).....153

Figura 4 - Análise de citometria de fluxo de fragmentação de DNA por coloração IP após tratamento com Cad e Put associadas em células HepG2/C3A (população de células subG0/G1).....155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações químicas descritas, de acordo com as fichas dos produtos.....	45
Tabela 2 - Porcentagem usadas nas soluções compostas pela associação das aminas biogênicas CAD e PUT, para os testes de resazurina (A), do cometa, do MN e qPCR (B) e de citometria de fluxo (C), com a linhagem celular <i>Speedy</i>	46
Tabela 3 - Porcentagem usadas nas soluções compostas pela associação das aminas biogênicas CAD e PUT, para os testes de resazurina (A), do cometa, MN e qPCR (B) e de citometria de fluxo (C), com a linhagem celular HepG2/C3A.....	48
Tabela 4 - Genes, sequências dos iniciadores e tamanho do amplicón (Pb) utilizados nos ensaios de expressão gênica.....	56

ARTIGO 1

Table 1 - Number of confirmed deaths from COVID-19 in the 5 continents, registered from March 16 (2020) to January 20 (2021).....	66
Table 2 - Total confirmed cases of COVID-19 and case fatality rate of countries ranked according to total deaths registered from March 16 (2020) to January 20 (2021).....	66
Table 3 Number of deaths confirmed from COVID-19 in Latin American countries, registered from March 16 (2020) to January 20 (2021).....	67
Table 4 - Deaths related to respiratory diseases, recorded from March 16 to December 31, for the years 2019 and 2020.....	67
Table 5 - Deaths related to respiratory and cardiac diseases, recorded from March 16 to December 31, for the years 2019 and 2020.....	67
Table 6 - Deaths cited in each of the Brazilian states, from March 16 to December 31, for the years 2019 and 2020.....	68
Table 7 - Deaths recorded in each Brazilian geographic region, from March 16 to September 15, for the years 2019 and 2020.....	69

ARTIGO 2

Tabela 1 - Soluções de diferentes concentrações da associação de CAD e PUT expostas em células <i>Speedy</i>	80
Tabela 2 - Concentrações não citotóxicas (viabilidade maior que 80%) das diferentes associações de CAD e PUT testadas.....	82
Tabela 3: Soluções das diferentes associações de CAD e PUT usadas no ensaio em citometria de fluxo.....	85

Tabela 4 - Resultados do teste de viabilidade celular (Resazurina) de células <i>Speedy</i> expostas a soluções com diferentes associações de CAD e PUT.....	87
--	----

Tabela 5 - Índice de proliferação do bloqueio de citocinese (CBPI) e frequência de MN, brotos nucleares e pontes internucleares observadas nas células <i>Speedy</i> expostas a diferentes associações das aminos biogênicas CAD e PUT.....	89
---	----

ARTIGO 3

Tabela 1 - Soluções de diferentes concentrações da associação de CAD e PUT expostas em células HepG2/C3A.....	112
---	-----

Tabela 2 - Concentrações não citotóxicas (viabilidade maior que 80%) das diferentes associações de CAD e PUT testadas.....	114
--	-----

Tabela 3 - Resultados do ensaio de viabilidade celular (Resazurina), de células HepG2/C3A expostas a soluções com diferentes concentrações de CAD e PUT.....	117
--	-----

Tabela 4 - Índice proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI), frequência de MNs, de brotos e de pontes observadas em células HepG2/C3A expostas a diferentes combinações das aminos biogênicas CAD e PUT.....	120
---	-----

DADOS ADICIONAIS

Tabela 1 - Soluções preparadas com as diferentes concentrações (%) das associações de CAD e PUT, selecionadas no ensaio de Resazurina, por apresentaram viabilidade celular maior que 80%.....	144
--	-----

Tabela 2 - Soluções preparadas com as diferentes concentrações (%) das associações de CAD e PUT, selecionadas para serem usadas no ensaio em citometria de fluxo.....	145
---	-----

Tabela 3 - Perfil de expressão de genes relacionados a danos no DNA, metabolismo de xenobióticos, estresse oxidativo, morte celular e apoptose, para as células HepG2/C3A, expostas a diferentes associações de CAD e PUT (Tabela 2). Os resultados foram normalizados com o gene endógeno da β -actina.....	146
--	-----

Tabela 4 - Perfil de expressão de genes relacionados a danos no DNA, metabolismo de xenobióticos, estresse oxidativo, morte celular e apoptose em células para as células HepG2/C3A, expostas a diferentes concentrações da associação de CAD e PUT (Tabela 3). Os resultados foram normalizados com o gene endógeno da β -actina.....	147
--	-----

APÊNDICE

Tabela 1 - Resultados do ensaio de intensidade de DNA na cauda (%), pelo ensaio do cometa, realizado com células da linhagem de fibroblasto de anfíbio (linhagem <i>Speedy</i>).....	165
---	-----

Tabela 2 - Resultados do ensaio de intensidade de DNA na cauda (%), pelo ensaio do cometa, realizado com células da linhagem de hepatoma humano (linhagem HepG2/C3A.....165

