
**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

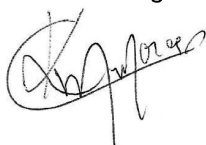
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



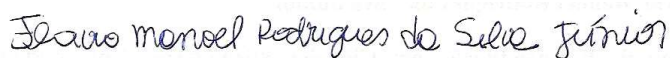
Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES (Participação Virtual) Departamento
de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro



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)
UNIARARAS / 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 aminas 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 aminas 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 apresentarem 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 Eletrophoresis

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.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico de cemitérios

A palavra cemitério, originada do grego, Koumeterian, e do latim, Coemeteriun, significa dormitório, lugar onde se dorme recinto onde se enterram ou se guardam os mortos. O cemitério tem como sinônimos as palavras necrópolis, carneiro, sepulcrário, campo-santo, cidade dos pés juntos e a última moradia (CAMPOS, 2007 e KEMERICH et al., 2014).

As práticas fúnebres, rituais e a tentativa de preservar cadáveres vieram com o aparecimento da civilização humana (OLIVEIRA et al., 2012). Há registros de que a 100.000 a.C. já era comum que os corpos fossem sepultados no solo, em interiores de grutas. O surgimento dos cemitérios com sepulturas agregadas surgiram a 10.000 a.C. Na Idade Média, os nobres eram enterrados dentro das Igrejas e os pobres nos arredores dos limites paroquiais (SILVA; MALAGUTTI, 2008, PACHECO, 2012).

Em decorrência dessa prática, o entorno das igrejas apresentava fortes odores, gerados pelo processo de decomposição cadavérica. Existem evidências de que poços de captação de água, localizados próximos às igrejas, tiveram a qualidade das suas águas comprometidas e associadas à disseminação de doenças, como tifo e peste negra (SILVA; MALAGUTTI, 2008). Como solução a esses problemas gerados, os cemitérios, de maneira geral, passaram a ser construídos afastados das zonas residenciais, mas com o crescimento urbano, as cidades acabaram se aproximando novamente desses ambientes (SILVA; MALAGUTTI, 2008; PACHECO, 2012; NECKEL et al., 2017 e GONÇALVES et al., 2021).

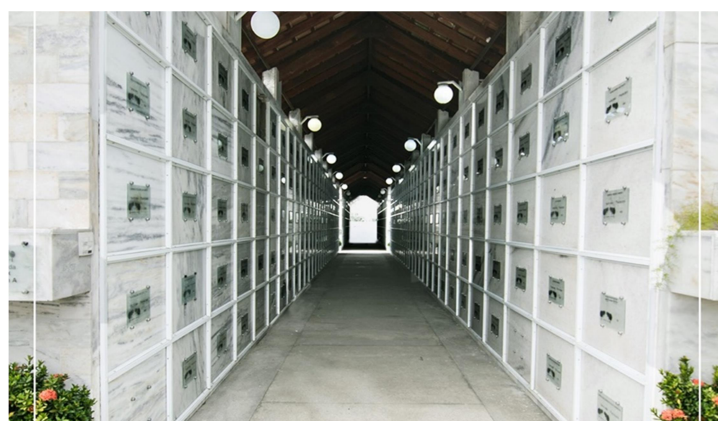
Um aspecto importante gerado em muitos países foi a falta de disponibilidade de espaço em cemitérios (CABIROL et al., 1998; DURÃES et al., 2010), o que foi parcialmente resolvido pela reutilização de sepulturas, após um período mínimo de inumação. No entanto, o acúmulo de cadáveres em um espaço limitado contribuiu e ainda contribui para a concentração elevada de poluentes ambientais, representando também riscos à saúde da população, principalmente devido ao acúmulo dos contaminantes gerados durante a decomposição cadavérica (NECKEL et al., 2021 e GONÇALVES et al., 2021). Por toda essa contaminação descrita, os cemitérios representam sérias ameaças à integridade ambiental, sendo considerada uma das principais fontes antropogênicas de contaminação de áreas urbanas (SILVA, 2011, ŻYCHOWSKI; BRYNDAL, 2015; NECKEL, 2017 e GONÇALVES et al., 2021).

2.2. Tipos de cemitérios

A destinação dos cadáveres pode ser feita em diferentes tipos de cemitérios, dentre os quais destacam-se os verticais e os horizontais, sendo que esses últimos podem ser do tradicional, que são os mais comumente instalados, e os do tipo parque ou jardim (CAMPOS, 2007; KEMERICH et al., 2014).

Ambos os tipos de necrópoles (verticais ou horizontais) apresentam características específicas, vantagens e desvantagens. Em relação aos cemitérios verticais, estes são caracterizados por constituírem prédios de dois ou mais pavimentos, dispostos com gavetas ou compartimentos para receber as urnas. Os corpos são sepultados sem contato com o solo e ficam sobrepostos, o que confere uma maior facilidade para a manutenção e tratamento dos resíduos comuns desses ambientes. Esse tipo de sepultamento ainda aumenta a própria capacidade de alocar corpos, não necessitando expandir horizontalmente (NECKEL et al., 2017) (Figura 1). Neste sistema, existe ainda a possibilidade de inativação dos gases gerados pelo processo de decomposição cadavérica, bem como de vedação, que impede o extravasamento dos compostos gerados para o ambiente e, conseqüentemente, para a exposição dos funcionários e visitantes (OLIVEIRA et al., 2013). Porém, para alcançar as vantagens citadas, há a necessidade de monitoramento na construção do cemitério, para assegurar a obtenção de uma infraestrutura correta, e manutenção constante da qualidade e da eficiência do sistema adotado (PACHECO, 1993).

Figura 1: Cemitério Campo da Paz Celestial de São Vicente-SP (vertical).



Disponível

em:

<https://cemiteriocampodapaz.com.br/post/eternidade-com-dignidade-e-sem-agredir-o-meio-ambiente>.

Os cemitérios horizontais, os do tipo tradicional, são caracterizados pela presença de túmulos semienterrados, mausoléus, capelas revestidas de mármore, granitos, cerâmica ou cimento, dispostos em ruas ou alamedas (pavimentadas ou não), com pouco ou nenhuma arborização (CAMPOS, 2007). Os cadáveres são alocados dentro de caixões e enterrados diretamente no solo ou em gavetas subterrâneas com pouca ou nenhuma vedação (PACHECO, 2012) (Figura 2). Esses cemitérios, embora tenham vantagem na disposição facilitada dos corpos, apresentam mais desvantagens que os cemitérios verticais. Nos cemitérios tradicionais, os resíduos da decomposição são expostos diretamente no solo, portanto com grande possibilidade de atingir os corpos hídricos adjacentes. Essas estruturas, além de promoverem contaminação de diferentes compartimentos ambientais (edáfica e hídrica), contaminam grandes extensões de terra, pois necessitam de maiores espaços para o sepultamento dos corpos, comparadas com os cemitérios verticais (ÜÇISIK; RUSHBROOK, 1998; NECKEL et al., 2017).

Figura 2: Cemitério da Saudade de Campinas-SP (horizontal tradicional)



Disponível em:
<https://www.acidadeon.com/campinas/NOT,0,0,1309636,confira+os+falecimentos+desta+segunda+feira+em+campinas.aspx>

Os cemitérios horizontais, do tipo parque/jardins são muito semelhantes aos tradicionais, com exceção de serem recobertos com vegetação rasteira e arbórea, sem construção de túmulos exuberantes (somente com identificações por lápides de pequenas dimensões dispostas ao nível do chão). É um tipo de necrópole cada vez mais utilizada nas cidades, por serem visualmente mais condizentes para ambientes urbanos, caracterizando uma vantagem, em relação aos cemitérios tradicionais (Figura 3). Contudo, ainda trazem as mesmas desvantagens dos tradicionais, quando à

contaminação ambiental, pois os resíduos gerados também não passam por tratamentos (CAMPOS, 2007).

Figura 3: Cemitério Memorial Campos Elíseos Ribeirão Preto – SP (Horizontal Parque).



Disponível em: <https://www.coroadeflores.net/coroadeflores-cemiterio-memorial-campos-eliseos-ribeirao-preto-sp/>

De acordo com a Resolução CONAMA nº 335/2003 (BRASIL, 2003), que trata de critérios para implantação de cemitérios, os ambientes cemiteriais são considerados fontes urbanas de contaminação ambiental. A Resolução 335/2003 foi alterada em 2006 (Resolução CONAMA nº 368/06) e em 2008 (Resolução CONAMA nº 402/08), quanto às exigências específicas para cemitérios horizontais, como o estabelecimento de distanciamento mínimo entre o nível inferior da sepultura e o lençol freático; localização na área urbana e caracterização do subsolo dos cemitérios; e critérios específicos para cemitérios instalados próximos a mananciais usados para abastecimento público.

Independente do tipo de cemitério adotado, a decomposição dos corpos sempre é passível de contaminar o ambiente e, conseqüentemente, causar riscos à saúde, principalmente, da população do entorno das necrópoles, bem como aos ecossistemas associados (OLIVEIRA et al., 2013).

O necrochorume é um líquido liberado durante o processo de decomposição cadavérica, em quantidades equivalentes a 0,60 L/kg do cadáver. Desta forma, um cadáver com cerca de 70 kg produzirá, em média, de 30 a 45 litros de necrochorume (CAMPOS, 2007 e PACHECO, 2012). O processo de produção e liberação do

necrochorume é intermitente, mas é mais significativa durante os primeiros 5 a 8 meses do sepultamento.

Esse líquido, de densidade superior à da água, apresenta boa dispersão e mobilidade no ambiente, o que possibilita o seu fácil transporte através dos compartimentos ambientais, como solo e águas superficiais e subterrâneas, por isso considerado um dos principais contaminantes de áreas de cemitérios (UÇISIK; RUSHBROOK, 1998).

O necrochorume é composto por 60% de água, 30% de sais minerais e 10% de substâncias orgânicas, muito delas potencialmente tóxicas para os seres vivos. A toxicidade desse líquido se deve aos altos teores de fósforo e nitrogênio (RAMANÓ, 2001) e a presença de metais pesados e aminas bioativas, como a CAD ($C_5H_{14}N_2$) e a PUT ($C_4H_{14}N_2$), que podem gerar íons de amônia quando degradadas (DENT et al., 2004; FINEZA, 2008; OLIVEIRA, et al. 2012 e GONÇALVES et al., 2022). O necrochorume pode possuir ainda microrganismos patogênicos na sua constituição (FEITOSA; FILHO, 1997; CASTRO, 2008; MACEDO, 2004).

2.3. Aminas Biogênicas – Biossíntese de Cadaverina e Putrescina

Aminas biogênicasou também aminas bioativas são compostos de bases orgânicas nitrogenadas que em concentrações micromolares estão presentes nos processos metabólicos normais dos seres vivos, exercendo diferentes funções fisiológicas (GIROTO et al., 2010; LUENGO; OLIVEIRA, 2020).

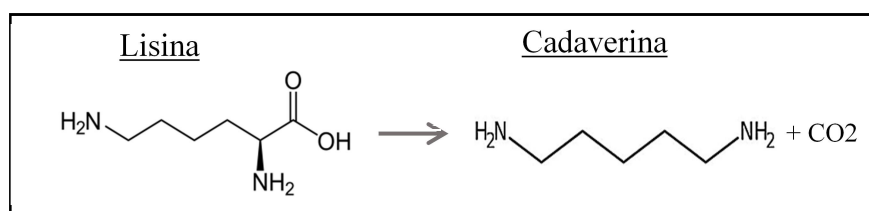
As aminas CAD e PUT, presentes no necrochorume, são classificadas de acordo com a estrutura química, em compostos alifáticos e pelo grupo amina, como diaminas (histamina, triptamina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (agmatina, putrescina, espermidina e espermina) (CASERO; MARTON, 2007; LARQUÉ et al., 2007).

A CAD é uma diamina alifática, que participa de diversos processos biológicos envolvidos com o crescimento e desenvolvimento de vegetais e animais (BAGNI; TASSONI, 2001); atua na sinalização celular, em resposta ao estresse e ainda em plantas, na defesa contra insetos (JANCEWICZ et al., 2016); e é um importante marcador de estresse ácido para *Escherichia coli* (HANEBURGER et al., 2012). Contudo, em concentrações superiores aos fisiológicos, essas aminas são biotóxicas (STRATTON et al., 1991), podendo estar relacionados nos seres humanos com o aparecimento de doenças, incluindo o câncer, diabetes, artrite e fibrose cística (TETI

et al., 2002; GERNER; MEYSKENS, 2004). Outro efeito importante desta diamina é a intensificação da toxicidade de outras amins como, por exemplo, a histamina (CHU; BJELDANES, 1981; HUI; TAYLOR, 1985). Em plantas, a concentração celular dessa amina está associada a fatores ambientais ou à exposição química de origem exógena. CAD também pode induzir alterações morfológicas em diferentes modelos de estudo, como na raiz de *Arabidopsis thaliana*, no núcleo de células meristemáticas de *Allium cepa*, no núcleo de linhagens celulares de fibroblasto de anfíbio (*Speedy*) e de hepatoma humano (HepG2/C3A) (LIU et al., 2014; STROHM et al., 2015; HARA, 2016 e GIGECK, 2018).

A síntese de cadaverina (1,5-diaminopentano) [$\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_3$] se dá por uma via exclusiva e independente de descarboxilação do aminoácido lisina intracelular, pela enzima lisina descarboxilase (CadA), amplamente distribuída em organismos eucariotos e procariotos (HAWEL, et al., 1994; BAGNI; TASSONI, 2001; LIU et al., 2020) (Figura 4).

Figura 4: Formação da cadaverina a partir da descarboxilação da lisina pela enzima lisina descarboxilase.



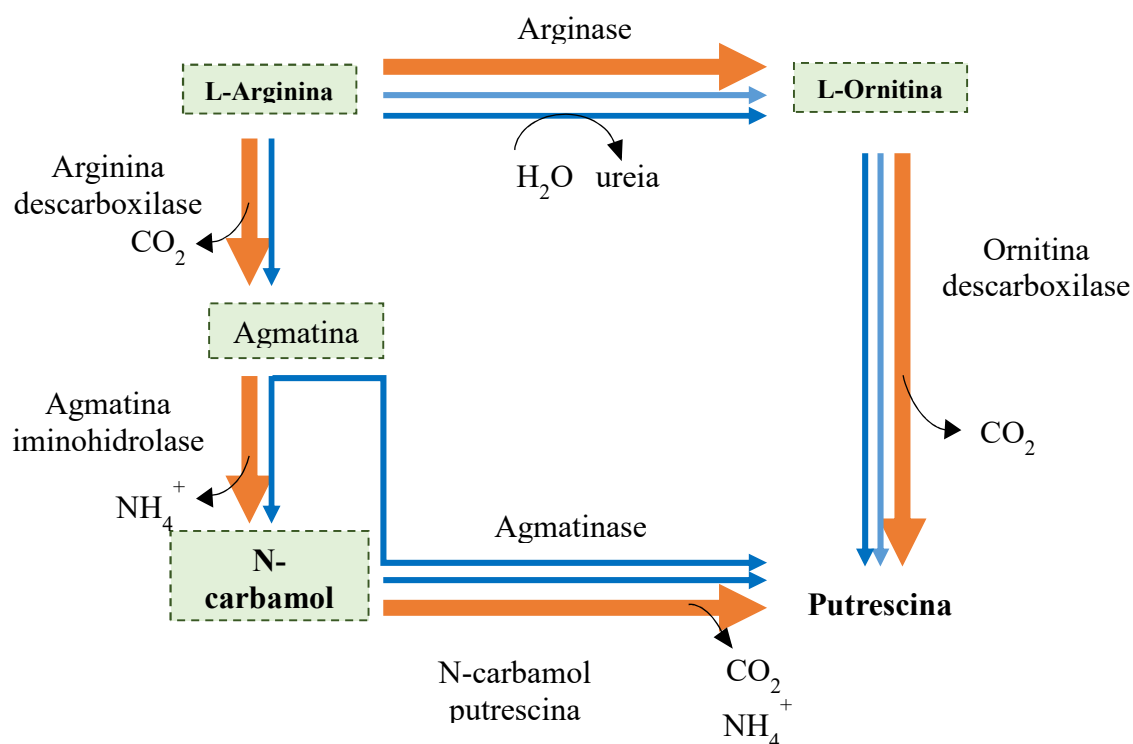
Disponível em: <https://digichem.org/2011/08/page/2/>

A lisina descarboxilase converte então o amino ácido lisina em cadaverina.

A cadaverina presente no necrochorume está associada ao grande aumento populacional de bactérias. A morte dos tecidos gera um ambiente anóxico que, somado à temperatura entre 20 e 37 °C é propício para o crescimento de bactérias putrefativas, principalmente as gram negativas que, por conterem descarboxilase, se alimentam de proteínas, carboidratos e gorduras do cadáver (MAIJALA et al., 1993 e BIJI et al., 2016). A CAD tem uma biossíntese comum e independente em todos os organismos, a partir da lisina. Contudo a síntese da CAD também pode se dar como subproduto da síntese de metionina, pela via do aspartato (TOMAR et al., 2013).

Diferentemente da formação da cadaverina, a putrescina $[\text{NH}_2 (\text{CH}_2)_4 \text{NH}_2]$, outra amina presente em células dos mamíferos, é sintetizada a partir do aminoácido arginina, em duas vias distintas. Na primeira via, que é a mais comum, a arginina é convertida em L-ornitina, pela arginase e a L-ornitina em putrescina, pela ornitina descarboxilase. Na outra via, a arginina é convertida em agmatina, pela arginina descarboxilase. A agmatina pode ser convertida diretamente em putrescina, pela agmatinase ou pode se converter primeiro em N-carbamol putrescina, pela agmatina iminohidrolase, seguida da conversão da N-carbamol putrescina em putrescina, pela N-carbamol iminohidrolase (ARENA; MANCA de NADRA, 2001; PEGG, 2009; LADERO, 2010; CAMPOS-PEREIRA, 2017; BEKEBREDE; KEIJER; GERRITS et al., 2020) (Figura 5).

Figura 5: Formação da putrescina, a partir da descarboxilação da L-arginina e da L-ornitina, pela enzima correspondentes.



Fonte: Adaptado de Campos-Pereira (2017).

Todo o processo de biossíntese de CAD e PUT são fortemente regulados por mecanismos especializados de transcrição, tradução e degradação de proteínas presentes nas vias de síntese, conferindo a manutenção dos níveis intracelulares dessas aminas. Esses mecanismos são altamente conservados em todos os organismos vivos e

demonstram que a regulação dos níveis destas moléculas é crítica para a sobrevivência celular. Todo esse metabolismo de manutenção dos níveis fisiológicos destas aminas é indicativo de que concentrações elevadas dessas aminas podem ser consideradas tóxicas para as células (MILLER-FLEMING et al., 2015; GONÇALVES et al., 2021).

2.4. Bioindicadores *in vitro*

A qualidade do meio ambiente pode ser sinalizada por um conjunto de ensaios realizados com bioindicadores adequados, que permitem estimar impactos derivados da ação de diferentes tipos de poluentes (ASIF; MALIK; CHAUDHRY, 2017). As avaliações podem ser feitas tanto por testes *in vivo*, quanto *in vitro*. Os ensaios *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo*, por respeitarem os princípios éticos de não utilização de modelos animais em pesquisas científicas (3R) e apresentarem a mesma qualidade dos resultados de testes *in vivo*. A utilização de bioindicadores *in vitro* ou *ex vivo*, como os realizados com culturas de células e organóides, e linhagens de células imortalizadas, são acreditadas pela comunidade científica por fornecerem informações consistentes sobre processos biológicos intra, intercelulares e histológicos. Além disso, o princípio 3Rs oferece ainda altos padrões de bem-estar animal, rapidez na obtenção de resultados e vantagens econômicas, por serem de baixo custo (SNEDDON; HALSEY; BURY, 2017; CLARK, 2018).

2.4.1. Cultura de Células

Ensaios *in vitro*, realizados com sistemas de cultivo celulares, têm sido amplamente utilizados em diversas áreas do conhecimento, como a virologia, oncologia, farmacologia e toxicologia, sendo importantes ferramentas para avaliações de efeitos de diferentes agentes sobre sistemas de vertebrados. Estudos realizados com esse modelo, além de permitirem a compreensão dos mecanismos celulares sem esbarrar em questões éticas de pesquisa, como os ensaios realizados com organismos vivos, minimizam os custos operacionais e de infraestrutura (LELAND; GINOCCHIO, 2007). Além disso, com os avanços biotecnológicos e de bioinformática, foi possível expandir ainda mais o uso e as aplicações das culturas celulares (LEWINSKA et al., 2007 e LI et al., 2010).

Por definição, a cultura celular primária é obtida de células de um tecido ou órgão, que são cultivadas diretamente em meio de cultura adequado. Essas células mantêm a característica do tecido original, por um determinado período tempo, mas,

em geral, morrem após certo número de divisão celular. Já as linhagens celulares contínuas, ou permanentes, embora derivem de subculturas de células primárias, são sistemas cujas células sofreram imortalização, ou seja, são capazes de se multiplicar indefinidamente, em meio de cultura específico. Quando esses dois sistemas são comparados entre si, os resultados obtidos com as células de linhagens permanentes tendem a apresentar menor variação, maior reprodutibilidade e fidelidade dos resultados (FRESHNEY, 2006).