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – Duas dimensões

3Rs - Replacement, reduction e refinement

a.C – Antes de Cristo

ANOVA – Análise de variância

ARPEN - Associação Nacional dos Registradores de Pessoas Naturais

BOD - biochemical oxygen demand

Cad – Cadaverina

CadA - Enzima lisina descarboxilase

CAT - Catalase

Ca - Cálcio

CBMN – Ensaio do MN com bloqueio de citocinese

CBPI – Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese

Cd – Cádmio

cDNA – DNA complementar

CHECK1 - Checkpoint kinase 1

Cl – Cloro

c-MyC - MYC proto-oncogene

CN – Controle negativo

CNN – Canal de notícias

CO₂ – Dióxido de carbono

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente

CP – Controle positivo

Cr – Cromo

Ct - Cycle threshold – ciclo limiar

CYP1A1 - Citocromo P450, família 1, subfamília A

DL₅₀ – Dose letal 50

DMEM - Meio essencial Eagle modificado por Dulbecco

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERCC – Proteína de reparo por excisão de DNA

Fe – Ferro

g- gramas

GSR - Glutathione reductase
GSTM4 – Glutathione S-transferase Mu 4
HCl - Hipoclorito
 HCO_3 – Bicarbonato de sódio
HeLa – Henrietta Lacks
 H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio
 $\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_3$ – cadaverina
IPBC - Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese
IDC – Índice de divisão celular
IP - iodeto de propídio
iSSB - Institute of Systems & Synthetic Biology
L - Litros
M – Molar
MEM - Meio essencial Eagle
mL - Mililitros
mM - Milimolar
MMS – Metilmetano Sulfonato
MN – Micronúcleo
mRNA – RNA mensageiro
MSF – Medecins Sans Frontieres
NaCl – Cloreto de Sódio
NaOH - Hidróxido de sódio
Na - Sódio
NCBI - National Center for Biotechnology Information
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ – putrescina
 NH_4 - ammonium ions
Ni – Níquel
nM - nanômetro
NPB - pontes nucleoplasmáticas
NBUD - brotos nucleares
ODC - ornithine decarboxylase enzyme
OECD – Organization for Economic Co-operation and Development
OMS – Organização Mundial da Saúde
Pb – Pares de base

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

pH – Potencial hidrogeniônico

PPE - personal protective equipment

p53 – Proteína de tumor – TP53

PUT – Putrescina

RT-PCR - Transcrição reversa ou tempo real - reação da cadeia de polimerase

RT-qPCR – Transcrição reversa ou tempo real - reação da cadeia de polimerase quantitativa

SARS-Cov2 - coronavirus 2 da síndrome respiratória aguda grave

SBF – Soro bovino fetal

SCGE - Single Gel Electrophoresis

SOD1A1 – Superóxido dismutase 1

Ti - Titânio

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

µg - Micrograma

µL - Microlitro

VOCP.1 - Variant Of Concern P.1

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	21
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1.	Histórico de cemitérios.....	24
2.2.	Tipos de cemitérios.....	25
2.3.	Aminas Biogênicas – Biossíntese de Cadaverina e Putrescina.....	28
2.4.	Bioindicadores in vitro.....	31
2.4.1.	Cultura de Células.....	31
2.4.2.	Histórico do estabelecimento da cultura celular.....	32
2.4.3.	Linhagem celular de fibroblasto de anfíbio <i>Xenopus tropicalis</i> (Speedy).....	34
2.4.4.	Linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A).....	34
2.5.	Biomarcadores.....	35
2.5.1.	Teste de citotoxicidade/viabilidade celular – Resazurina.....	35
2.5.2.	Teste de genotoxicidade.....	36
2.5.3.	Ensaio do cometa.....	37
2.5.4.	Teste do Micronúcleo.....	39
2.5.5.	Citometria de Fluxo de iodeto de propídio (IP).....	40
2.5.6.	Ensaaios com RT-qPCR.....	42
3.	OBJETIVOS.....	44
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1.	Substância testada.....	45
4.2.	Material biológico.....	45
4.2.1.	Linhagem celular Speedy.....	45
4.2.2.	Linhagem celular HepG2/C3A.....	46
4.3.	Bioensaaios com Cultura de Células.....	48
4.3.1.	Teste de viabilidade celular.....	48
4.3.2.	Teste de viabilidade com Azul de Trypan para o ensaio do cometa.....	49
4.3.3.	Ensaio do cometa.....	49
4.3.4.	Teste de micronúcleo de bloqueio de citocinese (CBMN).....	51
4.3.5.	Perfil do ciclo celular e de fragmentação do DNA, por citometria de fluxo.....	53
4.3.6.	Análises moleculares: extração de RNA e perfil de expressão gênica.....	54
4.3.7.	Padronização e otimização dos primers.....	55
4.3.8.	Síntese do cDNA via Transcrição Reversa.....	57

4.3.9. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	57
5. ARTIGOS.....	58
Artigo 1: Another casualty of the SARS-CoV-2 pandemic the environmental impact.....	59
Artigo 2: Efeitos citogenotóxicos das aminas biogênicas cadaverina e putrescina, em associação, sobre células de fibroblastos de anfíbios.	75
Artigo 3: Citogenotoxicidade de aminas biogênicas presentes no necrochorume sobre a linhagem celular HepG2/C3A.	107
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	132
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
8. DADOS ADICIONAIS.....	144
8.1. Dados adicionais de resultados em células HepG2/C3A.....	144
8.1.1. Soluções para análise do perfil da expressão de genes e de citometria de fluxo.....	144
8.2. Resultados do perfil de expressão de genes em células HepG2/C3A.....	145
8.3. Análise de citometria de fluxo na linhagem celular HepG2/C3A.....	148
APÊNDICE A - CONCENTRAÇÕES DE CADAVERINA (CAD) E PUTRESCINA (PUT) UTILIZADAS EM DIFERENTES UNIDADES (% e mg/Kg).....	156
APÊNDICE B - PROCEDIMENTOS E SOLUÇÕES PARA MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR <i>Speedy</i>	157
APÊNDICE C - PROCEDIMENTOS E SOLUÇÕES PARA MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR HepG2/C3A.....	160
APÊNDICE D - SOLUÇÕES PARA O ENSAIO DO COMETA.....	163
APÊNDICE E - RESULTADOS DO ENSAIO DO COMETA PARA AS LINHAGENS CELULARES <i>Speedy</i> (tabela 1) e HepG2/C3A (tabela 2).....	165
APÊNDICE F - SOLUÇÕES PARA O ENSAIO DO MICRONÚCLEO.....	166
APÊNDICE G - RESULTADOS DO ENSAIO DE EXPRESSÃO GÊNICA PARA A LINHAGEM CELULAR HepG2/C3A.....	167

1. INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as fontes de poluição ambiental, as decorrentes de atividades antrópicas são as que mais se destacam. As fontes antrópicas de contaminação ambiental estão associadas às atividades agrícolas, industriais e urbanas, sendo que nessas últimas estão incluídos os contaminantes de ambientes cemiteriais (JONKER; OLIVIER, 2012 e GONÇALVES et al., 2021). Os cemitérios, por serem ambientes receptores de cadáveres com diferentes causa *mortis*, são fontes potenciais de contaminação (MIGLIORINI, 1994; GONÇALVES et al., 2021), portanto, podem representar riscos tanto à saúde humana como ao ecossistema do seu entorno (MIGLIORINI, 1994; ÜÇISIK; RUSHBROOK, 1998; NECKEL et al., 2017).

Os contaminantes das áreas cemiteriais são de característica biológica, como bactérias e vírus, e químicas. Ambos os tipos de contaminação decorrente do próprio processo de decomposição cadavérica. Somado a esses contaminantes, têm ainda os compostos derivados de objetos usados para o sepultamento (urnas, vestimentas, substâncias preservantes, cosméticos, dentre outros), que caracterizam a poluição complexa desses ambientes.

Os compostos liberados durante a putrefação dos corpos formam um resíduo líquido, denominado de necrochorume, considerado o contaminante mais importante, de maior complexidade e mais abundante dessas áreas (COSTA SILVA; FILHO, 2008; GONÇALVES et al., 2021). Devido à sua característica líquida, o necrochorume pode infiltrar-se no solo e os contaminantes podem ser transferidos para outros compartimentos ambientais, como as águas subterrâneas e superficiais. Dentre os compostos tóxicos do necrochorume, estão as aminas biogênicas derivadas da decomposição das proteínas, como a cadaverina (CAD) e a putrescina (PUT).

As aminas CAD e PUT, por apresentarem sítios nucleofílicos que permitem a conexão com ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, participam, quando em quantidades micromolares, de processos metabólicos essenciais das células (BACHRACH, 2004; GIROTO et al., 2010; LUENGO; OLIVEIRA, 2020). Portanto, em quantidades acima das fisiológicas, essas aminas causam desestabilização dessas macromoléculas, ativam processos catabólicos geradores de eventos de estresse oxidativo e de danos no DNA, alterações que podem estar associadas à carcinogenicidade e até mesmo morte celular (THOMAS; THOMAS 2001; PEGG 2013; ALZOGHAIBI, 2013; BEKEBREDE et al., 2020).

A contaminação de cemitérios tornou-se ainda mais preocupante com o aumento no número de mortes no mundo, decorrente da pandemia do SARS-CoV2 (GONÇALVES et al., 2021). A decomposição desses corpos sepultados proporcionou um aporte maior de necrochorume para o meio ambiente, comprometendo ainda mais as redes edáficas e hídricas do entorno das necrópolis, além de causar impactos consideráveis à saúde humana (FINEGAN et al., 2020, ROSER et al., 2021 e ARPEN, 2021). Portanto, a importância de seguir rigorosamente os protocolos pré-estabelecidos e procedimentos para o sepultamento de corpos contaminados com COVID-19, bem como avaliar as condições de infraestrutura dos ambientes de cemitérios tornaram-se preocupações essenciais (OMS, 2020a e GONÇALVES et al., 2021). Contudo, ainda existe uma grande necessidade de desenvolvimento de pesquisas que tragam mais informações sobre o potencial poluidor de cemitérios, uma vez que esse tema ainda é pouco abordado.