Linhagens celulares cultivadas em sistemas bidimensionais ou de monocamadas de células, também chamadas de cultura 2D, são amplamente utilizadas para caracterizar fenótipos celulares (ZOLI et al., 2001), o que possibilita a investigação dos mecanismos de comportamento celular. Dessa maneira, na toxicologia, é possível avaliar os efeitos de uma dada substância sobre órgãos considerados alvos (ZUCCO et al., 2004), bem como estimar se um xenobionte tem ação direta ou indireta sobre o DNA (TAKAHASHI, 2003).

As vantagens do uso de linhagens celulares permanentes, citadas por diferentes autores, vão desde a boa reprodutividade, rapidez de aplicação, alta sensibilidade, facilidade de padronização, manipulação e controle das condições experimentais, até a obtenção de resultados confiáveis em curto período de tempo (BRUSICK, 1987; CARVALHO, 1996; ROGERO et al., 2003; ZUCCO et al., 2004; LEWINSKA et al., 2007). Contudo, é importante destacar que as condições de manutenção das células são cruciais para obtenção de resultados de excelência, condições essas que não mudaram desde meados do século 20, quando se iniciaram os estudos com sistemas celulares *in vitro* (ABBAS, et al., 2021).

2.4.2. Histórico do estabelecimento da cultura celular

No princípio, como as culturas celulares eram obtidas de tecido alvo, foram nomeadas de cultura celular primária. As primeiras linhagens celulares estabelecidas como sistemas *in vitro* (meados no século 20) foram de embriões de galinha (ABBAS et al., 2021). Posteriormente, novas descobertas foram sendo agregadas para melhorar as condições do cultivo, manter a célula viável por mais tempo e ter a maior preservação possível das características do tecido de origem.

Ross Harrison et al. (1907) destacaram em seus estudos a importância da assepsia para manutenção celular. Carrel e Burrows (1910; 1912) estabeleceram a base da cultura de tecidos, assim nomeado por eles, como metodologia que permite estudar

aspectos da biologia celular. Nesses estudos realizados ao longo de décadas, uma ampla variedade de tecidos de cães e de gatos adultos foi mantida *in vitro* por muitos dias. As descrições de crescimento tecidual sugerem que fibroblastos e/ou células epiteliais, quando submetidas sob condições pré-estabelecidas, se mantiveram por, aproximadamente, dois meses (AMBROSE et al., 2017).

Novas pesquisas foram sendo realizadas posteriormente e associadas aos importantes achados sobre manutenção de cultura de tecido *in vitro*. Rous e Jones (1916) cultivaram tipos específicos de células de tecidos normais e cancerosos de ratos e galinhas. Com isso, deram origem à cultura de células de vertebrados. Somente em meados de 1940, Earle estabeleceu a primeira linha celular contínua de mamífero, nomeada de células L, derivadas de tecido conjuntivo de camundongos adultos (JEDRZEJCZAK-SILICKA, 2017). George Gey (1952) estabeleceu a primeira linhagem imortal de células humanas, células HeLa, obtidas de um tumor da paciente Henrietta Lacks (do Hospital Johns Hopkins). Águia (1955) descreveu as necessidades nutricionais mínimas das células HeLa e de fibroblastos de camundongo para se manterem em cultura, e usou essas informações para determinar o 'meio mínimo' essencial (MEM) para células de mamífero *in vitro*, meio este posteriormente modificado por Dulbecco e Freeman (1959) (DMEM) (SWAIN et al., 2014).

Segundo Abbas et al. (2021), o meio DMEM está disponível em uma variedade de formulações, nas quais as concentrações de constituintes-chave como glicose, piruvato, L-glutamina e L-cistina variam, consideravelmente, a depender da linhagem celular utilizada. Além disso, DMEM suplementado com soro fetal bovino tornou-se protocolo padrão, junto à troca de meios a cada dois ou mais dias, para estimular o crescimento replicativo.

A imortalização da linhagem celular HeLa teve como base os parâmetros de assepsia, meios específicos, presença de O₂ a fim de evitar a hipóxia das células cultivadas *ex vivo* (BASSET; HeRMANN, 1961), e da habilidade de congelar e reviver as células de mamíferos. Esses processos conferem tolerância ao congelamento/descongelamento com a utilização de uma solução crioprotetora, como o glicerol, e mais tarde com a utilização do dimetilsulfóxido (DMSO) em vapor de nitrogênio líquido (LOVELOCK; BISHOP, 1959). A partir dessas descobertas, o uso como ferramenta central da cultura de células de mamíferos se expandiu em todo o mundo. Linhagens celulares são distribuídas internacionalmente e um número

crescente delas foi estabelecido ao longo dos anos que se seguiram às importantes descobertas de manutenção e cultivo (ABBAS et al., 2021).

2.4.3. Linhagem celular de fibroblasto de anfíbio *Xenopus tropicalis* (Speedy)

Xenopus tropicalis é um importante anfíbio diploide ($2n = 20$ cromossomos) para estudos genéticos, biológicos e biomédicos (BOWES et al., 2008 e ZHU, et al., 2019). *Xenopus* tem sido um bioindicador amplamente utilizado para investigar alterações nos eventos celulares, como na replicação cromossômica, na cromatina e no controle do ciclo celular, além de estudos realizados para avaliar o próprio desenvolvimento da espécie (HIRSCH et al., 2002; SHI et al., 2017; BERG et al., 2019).

O sequenciamento do genoma de *X. tropicalis* exibiu trechos de colinearidade gênica com humanos. De 20.000 a 21.000 genes codificadores de proteínas do genoma de *X. tropicalis*, 79% são ortólogos de doenças humanas identificadas e 60% de todos os modelos de genes podem ser diretamente associados a um ortólogo humano (HELLSTEN et al., 2010). O genoma exhibe sintonia substancialmente compartilhada com humanos na maior parte dos cromossomos grandes, quebrados por fusões e fissões cromossômicas específicas da linhagem.

A linhagem celular *Speedy* apresenta um cariótipo geneticamente estável ($2n = 20/21$), com 10 pares de cromossomos da espécie de origem (*X. tropicalis*). A maioria das células *Speedy* (63%) apresentou $2n = 20$, mas, uma segunda população celular dessa linhagem exibiu $2n = 21$ cromossomos, tendo um cromossomo adicional no par 10 (trissomia do cromossomo 10, $2n = 21$) (KHOKHA et al., 2009). As células *Speedy* se caracterizam como a primeira linhagem de *X. tropicalis*, obtida de cultura de células primárias de membros posteriores de girinos, denominada 91.1.F1. (SINZELLE et al., 2011). Nesse estudo, relatou-se pela primeira vez, o uso da linhagem celular *Speedy*, como modelo de estudos em ecotoxicologia.

2.4.4. Linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A)

Ensaio com culturas de células de mamíferos são amplamente aplicados em avaliações dos potenciais citotóxicos, genotóxico e mutagênico de poluentes ambientais (MAZZEO et al., 2010). As linhagens celulares de hepatócito são frequentemente utilizadas em avaliações da toxicidade de produtos químicos, por

estarem envolvidas, principalmente, com a metabolização de xenobiontes (GOMEZ-LECHON et al., 2004).

A linhagem celular HepG2/C3A é considerada um bom modelo de avaliação *in vitro*, por serem células derivadas de fígado, portanto com enzimas de metabolização de fase I e II, comuns em hepatócitos humanos normais, as quais estão envolvidas com a ativação e desintoxicação de substâncias, como pró-carcinógenos (KNASMÜLLER et al., 2004; LAOHAVECHVANICH et al., 2010). Por essas células apresentarem preservadas atividades metabólicas de biotransformação e desintoxicação de substâncias tóxicas isto é, semelhantes às células de fígado adulto, elas vêm sendo muito utilizadas em estudos toxicológicos (PROT et al., 2011; KELLY, 1994).

2.5. Biomarcadores

Biomarcadores (BM) são características biológicas qualificáveis, passíveis de serem medidas experimentalmente, que indicam a normalidade ou a ocorrência de alterações nos sistemas biológicos. Os BM podem ser do tipo molecular, bioquímico, celular, fisiológico, histológico ou de órgãos. As alterações mensuradas podem ser decorrentes tanto de processos patológicos, como de respostas à exposição à xenobióticos (RYAN et al., 2007; GUPTA, 2014). Uma das características mais importantes dos BM moleculares/celulares é que a sua avaliação precoce antecipa mudanças nos níveis superiores da organização biológica (organismo, população, comunidade ou ecossistema) (SILVA, 2013; RYAN et al., 2017).

2.5.1. Teste de citotoxicidade/viabilidade celular – Resazurina

O teste ideal para avaliar a viabilidade celular *in vitro* deve ser simples, rápido, eficiente, confiável, seguro, econômico e não deve interferir no composto testado (PERROT et. al, 2003). O teste da resazurina, também conhecido por Alamar Blue (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona) ou como diazo-resorcinol, azoresorcina e resazoína (RAMPERSAD, 2012), preenche esses requisitos, pois é um ensaio simples, de rápida execução, sensível (MAGNANI, 2000; O'BRIE et al., 2000) e que fornece uma excelente estimativa da proliferação celular e da potência do agente tóxico (PERROT et. al, 2003). Como a resazurina não é tóxica nem radioativa, não confere problemas de exposição ou de descarte de resíduos. É um teste econômico, pois permite que as células sejam reutilizadas em outros ensaios, além de serem necessárias poucas células (cerca de 80 células) para a obtenção de resultados (PERROT et. al,

2003). Assim, o ensaio de resazurina é uma excelente ferramenta a ser utilizada em testes *in vitro*, para medir a viabilidade celular e citotoxicidade em células eucariontes, após a exposição a agente tóxico (AHMED et al., 1994; NAJAYAMA et al., 1997). Por serem fotossensíveis as incubações devem ser feitas no escuro (PERROT et al., 2003; ZHANG et al., 2004; RAMPERSAD, 2012).

A resazurina é um corante azul solúvel em água, não fluorescente que, quando reduzido dentro das células, transforma-se em um corante altamente fluorescente de cor rosa, denominado de resofurina (MAGNANI, 2000). Essa conversão é ocasionada por células viáveis, com metabolismo intracelular ativo, a partir da ação de enzimas mitocondriais, microssomais ou por enzimas que ficam no citosol, do tipo oxidorreductase ou diaforase (O'BRIE et al., 2000; GONZALEZ et al., 2001 e RAMPERSAD, 2012). Essa alteração do estado oxidado para o estado reduzido promove uma mudança na cor das células, possibilitando detectar, visualmente, a presença ou ausência de células viáveis, bem como quantificar a viabilidade celular, por leituras colorimétricas e/ou fluorimétricas (sendo este último mais sensível) (PERROT et al., 2003).

O ensaio da resazurina tem alta sensibilidade e linearidade, é solúvel em água, não envolve lise celular e pode ser usado em diferentes modelos celulares, como linfócitos (MOCELIN et al., 2021), células de cérebro de rato (DERRY et al., 2021), células hepáticas (SRISSET et al., 2021) e células de fibroblastos (VOYTIK-HARBIN et al., 1998).

2.5.2. Teste de genotoxicidade

Avaliações genotóxicológicas são consideradas um importante *endpoint* de investigação de toxicidade. Vários ensaios *in vitro* e *in vivo* são desenvolvidos para este fim. Estudos de genotoxicidade auxiliam na detecção de danos na molécula de DNA (tanto gênicos como cromossômicos), promovidos por possíveis mutágenos e carcinógenos humanos (TURKEZ et al., 2017).

Dentre os ensaios de genotoxicidade, se destacam os ensaio do cometa e o teste do micronúcleo (MN). Esses testes, quando combinados, são excelentes ferramentas para detecção de diferentes danos no DNA e contribuem para uma melhor avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de compostos, cujos modos de ação ainda são pouco compreendidos (VAN GOETHEM et al., 1997; MAZZEO et al., 2013; BIANCHI et al., 2015; GAJSKI et al., 2016). Já as análises de citometria de fluxo e de

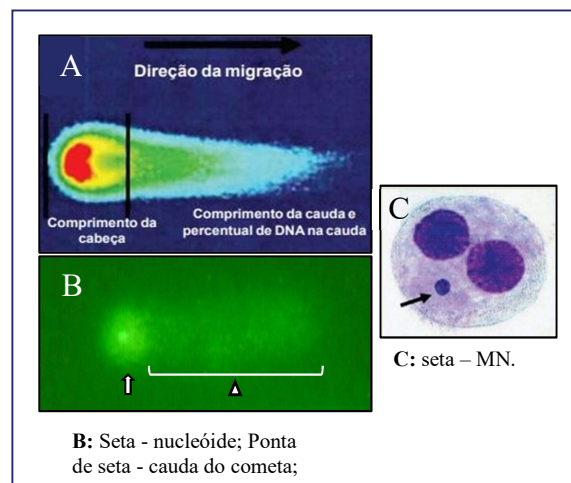
expressão gênica são ensaios que permitem novas abordagens, que podem trazer uma melhor interpretação dos resultados obtidos em outros ensaios, como os de genotoxicidade. A associação dessas novas tecnologias às já convencionalmente usadas em avaliações de toxicidade, como os ensaios do cometa e do MN, pode configurar uma estratégia consistente na busca de uma melhor compreensão dos mecanismos de ação de produtos químicos que possam afetar a saúde humana e a qualidade ambiental (TURKEZ et al., 2017).

2.5.3. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa ou Single Gel Eletrophoresis (SCGE) é um teste eficiente, simples, rápido e sensível para avaliar danos genotóxicos, detectar baixos níveis de danos no DNA, bem como reparos de DNA promovidos por agentes alquilantes, intercalantes e/ou oxidantes (PAVLICA et al., 2001; ANDRADE et al., 2004 e MATSUMOTO et al., 2006). Esse ensaio foi descrito por Ostling e Johanson (1984) e Speit et al. (2009) e tornou-se muito utilizado pela possibilidade de ser aplicado em diferentes tecidos e tipos celulares e por requerer baixo número de células, em qualquer fase do ciclo celular, para a sua execução (PAVLICA et al., 2001). Esses ensaios vêm sendo muito utilizado por diversos pesquisadores ao redor do mundo, cujos resultados têm mostrado sua versatilidade de aplicação (OLIVE et al., 1990, TICE, 2000; BAJPAYEE et al., 2019).

Nesse ensaio, as células são dispostas em lâminas cobertas por agarose, onde são lisadas (remoção de membranas e constituintes celulares solúveis), para a obtenção de nucleóides (núcleos sem envoltório nuclear, mas com proteínas que mantêm a forma do núcleo). Em seguida, os nucleóides são submetidos à eletroforese, para o deslocamento de fragmentos derivados de eventuais quebras do material genético, promovidas pelo agente testado, em relação à posição da cabeça do nucleóide, formando uma figura semelhante a um cometa (Figura 6) (OSTLING; JOHANSON, 1984; AZQUETA; COLLINS, 2011).

Figura 6: Representação de um cometa (A e B) e de um micronúcleo (C)



Fonte: Figuras adaptada pela autora: (A e C) disponível em <https://www.cosmeticsonline.com.br/artigo/400>; (B) disponível em FANG et al., 2015.

Nesse teste, quando realizado com o $\text{pH} > 13$, ou seja, em condições alcalina, é possível detectar quebras de fita simples e ligações cruzadas, quebras de dupla-fita, sítios álcali-lábeis, sítios abásicos e excisão de sítios incompletos de reparo (TICE et al., 2000; COLLINS, 2004 e BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009). Gontijo e Tice (2003) destacam, ainda, que quando a dupla fita de DNA é exposta ao pH extremamente alcalino, resulta em desnaturação dessa macromolécula, com separação das fitas. No entanto, se realizado em $\text{pH} \sim 7$, ou seja, condições neutras, poderá ser detectado quebras de fita dupla e de ligações cruzadas, sendo assim, resulta em uma análise mais limitada do ensaio (SINGH et al., 1988).

O software *Comet Assay IV*, usado nas análises dos cometas, permite medidas quantitativas e mais reprodutíveis do que as obtidas pelas análises visuais (KUMARAVEL et al., 2009; GYORI et al., 2014). *Comet Assay IV* segue os estudos de Olive, Banath e Durand (1990), onde a apresentação dos resultados é descrita a partir do momento da cauda analisado, sem unidades de medida. O momento da cauda é a proporção da intensidade da cauda e o comprimento da mesma (OLIVE; BANATH; DURAND, 1990). No entanto, o cálculo para o momento da cauda pode variar entre diferentes softwares e, devido a isso, dificulta a comparação entre resultados descritos por diferentes laboratórios. Assim, se não houver uma variação no comprimento da cauda das células expostas, a intensidade de DNA na cauda passa a ser a maneira mais precisa para se quantificar os danos (McKELVEY-MARTIN et al.,

1993). Dessa maneira, para fins regulatórios, o parâmetro de análise mais recomendado é o da porcentagem de DNA na cauda (KUMARAVEL et al., 2009).

2.5.4. Teste do Micronúcleo

Outra técnica amplamente utilizada para avaliar danos genotóxicos, tanto em sistemas *in vivo* quanto *in vitro* é o teste do micronúcleo (MN). Os MN também conhecidos como corpos de Howell-Jolly, foram identificados e descritos pela primeira vez em eritrócitos pelos hematologistas William Howell e Justin Jolly (FENECH, 2010).

Historicamente, o ensaio do MN foi desenvolvido para avaliar a presença de MN, especificamente, em células que completaram um ciclo de divisão nuclear, após exposição a um agente testado. Para sistemas *in vitro*, utiliza-se a citocalasina B para bloquear o processo de citocinese, resultando em um acúmulo de células binucleadas, independentemente do grau de sincronia e da proporção de células em divisão (FENECH, 1997; FENECH, 2000; KIRSCH-VOLDERS et al., 2002 e FENECH, 2010). A citocalasina B inibe a polimerização da proteína actina, a qual atua na formação do anel de microfilamentos responsável pela contração do citoplasma e clivagem da célula parental, em duas células-filhas (FENECH, 2000; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; OECD, 2014b).

No ensaio do MN também podem ser avaliados outros biomarcadores associados a danos no DNA, como as pontes nucleoplasmáticas e os brotos nucleares. Uma vez que esse ensaio foi projetado para detectar todos esses eventos, o ensaio do MN com bloqueio de citocinese (CBMN) evita subestimativas de frequência de MN e de outros danos no DNA, resultantes da contagem de células que não passaram por um ciclo de divisão celular (FENECH, 2007; FENECH, 2010). As agências regulamentadoras de todo o mundo recomendam o ensaio do CBMN para serem usados em avaliações de genotoxicidade (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Além disso, a OECD (2014) recomenda que seja quantificado o Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (CBPI), para indicar o número médio de núcleos por célula. Um valor reduzido de CBPI indica citotoxicidade.

Pelo ensaio do MN é possível avaliar danos genéticos induzidos por diversos agentes tóxicos, tanto de característica clastogênica como aneugênica; defeitos nos *checkpoints* do ciclo celular e/ou de genes de reparo do DNA; estresse oxidativo; bem como indução de morte celular (BONASSI et al., 2007). Os MN são estruturas que

podem ser formadas por fragmentos cromossômicos, derivados de quebras cromossômicas ou por perdas de cromossomos inteiros, que não se associaram aos fusos mitóticos, no momento da segregação dos mesmos para os polos opostos das células em divisão. Como consequência, na telófase, os fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros perdidos são envolvidos por membrana, formando uma estrutura semelhante a um pequeno núcleo (RIBEIRO et al., 2003 e KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

Alguns estudos indicam algumas possibilidades de destinos dos MN e de células micronucleadas. Estudos *in vitro* (células humanas e células de hamsters) e *in vivo* (experimentos com ratos) propuseram que, após a formação do MN, este pode sofrer degradação, reincorporação, extrusão ou persistência. Em relação a persistência, onde o DNA micronuclear não sofre alteração e/ou reincorporação durante o evento da mitose, pode levar ou não a formação de células filhas mutantes, além de desencadear processo tumoral (HINTZCHE et al., 2017). Stephens et al. (2011) indicaram possíveis destinos de células micronucleadas, como cromotripsis e apoptose. A cromotripsis é caracterizada pela presença de um elevado número de quebras do DNA, de um ou vários cromossomos, seguido de uma possível reorganização aleatória, que pode estar associada a doenças congênitas e ao câncer (STEPHENS et al., 2011; KLOOSTERMAN; CUPPEN, 2013 e HIRSCH et al., 2013). A apoptose é uma forma de morte celular essencial ao desenvolvimento e homeostase de tecidos, que também pode ocorrer nos processos normais de eliminação de MN (SAIKUMAR et al., 1999; DECODIER et al., 2002).