Atualmente, alguns autores têm alertado sobre os tipos de contaminantes gerados em cemitérios, bem como as melhores estruturas que podem minimizar os impactos desses contaminantes para o meio ambiente e para a saúde humana (NECKEL et al., 2017; 2020; LEMMEL et al., 2019; HONSCHA et al., 2021 e GONÇALVES et al., 2021). Dessa maneira, o desenvolvimento de ensaios que permitam avaliar a toxicidade de determinados compostos químicos presentes no necrochorume, poderá elucidar o real potencial poluidor dos cemitérios. Assim, o presente estudo visou avaliar os efeitos biológicos de associações das aminas biogênicas CAD e PUT, visto que essas aminas são geradas, continuamente e concomitantemente, no processo de decomposição cadavérica (DENT et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2012). Para tanto, foram desenvolvidos ensaios de citogenotoxicidade, de potencial mutagênico e análises moleculares com linhagens celulares (anfíbio e humana) expostas a associações dessas aminas, para estimar o potencial poluidor dessas substâncias. Esses bioindicadores foram selecionados por serem modelos importantes para as avaliações pretendidas (impactos ambientais e à saúde humana) e por representarem alternativas éticas para substituir/Replacement, reduzir/Reduction e refinar/Refinement - (3Rs) o uso de animais em experimentações científicas (ARAUJO et al., 2014 e QUADROS et al., 2020 e VICHARE et al., 2021).

A importância deste estudo está na geração de informações sobre os impactos que dois importantes contaminantes altamente tóxicos do necrochorume, as aminas biogênicas CAD e PUT, possam desencadear em bioindicadores que representam o

meio biológico e à sensibilidade humana. Por trazer informações que atestam o potencial poluidor das aminas biogênicas presentes no necrochorume, este estudo induz a reflexão da importância de monitoramento constante nesses ambientes, com vistas a minimizar seus impactos sobre a saúde humana e a todo ecossistema.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A presente pesquisa foi capaz de fornecer informações importantes sobre os contaminantes de áreas cemiteriais, bem como inferir sobre possíveis consequências ambientais, decorrentes do aumento no número de mortes pela pandemia da COVID-19. Além disso, os resultados do estudo alertam para o potencial poluidor das substâncias orgânicas presentes no necrochorume, como as aminas biogênicas CAD e PUT, quando associadas entre si. Dessa forma, podemos concluir que:

- As aminas biogênicas CAD e PUT presentes no necrochorume são substâncias citogenotóxicas, com potencial mutagênico, portanto também potencialmente carcinogênicas;
- Os contaminantes liberados no processo de decomposição cadavérica atingem o solo e recursos hídricos, causando sérios riscos para a saúde humana e para o ambiente;
- O elevado número de óbitos decorrentes da pandemia da COVID-19 alerta para o aumento dos impactos registrados em ambientes de cemitérios, decorrentes da liberação de resíduos da decomposição cadavérica;
- Os procedimentos para o sepultamento de corpos contaminados pela COVID-19 podem aumentar os perigos da contaminação pelos cemitérios, além de elevar as possibilidades de transmissão da doença entre o pessoal da área médica e dos envolvidos com a inumação dos corpos;
- O estudo destaca também sobre a importância de avaliações das condições infraestruturais dos cemitérios, com vistas à garantia da saúde dos funcionários, visitantes e da população residente ou dependentes dos recursos hídricos do entorno desses ambientes;
- Os resultados obtidos mostram ainda a necessidade de estudos que tragam informações que possam auxiliar para uma melhor compreensão do modo de ação de associações de CAD e PUT em sistemas biológicos;
- A linhagem celular *Speedy*, obtida de fibroblasto de *Xenopus tropicalis*, foi eficiente para avaliar os efeitos citogenotóxicos e potencial mutagênico de associações das aminas biogênicas CAD e PUT, presentes no necrochorume;
- Na linhagem celular *Speedy*, as aminas CAD e PUT apresentaram alta citotoxicidade para as associações de maiores concentrações testadas. No entanto, a

menor concentração de CAD (5%) só apresentou citotoxicidade, quando associada à maior concentração de PUT (10%);

- Para a linhagem celular *Speedy*, os dados apontam que os danos causados foi tempo dependente de exposição;

- Ainda nas células *Speedy*, as baixas concentrações das amins induziram um efeito aneugênico, quando em exposição por 24 h, e as concentrações mais altas induzirem fragmentação no DNA e parada do ciclo celular na fase S, em exposição por 48 h;

- Células da linhagem HepG2/C3A, expostas por 24 horas a diferentes associações de CAD e PUT, indicaram que essas amins são genotóxicas para humanos, com indicativo de potencial mutagênico para todas as concentrações testadas;

- Em HepG2/C3A, os danos induzidos ao material genético, pela exposição de associações de CAD e PUT, foram tanto de origem aneugênica quanto clastogênica;

As células da linhagem HepG2/C3A foram mais sensíveis aos efeitos das amins CAD e PUT, que a linhagem *Speedy*.

- As associações com baixas concentrações de CAD e PUT interagiram com o material genético das linhagens testadas, indicando que essas amins podem ser genotóxicas, com potencialidade de carcinogenicidade, para diferentes espécies;

- As amins CAD e PUT apresentam um alto potencial poluidor;

- Estudos sobre os contaminantes de cemitérios poderão auxiliar para o aprimoramento da legislação ambiental relacionada a esses ambientes e também para alertar sobre os possíveis perigos à saúde das pessoas ocupacionalmente expostas, bem como para a população que frequenta, vive ou depende dos recursos hídricos do entorno dessas áreas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, M. et al. Vertebrate cell culture as an experimental approach—limitations and solutions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 254, p. 110570, 2021.

AHMED, S. A. et al. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ALZOGHAIBI, M. A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 39, p. 6540, 2013.

AMBROSE, C. T. An amended history of tissue culture: Concerning Harrison, Burrows, Mall, and Carrel. **Journal of Medical Biography**, v. 27, n. 2, p. 95-102, 2019.

ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J., Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, v.560, p.57–67, 2004.

ARAÚJO, Gabrielle Luck de et al. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 55-62, 2014.

ARENA, M. E.; MANCA DE NADRA, M. C. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 158-162, 2001.

ARPEN (2021) Associação Nacional dos Registradores de Pessoas Naturais do Brasil - Portal da Transparência. Disponível em: <<https://transparencia.registrocivil.org.br/especial-covid>>. Accessed 28 Sep 2020.

ASIF, N.; MALIK, M. CHAUDHRY, F. N. A Review of on Environmental Pollution Bioindicators. **Pollution**, 4(1): 111-118, 2018.

BACHRACH, U. Polyamines and cancer: minireview article. **Amino acids**, v. 26, n. 4, p. 307-309, 2004.

BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. **Amino acids**, v. 20, n. 3, p. 301-317, 2001.

BAJPAYEE, M.; KUMAR, A.; DHAWAN, A. The comet assay: assessment of in vitro and in vivo DNA damage. In: **Genotoxicity assessment**. Humana, New York, NY, 2019. p. 237-257.

BASSET, C. A. L.; HERRMANN, I. Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissue in vitro. **Nature**, v. 190, p. 460-461, 1961.

BEKEBREDE, A. F. et al. The Molecular and Physiological Effects of Protein-Derived Polyamines in the Intestine. *Nutrients*, 12(1), 197. 2020.

BERG, C. The *Xenopus tropicalis* model for studies of developmental and reproductive toxicity. In: **Developmental Toxicology**. Humana, New York, NY, 2019. p. 173-186.

BIANCHI, J.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination *in vitro* tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 120, p. 174-83, 2015.

BIJI, K. B. et al. Biogenic amines in seafood: a review. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 5, p. 2210-2218, 2016.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 335, de 3 de abril de 2003. Dispõe sobre o licenciamento ambiental de cemitérios. Disponível em: Acesso em: 12 nov. 2021.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 368 de 28 de março de 2006. Altera dispositivos da Resolução nº 335, de 3 de abril de 2003, que dispõe sobre o licenciamento ambiental de cemitérios. Disponível em: Acesso em: 12 nov. 2021.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 402 de 17 de novembro de 2008. Altera os artigos 11 e 12 da Resolução nº 335, de abril de 2003. Disponível em: Acesso

em: 12 nov. 2021.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.L.V.; MIOT, H.A. Desenvolvimento e validação da técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

BONASSI, S. 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, 2007.

BOWES, J. B. et al. Xenbase: a *Xenopus* biology and genomics resource. *Nucleic acids research*, v. 36, n. suppl_1, p. D761-D767, 2007.

BRUSICK, D. **Principles of Genetic Toxicology**. 2 ed., Estados Unidos: Plenum Publishing Corporation, p. 1-432, 1987.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. 2009.

CAMPOS, A. P. S. Avaliação do potencial de poluição no solo e nas águas subterrâneas decorrentes da atividade cemitério. São Paulo: [s.n.], 2007.

CARVALHO, T. U. Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). Métodos de Estudo da Célula. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF., v. 2, p. 45-58, 1996.

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

CASSETTARI, C. et al. **Registro Civil das Pessoas Naturais**. Editora Foco, 2021.

CASTRO, D. L. Caracterização geofísica e hidrogeológica do cemitério bom jardim, fortaleza – CE. *Revista Brasileira de Geofísica*, v. 26, p. 251-271, 2008.

CHANGO, A. et al. Time course gene expression in the one-carbon metabolism network using HepG2 cell line grown in folate-deficient medium. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 20, n. 4, p. 312-320, 2009.

CLARK, J. M. A. The 3Rs in research. A contemporary approach to replacement reduction and refinement. *British Journal of Nutrition*, 120(S1), S1-S7. 2018.

DA COSTA SILVA, R. W.; MALAGUTTI FILHO, W. Cemitérios como áreas potencialmente contaminadas. *Brazilian Journal of Environmental Sciences (Online)*, n. 09, p. 26-35, 2008.

CROWLEY, L. C.; CHOJNOWSKI, G.; WATERHOUSE, N. J. Measuring the DNA content of cells in apoptosis and at different cell-cycle stages by propidium iodide staining and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2016, n. 10, p. pdb. prot087247, 2016.

DECORDIER, I. et al. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis*, v. 17, n. 4, p. 337-344, 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.

DERRY, P. J. et al. Abstract P792: Therapeutic Catalytic Nanoantioxidants Derived From Activated Charcoal. *Stroke*, v. 52, n. Suppl_1, p. AP792-AP792, 2021.

DOOMS, M.; CHANGO, A.; ABDEL-NOUR, Afif. La PCR quantitative (qPCR) et le guide de bonnes pratiques MIQE: adaptation et pertinence dans le contexte de la biologie clinique. In: **Annales de Biologie Clinique**. 2014. p. 265-269.

EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.