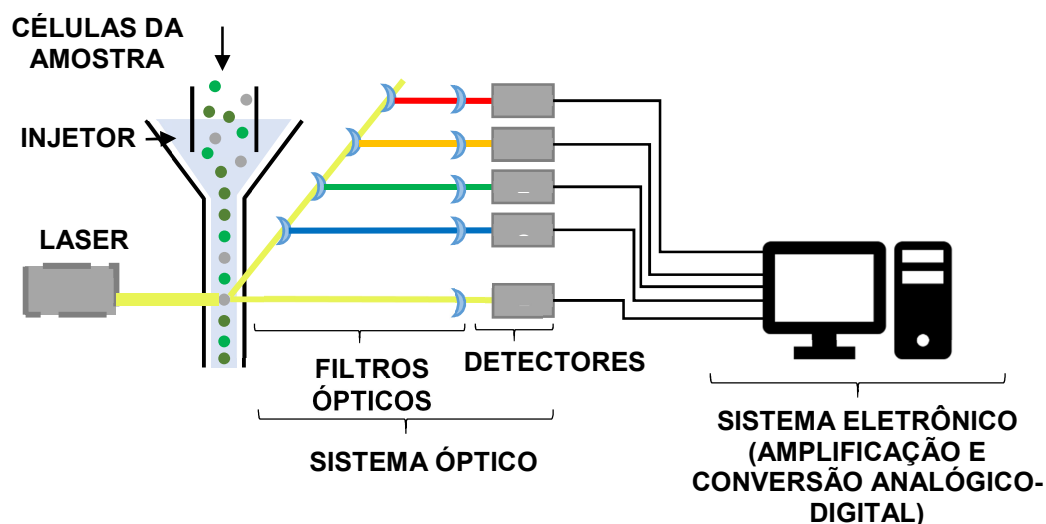
2.5.5. Citometria de Fluxo de iodeto de propídio (IP)

O ensaio de citometria de fluxo de iodeto de propídio (IP) tem sido amplamente utilizado em diferentes modelos experimentais, para avaliar parâmetros do ciclo celular e fragmentação do DNA, como indicativo de morte celular. Em linhagens celulares, as células apoptóticas ou necróticas, entre outras características típicas, são caracterizadas por fragmentação do DNA e, conseqüentemente, perda desse material fragmentado (RICCARDI e NICOLETTI, 2006).

Na técnica de citometria de fluxo, as células são previamente coradas com o composto fluorescente IP, que se liga diretamente ao DNA. Dessa maneira, a medição da fluorescência representa a quantidade de corante absorvido pelas células e, indiretamente, a quantidade de DNA (LI, 2016). A técnica tem como base a passagem

de um fluxo de partículas individuais, por uma região que contém feixes de lasers, que permitir medir a fluorescência, por múltiplos comprimentos de onda e pontos de dispersão de luz (figura 7) (NUNEZ, 2001; CRAM, 2002 e WANG et al., 2010).

Figura 7- Representação da técnica de citometria de fluxo, usada para análise do ciclo celular e de fragmentação de DNA.



Fonte: Figura elaborada pela autora (2022).

Com isso, é possível calcular as fases do ciclo celular nas células submetidas à técnica. Isso porque, no ciclo celular, há uma série de eventos em que os componentes celulares são duplicados e segregados, com precisão, para as células filhas. Este consiste de algumas fases (figura 8): G1 (pré-síntese de DNA), S (síntese de DNA), G2 (pré- mitótica) e M (mitótica). As denominadas células quiescentes são aquelas que se encontram, momentânea ou definitivamente, fora do ciclo celular, portanto, em G0 (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Figura 8: Esquema representativo do ciclo celular.



Fonte: Figura elaborada pela autora (2022).

O ciclo celular é regulado por uma rede bioquímica bastante complexa, para manter a integridade celular, uma vez que há pontos de restrição (entre G0 e G1) e *checkpoints* que regulam a entrada na fase S e a entrada e saída da fase M (VERMEULEN et al., 2003). Como na fase S ocorre a replicação do DNA, nas fases subsequentes (G2/M) a célula terá duas cópias do seu material genético. Durante o processo de divisão que ocorre na fase M serão então formadas duas células filhas, como o mesmo conteúdo inicial da célula mãe (fase G0/G1) (CROWLEY et al., 2016 e PETSALAKI et al., 2020).

Já em relação ao indicativo de morte celular, pelos ensaios de citometria - coloração IP -, a fragmentação nuclear é identificada quando as células exibem baixa emissão da fluorescência do IP. Contudo, a presença de fragmentos, identificados pelos ensaios com IP, não certifica o tipo de morte envolvido no processo (apoptose ou necrose), embora seja um indicativo de morte apoptótica. Para a comprovação desta apoptose sugerida, torna-se necessária a associação desses dados com os de outros testes, também realizados em citometria, como os de anexina-V ou de ensaios de análise de expressão gênica (RICCARDI; NICOLETTI, 2006).

2.5.6. Ensaios com RT-qPCR

A reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR quantitativa) é uma ferramenta de estudo em biologia molecular e em biotecnologia, onde se utiliza ácidos nucleicos (DNA ou mRNA, principalmente) para

caracterizar a atividade de um sistema vivo (BUSTIN et al., 2009; THORNTON et al., 2015).

A técnica consiste de grande sensibilidade, porque permite quantificar sequências de nucleotídeos específicos de um gene de interesse, a fim de estimar a razão da expressão relativa dos genes, em relação às amostras controle e outras. Dessa maneira, é possível determinar se o alvo é expresso sob certas condições, bem como calcular a expressão do nível deles (CHANGO et al., 2009; THORNTON et al., 2015). A leitura das informações é feita com a utilização de oligonucleotídeos de um determinado alvo, sendo, portanto, importante garantir a qualidade e a relevância deles. Contudo, é essencial que as sequências utilizadas sejam publicadas, o que nem sempre acontece (BUSTIN et al., 2009).

Um dos agentes fluorescentes utilizados para detecção dos alvos é o SYBR® Green, composto este que se intercala aos ácidos nucleicos, mais especificamente com qualquer sequência de nucleotídeos de fita dupla, para a emissão de fluorescência.

Os processos realizados para gerar dados de RT-qPCR não são difíceis, embora a garantia de sua qualidade e sua adequação com a realidade biológica estudada seja mais difícil e ao mesmo tempo crucial (DOMMS et al., 2014). Consultar um guia consistente de boas práticas, com informações mínimas para publicação de experimentos de RT-qPCR (MIQE), garante a qualidade dos resultados, sua compreensão e adequação do fenômeno estudado (BUSTIN et al., 2009).

3. OBJETIVOS

A cadaverina (CAD) e a putrescina (PUT) são aminas biogênicas produzidas durante a decomposição cadavérica. Estas aminas, que são encontradas no necrochorume, podem ser tóxicas e causar danos ao ecossistema e à saúde humana. O objetivo deste estudo foi alertar para os impactos que o necrochorume pode promover no ambiente, bem como na saúde humana, e avaliar o potencial tóxico e o mecanismo de ação de diferentes associações das aminas CAD e PUT sobre as linhagens celulares humanas e de anfíbio, como segue:

- Discutir a contaminação ambiental por necrochorume, comum em ambientes de cemitérios, e o agravamento desses impactos pela pandemia da COVID-19.
- Determinar as concentrações citotóxicas de associações de CAD e PUT, para as linhagens celulares *Speedy* e HepG2/C3A, por meio do ensaio de Resazurina;
- Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e potencial mutagênico de associações de CAD e PUT para as linhagens celulares *Speedy* e HepG2/C3A, por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo;
- Avaliar o potencial de alteração do ciclo celular e da indução de processo de morte celular nas linhagens celulares *Speedy* e HepG2/C3A, após exposição delas à associação de CAD e PUT, por meio do ensaio de citometria de fluxo, com iodeto de propídeo (IP);
- Avaliar as alterações no padrão de expressão de genes envolvidos nas vias de -metabolização de xenobióticos, de reparo do DNA e de estresse oxidativo, para a linhagem celular HepG2/C3A, promovidas pela exposição das mesmas à associação de CAD e PUT, por meio do ensaio de RT-qPCR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

- Parte A

4.1. Revisão de literatura

No presente estudo foi descrita uma revisão de literatura das informações dos impactos de contaminantes de cemitérios sobre a biota e a saúde humana, bem como os impactos da pandemia na geração desses contaminantes. Como ferramenta de estudo, foram realizadas pesquisas em 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.

- Parte B

4.2. Substância testada

No presente estudo, foram avaliadas diferentes associações das aminas biogênicas cadaverina (1,5-Diaminopentano, 1,5-Pentanodiamina, Pentametilenediamina) (CAD) e da putrescina (1,4-Diaminobutano) (PUT). Ambas fornecidas pela Sigma-Aldrich, cujas informações químicas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Informações químicas descritas, de acordo com as fichas dos produtos.

Substâncias	Cadaverina	Putrescina
Fórmula Linear	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Peso Molecular	102,18 g/mol	88,15 g/mol
Pureza	97%	99%
CAS	462-94-2	110-60-1

Fonte: elaborado pela autora (2022).

4.3. Material biológico

Para a realização das análises deste trabalho foram utilizadas duas linhagens celulares: a linhagem de fibroblasto do anfíbio (*Xenopus tropicalis*), nomeada de linhagem celular *Speedy*, bem como a linhagem de célula metabolizadora humana (HepG2/C3A), derivada de hepatoma humano.

4.3.1. Linhagem celular *Speedy*

As células da linhagem de fibroblasto do anfíbio (*Xenopus tropicalis*), nomeada de linhagem celular *Speedy*, descritas por Sinzelle et al. (2012), foram cedidas pelo Prof. Dr. Nicolas Pollet do Institute of Systems & Synthetic Biology – iSSB – Genopole/França e inseridas no banco de células do Laboratório de Mutagênese Ambiental do Departamento de Biologia da UNESP-IB/Rio Claro/SP. O cultivo celular foi realizado, em frascos de 25 cm², com meio Leibowitz L-15, preparado com solução antibiótica/antimicótica e suplementado com 10% de soro bovino fetal, mantidos em incubadora BOD a 28 °C. Inicialmente, alíquotas da linhagem *Speedy*

foram descongeladas em 10 mL de meio Leibowitz L-15, diluído e suplementado com SBF. Após o crescimento celular, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas com Tripsina-EDTA 0,25% por 1 minuto. Em seguida, a tripsina foi inativada com 1,5 mL de meio de cultura suplementado. Nessas condições, o ciclo celular foi de 24 horas. Após obter 80% de confluência celular, foram realizados os testes da resazurina, do cometa, do MN com bloqueio de citocinese e de citometria de fluxo. Os percentuais da associação de CAD e PUT foram estabelecidos através da amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de cadaverina (Til, et al.,1997) e da DL₅₀ 463 mg/kg para ratazanas de putrescina, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. As concentrações de cada amina usada em cada associação estão descritas na tabela 2. A unidade em mg/kg correspondente a cada percentual das aminas biogênicas utilizadas estão descritas no Apêndice A; os procedimentos e as soluções empregadas para manutenção das células *Speedy* estão apresentados no Apêndice B.

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 *Speedy*.

Soluções de CAD + PUT	Ensaio com a linhagem celular <i>Speedy</i>		
	A	B	C
1	20% + 0,01%		
2	20% + 0,10%		
3	5% + 10%		
4	10% + 10%		
5	20% + 10%		T4 - 20% + 10%
6	10% + 0,10%	T1 - 10% + 0,1%	T1 - 10% + 0,1%
7	10% + 0,01		
8	5% + 0,10%	T2 - 5% + 0,10%	T2 - 5% + 0,1%
9	5% + 0,01%	T3 - 5% + 0,01%	T3 - 5% + 0,01%

A: Associações de CAD e PUT no Ensaio de Resazurina; B: Ensaio do cometa e teste do micronúcleo (MN); C: Ensaio de citometria de fluxo. 1 a 9: soluções testadas. T1 a T4: associações selecionadas para os testes realizados. As concentrações foram estabelecidas através da amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de cadaverina (Til, et al.,1997) e da DL₅₀ 463 mg/kg para ratazanas de putrescina, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. Fonte: elaborado pela autora (2022).

4.3.2. Linhagem celular HepG2/C3A

As células de hepatoma humano, nomeada de linhagem celular HepG2/C3A, foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro e inseridas no banco de

células do Laboratório de Mutagênese Ambiental do Departamento de Biologia da UNESP-IB / Rio Claro / SP. O cultivo celular foi realizado em meio essencial Eagle modificado por Dulbecco - DMEM (suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL/estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab). Foram utilizados frascos de 25 cm² (com ventilação de cultivo celular), mantidos em temperatura controlada (37 °C), em estufa de CO₂ (5%) e umidade de 60%. Inicialmente, foram descongeladas alíquotas contendo a linhagem HepG2 em 10 mL de meio MEM com soro bovino fetal (SBF). Após o crescimento celular, as células foram lavadas, duas vezes com 5 mL de PBS, tripsinizadas por 5 minutos, com Tripsina-EDTA 0,5%. Na sequência, foram adicionados às células 1,5 mL de meio de cultura suplementado, para inativar a tripsina. Nessas condições, o ciclo celular foi de 24 horas. Os procedimentos e as soluções empregadas para manutenção das células HepG2/C3A estão apresentados no Apêndice C. Após obter 80% de confluência celular, foram realizados o teste da resazurina, ensaio do cometa, teste do MN com bloqueio de citocinese, ensaios de qPCR e de citometria de fluxo. Os percentuais das associações de CAD e PUT foram estabelecidos pela amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg, para ratos, de cadaverina (Til, et al.,1997) e da DL₅₀ 463 mg/kg, para ratazanas, de putrescina, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. As concentrações de cada amina usada nas associações estão descritas na tabela 3.

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.

Soluções de CAD e PUT	Ensaio com a linhagem celular HepG2/C3A		
	A	B	C
1	40% + 60%	-	-
2	40% + 30%	-	-
3	40% + 10%	-	-
4	30% + 70%	-	T4 - 30% + 70%
5	30% + 30%		
6	30% + 10%	T1 - 30% + 10%	T1 - 30% + 10%
7	20% + 70%	-	-
8	20% + 30%	T2 - 20% + 30%	T2 - 20% + 30%
9	20% + 10%	T3 - 20% + 10%	T3 - 20% + 10%

A: Ensaio de Resazurina; B: Ensaio do cometa, teste do micronúcleo (MN) e qPCR; C: Ensaio de citometria de fluxo. 1 a 9: soluções testadas. T1 a T4: soluções selecionadas, renomeadas de tratamento 1 ao 4. As concentrações foram estabelecidas através da amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de cadaverina (Til, et al., 1997) e da DL₅₀ 463 mg/kg para ratazanas de putrescina, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. Fonte: elaborado pela autora (2022).

4.4. Bioensaios com Cultura de Células

4.4.1. Teste de viabilidade celular

As células das linhagens celular *Speedy* e HepG2/C3A, foram expostas às associações de CAD e PUT, para a realização do ensaio de Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin 3-ona 10-óxido), de acordo com o protocolo de O'Brien et al., (2000), com algumas modificações. $2,34 \times 10^6$ células foram colocadas em microplacas de 96 poços, para estabilização, e mantidas de acordo com as condições especificadas nos itens 4.3.1 e 4.3.2, por 24 h. Em seguida, foram avaliadas nove (9) soluções preparadas com diferentes percentuais de CAD e PUT, para cada uma das linhagens celulares testadas (*Speedy* e HepG2/C3A, Tabelas 2 e 3, respectivamente). O controle negativo (CN) foi realizado com meio de cultura celular e o controle positivo (CP) com meio de cultura celular e Triton X-100 a 1%. Em seguida, as células foram incubadas por 4 h com resazurina (44 µM). As placas foram então medidas num leitor de placa, modelo Infinite M200 Pro™ plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany), a 590 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. As concentrações testadas foram

consideradas citotóxicas, quando apresentaram valores inferiores a 80% com base nos valores obtidos pelos observados no CN.

4.4.2. Teste de viabilidade com Azul de Trypan para o ensaio do cometa

Para a realização do ensaio do cometa foi realizado, previamente, um teste de viabilidade celular com Azul de Trypan. As células foram coletadas e avaliadas, quanto a sua viabilidade, no dia da realização do ensaio do cometa. Para a realização deste teste, foram transferidos 20 µL da suspensão celular, de cada tratamento, para microtubos previamente identificados. A suspensão celular foi homogeneizada com 20 µL de Azul de Trypan. Posteriormente, foram transferidos os 40 µL para uma câmara de Neubauer, para a identificação e contagem das células brancas (células viáveis) e das azuis (não viáveis). Em seguida, foi calculada a porcentagem das células viáveis. Quando a viabilidade celular foi igual ou maior que 80%, deu-se continuidade ao experimento.

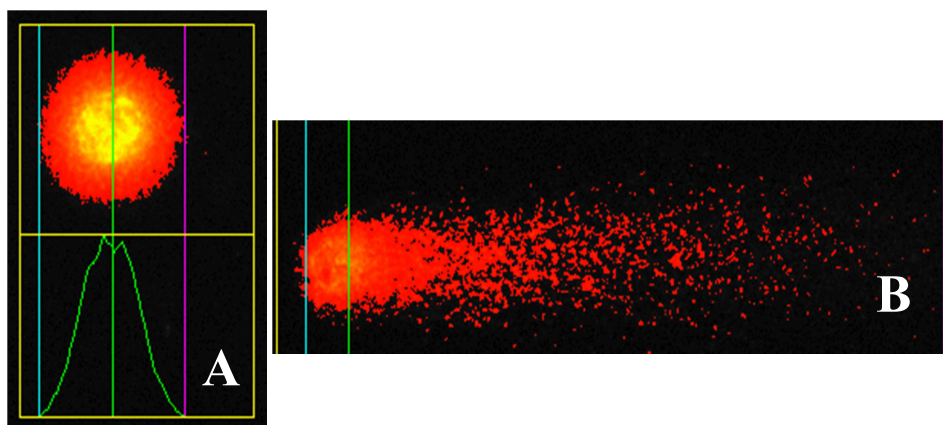
4.4.3. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Tice et al. (2000), com algumas modificações. A descrição do preparo das soluções utilizadas neste ensaio encontra-se apresentada no Apêndice D. Para esse teste, foi realizada uma coleta da suspensão celular, depois de 24 horas de exposição às diferentes associações da CAD e PUT, previamente selecionadas no ensaio de Resazurina (linhagens *Speedy* e HepG2/C3A - Tabelas 2 e 3, respectivamente). O CN foi realizado com meios de cultura celular e o CP foi realizado com solução de sulfonato de metilmetano (MMS) 10 mM, preparado pela diluição de 3,33 µL de MMS (marca: Sigma Aldrich) em 4 mL de PBS. Desta solução, foram pipetados 50 µL, os quais foram acrescentados com 5 mL de meio específico para cada linhagem celular (1×10^{-2} M; 50 µl/5ml). As células foram tripsinizadas de acordo com suas especificações, seguido de inativação com o meio específico para cada linhagem celular. As células foram transferidas para tubos de centrífuga e centrifugadas em 1.500 rpm, por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e apenas 0,5 mL desta solução foram ressuspensas. Posteriormente, a suspensão foi passada por seringa de insulina de 1 mL, a fim de se obter células isoladas. Para a realização do ensaio de viabilidade celular, foram transferidos para um microtubo de 20 µL da suspensão celular e 20 µL do corante Azul de Trypan. A continuidade do ensaio do cometa se deu quando o valor de viabilidade celular foi

superior a 80%. A quantificação das células viáveis (brancas) e mortas (azuis) foi realizada em câmara de Neubauer.

Para o ensaio do cometa, lâminas previamente recobertas com agarose comum (1,5%) receberam 20 µL da suspensão celular misturada a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5% a 37 °C). As lâminas foram então cobertas por lamínulas e levadas à geladeira (4 °C), por 15 minutos. Após a solidificação do gel, as lamínulas foram removidas e as lâminas transferidas para uma cubeta com solução de lise gelada (1 mL Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução estoque de lise – NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM e ~ 8,0 g de NaOH, pH 10,0), mantidas no escuro, em geladeira, a 4 °C, por 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram deslocadas para uma cuba de eletroforese, contendo uma solução tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, com pH>13), por 20 minutos, para a desnaturação do DNA. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas, em 3 banhos de 5 minutos, em tampão de neutralização (0,4 M de tris-HCl, pH 7,2) e fixadas, durante 10 minutos, em etanol absoluto. No momento da realização das análises, as lâminas foram coradas com 50 µL de solução de GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água deionizada) e analisadas em microscópio de fluorescência Leica, filtro B - 34 (excitação: $\lambda = 420\text{ nm} - 490\text{ nm}$, barreira: $\lambda = 520\text{ nm}$), objetiva de 40x. O ensaio foi realizado em triplicata e a contagem foi feita ao acaso, contemplando-se 200 nucleóides por frasco (3 réplicas, duas lâminas com 100 nucleóides cada), totalizando 600 nucleóides contabilizados por tratamento (Figura 9). Os danos no DNA foram estimados pelo parâmetro intensidade de DNA na cauda, avaliado pelo software *Comet Assay IV* (Perspective Instruments, Bury Saint Edmunds, Reino Unido). A média dos resultados de cada tratamento foi calculada e submetida ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis/Dunn's ($p < 0,05$), para comparar os efeitos das diferentes associações de CAD e PUT em relação ao CN. Valores expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão estão descritos no Apêndice E.

Figura 9: Representação das análises realizadas no Software Comet Assay IV.



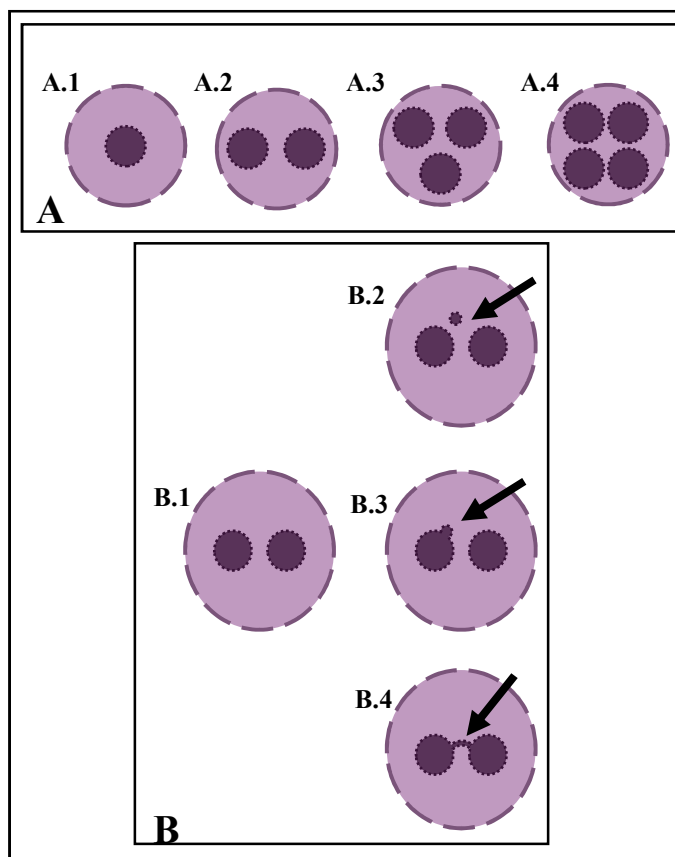
A: nucleóide sem danos e B: nucleóide com danos no DNA. Fonte: elaborado pela autora (2022).