FANG, L. et al. Ensaio Cometa como uma medida indireta do Systemic Estresse Oxidativo. *JoVE Journal Biology*, May, 2015.

*FEITOSA, F. A. C.; FILHO, J. M. Hidrogeologia conceitos e aplicações. CPRM, LABHID, UFPE. Fortaleza, 412p, 1997.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n.1-2, p. 11-18, 1997.

FENECH, M.. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FINEGAN, O. et al. International Committee of the Red Cross (ICRC): General guidance for the management of the dead related to COVID-19. *Forensic Science International: Synergy*, 2, 129–137, 2020.

FINEZA, A. G. Avaliação da contaminação de águas subterrâneas por cemitérios: estudo de caso de tabuleiro-MG. Viçosa, Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008. (Trabalho de dissertação).

FRESHNEY, R. Ian; VUNJAK-NOVAKOVIC, Gordana (Ed.). **Culture of cells for tissue engineering**. John Wiley & Sons, p. 03-22. 2006.

GAJSKI, G. et al. Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in human and zebrafish cells. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 23, n. 15, p. 14739-50, 2016.

GAO, S.; LIU, F. Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 20, n. 6, p. 467-475, 2019.

GEY, G.O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research.*, 12, p. 264–265. 1952

GIGECK, L., S. Avaliação dos efeitos citogenotóxicos da associação das aminas biogênicas (cadaverina e putrescina) presentes no necrochorume, por meio de bioensaios com *Allium cepa* (Liliaceae) e *Lactuca sativa* (Asteraceae). 2018. TCC, Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP. Faculdade de Ciências da Saúde - FACIS. Piracicaba/SP.

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.

GOMEZ-LECHON, M. J. et al. Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. **Current drug metabolism**, v. 5, n. 5, p. 443-462, 2004.

GONÇALVES, L. R.; ROBERTO, M. M.; BRAGA, A. P. A.; BAROZZI, G. B.; CANIZELA, G. S.; GIGECK, L. S.; de SOUZA, L. R.; MARIN-MORALES, M. A. Another casualty of the SARS-CoV-2 pandemic-the environmental impact. *Environ Sci Pollut Res*. 29(2):1696-1711, 2021.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagênese ambiental. Canoas: Ulbra**, p. 173-200, 2003.

GONZALEZ, R. J.; TARLOFF, J. B. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. **Toxicol In Vitro**, v. 15, p. 257-9, 2001.

GUPTA, R. C. Chapter 1: Introduction. In: Gupta. R. C. (Ed.). *Biomarkers in Toxicology*. Kentucky, USA, Elsevier, pp. 3-5. 2014.

GYORI, B.M. et al. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, Amsterda, v. 2, p. 457-465, 2014.

HARA, R. V. **Avaliação dos efeitos citogenotóxicos da diamina cadaverina, presente no necrochorume, por meio de ensaios com sistemas testes *in vitro* e *in vivo***. 2016, 136 f Tese (Doutorado, Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 136 f, 2016.

HAWEL, L. et al. Biosynthesis and selective export of 1, 5-diaminopentane (cadaverine) in mycoplasma-free cultured mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7412-7418, 1994.

HELLSTEN, U. et al. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. **Science**, v. 328, n. 5978, p. 633-636, 2010.

HINTZCHE, H. et al. Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research*, Amsterda, v. 771, p. 85-98, 2017.

HIRSCH, D. et al. Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *Cancer Research*, Filadelfia, v. 73, n. 5, p. 1454-1460, 2013.

HIRSCH, N.; ZIMMERMAN, L. B.; GRAINGER, R. M. *Xenopus*, the next generation: X. *tropicalis* genetics and genomics. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 225, n. 4, p. 422-433, 2002.

HONSCHA, L. C. et al. Bioassays for the evaluation of reclaimed opencast coal mining areas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 21, p. 26664-26676, 2021.

JEDRZEJCZAK-SILICKA, M. Chapter 1: History of cell culture. **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. New Insights into Cell Culture Technology**, 2017.

SANTOS, M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. **International journal of food microbiology**, v. 29, n. 2-3, p. 213-231, 1996.

JONKER, C.; OLIVIER, J. Mineral contamination from cemetery soils: case study of Zandfontein Cemetery, South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 2, p. 511-520, 2012.

KELLY, J. H. **Permanent human hepatocyte cell line and its use in a liver assist device**

(LAD). U.S. Patent n. 5,290,684, 1 mar. 1994.

KEMERICH, P. D. C. et al. The environmental issue involving cemeteries in Brazil. **Revista Do Centro Do Ciências Naturais e Exatas**, v. 13, n. 5, p. 3777-3785, 2014.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 167-172, 2000.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 540, n. 2, p. 153-163, 2003.

KLOOSTERMAN, W. P.; CUPPEN, E. Chromothripsis in congenital disorders and cancer: similarities and differences. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 25, n. 3, p. 341-348, 2013.

KNASMÜLLER, S. et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 315-328, 2004.

KHOKHA, M. K. et al. Rapid gynogenetic mapping of *Xenopus tropicalis* mutations to chromosomes. *Dev. Dyn.* 238:1398–1346, 2009.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.*, v.455, p. 155-166, 2000.

KUMARAVEL, T. S. et al. Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 53-64, 2009.

LADERO, V. et al. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, n. 2, p. 145-156, 2010.