4.4.4. Teste de micronúcleo de bloqueio de citocinese (CBMN)

O teste de CBMN foi realizado utilizando o protocolo descrito por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações. A descrição do preparo das soluções utilizadas neste ensaio encontra-se apresentada no Apêndice F. Para esse teste, foi realizada uma coleta da suspensão celular, depois de 24 horas de exposição de células das linhagens *Speedy* e HepG2/C3A às diferentes associações de CAD e PUT, previamente selecionadas no ensaio de Resazurina (tabelas 2 e 3, respectivamente). O CN foi realizado com meios de cultura correspondente à linhagem celular e o CP foi realizado com solução de sulfonato de metilmetano (MMS) 10 mM, preparado pela diluição de 3,33 μL de MMS (marca: Sigma Aldrich) em 4 mL de PBS. Desta solução, foram pipetados 50 μL , os quais foram acrescentados com 5 mL de meio específico para cada linhagem celular (1×10^{-2} M; 50 $\mu\text{L}/5\text{mL}$). Após a exposição, as células foram lavadas duas vezes com PBS e 5 mL de meio de cultura completo, contendo 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de citocalasina B. Os frascos foram incubados em temperatura específica para cada linhagem celular, por 28 horas. As células foram colhidas, fixadas em Carnoy (metanol: ácido acético, 3: 1 v / v) e mantidas a 4 $^{\circ}\text{C}$, antes da utilização. Para preparação das lâminas, aproximadamente cinco gotas da suspensão celular foram colocadas em lâminas limpas, contendo um filme de água fria. Após a secagem das lâminas, estas foram submetidas à hidrólise, com HCl 1N, por 10 minutos, a 60 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as lâminas foram expostas por 2 horas no reativo de Shiff, em temperatura ambiente, e lavadas com água corrente. Posteriormente a secagem das lâminas, as mesmas foram coradas com Giemsa 5%, por 8 minutos.

Para as análises, foram utilizados microscópios de luz, ampliação de 1.000X. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo contabilizadas 2000 células por réplica, totalizando 6000 células para cada concentração e controles avaliados. Para a avaliação da genotoxicidade e do potencial mutagênico das associações das aminas biogênicas CAD e PUT, para as linhagens celulares *Speedy* e HepG2/C3A, foram observadas células binucleadas normais e células binucleadas portadoras de MN, pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares, usando os critérios descritos por Fenech et al. (2003) (Figura 10). Para avaliar o índice de divisão celular (IDC), foram contabilizadas 1.000 células/tratamento. O IDC foi calculado seguindo a fórmula: $IDC = [M1 + (2 \times M2) + (3 \times M3) + (4 \times M4)]/N$, onde M1 – M4 representa o número de células com 1 a 4 núcleos, respectivamente, e N é o número total de células analisadas (EASTMOND; TUCKER, 1989). Os resultados foram submetidos ao teste estatístico paramétrico ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).

Figura 10 - Esquema representativo das alterações celulares consideradas na análise da proliferação celular do ensaio do MN.



A - representação da análise de proliferação celular; A1 - célula mononucleada; A2 - célula binucleada normal; A3 e A4 - célula multinucleada; B.1 - célula binucleada normal; B.2 - célula binucleada com micronúcleo; B.3 - célula binucleada com broto e B.4 - célula binucleada com ponte.
Fonte: elaborado pela autora (2022).

4.4.5. Perfil do ciclo celular e de fragmentação do DNA, por citometria de fluxo

A distribuição do ciclo celular e a porcentagem de células com DNA fragmentado foram avaliadas medindo o conteúdo de DNA, após a marcação com iodeto de propídio (IP). $2,5 \times 10^5$ células foram cultivadas em microplacas de 6 poços, sob as condições descritas nos itens 4.2.1 para as células *Speedy* e 4.2.2 para a linhagem celular HepG2/C3A. As células *Speedy* e HepG2/C3A foram expostas a quatro (4) diferentes associações de CAD e PUT (tabela 2 e 3), por um período de 24 horas e, em seguida, o experimento foi repetido com os mesmos tratamentos, para a exposição de 48 horas (tabela 2 e 3). O CN foi realizado com meios de cultura celular correspondente ao tipo celular testado e o CP foi realizado com solução de sulfonato de metilmetano (MMS) 10 mM, preparado pela diluição de 3,33 μ L de MMS (marca: Sigma Aldrich) em 4 mL de PBS. Desta solução, foram pipetados 50 μ L, os quais

foram acrescentados com 5 mL de meio específico para cada linhagem celular (1×10^{-2} M; 50 μ L/5ml). Após os tratamentos, as células foram coletadas por tripsinização e transferidas para tubos de microcentrífuga. As células foram centrifugadas a $300 \times g$, por 5 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS. As células foram fixadas com etanol (70%) em banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a $300 \times g$, durante 5 minutos, à temperatura ambiente, e as lâminas foram lavadas com PBS novamente. Em seguida, foram adicionados às células 200 μ L da solução de coloração contendo 20 μ g/mL de iodeto de propídio, 10 μ g/mL de RNase A e 0,1% de Triton X-100. As células foram incubadas à temperatura ambiente, por 30 minutos no escuro. As células foram analisadas, usando o citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Foram realizados 10.000 eventos por amostra, usando o canal FL-2A para determinar o conteúdo de DNA das células. As porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo celular foram configuradas a partir dos dados coletados, usando o software BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

4.4.6. Análises moleculares: extração de RNA e perfil de expressão gênica

As células HepG2/C3A foram submetidas ao ensaio de RT-qPCR. Neste ensaio, primeiramente foi extraído o RNA. Para isso, foi realizada uma coleta da suspensão celular, após 24 horas de exposição às diferentes associações de CAD e PUT, previamente selecionadas no ensaio de Resazurina (tabela 3). O CN foi realizado com meios de cultura celular. As células foram então tripsinizadas, coletadas, lavadas por três vezes com PBS e centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos. As células foram ressuspensas em TRI Reagent® (Sigma, St Louis, EUA) e incubadas por 5 minutos, em temperatura ambiente. Para 1 mL de TRI Reagent®, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Merck), seguido de agitação vigorosa do microtubo, por 15 segundos, e incubação em temperatura ambiente, por 3 minutos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 15 minutos a 4 °C, resultando em uma mistura trifásica, cujo sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Ao sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de álcool isopropílico (100%) para cada 1 mL de TRI Reagent®, seguido de incubação à temperatura ambiente, por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA lavado com 1 mL de etanol 75%, para cada 1 mL de TRI Reagent®. Os microtubos foram invertidos por 5 vezes, seguido de

centrifugação a 8000 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os microtubos contendo o RNA precipitado foram colocados em um fluxo laminar, por 5 minutos, para garantir a secagem do RNA.

Posteriormente as amostras extraídas foram submetidas à dosagem espectrofotométrica do RNA total, a partir de 1 µL do RNA total e à avaliação da absorbância em 260 nm com aparelho espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare).

4.4.7. Padronização e otimização dos primers

Foram criadas matrizes de acordo com o protocolo descrito no USER GUIDE SYBR® Green PCR Master Mix and SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit, Applied Biosystems. Para isso, foi utilizado 1 ng de cDNA, 1 µL de primer forward, 1 µL de primer reverse com concentrações de 250 a 900 mM para cada, 2,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix® 1X e volume ajustado para 10µL.

Os primers foram construídos com uma ferramenta online descrita por Lefever et al. (2009). As concentrações em nanomolar foram definidas a partir da construção dos primers e padronização dos mesmos (Tabela 4).

Tabela 4: Genes, sequências dos iniciadores e tamanho do amplicón (Pb) utilizados nos ensaios de expressão gênica.

Nome dos genes	Gene	Sequência direta (5' - 3')	Sequência reversa (3' - 5')	Pb
Housekeeping	Housekeeping			
Beta - actina	β -actina	CGGGACCTGACTGACTAC	CTCCTTAATGTCACGCAC	87
Estresse Oxidativo	Estresse Oxidativo			
Superóxido Dismutase	SOD1A	AGGGCATCATCAATTTTCGAG	GTGAGGACCTGCACTGGTAC	146
Catalase	CAT	CGTGCTGAATGAGGAACAGA	AGTCAGGGTGGACCTCAGTG	119
Glutathiona Redutase	GSR	ATCCATATGCAGGGGACTTGG	GTAGGGTGAATGGCGACTGT	110
Glutathiona S transferase Mu4	GSTM4	CAGCCCTGACTTTGAGAAAC	CAAAGGTGATCTTGTCTCCAA	119
Metabolismo de Xenobióticos	Metabolismo de Xenobióticos			
Citocromo P450 família 1	CYP1A1	TTCCCTGATCCTTGTGATCC	GGAGATTGGGAAAAGCATGA	109
Danos no DNA	Danos no DNA			
Reparo por excisão	ERCC1	CTACAGCCAGTGCATCTCCA	CTCCTGAAACAAGGCACCTC	112
Checkpoint Quinase 1	CHEK1	CGCTCCCAACACGGAGTTCC	TCACAGTCGGTGAAGCAGAG	119
Morte Celular	Morte Celular			
Proteína tumoral P53	P53	TGGCTCTGACTGTACCACCA	CCAGTGTGATGATGGTGAGG	98
c-Myc	c-Myc	CACCAGCAGCGACTCTGA	GATCCCAGACTCTGACCTTTTGC	98
Apoptose	Apoptose			
Caspase 3	Caspase 3	ATTGTGGAATTGATGCGTGA	CTTCACCATGGCTCAGAAGC	85
Caspase 9	Caspase 9	CACTTCCCCTGAAGACGAGT	CTGGTCGAAGGTCCTCAAAC	85

Fonte: elaborado pela autora (2022).

4.4.8. Síntese do cDNA via Transcrição Reversa

Para síntese do DNA complementar (cDNA), a partir do RNA total extraído das células HepG2/C3A, foi utilizado o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.). As reações de transcrição reversa foram realizadas com 1 µg do RNA extraído, 10 µM de oligonucleotídeos (10 x RT *Random primer*), 8 mM de dNTPs [25 x dNTP Mix] e 1,25 U de transcriptase reversa (*Multi ScriptTM Reverse Transcriptase*), conforme as especificações do fabricante. As reações foram incubadas em termociclador *Mastercycler pro S[®]* (Eppendorf), conforme as orientações do fornecedor, a 25 °C, por um intervalo de 10 minutos e a 37 °C, por 120 minutos, seguido de inativação enzimática a 85 °C, por 5 minutos. As amostras de RNA total foram armazenadas a -80°C e o cDNA sintetizado foi diluído (1:10) e estocado a -20°C, até a utilização dos mesmos.

4.4.9. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A expressão gênica foi avaliada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real-time PCR, qPCR), com a tecnologia SYBR Green, utilizando sequências de primers (Invitrogen Technologies®) para os genes β -actina, SOD1A, CAT, GSR, GSTM4, CYP1A1, ERCC1, CHEK1, p53, c-Myc, Caspase 3 e Caspase 9 (tabela 4). A reação foi realizada com 1 µL de cDNA e 9 µL de Master Mix (6 µL Syber Green PCR Master Mix® 1X, 0,5 µL sequência forward e 0,5 µL reverse de cada par de primer e 2 µL água Mili-Q estéril).

Para todas as reações de qPCR, foram utilizadas temperaturas de desnaturação inicial e ativação enzimática, por 10 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos a 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*). Todas as reações foram realizadas em triplicata.

A qPCR foi realizada no aparelho StepOnePlusTM System (Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation), com software integrado AB Prism Step One, e a expressão gênica avaliada pela técnica de Ct (*Cycle threshold* – ciclo limiar) comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os resultados foram submetidos ao teste estatístico paramétrico ANOVA/Tukey ($p < 0,05$). Resultados em gráficos estão descritos no Apêndice G.

5. ARTIGOS

Os resultados obtidos na presente pesquisa serão apresentados a seguir, em formato de artigo.

Artigo 1: Another casualty of the SARS-CoV-2 pandemic the environmental impact.

Artigo 2: Efeitos citogenotóxicos das aminas biogênicas cadaverina e putrescina, em associação, sobre células de fibroblastos de anfíbios.

Artigo 3: Citogenotoxicidade de aminas biogênicas presentes no necrochorume sobre a linhagem celular HepG2/C3A.

Dados adicionais: Análise de expressão gênica e citometria de fluxo por coloração com IP em células HepG2/C3A



Another casualty of the SARS-CoV-2 pandemic—the environmental impact

Letícia Rocha Gonçalves¹ · Matheus Mantuanelli Roberto² · Ana Paula Andrade Braga¹ · Gabriel Bertoletti Barozzi¹ · Giovanna Segati Canizela¹ · Letícia de Souza Gigeck¹ · Letícia Rosa de Souza¹ · Maria Aparecida Marin-Morales¹

Received: 2 July 2021 / Accepted: 13 October 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Cemetery leachate generated by the process of cadaveric decomposition is a significant contaminant of several matrices in the cemetery environment (soil, groundwater, and surface water). The biogenic amines cadaverine and putrescine stand out among the cemetery leachate contaminants, since they are potentially carcinogenic compounds. This review article presents a discussion of possible environmental impacts caused by the increase in deaths resulting from COVID-19 as its central theme. The study also aims to demonstrate the importance of considering, in this context, some climatic factors that can alter both the time of bodily decomposition and the longevity of the virus in the environment. Additionally, some evidence for the transmission of the virus to health professionals and family members after the patient's death and environmental contamination after the burial of the bodies will also be presented. Several sources were consulted, such as scientific electronic databases (NCBI), publications by government agencies (e.g., ARPEN, Brazil) and internationally recognized health and environmental agencies (e.g., WHO, OurWorldInData.org), as well as information published on reliable websites available for free (e.g., CNN) and scientific journals related to the topic. The data from this study sounds the alarm on the fact that an increase in the number of deaths from the complications of COVID-19 has generated serious environmental problems, resulting from Cemetery leachate.

Keywords Cemetery leachate · Cadaverine · Putrescine · Biogenic amines · COVID-19 · Pollution from cemeteries

Introduction

The main anthropic sources of environmental contamination are agriculture, industry, and urban activities, such as sanitary landfills, effluents from the Water and Wastewater Treatment Plants, and, more recently included in this last group, cemetery environments (Jonker and Olivier 2012).

Necropolises, as cemeteries are also called (Campos 2007), receive constant and intense additions of chemical compounds of high toxic potential, which have serious impacts on the environment and the surrounding biota, in addition to harmful effects on human health (Łukaszuk et al. 2015).

The cadaveric decomposition process generates a liquid called cemetery leachate (Dent et al. 2004), which is rich in mineral salts and organic substances called biogenic amines, such as cadaverine and putrescine. These biogenic amines, in addition to being highly toxic to living beings, may also be associated with diseases such as cancer (Pegg 2013; Thomas and Thomas 2001). Although the contamination caused by the disposal of corpses in cemeteries presents risks to human health, this type of environment has attracted little attention from civil communities and government institutions regarding their polluting potential.

The overflow of cemetery leachate, which occurs during the cadaveric putrefaction process, allows the cemetery leachate to percolate in the soil and transmit contaminants from the body's own decomposition; chemical compounds

Responsible Editor: Lotfi Aleya

✉ Letícia Rocha Gonçalves
leticia.rocha-goncalves@unesp.br

✉ Maria Aparecida Marin-Morales
marin-morales@unesp.br

¹ Institute of Biosciences, Department of Biology, São Paulo State University (Unesp), Av. 24-A, 1515, Rio Claro, SP CEP: 13506-900, Brazil

² Hermínio Ometto Foundation's University Center (FHO), Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 - Jardim Universitário, Araras, SP CEP: 13607-339, Brazil

used during the life of the buried person, such as medicines for daily use and chemotherapy; substances used in the body's preservation and preparation processes, such as preservatives and makeup; as well as compounds derived from additional items, such as pacemakers, personal jewelry, paints, varnishes, and metallic elements from the mortuary urn (Zychowski and Bryndal 2015). In addition to the chemical compounds mentioned, biological materials may also be transmitted, such as bacteria and viruses, related to the individual's cause of death which puts the environment and public health at risk (Anjos 2013).

The cemetery leachate and all the aforementioned compounds can be characterized as a polluting load that can reach and contaminate the soil and surface and underground water resources near the cemetery (Zychowski and Bryndal 2015). The problem can be further aggravated when the surrounding population makes direct use of water resources that are under the influence of cemeteries, as they will be predisposed to waterborne diseases (Kemerich et al. 2012).

The COVID-19 pandemic, caused by the new coronavirus or severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), began in late 2019 in China's Wuhan city. Since then, an overwhelming and deadly scenario has taken over the world (CarodArtal 2020; Madabhavi et al. 2020). According to data from the Center for Systems Science and Engineering (October 1, 2020) and WHO (2020a), the number of deaths registered in the world due to COVID-19 has already passed 900,000, data that only confirm the enormous impact of this pandemic on human health. In the same context, the World Health Organization (2020a) also disclosed that, by the end of September 2020, more than 900,000 deaths caused by COVID-19 had been registered worldwide. The two countries that have been most affected by the pandemic are the USA, with more than 190,000 deaths, and Brazil, with more than 125,000 deaths.

In view of the environmental problems related to cadaveric putrefaction and the increase in deaths registered in the world due to the pandemic, a concern has been established regarding the intensified impacts on cemetery environments. An important aspect to be considered, in addition to the presence of chemical compounds from the cemetery leachate, is the fact that the etiological agents SARS-CoV (Qu et al. 2020) and SARS-CoV-2 (Wang et al. 2020; Wu et al. 2020) have the ability to remain in the environment for long periods. Although all post-mortem activities (transportation, autopsies, delivery to families, burial, and exhumation) are supposed to be conducted in a way that avoids procedures that generate aerosols and release contaminated fluids after burial (Finegan et al. 2020), today there is an additional and serious concern about the spread of these viruses by bodies that were buried without undergoing appropriate decontamination treatments.

Due to the general dynamics of cadaveric decomposition, which produce potentially toxic compounds, it is clear that contamination in cemeteries correlates to the number of buried bodies, as well as site-specific climatic and geological characteristics (Zychowski and Bryndal 2015). Thus, it is possible to infer that the high number of human losses caused by the COVID-19 pandemic may also raise the level of contamination in cemetery environments and, consequently, in the surrounding urban environment, especially for medium to large cities. The abrupt increase in the number of deaths that have been recorded during the pandemic period, which has occurred throughout the entire planet, has caused many to worry about the possible environmental impacts resulting from the pandemic. In this review article, data already described in the scientific literature regarding the contamination of necropolis will be presented, which will serve as a basis for a more in-depth discussion on the real environmental impact caused by the COVID-19 pandemic. Although cemetery environments are places that pose high risks to human health, they are either discussed very little or not at all as places of high contamination. However, the increase in death rates registered since March 2020 as a result of the pandemic highlights the need to consider, in a more punctual and emphatic way, the negative aspects that the pandemic has caused in cemetery environments, especially regarding the ecotoxicity of these areas. Since this contamination is not only restricted to cemetery environments it can affect a large surrounding area the aforementioned effect on the environment ends up impacting human health, a fact that considerably accentuates the need to discuss the contamination of cemeteries after the COVID-19 pandemic. The approach of this study includes not only the description of the possible environmental and human health impacts resulting from the pandemic but also calls for the need for health and environmental government agencies to pay more attention to cemeterial contamination.

Cadaverous decomposition processes

The main environmental impact of cemeteries is caused by the cadaverous decomposition process (Pacheco and Matos 2000). The nomenclature and the stages of the body putrefaction process can vary from four to six stages (Carter and Tibbett 2008). In the so-called fresh or initial stage of decomposition, there is no overflow of cemetery leachate; the emphysematous phase (or putrefaction stage) is marked by the production of organic acids, gases, and biogenic amines, but without being released into the external environment; in the colliquative (or black putrefaction) stage, cemetery leachate is released due to the rupture of the skin; saponification (or butyl fermentation) is characterized by the formation of fatty acids in the regions with

the highest accumulation of triglycerides in the decomposing body; in skeletonization (or dry decomposition), there is no production of cemetery leachate, however, there is the degradation of bone structures; the release of minerals is the last phase, where the remains start to release minerals previously present in the tissues (Bornemissza 1957; Carter and Tibbett 2008; Christensen et al. 2014). The last phase of the putrefaction process is skeletonizing. This phase takes days or even years to be achieved, while the complete disappearance of the corpse can take hundreds of years (Rodriguez and Bass 1983).

It is worth noting that the entire decomposition process follows the same stages for corpses, but there are specific characteristics of both the buried body and the environment that can interfere with the duration of time between one phase and another (Ioan et al. 2017). Among these particularities are clothing, age, body mass, gastric content, nutritional and hydration status, as well as the cause of death. The environmental characteristics involve pH, temperature, humidity, type, and composition of the soil where the corpse was buried (Vass et al. 2002; Pinheiro 2006; Carter and Tibbett 2008; Ioan et al. 2017; Antonio et al. 2018).

Increased burials cause greater cemetery leachate contamination

The main cause of contamination from cemeteries is the liquid continuously released by putrefying corpses, called cemetery leachate (Silva and Malagutti Filho 2008). Cemetery leachate is a more viscous liquid than water, rich in mineral salts and degradable organic substances, of grayish-brown color, with an acrid and fetid smell, polymerizable, with high biochemical oxygen demand (BOD), and varying degrees of pathogenicity (Matos and Pacheco 2001; Silva 1995). The cemetery leachate has an average density of 1.23 g/cm³, high values of conductivity, a pH ranging from 5 to 9, and temperatures from 23 to 28 °C. For every 1 kg of body weight, about 400 to 600 mL of cemetery leachate are produced. Its composition is 60% water, 30% mineralized substances, 10% organic substances, and various metals (Oliveira et al. 2013; Zychowski and Bryndal 2015).

Among the organic compounds present in the cemetery leachate are the biogenic amines cadaverine (1,5-pentanediamine) and putrescine (1,4-butanediamine), which are small molecules, produced by the decarboxylation of amino acids through biosynthesis and enzymatic processes (Bachrach 2004). These amines are soluble in water, generate, when degraded, ammonium ions (NH₄⁺), and are

potentially highly toxic (Almeida and Macêdo 2005; Melo et al. 2010).

Toxicity of biogenic amines present in cemetery leachate

Toxicity of cadaverine and putrescine

Cadaverine (Cad) and putrescine (Put) biogenic amines are diamines that, in low concentrations, play important roles in organisms (Bach et al. 2012; Křížek et al. 2002; Ramani et al. 2014). They are involved in various natural biological processes such as brain activity, temperature and pH regulation, immune responses, cell growth, and differentiation in different organisms. However, biogenic amines, in general, can also be considered carcinogenic due to their ability to react with nitrites to form potentially carcinogenic nitrosamines (Shalaby 1996). Cad and Put are amines that have nucleophilic sites, which give them an easy connection with nucleic acids, lipids, and proteins. When these amines are in high concentrations, they can be toxic (Bach et al. 2012; Ladero et al. 2010) by altering the stability of these molecules (Bloomfield and Wilson 1981; Brysont and Greenall 2000; Hussain et al. 2011; Schuber 1989).

The toxicity of Cad and Put causes the activation of catabolic processes, which can generate an excessive increase in hydrogen peroxide (Pegg 2013; Thomas and Thomas 2001). In general, biogenic amines, when undergoing oxidation processes, generate unstable and potentially toxic compounds, such as aldehydes and hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide is generated in the outer mitochondrial membranes, causing oxidative damage to mitochondrial DNA and other biomolecules, in addition to promoting neurodegenerative damage (Hauptmann et al. 1996; Pegg 2013).

Studies carried out where Wistar rats ingested Cad and Put indicated that the consumption of Put may be related to acute harmful effects, such as dilation of the vascular system, hypotension, and bradycardia (del Rio et al. 2019; Ladero et al. 2010; Shalaby 1996). In addition, both have indirect toxic effects that enhance the toxicity of other biogenic amines, such as histamine (del Rio et al. 2019; Til et al. 1997), by facilitating the passage of histamine into the small intestine, increasing its rate of absorption into the bloodstream. This is due to the inhibition of detoxifying enzymes (diaminaoxidase and histamine *N*-methyltransferase) involved in the oxidative catabolism of histamine (Al Bulushi et al. 2009; del Rio et al. 2019; Lyons et al. 1983; Paik Jung and Bioldanes 1979).

A study by Rauscher-Gabernig et al. (2012), on food contaminated by putrescine and cadaverine diamines,

showed that these amines can potentiate the effects of histamine if ingested simultaneously. Although formed endogenously and essential for some metabolic pathways, these diamines are known as precursors of carcinogenic nitrosamines. Putrescine is a diamine that may also be involved in tumor growth. However, because there are few published studies on the toxicological levels of these substances, the authors claim that the tolerable levels disclosed for these amines may be underestimated and are characterized with some uncertainty.

Association of cadaverine and putrescine amines with carcinogenic processes in humans

The association of increased synthesis of biogenic amines with cell proliferation and cancer was first reported in the late 1960s (Andersson and Heby 1972; Gerner and Meyskens 2004). The cadaverine and putrescine diamines present in organisms can be nitrosated or they can act as precursors to other compounds capable of forming nitrosamines. Cadaverine produces nitrosopiperidine, and putrescine produces nitrosopyrrolidine. These compounds are considered carcinogenic to several animal species and represent a potential risk to human health (De Mey et al. 2014; del Rio et al. 2019; Ladero et al. 2010; Rauscher-Gabernig et al. 2012; Shalaby 1996).

Cadaverine is involved in several critical cellular processes in living organisms, including the induction of inflammation and necrosis in living tissues. In high doses, this diamine is considered a biochemical marker for some diseases, such as cancer, diabetes, arthritis, and cystic fibrosis (Jancewicz et al. 2016; Teti et al. 2002). Fusi et al. (2008) evaluated the effects of various concentrations of cadaverine on bovine mammary epithelial cells (BME-UV1) and in three-dimensional primary cultures (3D culture) of mammary parenchyma, also in bovine. The authors observed that, in both cultures, the lowest concentration of the diamine (10 mM) induced cell proliferation, while the highest (50 mM) inhibited proliferation.

Studies by Chen et al. (2015), in human skin fibroblasts, showed that low concentrations of putrescine (0, 5, 1.0, 5.0, and 10 µg/mL) induced cell proliferation, while higher concentrations (100, 500, and 1000 µg/mL) inhibited cell migration and proliferation, leading fibroblasts to apoptosis.

The putrescine polyamine is synthesized through ornithine decarboxylation and the action of the ornithine decarboxylase enzyme (ODC). Because this diamine has several cellular functions and is regulated at various times during cellular activity (during its synthesis, degradation, absorption, and efflux), it is very difficult to find consistent evidence about the cellular functions of these diamines. Studies carried out with this putrescine have turned up controversial results on the role of ODC in carcinogenesis and apoptosis

(Thomas and Thomas 2001). Based on this information, these same authors have suggested that the different actions of putrescine may be related to the differences inherent to the cell type involved in the putrescine uptake, thus characterizing differences in cellular sensitivity to apoptosis (Thomas and Thomas 2001).

Cemetery leachate chemicals

After burial, chemical, and biological agents are released from the body caused by chemical substances applied in the individual's life, such as chemotherapy, dental implants, metallic prostheses, among other materials, which end up contaminating the environment. In addition to these materials for human use, there is also the supply of metallic contaminants and coatings used in the manufacture of mortuary urns. Metallic compounds can corrode and infiltrate the soil and be carried to underground bodies of water near the burial site (van Allemann et al. 2019). These same authors also warn that cemeteries are characterized by environments potentially contaminated by dangerous metals, such as aluminum, iron, copper, and zinc. The environment contamination of cemetery by metals is also described by Aruomero and Afolabi (2014), who cites the presence of lead, arsenic, mercury, nickel, copper, cadmium, zinc, silver, bronze, and chromium. In addition to these metals, most coffins are made of wood that undergoes a treatment process with preservatives and are subsequently painted and/or varnished for a longer duration (Gondal et al. 2011). All these components are easily associated with cemetery leachate, which optimizes its percolation in the soil, its flow into surface waters, or its leaching into groundwater (van Allemann et al. 2019).

Several factors contribute to the mobility and corrosion rate of metals related to burials. The most studied factors are the following: the type of metal present in bodies and urns; the edaphic conditions in which the body is buried; and climatic factors, such as temperature and precipitation in the region. These variables play an important role in relation to the accumulation, transmission, and corrosion of materials in cemetery environments (Silva et al. 2020).

According to Jonker and Oliver (2012), a South African cemetery in Tshwane contains more than 60,000 tombs, which can release about 108,000 kg of metals from the constituent parts of the coffins into the environment. From the moment these metals suffer corrosion and are introduced into the environment, they can accumulate in the short and/or long-term, and characterize a serious risk to public health (Bianchi et al. 2011; Dourado et al. 2017; Matsumoto and Marin-Morales 2004) mainly because their adverse effects may not be immediately observable and can compromise the following generations (Paíga and Delerue-Matos 2016).

Another worrying factor, in addition to the release of metals into the environment, is the embalming process of

the body (thanatopraxy), a practice commonly undertaken since Ancient Egypt. In this process, fluid substances that do not degrade easily are applied (Nogueira et al. 2013). The thanatopraxy aims to maintain the color, conservation, and asepsis of the corpse. In this process, fluids are injected, such as formaldehyde, acetate and potassium nitrate, glycerin, and chrome paint (Souza and Botelho 1999), which are not degraded in the cadaveric decomposition process and, therefore, easily pass into the soil and groundwater (Matos and Pacheco 2001).

During the cadaveric decomposition process, large quantities of substances with a high degree of toxicity are released, such as hydrogen sulfide, carbon dioxide, methane, ammonia, cadaverine, and putrescine. These substances, in addition to contaminating the soil, can also reach the groundwater through a leaching process, thus increasing the potential for environmental impact (da Kemerich et al. 2014; Neckel et al. 2017; Dalmora et al. 2020).

The cadaverous decomposition process and contamination by pathogens

After death, the human body becomes the substrate of an ecosystem composed of several saprophytic microorganisms (Antonio et al. 2018). The microorganisms involved in the cadaveric decomposition, according to Całkosiński et al. (2015), can impact the environment and also pose a risk to human health.

The decomposition process is initiated by enterobacteria from the body itself, which overtake the intestinal epithelium and invade adjacent tissues (Carneiro 2008). Gram-negative enterobacteria present in the decomposition process have also been found in the cemetery leachate (Antonio et al. 2018). Among the bacteria of the cemetery leachate are the genera *Clostridium* and *Salmonella*, in addition to *E. coli*, bacteria that are involved with diseases such as tetanus, typhoid fever, gas gangrene, and dysentery.

Studies by several authors (Kandoli et al. 2019; Rodrigues and Pacheco 2003) show that there is a high level of microbial contamination in groundwater samples collected in the vicinity of cemeteries (Kandoli et al. 2019; Rodrigues and Pacheco 2003; Zychowski and Bryndal 2015). It was also observed that the survival of these pathogens can vary in the soil. Specific characteristics of the soil, such as permeability, aeration, humidity, and nutrition factors, alter the effectiveness of microorganism retention (Silva and Malagutti Filho 2008). Some more resistant microorganisms can survive for more than 5 years in the soil, under favorable environmental conditions, and, during this period, they can mobilize and reach and contaminate aquifers (Zychowski and Bryndal 2015). Research carried out in tropical countries shows an influence of climatic and edaphic conditions on the

biological contamination of the environment (Ourives et al. 2017). An example of this is that environmental samples collected in Brazilian and South African cemeteries showed higher levels of pathogens than samples collected in colder environments (Zychowski and Bryndal 2015).

Studies on the migration potential of bacteria and viruses, carried out by Pacheco and Matos (2000) on samples collected in cemetery environments, show that viruses have a greater capacity for mobility in the soil when compared to bacteria. Few studies have analyzed virus contamination in necropolises; however, the presence of adenoviruses and enteroviruses has already been detected in water samples collected in these environments. It is worth mentioning that, in the places where the graves were closer to the water table, the level of contamination was higher (Zychowski and Bryndal 2015).

Prescott et al. (2015) carried out a relevant study on the stability of the Ebola virus, after the outbreak that started in 2014 in West Africa. In this study, the authors evaluated tissue samples from five monkeys that died from being infected by the virus, to ascertain the stability and transmissibility of the virus, as well as the presence of viral RNA in these samples. It was possible to detect, using the RT-PCR technique, the presence of the virus in the different samples, for up to 3 weeks after the death of the primates. They detected the virus was viable and replicating within a cell culture, demonstrating its viability for up to 7 days after the euthanasia of the animals (Prescott et al. 2015).

Currently, the outbreak of infection of the new coronavirus has become a risk on a global level, due to its speed in both contamination and spread throughout the world. The survival time of this virus in the corpse, after burial, is still uncertain (Calmon 2020), which makes this scenario more worrying, because, in cities whose water and wastewater treatment plants are flawed, the population can be directly exposed to the biological material leached from the cemetery leachate, increasing the risk of contamination (Nascimento 2020).

Although an improvement in the US and Chinese air quality was reported during the COVID-19 pandemic (Shakoor et al. 2020), an increase in the mortality rate, and hence the number of burials, is most likely negatively altering the quality of other environmental matrices, such as soil and groundwater. Thus, the need to assess the impact of cemetery environments and the impairment of this type of contamination on human health is pertinent.

SARS-CoV-2 survival time in different environments

While some researchers related the transmissibility of the virus to meteorological factors, such as temperature and humidity (Doğan et al. 2020; Shahzad et al., 2020a, b; Sarwar

et al. 2021), others have already estimated the survival time of SARS-CoV-2 in different environments and environmental conditions. Seetulsingh et al. (2020) reported a case of a patient who died on suspicion of COVID-19 and, due to an administrative delay, the autopsy was performed 27 days after his death. During this period, the body was kept at a temperature of 4 to 6 °C. After that period, PCR analysis for COVID-19 and histological analysis of lung tissue were performed. Since these analyses confirmed that the patient's cause of death was from COVID-19, it was not necessary to carry out other internal studies. This case was the first study to detect the virus in lung tissue, carried out well after the patient's death. Thus, from this study, it was possible to infer that the virus can persist and remain viable in cadavers, which alerted the medical-scientific community to the need for the proper use of personal protective equipment (PPE), for handling bodies affected by COVID-19 or when conducting postmortem examinations.

Some studies carried out with the aim of mitigating the COVID-19 pandemic have shown that the survival of SARS-CoV-2 is dependent on the type of surface it is attached to. Hirose et al. (2020) evaluated the stability of SARS-CoV-2 on human skin obtained from forensic autopsies and identified that the SARS-CoV-2 strain can remain alive for up to 9 h on human skin. This extended permanence on the skin allows for an increased risk of self-contamination and transmission to other surfaces and even to other people. In that same study, the difficulty in carrying out the same type of study on the skin of living people, as it is a highly infectious agent, was highlighted. However, some authors (Hirel et al. 1996; Boekema et al. 2015; Akutsu et al. 2019) cite that autopsy performed on the skin of individuals 24 h after their death can serve as a model for a better understanding of the viability of the virus in humans.

van Doremalen et al. (2020) analyzed the stability of SARS-CoV-2 in aerosol, plastic, stainless steel, copper, and cardboard, at temperatures ranging from 21 to 23 °C and 40% humidity. SARS-CoV-2 remained viable in aerosols for 3 h, on plastic for up to 72 h, and on stainless steel for 8 h. On copper, SARS-CoV-2 was no longer detected after 4 h of contamination, and on cardboard, no viable SARS-CoV-2 was observed after 24 h. With these data, it is possible to affirm that the transmission of SARS-CoV-2 can happen through aerosol and by human contact with contaminated surfaces because the virus can remain viable and infectious for hours in aerosols and for days on solid surfaces.

Temperature is one of the main factors that influence the survival of the virus. High temperatures can cause protein denaturation and increase the activity of extracellular enzymes. Temperature can be a denaturant factor for proteins since it can break hydrogen bonds leading

to an alteration in the sites for these macromolecules. As described by Wang et al. (2004), viral proteins can be denatured by heat. Both the N-proteins (nucleocapsids) and the viral S proteins (membrane proteins), when in a phosphate-buffered saline buffer, begin to unfold at 35 °C, and exhibit complete denaturation at 55 °C. The author also mentions that these SARS-Cov-2 proteins are irreversibly denatured by heat. This denaturation begins when the medium reaches 35 °C and is completed in 10 min at 55 °C. In addition to this factor, exposure to light, the presence of organic matter, and other microorganisms can also interfere with coronavirus survival (Gundy et al. 2009; Naddeo and Liu 2020).

SARS-CoV-2 is composed of a protein capsid, genetic material, and an enveloping lipid membrane, derived from the host cell. This virus infects animal cells and replicates in the cytoplasm of those cells (Spriggs et al. 2019). Although the membrane gives this virus greater ease of entry into host cells (endocytosis) (Spriggs et al. 2019), this envelope is fragile and, in general, is less stable in an environment contaminated by oxidizing agents, such as chlorine. Studies have shown that this pathogen survives 2 days (20 °C) in water not treated with chlorine and in untreated hospital sewage. Thus, the characteristics of the effluents from water treatment facilities influence the survival time of the virus (Rolemberg et al. 2020; WHO 2020a). Medema et al. (2020) analyzed the sewage networks of two hospitals in the Netherlands and, in both sewers, the presence of SARS-CoV-2 was detected. Wu et al. (2020) observed, in March 2020, a high concentration of the virus in wastewater from a Massachusetts wastewater treatment plant. Therefore, the efficiency of the disinfection process used in water and wastewater treatment plants is of crucial importance for the inactivation and, consequently, the removal of this pathogen from the effluents of the treatment plants (Rolemberg et al. 2020). This concern is supported by Fareed et al. (2020), who mention that the countries with the greatest environmental quality problems are listed as the ones with the highest number of deaths from COVID-19.

The studies discussed above reinforce that water transmission in environments contaminated by SARS-CoV-2 can aggravate transmission potential. The evaluations performed up until now are still insufficient in elucidating the extent of this type of contamination, since little research has been carried out on the survival time of this virus in a post-mortem situation and on the risks of human exposure during that period. Considering the increase in the mortality rate, as a result of the increase in the number of people contaminated by SARS-CoV-2, the need to discuss and evaluate the environmental and public health impacts of environments potentially contaminated by SARS-CoV-2 is evident, including in cemetery environments.

Contamination of soils, groundwater, and surface waters by cemeteries

The overflow of cemetery leachate, the main pollutant in cemeteries, resulting from the decomposition of corpses, reaches the soil and causes, in addition to an increase in microbial activity, an increase in the levels of nitrogen, phosphorus, mineral salts, and electrical conductivity (Kemerich et al. 2012; Silva and Malagutti Filho 2008; Zychowski and Bryndal 2015).

Soil contamination is dangerous to human health and environmental quality and, because it is often visually imperceptible, can be characterized as a hidden danger (Rodríguez-Eugenio et al. 2018). A type of mechanical filtration can occur in the soil, which retains larger particles, such as bacteria and viruses. Viruses can attach themselves to the soil due to the electrical charges of mineral particles. Although this fixation may not be permanent, it can result in significant health problems (Nascimento 2020; Pacheco 2017).

As already mentioned, another alarming and high-risk factor is the contamination of groundwater, which occurs through the percolation of the cemetery leachate into the unsaturated area of the soil. The contamination dynamics, which can be initiated, for example, by graves that have cracks, depends on the type of soil where the cemeteries are installed. Cemeteries with more sandy substrates have a greater potential for contamination, as they have more porous and permeable soils, while soils classified as clayey have a greater capacity for cemetery leachate retention, as they are more compact and impermeable (Campos 2007; Silva and Malagutti Filho 2008).

When the leachate of cemeteries reaches the aquifers, these groundwaters become vehicles of contamination, and it spreads to external areas as the vicinity of the cemeteries (Pacheco 2017). Such contamination poses risks to the environment since groundwater is important for the balance of the planet. As these waters flow slowly to lakes, rivers, and oceans, it is extremely difficult to recover a contaminated aquifer (Giampá and Gonçalves 2005). Another complication is the fact that groundwater can often be used to supply the population, putting people's health at risk, as is the case with residents in the vicinity of cemeteries, who end up consuming polluted water, resulting in negative consequences on their health (Pacheco 2017).

Surface waters can also be impacted by necropolises. In cemeteries that do not have an efficient drainage system, where the land is waterproofed by tombs and by paving the streets, there is an impediment to draining rainwater, which can accumulate on the site. These waters can then flood tombs, drain, and reach areas outside the cemetery, transporting contaminants to the urban rainwater network

and, consequently, to water bodies in the region (Silva and Malagutti Filho 2008). Due to these contamination possibilities, there is a need to adequately structure the cemeteries, so that these environments are prepared to receive the corpses, without causing impacts on water resources and the surrounding urban areas (Neckel et al. 2017).

Water is an indispensable natural resource for the survival of life on the planet. Its quality is closely related to environmental quality and public health (Westall and Brack 2018). As evidenced by Pacheco (2017), the lack of sanitation and the consequent contamination of water results in high rates of hospitalizations and deaths as is seen in developing countries.

Among anthropic sources, cemeteries are the most asymptomatic, silent, and continuous sources of water contamination (Pacheco 2017). This is extremely concerning, due to the fact that the population is unaware of the polluting potential of the by-products of cadaverous decomposition happening in these environments (Anjos 2013). Due to this lack of knowledge, there may be negligence in relation to the necessary care when handling soils in these places or when using groundwater, which is influenced by this type of contamination, for supply (wells). In addition to these public health problems, the contamination of natural resources, such as soil and water, is also extremely harmful to the environment, since, with population growth, these resources are already scarce and more degraded (Tormen et al. 2016). Fagundes et al. (2020) points out that water is a resource that is becoming increasingly scarce, both in quantity and quality. The author mentions that a good part of the water available for consumption is extracted from groundwater and that these waters correspond to about 30% of all freshwater on the planet, reinforcing the need for its conservation.