LAOHAVECHVANICH, P. et al. Protective effect of makrut lime leaf (*Citrus hystrix*) in HepG2 cells: Implications for oxidative stress. **Science Asia**, v. 36, p. 112-117, 2010.

LARQUÉ, E.; SABATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. **Nutrition**, v. 23, p. 87-95, 2007.

LEFEVER, S. et al. RTPrimerDB: the portal for real-time PCR primers and probes. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_1, p. D942-D945, 2009.

LELAND, D. S. e GINOCCHIO, C. C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin. Microbiol. Rev.* V. 20, n. 1, pág. 49-78, 2007.

LEMMEL, F. et al. Soil properties and multi-pollution affect taxonomic and functional bacterial diversity in a range of French soils displaying an anthropisation gradient. **Microbial ecology**, v. 77, n. 4, p. 993-1013, 2019.

LEWINSKA, A. et al. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 34, n. 8, p. 781-786, 2007.

LI, C. J. Flow cytometry analysis of cell cycle and specific cell synchronization with butyrate. In: **Cell Cycle Synchronization**. Humana Press, New York, NY, p. 149-159. 2017.

LI, Y. et al. Anti-miR-21 oligonucleotide enhances chemosensitivity of leukemic HL60 cells to

- arabinosylcytosine by inducing apoptosis. **Hematology**, v. 15, n. 4, p. 215-221, 2010.
- LIU, Y. et al. Development of an integrated process for the production of high-purity cadaverine from lysine decarboxylase. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 95, n. 5, p. 1542-1549, 2020.
- LOVELOCK, J. E. e BISHOP, M. W. H. *Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide*. *Nature*, 183(4672), 1394–1395. 1959.
- LUENGO, J. M.; OLIVERA, E. R. Catabolism of biogenic amines in *Pseudomonas* species. **Environmental microbiology**, v. 22, n. 4, p. 1174-1192, 2020.
- MACEDO, J. A. B. *Águas & Águas*. 2. ed. Belo Horizonte: CRQ-MG, 2004.
- MAGNANI, E.; BETTINI, E. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect. **Brain Research Protocols**, v. 5, n. 3, p. 266-272, 2000.
- MAIJALA, R. L. et al. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. **Journal of food protection**, v. 56, n. 2, p. 125-129, 1993.
- MALUMBRES, M.; BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Natural Revist of Cancer**. v. 9 (3) p. 153-166. 2009
- MATSUMOTO, S. T. et al. Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in of *Allium cepa*. **Genet Mol Biol**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.
- MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. F.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. M. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4334–4340, 2010.
- MAZZEO, D. E. C.; MATSUMOTO, S. T.; LEVY, C. E.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1030-1036, 2013.
- McKELVEY-MARTIN, V. J. et al. The single cell gel electrophorese assay (comet assay): a European review. **Mutation Res.**, v. 288, p. 47–63, 1993.
- MILLER-FLEMING, L. et al. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 21, p. 3389–3406, 2015.
- MOCELIN, L. C. et al. Efeito citotóxico diferencial do extrato hidroetanólico de erva-mate (*ilex paraguariensis*) sobre eritrócitos e células mononucleares de sangue periférico. **Holos**, v. 1, p. 1-16, 2021.
- MORDHORST, A. et al. Environmental risk of (heavy) metal release from urns into cemetery soils. **Science of The Total Environment**, v. 817, p. 152952, 2022.
- NAKAYAMA, G. R. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **J Immunol Methods**, v. 204, p. 205-208, 1997.
- NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic

- activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v. 6, n. 5, p. 399-403, 1991.
- NECKEL, Alcindo 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**, v. 9, p. 216-230, 2017.
- NECKEL, Alcindo et al. Hazardous elements in the soil of urban cemeteries; constructive solutions aimed at sustainability. **Chemosphere**, v. 262, p. 128248, 2021.
- NUNEZ, Rafael. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Current issues in molecular biology**, v. 3, n. 3, p. 67-70, 2001.
- O'BRIEN, John et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –OECD 487. Guideline for the testing of chemicals, in vitro mammalian cell micronucleus test, 2014.
- OLIVE, P. L.; BANATH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation research*, Lawrence, v. 122, n. 1, p. 86-94, 1990.
- OLIVEIRA, B. et al. Burial grounds' impact on groundwater and public health: an overview. **Water and Environment Journal**, v. 27, n. 1, p. 99-106, 2013.
- OSTLING, 650; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.
- PAVLICA, M. et al. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 490, n. 2, p. 209-214, 2001.
- PEGG, A. E. Toxicity of polyamines and their metabolic products. **Chemical research in toxicology**, v. 26, n. 12, p. 1782-1800, 2013.
- PEREIRA, F. D. C. Estudo dos efeitos biológicos da poliamina putrescina em diferentes organismos teste. 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, 2017.
- PERROT, S. et al. A new nondestructive cytometric assay based on resazurin metabolism and an organ culture model for the assessment of corneal viability. **Cytometry, Part A**, v. 55^a, p. 7–14, 2003.
- PETSALAKI, E.; ZACHOS, G. DNA damage response proteins regulating mitotic cell division: double agents preserving genome stability. **The FEBS journal**, v. 287, n. 9, p. 1700-1721, 2020.
- PROT, J. M. et al. Improvement of HepG2/C3a cell functions in a microfluidic biochip. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 7, p. 1704-1715, 2011.
- QUADROS, A. P. O. et al. Risk assessment via genotoxicity, metabolism, apoptosis, and cell growth effects in a HepG2/C3A cell line upon treatment with *Rubus rosifolius* (Rosaceae)

leaves extract. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 83, n. 13-14, p. 495-508, 2020.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. 1 ed. Brasil: ULBRA, p. 355, 2003.