Cemeteries are a significant global source of pollution since they contribute to the introduction of physical, chemical, and biological agents exogenous to the environment, which, consequently, compromises the health of both the population living in proximity to them (Nogueira et al. 2013; Neckel et al. 2016, 2017) and the use of the water contaminated with its by-products.

Increase in mortality

The number of deaths from the COVID-19 pandemic is being considered a negative and frightening milestone in human history. Due to the lack of efficient treatment, and the delay in large-scale vaccinations, protective measures such as social distancing, strict personal, and object hygiene, as well as the use of personal protection equipment (PPE), have been adopted and recommended worldwide. As can be seen in Tables 1 and 2, the deaths registered for COVID-19

Table 1 Number of confirmed deaths from COVID-19 in the 5 continents, registered from March 16 (2020) to January 20 (2021)

Region	COVID-19 deaths	Death proportion
America	984,625	47.46%
Europe	646,760	31.17%
Asia	360,646	17.38%
Africa	81,756	3.94%
Oceania	945	0.05%
Total	2,074,732	100.00%

Source: European CDC—Situation Update Worldwide—OurWorldInData.org/coronavirus (Roser et al. 2021)

vary considerably according to the country or region considered. This variation is related to the speed with which strategies are implemented in mitigating the spread of the disease, such as carrying out diagnostic tests in the population and the determination and encouragement of effective social isolation.

According to the data, the American continent has the majority of COVID-19 confirmed deaths, corresponding to 47.46% of the total global value. A few American countries (USA, Brazil, and Mexico) lead the world numerical ranking for cases of death by COVID-19, as can be seen in Table 2.

According to current data on the mortality rate of the SARS-CoV-2 infection, the country that draws the most attention is the United States of America (USA), which leads in deaths (407,565) and confirmed cases (27,690,000), despite the low mortality rate (1.7%) compared to the world average (2.1%). The cases of deaths from COVID-19 in this country correspond to 19.57% of the total deaths worldwide (Table 2). Brazil ranks second in the number of dead (212,831) and third in confirmed cases (9,870,000), behind the USA and India (10,930,000). The Brazilian mortality rate is 2.5%, slightly above the world average. Mexico's situation is concerning since they reached a total of 144,000 deaths in January 2021 and a mortality rate of 8.5%, much higher than the global rate (Table 2).

Considering Latin America, the numbers show more virus dissemination and deaths in the South (Table 3).

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)

Total deaths			Total cases			Case fatality rate		
1	United States	407,565	1	United States	27,690,000	1	Mexico	8.5%
2	Brazil	212,831	2	India	10,930,000	2	Iran	4.2%
3	India	152,869	3	Brazil	9,870,000	3	Peru	3.6%
4	Mexico	144,371	4	United Kingdom	4,060,000	4	Italy	3.5%
5	United Kingdom	93,469	5	Russia	4,040,000	5	Belgium	3.0%
6	Italy	83,681	6	France	3,530,000	6	Indonesia	2.9%
7	France	71,792	7	Spain	3,090,000	7	South Africa	2.8%
8	Russia	66,214	8	Italy	2,730,000	8	United Kingdom	2.7%
9	Iran	57,057	9	Turkey	2,590,000	9	Chile	2.6%
10	Spain	54,637	10	Germany	2,350,000	10	Colombia	2.5%
11	Germany	50,010	11	Colombia	2,200,000	11	Canada	2.5%
12	Colombia	49,792	12	Argentina	2,030,000	12	Argentina	2.5%
13	Argentina	46,216	13	Mexico	2,000,000	13	Romania	2.5%
14	Peru	39,044	14	Poland	1,590,000	14	Brazil	2.5%
15	South Africa	38,854	15	Iran	1,530,000	15	Germany	2.4%
16	Poland	34,141	16	South Africa	1,490,000	16	France	2.4%
17	Indonesia	26,857	17	Ukraine	1,320,000	17	Poland	2.4%
18	Turkey	24,487	18	Peru	1,240,000	18	Spain	2.3%
19	Ukraine	22,264	19	Indonesia	1,220,000	19	Russia	1.8%
20	Belgium	20,572	20	Czechia	1,090,000	20	Ukraine	1.8%
21	Canada	18,567	21	Canada	832,375	21	United States	1.7%
22	Chile	17,594	22	Portugal	787,059	22	Czechia	1.6%
23	Romania	17,485	23	Chile	779,541	23	Portugal	1.6%
24	Czechia	14,820	24	Romania	763,294	24	India	1.4%
25	Portugal	9,465	25	Belgium	739,488	25	Turkey	1.0%
	World	2,410,000		World	109,160,000		World	2.1%

Source: European CDC—Situation Update Worldwide—OurWorldInData.org/coronavirus (Roser et al. 2021)

Table 3 Number of deaths confirmed from COVID-19 in Latin American countries, registered from March 16 (2020) to January 20 (2021)

Country	COVID-19 deaths	Confirmed cases	Mortality rate
Brazil	212,831	8,640,000	2.5%
Mexico	144,371	1,690,000	8.5%
Colombia	49,792	1,960,000	2.5%
Argentina	46,216	1,830,000	2.5%
Peru	39,044	1,070,000	3.6%
Chile	17,594	680,740	2.6%
Ecuador	14,437	234,315	6.2%
Bolivia	9,764	193,745	5.0%
Guatemala	5,343	151,324	3.5%
Honduras	3,406	136,989	2.5%
Paraguay	2,556	124,447	2.0%
El Salvador	1,521	51,437	3.0%
All countries of Latin America	560,056	17,704,073	3.2%

Only countries with > 1,000 deaths and with > 2.0% of mortality rate are listed. Source: European CDC—Situation Update Worldwide—OurWorldInData.org/coronavirus (Roser et al. 2021)

Regarding the data from Latin America, it is possible to observe that in several countries, the mortality rates are above the world rate, registered as 2.1%. Among the countries listed in Table 3, Mexico, Ecuador, and Bolivia are those with the highest mortality rate (8.5%, 6.2%, and 5.0%, respectively). However, as the largest and most populous country in this region, Brazil leads the number of deaths and cases confirmed by COVID-19 (212,831 and more than 8.5 million, respectively).

Pandemic data from Brazil

According to Roser et al. (2021), Brazil has approximately 8.64 million COVID-19 confirmed cases. Comparing this data with the total population (approx. 212.56 million), 4.0% of the population was contaminated by the coronavirus. However, compared with the total number of contaminated people around the world (96.86 million), this rate rises to 8.92%. Comparing the numbers of cumulative confirmed COVID-19 deaths, Brazil registered 212,831 among 2.07 million deaths around the world, resulting in 10.28% of the death toll. It is important to note that the Brazilian population comprises only 2.72% of the world population.

In order to estimate the increase in the number of deaths in Brazil, the records from March 16 to December 31, 2020, were compared with the same time interval as in the year 2019. To assess the effects of COVID-19, in relation to the

Table 4 Deaths related to respiratory diseases, recorded from March 16 to December 31, for the years 2019 and 2020

Death cause	Year		Variation
	2019	2020	
Other (not respiratory-related cause)	532,718.0	556,648.0	4.49%
Respiratory insufficiency	81,592.0	79,069.0	-3.09%
Pneumonia	185,229.0	138,688.0	-25.13%
Sepsis	140,194.0	126,866.0	-9.51%
Undetermined	5,705.0	8,109.0	42.14%
SARS	1,265.0	16,279.0	1,186.88%
COVID-19	0.0	195,598.0	-
Total	946,703.0	1,121,257.0	18.44%

SARS, severe acute respiratory syndrome; COVID-19, coronavirus disease 2019. Source: Central de Informações do Registro Civil—CRC Nacional, Brazil (Arpen 2021)

possible worsening of more specific symptoms, data on deaths from respiratory causes and heart disease was collected, as shown in Tables 3 and 4, respectively.

From the analysis carried out between the values of the two tables (4 and 5), it is possible to observe an increase of approximately 18.44% in the number of deaths from 2019 to 2020, for the same period. However, there are several variations regarding the registered causes. Table 4 shows a significant decrease in the number of deaths caused by respiratory insufficiency, pneumonia, and septicemia. On the other hand, there was a considerable increase in deaths from undetermined causes and severe acute respiratory syndrome, in addition to deaths from COVID-19. Table 5

Table 5 Deaths related to respiratory and cardiac diseases, recorded from March 16 to December 31, for the years 2019 and 2020

Cause of death	Year		Variation
	2019	2020	
Other (not cardiac-related cause)	368,694.0	375,973.0	1.97%
Respiratory insufficiency	69,251.0	64,752.0	-6.50%
Pneumonia	159,500.0	117,810.0	-26.14%
Sepsis	123,319.0	110,791.0	-10.16%
Undetermined	5,516.0	7,558.0	37.02%
SARS	1,265.0	16,279.0	1186.88%
Stroke	80,831.0	80,715.0	-0.14%
Heart Attack	80,497.0	73,954.0	-8.13%
Unspecific cardiovascular causes	57,830.0	77,827.0	34.58%
COVID-19	0.0	195,598.0	-
Total	946,703.0	1,121,257.0	18.44%

SARS, severe acute respiratory syndrome; COVID-19, coronavirus disease 2019. Source: Central de Informações do Registro Civil—CRC Nacional, Brazil (Arpen 2021)

also shows a decrease in the number of deaths for specific heart diseases, such as stroke and heart attack, while the values for other unspecific cardiovascular diseases have increased. In the database used (Arpen 2021), unspecific cardiovascular diseases were considered: sudden death or cardiorespiratory arrest, arterial hypertension, heart failure, dilated cardiomyopathy, atrioventricular block, cardiac arrhythmia, supraventricular tachycardia, ventricular tachycardia, atrial fibrillation, bradyarrhythmia, and cardiogenic shock associated with ischemic disease.

These observations may be due to insufficient testing for COVID-19, which must be masking the real effects of the pandemic on the Brazilian population, in terms of the number of infected and consequently of deaths. This situation is probably happening in other developing countries around the world. For the analysis of the effects of the pandemic on the Brazilian states (Table 6) and the geographic regions of Brazil (Table 7), several factors should be considered.

While the Southern region has had little change in the number of deaths recorded for 2019 and 2020, the other regions showed significant increases for the same period considered. Comparing the data, it is possible to highlight that the increases for the North, Midwest, and Northeast regions (31.36%, 26.21%, and 21.23%, respectively) were the most expressive recorded in Brazil (Table 7).

The increase recorded in the North of Brazil was due to the variations observed for the states of Amazonas (43.37%), Pará (33.38%), and Roraima (25.40%). With the exception of the states of Acre, Amapá, Rondônia, and Tocantins, the others increased more than 25.00% (Table 6). The capital of Amazonas, Manaus, already at the beginning of April, had declared the collapse of the healthcare system, where 95% of the 293 ICU beds were occupied (Calmon 2020). Recently, this Brazilian state faced an even worse scenario of health system collapse. After increasing the number of beds, 100% of the ICU beds in the state were occupied, and there was a

Table 6 Deaths cited in each of the Brazilian states, from March 16 to December 31, for the years 2019 and 2020

Brazilian states	COVID-19 deaths	Total deaths per year 2019–2020		Difference 2019–2020	Variation
Acre	805.0	2,882.0	3,515.0	633.0	21.96%
Alagoas	2,377.0	13,547.0	15,573.0	2,026.0	14.96%
Amapá	805.0	1,984.0	2,373.0	389.0	19.61%
Amazonas	2,974.0	10,431.0	14,955.0	4,524.0	43.37%
Bahia	8,790.0	54,916.0	65,857.0	10,941.0	19.92%
Ceará	9,850.0	31,407.0	43,419.0	12,012.0	38.25%
Distrito Federal	3,971.0	11,405.0	14,786.0	3,381.0	29.64%
Espírito Santo	5,397.0	18,799.0	22,877.0	4,078.0	21.69%
Goiás	7,250.0	24,579.0	31,121.0	6,542.0	26.62%
Maranhão	2,778.0	15,166.0	20,774.0	5,608.0	36.98%
Mato Grosso	3,162.0	11,009.0	14,676.0	3,667.0	33.31%
Mato Grosso do Sul	2,438.0	12,523.0	14,535.0	2,012.0	16.07%
Minas Gerais	14,443.0	97,034.0	114,389.0	17,355.0	17.89%
Pará	5,464.0	18,687.0	24,924.0	6,237.0	33.38%
Paraíba	3,100.0	20,293.0	22,436.0	2,143.0	10.56%
Paraná	9,907.0	52,960.0	58,483.0	5,523.0	10.43%
Pernambuco	7,747.0	47,545.0	56,808.0	9,263.0	19.48%
Piauí	1,687.0	10,242.0	10,789.0	547.0	5.34%
Rio de Janeiro	28,409.0	111,674.0	137,554.0	25,880.0	23.17%
Rio Grande do Norte	2,308.0	12,671.0	14,255.0	1,584.0	12.50%
Rio Grande do Sul	9,387.0	68,960.0	71,929.0	2,969.0	4.31%
Rondônia	1,493.0	5,666.0	7,011.0	1,345.0	23.74%
Roraima	684.0	1,827.0	2,291.0	464.0	25.40%
Santa Catarina	5,469.0	31,383.0	35,705.0	4,322.0	13.77%
São Paulo	51,944.0	246,017.0	285,841.0	39,824.0	16.19%
Sergipe	2,123.0	8,993.0	10,469.0	1,476.0	16.41%
Tocantins	890.0	4,122.0	4,828.0	706.0	17.13%
Total	195,652.0	946,722.0	1,122,173.0	175,451.0	18.53%

Source: Central de Informações do Registro Civil—CRC Nacional, Brazil (Arpen 2021)

Table 7 Deaths recorded in each Brazilian geographic region, from March 16 to September 15, for the years 2019 and 2020

Region	Deaths				Variation
	2019	2020			
	Total	Other	COVID-19	Total	
North	45,599.0	46,782.0	13,115.0	59,897.0	31.36%
Northeast	214,780.0	219,620.0	40,760.0	260,380.0	21.23%
Midwest	59,516.0	58,297.0	16,821.0	75,118.0	26.21%
Southeast	473,524.0	460,468.0	100,193.0	560,661.0	18.40%
South	153,303.0	141,354.0	24,763.0	166,117.0	8.36%
Total	946,722.0	926,521.0	195,652.0	1,122,173.0	18.53%

Source: Central de Informações do Registro Civil—CRC Nacional, Brazil (Arpen 2021)

depletion in the number of oxygen tanks, which is necessary to ventilate patients (MSF 2021).

In relation to the Northeast region of Brazil, the states of Alagoas (14.96%), Ceará (38.25%), Maranhão (36.98%), Pernambuco (19.48%), and Bahia (19.92%) reported the highest increase in the number of deaths (Table 6). According to Fiocruz Pernambuco (2020), there is a higher incidence of deaths in the North and Northeastern Brazilian states and, as regions of low socioeconomic development, the effects of the disease were more devastating.

A history of the spread of COVID-19 in Brazil considers that the disease reached the country in more developed areas, due to the fact that SARS-CoV-2 was introduced by travelers who circulated in China, Europe, and the US. As the disease progressed to the interior of the states and reached poorer regions, the impact of the disease on the population increased (Fiocruz Pernambuco 2020). Also, according to data from this Brazilian health institution (Fiocruz Pernambuco), the Northern and Northeastern regions of Brazil, which have the lowest socioeconomic development in the country, were the most negatively impacted by the disease and saw the greatest socioeconomic problems. These data are corroborated by Iqbal et al. (2020), where the authors state that the most important factor to be considered in containing the spread of the disease in the Wuhan region (China) was the socioeconomic factor.

The Southeast is the region with the highest number of deaths (Table 6) and the highest population density in the country. The state of São Paulo and its capital were already considered the epicenter of the disease in Brazil (Calmon 2020; El País, 2020). However, Manaus, the capital of the state of Amazonas, is now considered the main region of COVID-19 in Brazil (MSF 2021).

The concern over the increase in the number of COVID-19 cases identified in Manaus (Amazonas state—Brazil), until November 2020, intensified even more after the emergence in the region of a new variant, called VOCP.1 (Variant Of Concern P.1). This new variant, which appeared at the end of December 2020 (identified in January 2021),

was responsible for the second wave of cases of the disease, causing collapse both to the healthcare system and hospitals in the region of Manaus. This new SARS-CoV-2 variant presents important mutations that make the virus more transmissible (superior to other strains, with higher risks of reinfection) and more aggressive, as the worsening in patients' symptoms is faster (Singanayagam et al. 2020; Faria et al. 2021). For this reason, Brazil today stands out on the world stage as being the new worldwide epicenter of the dissemination of SARS-CoV-2 VOCP.1.

The SARS-CoV-2 VOCP.1 variant spread rapidly throughout Brazil, reaching 17 of the 27 Brazilian states (CNN 2021). The World Health Organization (WHO 2021) stated in its epidemiological report on COVID-19 that the Manaus variant has already reached eight countries (Brazil, Japan, United States, United Kingdom, Italy, Germany, South Korea, and Ireland). Thus, SARS-CoV-2 VOCP.1 is today one of the biggest global concerns in relation to COVID-19.

Management of bodies and transmission of SARS-CoV-2 after death

Transmission of infectious diseases can occur during the handling of bodies and also through contact with contaminated hospital equipment, especially when there are no properly trained personnel or personal protective equipment (PPE) is absent or inadequate (Calmon 2020).

Although the lethality of SARS-CoV-2 is low (on average 3.0 to 4.0%) (Fineschi et al. 2020; WHO 2020a) for doctors and other health professionals, since they are exposed to a higher viral load, they are more subject to the risks associated with this etiologic agent. For this reason, these professionals must strictly follow self-protection recommendations to avoid contamination. Due to the ease with which the disease spreads, the World Health Organization (WHO 2020a) released basic guidelines for the proper management of those who died from COVID-19.

The WHO document provides instructions for handling the bodies of COVID-19 victims in order to prevent leakage of body fluids and the spread of the virus. In Brazil, the bodies that will be transported for burial or cremation must have all orifices sealed, must be covered with fabric (sheets), and be placed in an appropriate waterproof bag. Then, a second bag must be used after be cleaned with 70% ethanol, a chlorinated solution (0.5 to 1.0%), or with some other sanitizer authorized by ANVISA, the Brazilian health surveillance agency (Brasil 2020). The WHO guidelines do not require the use of impervious bags for the corpses of COVID-19 but recommend them only in cases of excessive leakage of bodily fluids or in the absence of refrigerated morgues, and especially in countries with hot weather. A second bag is only recommended if burial exceeds 24 h after death or if burial or cremation cannot occur within the next 24 to 48 h (WHO 2020b). Even with all the added precautions for the proper transport of the dead by SARS-CoV-2, another problem that can aggravate the spread of the disease occurs when the cause of death is documented with unknown origin, due to the delay in testing to confirm the infection. This lack of information compromises the performance of adequate body management procedures and increases the risk of contamination of personnel who manage these deaths (Calmon 2020).

Other publications have released relevant policies and some suggestions for safety protocols involving Covid-19, with information and detailed guidelines for professionals involved in handling the bodies of people with suspected or proven cause of death as COVID-19 (Finegan et al. 2020; Fineschi et al. 2020). However, in addition to the concern for the health of these people, the increase in the number of deaths and, consequently, burials, is concerning for public and environmental health.

In Brazil, more specifically in the state of Amazonas, 6,268 deaths were recorded between April, May, and June 2020, whose bodies were either buried or cremated. Of the 5,246 burials (83.6% of those killed), 2,435 occurred in April, 1,899 in May, and 912 in June. The number of burials recorded for the same period in 2019 was 871 for April, 860 for May, and 842 for June, totaling 2,573 deaths for the same period. Comparing the data from these two years, it can be seen that, in 2020, there was an increase of 179.5%, 120.8%, and 8.31%, for the months of April, May, and June, respectively (D24AM 2020). In Cuiabá, the Brazilian state of Mato Grosso, a daily average of 20 burials was recorded in 2020, an increase of 300.0% when compared to the values recorded in the same period of 2019 (Garcia 2020).

As previously mentioned, viruses have a high capacity for survival, mobility, and contamination. In the case of SARS-CoV-2, professionals working in cemeteries must follow the same biosafety rules against infectious diseases adopted in hospital environments (Nascimento 2020). Since the time that the virus can remain in the corpse is uncertain, there is

a potential risk of contamination for both the family of the deceased and for the agents of the funeral services (Neckel et al. 2017).

According to Finegan et al. (2020), burial in individual graves is the best strategy to be adopted for the disposal of the bodies affected by COVID-19, taking into account the care described above to avoid carrying remnants of decomposition of the bodies to groundwater. In addition, if the family opts for the exhumation process, the professionals involved in this process must follow the necessary care, from the preparation of the body to the correct disposal of waste (Neckel et al. 2017). Many other guidelines exist for the transport, handling, and preparation of bodies, as well as the use of PPE that enhance the protection of professionals and can be found in the manual prepared by the Pan American Health Organization, in collaboration with the International Committee of the Red Cross (Cordner et al. 2016).

Due to the high number of deaths by COVID-19 in the world, it is necessary to pay more attention to the correct handling and disposal of the bodies affected by the virus, as well as to ensure the adequacy of cemetery facilities, so that these environments are in compliance with public health and environmental quality laws.

Final considerations

The cadaveric decomposition generates a liquid with toxic potential, called the “colliquation” or cemetery leachate product, which impacts both human health and the environment.

Cemetery leachate is a viscous liquid with a brownish-gray color and a strong odor, composed of 60% water, 30% mineral salts, and 10% organic substances. Among the inorganic compounds of the cemetery leachate are ions of nitrogen, phosphorus, Cl, HCO_3^- , Ca^{2+} , Na^+ and metallic compounds of Ti, Cr, Cd, Pb, Fe, Mn, Ni. Among the organic compounds are biogenic amines, such as cadaverine and putrescine, which are toxic substances and potentially carcinogenic. The cemetery leachate still contains a range of microorganisms and viruses, which gives this liquid a worrying pathogenic potential.

Due to the liquid characteristic of the cemetery leachate, it can seep into the soil and carry with it both its chemical compounds and the biological agents present, thus contaminating, in addition to the soil, the ground and surface waters of the region impacted by its presence.

Environmental contamination resulting from the cadaverous decomposition that takes place in cemeteries can lead to considerable impacts in the most diverse environmental networks, and also to serious risks to human health.

Due to the high number of deaths resulting from the negative effects of the COVID-19 pandemic; the dangers that

decomposing bodies pose to the contamination of soils and water resources; and the possible transfer of pathogens from cadavers, such as viruses and bacteria, to the environment, the importance of strictly following the pre-established protocols and procedures for the burial of bodies contaminated with COVID-19, and to assess the infrastructural conditions of the cemetery environments that are receiving this large number of victims of this pandemic. These precautions are essential to prevent contamination in the work environment and ensure the health of employees, visitors, and the population residing in the vicinity of these environments, or even people who make use of groundwater for subsistence, with the possibility of contamination resulting from leaching that occurs in cemeteries.

Author contribution LRG was responsible for reviewing environmental contamination in cemeteries, but also for writing, editing, and translating the manuscript. MMR acted in the conceptualization and was the major collaborator to review the COVID-19 pandemic data and in writing the manuscript. APAB collaborated in reviewing and writing about cemetery leachate chemicals and contamination by pathogens. GSC and GBB were contributors in review and writing about contamination of soils, groundwater, and surface waters by cemeteries. LSG made the review about cadaverous decomposition processes, wrote this section, and corrected the manuscript layout. LRS contributed to review and writing about the toxicity of biogenic amines present in cemetery leachate. MAMM acted in the supervision, conceptualization, writing, and revision of the entire manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Declarations

Ethics approval This contribution is a review and does not warrant an ethical statement.

Consent to participate This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Consent for publication Not applicable.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Akutsu T, Ikegaya H, Watanabe K, Miyasaka S (2019) Immunohistochemical staining of skin-expressed proteins to identify exfoliated epidermal cells for forensic purposes. *Forensic Sci Int* 303:109940. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.109940>
- Al Bulushi I, Poole S, Deeth HC, Dykes GA (2009) Biogenic amines in fish: Roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation—a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49:369–377. <https://doi.org/10.1080/10408390802067514>
- Almeida AM de, Macêdo JAB de (2005) Parâmetros Físico-Químicos De Caracterização Da Contaminação Do Lençol Freático Por Necrochorume. *Semin. Gestão Ambient.* – Um convite a Interdiscip. Inst. Vianna Júnior – 31/05 a 04/06/2005 1–12
- Andersson G, Heby O (1972) Polyamine and nucleic acid concentrations in Ehrlich ascites carcinoma cells and liver of tumor-bearing mice at various stages of tumor growth. *JNCI J Natl Cancer Inst* 48:165–172. <https://doi.org/10.1093/jnci/48.1.165>
- Anjos 2013: Anjos RM (2013) Cemitérios: uma ameaça à saúde humana? <http://www.crea-sc.org.br/portal/index.php?cmd=artigos-detalle&id=2635#YW823xrMLIU>. Accessed 13 May 2017
- Antonio AS, De Da Costa LCA, Paula ARU, Aguiar ATC, Keppler RLF, Bentes KRS, Wiedemann LSM (2018) Evaluation of soil chemical properties during cadaveric decomposition and its applications to forensic chemistry. *Rev Virtual Quim* 10:574–599. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180043>
- ARPEN (2021) Associação Nacional dos Registradores de Pessoas Naturais do Brasil - Portal da Transparência [WWW Document]. <https://transparencia.registrocivil.org.br/especial-covid>. Accessed 28 Sep 2020
- Aruomero AS, Afolabi O (2014) Comparative assessment of trace metals in soils associated with casket burials: towards implementing green burials. *Eurasian J Soil Sci* 3:65. <https://doi.org/10.18393/ejss.66428>
- Bach B, Le Quere S, Vuchot P, Grinbaum M, Barnavon L (2012) Validation of a method for the analysis of biogenic amines: histamine instability during wine sample storage. *Anal Chim Acta* 732:114–119. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.036>
- Bachrach U (2004) Polyamines and cancer: Minireview article. *Amino Acids* 26:307–309. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0076-6>
- Bianchi J, Espindola ELG, Marin-Morales MA (2011) Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:826–833. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.11.006>
- Bloomfield VA, Wilson RW (1981) Polyamines in Medicine and Biology. Marcel Dekker, New York
- Boekema BKHL, Boekestijn B, Breederveld RS (2015) Evaluation of saline, RPMI and DMEM/F12 for storage of split-thickness skin grafts. *Burns* 41:848–852. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.10.016>
- Bornemissza G (1957) An analysis of Arthropod succession in Carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *Aust J Zool* 5:1–12. <https://doi.org/10.1071/ZO9570001>
- BRASIL (2020) Dead body management in the context of coronavirus disease Sars-CoV-2 (Covid-19), 1st edn. Ministério da Saúde, Brasília/DF. http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manejo_corpos_coronavirus_covid19.pdf. Accessed 14 Jul 2020
- Bryson K, Greenall RJ (2000) Binding sites of the polyamines putrescine, cadaverine, spermidine and spermine on A- and B-DNA located by simulated annealing. *J Biomol Struct Dyn* 18:393–412. <https://doi.org/10.1080/07391102.2000.10506676>
- Całkosiński I, Płoneczka-Janeczko K, Ostapska M, Dudek K, Gamian A, Rypuła K (2015) Microbiological analysis of necrosols collected from urban cemeteries in Poland. *Biomed Res Int Hindawi* 2015:1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/169573>
- Calmon M (2020) Considerations of coronavirus (COVID-19) impact and the management of the dead in Brazil. *Forensic Sci. Int. Reports* 100110. <https://doi.org/10.1016/j.fsir.2020.100110>. [WWW Document]. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2665910720300591?via%3Dihub>. Accessed 05 Mar 21
- Campos APS (2007) Avaliação do potencial de poluição no solo e nas águas subterrâneas decorrente da atividade cemiterial. Dissertação, Universidade de São Paulo
- Carneiro VS (2008) Impactos causados por necrochorume de cemitérios: meio ambiente e saúde pública. *Águas Subterrâneas* 1: 1–18
- CarodArtal FJ (2020) Complicaciones neurológicas por coronavirus y COVID-19. *Rev Neurol* 70: 311. <https://doi.org/10.33588/rn.7009.2020179>
- Carter DO, Tibbett M (2008) Cadaver decomposition and soil: process. *Soil Analysis in Forensic Taphonomy: Chemicals and Biological*

- Effects of Buried Human Remains. CRC Press, Boca Raton, pp 29–52
- Chen J, Rong X, Fan G, Li S, Li Q (2015) Effects of different concentrations of putrescine on proliferation, migration and apoptosis of human skin fibroblasts. *NanFang Yi Ke Da XueXueBao* 35:758–762. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-4254.2015.05.27>
- Christensen AM, Passalacqua NV, Bartelink EJ (2014) *Forensic Anthropology: Current Methods and Practice*, 1a edn. Academic Press, Amsterdam
- CNN (2021) Covid-19: Variante de Manaus já está em pelo menos 12 estados brasileiros. <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/2021/02/16/covid-19-variante-de-manauas-ja-esta-em-pelo-menos-12-estados-brasileiros>. Accessed 1 May 2021
- Cordner S, Coninx R, Kim H-J et al (2016) *Gestão de cadáveres após desastres: Manual para as equipes de primeira resposta no terreno*, 2nd edn. OPAS, Washington
- da Kemerich PD, C, Bianchini DC, Fank JC, et al (2014) A questão ambiental envolvendo os cemitérios no Brasil. *Rev Monogr Ambient* 13:3777–3785. <https://doi.org/10.5902/2236130814506>
- Dalmora AC, Ramos CG, Oliveira MLS, Oliveira LFS, Schneider IAH, Kautzmann, RM (2020) Application of andesite rock as a clean source of fertilizer for eucalyptus crop: evidence of sustainability. *J Clean Prod* 256:120432. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120432>
- D24AM - Rede Diário de Comunicação (2020) Manaus tem índice de sepultamentos em junho semelhante a período anterior à pandemia. <https://d24am.com/amazonas/manaus-tem-indice-de-sepultamentos-emjunho-semelhante-a-periodo-anterior-a-pandemia/>. Accessed 3 Jul 2020
- De Mey E, De Klerck K, De Maere H, Dewulf L, Derdelinckx G, Peeters MC, Fraeye I, Vander Heyden Y, Paelinck H (2014) The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. *MeatSci* 96:821–828. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.010>
- del Rio B, Redruello B, Linares DM, Ladero V, Ruas-Madiedo P, Fernandez M, Martin MC, Alvarez MA (2019) The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Sci Rep* 9:1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36239-w>
- Dent BB, Forbes SL, Stuart BH (2004) Review of human decomposition processes in soil. *Environ Geol* 45:576–585. <https://doi.org/10.1007/s00254-003-0913-z>
- Doğan B, Jebli MB, Shahzad K, Farooq TH, Shahzad U (2020) Investigating the effects of meteorological parameters on COVID-19: case study of New Jersey. *United States Environ Res* 191(110148):1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110148>
- Dourado PLR, da Rocha MP, Roveda LM, Junior JLR, Cândido LS, Cardoso CAL, Morales MAM, de Oliveira KMP, Grisolia AB (2017) Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays. *Genet Mol Biol* 40:123–133. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0223>
- El País, 2020. A crise do coronavírus - As últimas notícias sobre o coronavírus e a crise política no Brasil [WWW Document]. URL <https://brasil.elpais.com/brasil/2020-07-13/ao-vivo-as-ultimas-noticias-sobre-o-coronavirus-e-a-crise-politica-no-brasil.html>. Accessed 14 July 2020
- Fagundes OS, Oliveira LCA, Yamashita OM, Silva IV, Carvalho MAC, Rodrigues DV (2020) The water crisis and its implications in Brazilian agribusiness: A bibliographic review. *Sci Electron Arch* 13:42. <https://doi.org/10.36560/1312020801>
- Fareed Z, Iqbal N, Shahzad F et al (2020) Co-variance nexus between COVID-19 mortality, humidity, and air quality index in Wuhan, China: New insights from partial and multiple wavelet coherence. *Air Qual Atmos Heal* 13:673–682. <https://doi.org/10.1007/s11869-020-00847-1>
- Faria NR, Claro MI, Candido D et al (2021) Genomic characterization of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. [WWW Document]. URL <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586>. Accessed 05 Mar 21
- Finegan O, Fonseca S, Guyomarc'h P, Morcillo Mendez MD, Rodriguez Gonzalez J, Tidball-Binz M, Winter KA (2020) International Committee of the Red Cross (ICRC): general guidance for the management of the dead related to COVID-19. *Forensic Sci Int Synerg* 2:129–137. <https://doi.org/10.1016/j.fsissyn.2020.03.007>
- Fineschi V, Aprile A, Aquila I, Arcangeli M, Asmundo A, Bacci M, Cingolani M, Cipolloni L, D'Errico S, de Casamassimi I, Di Mizio G, Di Paolo M, Focardi M, Frati P, Gabbriellini M, La Russa R, Maiese A, Manetti F, Martelloni M, Mazzeo E, Montana A, Neri M, Padovano M, Pinchi V, Pomara C, Ricci P, Salerno M, Santurro A, Scopetti M, Testi R, Turillazzi E, Vacchiano G, Crivelli F, Bonoldi E, Facchetti F, Nebuloni M, Sapino A (2020) Management of the corpse with suspect, probable or confirmed COVID-19 respiratory infection – Italian interim recommendations for personnel potentially exposed to material from corpses, including body fluids, in morgue structures and during autopsy practice. *Pathologica* 112:64–77. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-13-20>
- Fiocruz Pernambuco (2020) Estudo aponta maior aceleração da Covid-19 no Norte e Nordeste [WWW Document]. URL <https://agencia.fiocruz.br/estudo-aponta-maior-aceleracao-da-covid-19-no-norte-e-nordeste>. Accessed 14 July 2020
- Fusi E, Baldi A, Cheli F, Rebucci R, Ayuso E, Sejrnsen K, Purup S (2008) Effects of putrescine, cadaverine, spermine, spermidine and β-phenylethylamine on cultured bovine mammary epithelial cells. *Ital J Anim Sci* 7:131–140. <https://doi.org/10.4081/ijas.2008.131>
- Garcia I (2020) Sepultamentos aumentam 300% em cemitério em Cuiabá; maioria de vítimas da Covid-19 [WWW Document]. TV Cent. América/G1. URL <https://g1.globo.com/mt/mato-grosso/noticia/2020/07/02/sepultamentos-aumentam-300percent-em-cemiterio-em-cuiaba-maioria-sao-de-vitimas-da-covid-19.ghtml>. Accessed 13 July 2020
- Gerner EW, Meyskens FL (2004) Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* 4:781–792. <https://doi.org/10.1038/nrc1454>
- Giampá CEQ, Gonçalves VG (2005) Orientações para a utilização de águas subterrâneas no Estado de São Paulo. *J. Vis. Lang. Comput.* [WWW Document]. https://sigrh.sp.gov.br/public/uploads/documents/9301/revista_aguas_subterraneas.pdf. Accessed 05 Mar 21
- Gondal MA, Nasr MM, Ahmed MM, Yamani ZH, Alsalhi MS (2011) Detection of lead in paint samples synthesized locally using laser-induced breakdown spectroscopy. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng* 46: 42–49. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.526082>. [WWW Document]. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10934529.2011.526082>. Accessed 05 Mar 2021
- Gundy PM, Gerba CP, Pepper IL (2009) Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater. *Food Environ Virol* 1:10–14. <https://doi.org/10.1007/s12560-008-9001-6>
- Hauptmann N, Grimsby J, Shih JC, Cadenas E (1996) The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 335:295–304. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0510>
- Hirel B, Watier E, Chesne C et al (1996) Culture and drug biotransformation capacity of adult human keratinocytes from post-mortem

- skin. *Br J Dermatol* 134:831–836. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1996.113848.x>
- Hirose R, Ikegaya H, Naito Y, et al (2020) Survival of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Influenza Virus on Human Skin: Importance of Hand Hygiene in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis* ciaa1517. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa151>
- Hussain SS, Ali M, Ahmad M, Siddique KHM (2011) Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnol Adv* 29:300–311. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.003>
- Ioan BG, Manea C, Hanganu B, Stătescu L, Solovastru LG, Manolescu I (2017) The chemistry decomposition in human corpses. *Rev Chim* 68:1450–1454. <https://doi.org/10.37358/rc.17.6.5672>
- Iqbal N, Fareed Z, Shahzad F, He X, Shahzad U, Lina M (2020) The nexus between COVID-19, temperature and exchange rate in Wuhan city: new findings from partial and multiple wavelet coherence. *Sci Total Environ* 729:138916. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138916>
- Jancewicz AL, Gibbs NM, Masson PH (2016) Cadaverine's functional role in plant development and environmental response. *Front Plant Sci* 7:1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00870>
- Jonker C, Olivier J (2012) Mineral contamination from cemetery soils: case study of Zandfontein Cemetery, South Africa. *Int J Environ Res Public Health* 9:511–520. <https://doi.org/10.3390/ijerph9020511>
- Kandoli SJ, Alidadi H, Najafpoor AA, Mehrabpour M, Hosseinzadeh A, Momeni F (2019) Assessment of cemetery effects on groundwater quality using GIS. *Desalin Water Treat* 168: 235–242. <https://doi.org/10.5004/dwt.2019.24622>. [WWW. Document]. https://www.deswater.com/DWT_abstracts/vol_168/168_2019_235.pdf. Accessed 05 Mar 2021
- Kemerich PD da C, Borba WF de, Silva RF da, Barros G, Gerhardt AE, Flores CEB (2012) Valores anômalos de metais pesados em solo de cemitério (doi:<https://doi.org/10.4136/ambi-agua.838>). *Ambient. e Água - AnInterdiscip J Appl Sci* 7: 140–156. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.838>
- Křifžek M, Pavlíček T, Vácha F (2002) Formation of selected biogenic amines in carp meat. *J Sci Food Agric* 82:1088–1093. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1154>
- Ladero V, Calles-Enriquez M, Fernandez M, Alvarez MA (2010) Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Curr Nutr Food Sci* 6:145–156. <https://doi.org/10.2174/157340110791233256>
- Łukaszuk C, Krajewska-Kula E, Guzowski A, Kraszyńska B, Grassmann M, Dobrowolski R (2015) Analysis of the incidence of fungi in a crypt cemetery. *J Air Waste Manag Assoc* 65:1141–1147. <https://doi.org/10.1080/10962247.2015.1068884>
- Lyons DE, Beery JT, Lyons SA, Taylor SL (1983) Cadaverine and aminoguanidine potentiate the uptake of histamine in vitro in perfused intestinal segments of rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 70:445–458. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(83\)90162-X](https://doi.org/10.1016/0041-008X(83)90162-X)
- Madabhavi I, Sarkar M, Kadakol N (2020) CoviD-19: A review. *Monaldi Arch Chest Dis* 90:248–258. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2020.1298>
- Matos B, Pacheco A (2001) Avaliação da ocorrência e do transporte de microrganismos no aquífero freático do cemitério de Vila Nova Cachoeirinha, município de São Paulo. *Águas Subterrâneas* 172. <https://aguassubterraneas.abas.org/asubterraneas/article/view/22635>
- Matsumoto ST, Marin-Morales MA (2004) Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluent using the Allium cepa test system. *Cytologia (Tokyo)* 69:399–408. <https://doi.org/10.1508/cytologia.69.399>
- Medema G, Heijnen L, Elsinga G et al (2020) Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in the Netherlands. *Environ Sci Technol Lett* 7:511–516. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>
- Melo DBG, Tudor F, Bernardino VN (2010) Cemitérios Sustentáveis, in: Feira Tecnológica do Centro Paula Souza – FETEPS. Campinas
- MSF – Medecins Sans Frontieres (2021) COVID-19 leaves Amazonas health system saturated, overloaded and struggling (Brazil) [WWW Document]. URL <https://www.msf.org/coronavirus-covid-19-collapses-health-system-manaus-brazil>. Accessed 22 Jan 2021
- Naddeo V, Liu H (2020) Editorial Perspectives: 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2): What is its fate in urban water cycle and how can the water research community respond? *Environ Sci Water Res Technol* 6:1213–1216. <https://doi.org/10.1039/d0ew90015j>
- Nascimento FL (2020) Cemitério X Novo Coronavírus: Impactos da COVID-19 na Saúde Pública e Coletiva dos Mortos e dos Vivos. *Rev. UFRJ, Boletim de Conjuntura* 2(4):1–11
- Neckel A, Costa C, Mario DN, Sabadin CES, Bodah ET (2017) Environmental damage and public health threat caused by cemeteries: A proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. *Urbe* 9:216–230. <https://doi.org/10.1590/2175-3369.009.002.AO05>
- Nogueira C de OG, Costa Júnior JEV, Coimbra LAB (2013) Cemitérios E Seus Impactos Socioambientais No Brasil. *Periódico Eletrônico Fórum Ambient. da Alta Paul* 9 (11): 331–344. <https://doi.org/10.17271/198008279112013681>
- Oliveira B, Quinteiro P, Caetano C, Nadaís 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. <https://doi.org/10.1111/j.1747-6593.2012.00330.x>
- WHO W.H.O. (2021) COVID-19 Weekly Epidemiological Update. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20210127-weekly-epi-update_24.pdf. Accessed 20 Sep 2021
- Ourives EM, Carvalho PDS, De Oliveira BM, Ferreira AM (2017) Analysis of Environmental Impact of Cemetery in the Town of Três Pontas - MG. *Rev Bras Gestão Ambient* 11(1):109–111
- Pacheco A (2017) Meio Ambiente e Cemitérios. Editora Senac, São Paulo
- Pacheco A, Matos BA (2000) Cemitérios e meio ambiente: critérios para a implantação e norma técnica. *Rev. Tecnologias do Ambiente [S.l.]* 7(33): 13–15
- Paíga P, Delerue-Matos C (2016) Determination of pharmaceuticals in groundwater collected in five cemeteries' areas (Portugal). *Sci Total Environ* 569–570:16–22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.090>
- Paik Jung H-Y, Bieldanes LF (1979) Effects of cadaverine on histamine transport and metabolism in isolated gut sections of the guinea-pig. *Food Cosmet Toxicol* 17:629–632. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(79\)90123-8](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90123-8)
- Pegg AE (2013) Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chem Res Toxicol* 26:1782–1800. <https://doi.org/10.1021/tx400316s>
- Pinheiro J (2006) Decay process of cadaver. In: Schmitt A, Cunha E, Pinheiro J (eds) *Forensic Anthropology and Medicine*. Humana Press, Totowa, pp 85–116
- Prescott J, Bushmaker T, Fischer R, Miazgowski K, Judson S, Munster VJ (2015) Postmortem stability of Ebola virus. *Emerg Infect Dis* 21:856–859. <https://doi.org/10.3201/eid2105.150041>
- Qu G, Li X, Hu L, Jiang G (2020) An imperative need for research on the role of environmental factors in transmission of novel coronavirus (COVID-19). *Environ Sci Technol*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01102>
- Ramani D, De Bandt JP, Cynober L (2014) Aliphatic polyamines in physiology and diseases. *Clin Nutr* 33:14–22. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.09.019>