RICCARDI, C. e NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, 1(3), 1458 1461. doi:10.1038/nprot.2006.238

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.

ROMANÓ, E. N. L. Cemitérios: passivo ambiental e medidas preventivas e mitigadoras, 2001.

ROSER, M.; RITCHIE, H.; ORTIZ-OSPINA, E.; HASELL, J. Coronavirus Pandemic (COVID-19) [WWW Document]. Publ. online Our- WorldInData.org. Disponível em: <URL [https:// ourworldin data. org/ coron avirus](https://ourworldindata.org/coronavirus)>. Acessado em: 22 Jan 2021.

ROUS, P.; JONES, F. S. A. method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 23, n. 4, p. 549-555, 1916.

RYAN, P. B. et al. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment, *Environmental Health Perspectives*, 155(5), pp. 833-840. 2007.

SAIKUMAR, P. et al. Apoptosis: definition, mechanisms and relevance to disease. *American Journal of Medicine, Bridgewater*, v. 107, n. 5, 489–506, 1999.

SALVADORI, D. M. F. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. **Mutagênese ambiental**, p. 201-222. 2003.

SHI, Z. et al. Targeted integration of genes in *Xenopus tropicalis*. **Genesis**, v. 55, n. 1-2, p. e23006, 2017.

SILVA, T. (2013). Avaliação Ecológica do Efeito Combinado de Contaminantes Ambientais. Tese de Doutorado, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro.

SINGH, N. P. et al. 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.

SINZELLE, L. et al. Characterization of a novel *Xenopus tropicalis* cell line as a model for in vitro studies. **Genesis**, v. 50, n. 3, p. 316-324, 2012.

SNEDDON, L. U., HALSEY, L. G. e BURY, N. R. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. **The Journal of Experimental Biology**, 220(17), 3007–3016. 2017.

SRISSET, Y.; CHATUPHONPRASERT, W.; JARUKAMJORN, K.. Bergenin attenuates sodium selenite-induced hepatotoxicity via improvement of hepatic oxidant-antioxidant balance in HepG2 cells and ICR mice. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 11, n. 2,

p. 97-115, 2021.

SPEIT, G.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research**, v.681, p.3-12, 2009.

STEPHENS, P. J. et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 27-40, 2011.

STRATTON, J. E.; HUTKINS, R. W.; TAYLOR, S. L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. **J. Food Prot.**, v. 54, p. 460–470, 1991.

SWAIN et al. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**. Adv. Anim. Vet. Sci. 2 (4S): 1 - 10. Special Issue-4 (Reviews on Frontiers in Animal and Veterinary Sciences). 2014.

TAKAHASHI, C. S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. **Mutagênese Ambiental. ULBRA, Canoas**, p. 151-172, 2003.

THOMAS, T. J. et al. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, n. 2, p. 244-258, 2001.

THORNTON, B.; BASU, C. Rapid and simple method of qPCR primer design. In: **PCR Primer Design**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 173-179.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, Wilmington, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TOMAR, P. C.; LAKRA, N. e MISHRA, S. N. Cadaverine. **Plant Signaling & Behavior**, 8(10), e25850. 2013.

TURKEZ, H.; ARSLAN, M. E.; OZDEMIR, O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 13, n. 10, p. 1089-1098, 2017.

WANG, Y. et al. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. **Trends in Biotechnology**, v.28, p.416-424, 2010.

WHO, W.H.O (2020a) WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard [WWW Document]. URL [https:// covid 19. who. int](https://covid19.who.int). Accessed 7 Oct 2020

VAN GOETHEM, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutat Res.**, v. 392, n. 1-2, p. 31-43, 1997.

VERMEULEN, K.; Van BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, 36(3), 131–149.2003.

VICHARE, A. S. et al. Application of the 3Rs principles in the development of pharmaceutical generics. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 125, p. 105016, 2021.

VOYTIK-HARBIN, S. L. et al. Application and evaluation of the alamarBlue assay for cell

growth and survival of fibroblasts. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 34, n. 3, p. 239-246, 1998.

ÜÇISIK, 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.

ZHANG, H. X.; DU, G. H.; ZHANG, J. T. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. **Acta Pharmacol Sin**, v. 25, p.385–9, 2004.

ZHU, Sheng et al. Modeling of genome-wide polyadenylation signals in *Xenopus tropicalis*. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 647, 2019.

ZOLI, W. et al. In vitro preclinical models for a rational design of chemotherapy combinations in human tumors. **Crit Rev Oncol Hematol**. V. 37, pág. 69-82, 2001.

ŻYCHOWSKI, J.; BRYNDAL, T. Impact of cemeteries on groundwater contamination by bacteria and viruses—a review. **Journal of water and health**, v. 13, n. 2, p. 285-301, 2015.

ZUCCO, F. et al. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in vitro**, v. 18, p. 153-163, 2004.