- Rauscher-Gabernig E, Gabernig R, Brueller W, Grossgut R, Bauer F, Paulsen P (2012) Dietary exposure assessment of putrescine and cadaverine and derivation of tolerable levels in selected foods consumed in Austria. *Eur Food Res Technol* 235:209–220. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1748-1>
- Rodríguez-Eugenio N, McLaughlin M, Pennock D (2018) Soil pollution: a hidden reality. *FAO, Rome*
- Rodrigues L, Pacheco A (2003) Groundwater contamination from cemeteries cases of study. *Environ 2010 Situat Perspect Eur Union* 6(10): 1–6
- Rodriguez W, Bass WM (1983) Insect activity and its relationship to decay rates of human cadavers in east Tennessee. *J Forensic Sci* 28:423–432
- Rollemberg S, de Barros AN, de Lima JPM (2020) Avaliação da contaminação, sobrevivência e remoção do coronavírus em sistemas de tratamento de esgoto sanitário. *Rev Tecnol* 41:1–15. <https://doi.org/10.5020/23180730.2020.10849>
- Roser M, Ritchie H, Ortiz-Ospina E, Hasell J (2021) Coronavirus Pandemic (COVID-19) [WWW Document]. *Publ. online OurWorldInData.org*. URL <https://ourworldindata.org/coronavirus>. Accessed 22 Jan 2021
- Sarwar S, Shahzad K, Fareed Z, Shahzad U (2021) A study on the effects of meteorological and climatic factors on the COVID-19 spread in Canada during 2020. *J Environ Health Sci Engineer.* <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00707-9>
- Schuber F (1989) Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem J* 260:1–10. <https://doi.org/10.1042/bj2600001>
- Seetulsingh P, Kannangara CI, Richman P (2020) Undetectable SARS-CoV-2 in anasopharyngeal swab but persistent viral RNA from deep lung swabs: findings from an autopsy. *BMJ Case Rep* 13. <https://doi.org/10.1136/bcr-2020-237446>
- Shalaby AR (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res Int* 29:675–690. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(96\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(96)00066-X)
- Shahzad K, Shahzad U, Iqbal N, Shahzad F, Fareed Z (2020a) Effects of climatological parameters on the outbreak spread of COVID-19 in highly affected regions of Spain. *Environ Sci Pollut Res* 27(31):39657–39666. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10551-3>
- Shahzad F, Shahzad U, Fareed Z, Iqbal N, Hashmi SH, Ahmad F (2020b) Asymmetric nexus between temperature and COVID-19 in the top ten affected provinces of China: a current application of quantile-on-quantile approach. *Sci Total Environ* 736:139115. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139115>
- Shakoor A, Chen X, Farooq TH, Shahzad U, Ashraf F, Rehman A, Sahar N, Yan W (2020) Fluctuations in environmental pollutants and air quality during the lockdown in the USA and China: two sides of COVID-19 pandemic. *Air Qual Atmos Health* 13:1335–1342. <https://doi.org/10.1007/s11869-020-00888-6>
- Silva LM (1995) Os cemitérios na problemática ambiental. In: *I Seminário Nacional "Cemitérios e Meio Ambiente."* SINCESP & ACEMBRA, São Paulo
- Silva RBP da, Campos MCC, Silva LS, Filho EG. de B, Lima AFL de, Pinheiro EN, Cunha JM (2020) Concentration of heavy metals in soils under cemetery occupation in Amazonas, Brazil. *SoilSediment Contam. An Int J* 29: 192–208. <https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1696280> [WWW Document]. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15320383.2019.1696280>. Accessed 03 05 21
- Silva RW da C, Malagutti Filho W (2008) Cemitérios como áreas potencialmente contaminadas. *Ver. Brazilian Journal of Environmental Sciences (Online)*, (09): 26–35. [WWW Document]. http://rbciamb.com.br/index.php/Publicacoes_RBCIAMB/article/view/423. Accessed 20.05.21
- Singanayagam A, Patel M, Charlett A et al (2020) Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill.* 25(32):2001483. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483>
- Souza M, Botelho RA (1999) Métodos Artificiais De Tanatocon-servação. *Saúde, Ética & Justiça* 4: 33–47. <https://doi.org/10.11606/issn.2317-2770.v4i1-2p33-47> [WWW Document]. <https://www.revistas.usp.br/sej/article/view/40826>. Accessed 20.05.21
- Spriggs CC, Harwood MC, Tsai B (2019) How non-enveloped viruses hijack host machineries to cause infection. In: Kielian M, Metten-leiter TC, Roossinck MJ (eds) *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp 97–122
- Teti D, Visalli M, McNair H (2002) Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J Chromatogr B* 781:107–149. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00669-4](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00669-4)
- Thomas T, Thomas TJ (2001) Polyamines in cell growth and cell death: Molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 58:244–258. <https://doi.org/10.1007/PL00000852>
- Til HP, Falke HE, Prinsen MK, Willems MI (1997) Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food Chem Toxicol* 35:337–348. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00121-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00121-X)
- Tormen AF, Tasso CA, Korf EP (2016) Estudo da contaminação de águas subterrâneas por cemitérios. *Perspect Online Ciências Exatas e Eng* 16: 50–57. <https://doi.org/10.25242/885X6162016902>
- van Allemann S, Dippenaar MA, Olivier J (2019) A laboratory study of the leachate composition of selected metals in cemeteries (South Africa). *Environ Earth Sci* 78:1–9. <https://doi.org/10.1007/s12665-019-8521-8>
- Vass A, Barshick S, Segal G, Caton J, Skeen J, Love J (2002) Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. *J Forensic Sci* 47:542–553
- van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH et al (2020) Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* 382:1564–1567. <https://doi.org/10.1056/nejmc200497>
- Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, Wang B, Xiang H, Cheng Z, Xiong Y, Zhao Y, Li Y, Wang X, Peng Z (2020) Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J Am Med Assoc* 323:1061–1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
- Wang Y, Wu X, Wang Y et al (2004) Low stability of nucleocapsid protein in SARS virus. *Biochemistry* 43:11103–11108. <https://doi.org/10.1021/bi049194b>
- Westall F, Brack A (2018) The Importance of Water for Life. *Space Sci Rev* 214:1–23. <https://doi.org/10.1007/s11214-018-0476-7>
- WHO, W.H.O (2020a) WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard [WWW Document]. URL <https://covid19.who.int>. Accessed 7 Oct 2020
- WHO, W.H.O (2020b) Infection prevention and control during health care when coronavirus disease (COVID-19) is suspected or confirmed [WWW Document]. URL <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-IPC-2020.4>. Accessed 6.19.20
- Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, Dong X, Yin H, Xiao Q, Tang Y, Qu X, Kuang L, Fang X, Mishra N, Lu J, Shan H, Jiang G, Huang X (2020) Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5:434–435. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2)
- Zychowski J, Bryndal T (2015) Impact of cemeteries on groundwater contamination by bacteria and viruses - a review. *J Water Health* 13:285–301. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.119>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

ARTIGO 2

Efeitos citogenotóxicos das aminas biogênicas cadaverina e putrescina, em associação, sobre células de fibroblastos de anfíbios

Letícia Rocha Gonçalves¹, Letícia Tamborlin^{1,2}, Augusto Ducati Luchessi^{1,2}, Nicolas Pollet³, Maria Aparecida Marin-Morales¹

1. Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Av. 24-A, 1515, Rio Claro, SP CEP: 13506-900, Brasil.

2. Laboratório de Biotecnologia (BioTech), Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA), Universidade de Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brasil.

3. Evolution, Génomes, Comportement & Ecologie, Université Paris-Saclay, CNRS, IRD, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

RESUMO

Os cemitérios são fontes antrópicas de contaminação ambiental, tendo como uma das principais causas desta contaminação a liberação do necrochorume. Este estudo é pioneiro pela investigação de citogenotoxicidade de contaminantes de cemitérios e também pelo uso da linhagem celular *Speedy* para este fim. Dentre os contaminantes presentes no necrochorume estão as aminas biogênicas cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). Essas substâncias desempenham funções biológicas, quando estão em concentrações micromolares. Porém, quando em altas concentrações elevadas desestabilizam macromoléculas orgânicas, causando graves alterações celulares. Para avaliar os efeitos citogenotóxicos dessas aminas, foram realizados ensaios expondo a linhagem de fibroblasto de anfíbio (células *Speedy*) a diferentes associações de CAD e PUT. Nos testes de 24h, os resultados mostraram alta citotoxicidade das associações de maior concentração das aminas CAD (20%) e PUT (10 e 0,1%), independente da concentração da outra amina associada; citotoxicidade da concentração de CAD de 5%, somente quando associada à maior concentração de PUT (10%); genotoxicidade para as associações com baixas concentrações das aminas, por efeito aneugênico, quando em exposição por 24h; fragmentação do DNA, parada do ciclo celular na fase S e apoptose, induzida pela associação de mais alta concentração das aminas (associação de 20% de CAD e 10% de PUT), na exposição de 48 h. Pelos resultados, pode-se inferir que toxicidade conjunta das aminas das CAD e PUT, para a linhagem *Speedy*, foi tempo dependente de exposição. A linhagem *Speedy* foi eficiente para ser usada em avaliação dos efeitos citogenotóxicos de aminas biogênicas. O estudo ainda mostrou que os contaminantes de cemitérios apresentam um alto potencial poluidor, portanto devem ser frequentemente monitorados.

Palavras chave: citometria de fluxo, ensaio do cometa, ensaio do MN; linhagem celular *Speedy*; necrochorume.

1. INTRODUÇÃO

A degradação ambiental está, de maneira geral, associada a ações antrópicas que descaracterizam as condições físicas e químicas do ambiente. Essas alterações ambientais podem interferir, direta ou indiretamente, na harmonia dos ecossistemas, o que faz dos impactos antrópicos um dos grandes desafios a serem vencidos no século XXI.

Dentre as principais fontes antrópicas de contaminação ambiental estão os cemitérios (JONKER; OLIVIER, 2012), ambientes estes que vêm sendo negligenciados há séculos quanto ao seu potencial poluidor. As necrópoles se caracterizam como uma importante fonte de poluição de solos e águas superficiais em escala global. Fato decorrente da concentração de cadáveres que resulta em um aporte de agentes físicos, químicos e de contaminantes biológicos ao meio ambiente, advindos, principalmente, do processo de decomposição cadavérica (NOGUEIRA et al., 2013; KEMERICH et al., 2014; GONÇALVES et al., 2021 e NECKEL et al., 2021).

A principal causa de contaminação ambiental pelos cemitérios é o líquido liberado continuamente durante a putrefação cadavérica, denominado de necrochorume (COSTA SILVA; FILHO, 2008). Este líquido se caracteriza por ser mais viscoso que a água, rico em sais minerais e substâncias orgânicas degradáveis, ter a coloração castanho-acinzentada, cheiro acre e fétido, ser polimerizável e apresentar um grau variado de patogenicidade (SILVA, 1995 e MATOS, 2001).

A produção de necrochorume é alta, pois, de acordo com Pacheco (2012), um corpo com massa de 70 kg libera cerca de 45 L desse composto. O necrochorume tem uma densidade média de 1,23 g/cm³ e um pH que varia de 5 a 9, em temperatura de 23° a 28° C. A sua composição é de 60% de água, 30% de substâncias mineralizadas e 10% de substâncias orgânicas (OLIVEIRA et al., 2013). Os compostos orgânicos presentes no necrochorume são altamente tóxicos. Dentre eles estão as aminas biogênicas cadaverina (CAD) (1,5-pentanodiamina) e putrescina (PUT) (1,4- butanodiamina).

Ambas as aminas são moléculas pequenas, produzidas pela descarboxilação de aminoácidos, por meio de biossíntese e processos enzimáticos (BACHRACH, 2004). Estão presentes no organismo em concentrações micromolares, participando de alguns processos celulares como transcrição, tradução, crescimento, divisão e morte celular. São solúveis em água e geram, quando degradadas, íons amônia (NH₄⁺) (ALMEIDA; MACEDO, 2005). Essas aminas, por conta de seus sítios nucleofílicos, podem interagir com macromoléculas como os ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (HUSSAIN et al., 2011).

Em concentrações acima da fisiológica, as aminas CAD e PUT podem interferir na estabilidade das moléculas as quais interagem, promovendo danos ao DNA/proteínas (UNAL; PALAVAN-UNSAL; TUFEKCI, 2008 e HUSSAIN et al., 2011). Também podem induzir ativação de processos catabólicos que geram um aumento excessivo de radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), geradores de eventos de estresse oxidativo (BETTERIDGE, 2000; THOMAS; THOMAS, 2001; PEGG, 2013 e ALZOGHAIBI, 2013). Esses eventos podem causar danos ao DNA, alterar os processos de transcrição gênica e de tradução de proteínas, alterações essas, muitas vezes, envolvidas com carcinogenicidade ou até mesmo a morte celular. Assim, os impactos da presença de CAD e PUT estão fortemente associados à concentração das aminas na célula, bem como ao tecido envolvido (BEKEBREDE et al., 2020 e GONÇALVES et al., 2021).

Todos os compostos produzidos e liberados durante o processo de putrefação podem contaminar o solo e atingir águas superficiais e subterrâneas e,consequentemente, comprometer todo o ecossistema do entorno da área cemiterial. A percolação nesses meios pode variar com as características do solo, temperatura e clima do local (ZYCHOWSKI; BRYNDAL 2015, GONÇALVES et al., 2021; LEMMEL et al., 2019 e HONSCHA et al., 2021).

Ensaio *in vitro* realizados com linhagens celulares têm contribuído muito com os estudos toxicológicos, sendo consideradas ferramentas importantes nas avaliações de efeitos de diferentes agentes sobre sistemas vertebrados. As culturas celulares bidimensionais (2D) ou em monocamadas são amplamente utilizadas para esse fim (ZOLI et al., 2001), por possibilitarem a investigação de mecanismos do comportamento celular. Além disso, esses ensaios se caracterizam como ótimas alternativas para substituir/**R**eplacement, reduzir/**R**eduction e refinar/**R**efinement o uso de animais em experimentações científicas (3Rs), estratégias essas essenciais para a proteção e bem-estar animal (ARAÚJO et al., 2014 e QUADROS et al., 2020 e VICHARE et al., 2021).

A linhagem celular derivada de fibroblasto do anfíbio *Xenopus tropicalis*, denominada de linhagem *Speedy*, nome dado pela sua rápida proliferação em condições de cultivo, tem como característica um número cromossômico de 2n=21 (trissomia no cromossomo 10) (SINZELLE et al., 2012). O genoma desse organismo apresenta trechos de colinearidade gênica com humanos. Dos mais de 20.000 genes do *X. tropicalis*, 1.700 são ortólogos com doenças humanas e mais de 1/3 do genoma desses anfíbios apresenta elementos transponíveis que são de 40 a 50% comparáveis com a densidade observada

no genoma de mamíferos (HELLSTEN et al., 2010). Os autores ainda afirmam que 60% de todos os genes da estrutura de *X. tropicalis* pode ser associado a um ortólogo humano. Por essas características específicas, esse anfíbio tornou-se um importante organismo modelo para estudos genéticos, biológicos e biomédicos (BOWES et al., 2008 e ZHU et al., 2019).

Pela toxicidade reconhecida de concentrações não fisiológicas das aminas biogênicas CAD e PUT e pela presença dessas duas aminas em ambientes de cemitérios, esse estudo teve como objetivo investigar a citogenotoxicidade, o potencial mutagênico e as possíveis interferências no perfil do ciclo celular e na fragmentação de DNA de associações dessas duas aminas, sobre culturas de fibroblastos da linhagem celular *Speedy* (anfíbio). O uso dessa linhagem celular é pioneiro em avaliações ecotoxicológicas. Os resultados do estudo podem ser extrapolados para possíveis ações sobre o genoma humano, pela uma alta colinearidade existente entre esses dois genomas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Substância Testada

Foram avaliadas associações de diferentes concentrações das aminas biogênicas cadaverina (CAD) (1,5-Diaminopentano, 1,5-Pentanodiamina, Pentametilenediamina), fórmula molecular $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, peso molecular 102,18, CAS: 462-94-2, com pureza de 97% e da putrescina (PUT) (1,4-butanodiamina), fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2$, peso molecular 88,15 g/mol, CAS No. 110-60-1, com pureza de 99,0%. Ambas as substâncias foram adquiridas da Sigma-Aldrich.

Para preparação das soluções, foram utilizadas as concentrações de 40, 30 e 20% de 83mg/L de CAD, concentrações baseadas na amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos (Til et al., 1997) e 70, 60, 30 e 10% da DL50 de PUT para ratas (463 mg/kg), descritas na ficha do produto. As porcentagens testadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Soluções de diferentes concentrações da associação de CAD e PUT utilizadas na exposição em células *Speedy*.

Soluções	Cadaverina	Putrescina
1	20%	0,01%
2	20%	0,1%
3	5%	10%
4	10%	10%
5	20%	10%
6	10%	0,1%
7	10%	0,01%
8	5%	0,1%
9	5%	0,01%

As concentrações foram estabelecidas através da amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de CAD (Til, et al.,1997) e da DL 50 463 mg/kg para ratazanas de PUT, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. Fonte: elaborada pela autora (2022).

2.2. Material biológico

Os ensaios de genotoxicidade e/ou mutagenicidade, realizados no Laboratório de Mutagênese Ambiental (Instituto de Biociências da UNESP em Rio Claro), foram desenvolvidos com as células de fibroblasto de anfíbio (*Xenopus tropicalis*), mantidas em cultura (linhagem *Speedy*).

2.3. Cultura de células derivadas de fibroblastos de anfíbios (*Speedy*)

A linhagem celular *Speedy* foi utilizada como modelo de estudo para os ensaios de toxicidade pela Resazurina; genotoxicidade/mutagenicidade pelo ensaio do cometa e do MN com bloqueio de citocinese; e alteração de ciclo celular e fragmentação nuclear por citometria de fluxo. A linhagem celular usada foi cedida pelo Prof. Dr. Nicolas Pollet do Institute of Systems & Synthetic Biology – iSSB – Genopole/França e inserida no banco de células do Laboratório de Mutagênese Ambiental do Departamento de Biologia da UNESP-IB/Rio Claro/SP.

O cultivo celular foi realizado com o meio Leibowitz L-15, preparado com solução antibiótica/antimicótica e suplementado com 10% de soro bovino fetal. Foram utilizadas garrafas de 25 cm² sem ventilação, em uma incubadora BOD a 28 °C. Nessas

condições, o ciclo celular foi de 24 horas.

2.4. Teste de viabilidade celular

Para o ensaio de resazurina com a linhagem celular *Speedy*, as células foram expostas às nove concentrações da combinação de CAD e PUT, descritas na tabela 1, de acordo com o protocolo de O'Brien et al., (2000), com algumas modificações. $2,34 \times 10^6$ células foram colocadas em microplacas de 96 poços para estabilização, onde foram mantidas nas condições especificadas do item 2.3, por 24 h. O controle negativo (CN) foi realizado com meio de cultura celular e o controle positivo (CP) com meio de cultura celular e Triton X-100 a 1%. Em seguida, as células foram incubadas por 4 h com resazurina (44 μ M), nas mesmas condições. As placas foram lidas em leitor de placa, modelo Infinite M200 Pro™ plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany), a 590 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. As concentrações testadas (Tabela 1) foram consideradas citotóxicas, quando apresentaram valores inferiores a 80% daqueles observados para o CN.

2.5. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Tice et al. (2000), com algumas modificações. 1×10^6 células da linhagem *Speedy* foram cultivadas em frascos de 25 cm², onde foram mantidas para estabilização sob as condições descritas no item 2.3. As células foram expostas a 3 diferentes concentrações da associação de CAD e PUT, selecionadas no ensaio de viabilidade celular, descritos na tabela 2, por um período de 24 horas. O CN foi realizado com meios de cultura celular e o CP foi realizado com solução de sulfonato de metilmetano (MMS) 10 mM, preparado pela diluição de 3,33 μ L de MMS (marca: Sigma Aldrich) em 4 mL de PBS. Desta solução, foram pipetados 50 μ L, os quais foram acrescentados com 5 mL de meio específico para cada linhagem celular (1×10^{-2} M; 50 μ L/5ml).

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

Soluções	Cadaverina	Putrescina	Tratamentos
6	10%	0,1%	T1
8	5%	0,1%	T2
9	5%	0,01%	T3

As soluções 6, 8 e 9 correspondem aos percentuais baseados na amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de CAD (Til, et al.,1997) e da DL 50 463 mg/kg para ratazanas de PUT, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. As soluções 6, 8 e 9 referem-se aos tratamentos (T) T1, T2 e T3, respectivamente. Fonte: elaborada pela autora (2022).

Em seguida as células foram desprendidas da parede dos frascos, utilizando 500 µL de Tripsina-EDTA (25%). Depois disso, o processo foi inativado pela adição de 5 mL de meio completo. As células foram transferidas para tubos de centrifugação e centrifugadas a 1.500 rpm, por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e apenas 0,5 mL destas soluções foram ressuspensas. Células de controle com viabilidade $\geq 80\%$ (Trypan Blue Dye - Teste de Exclusão) foram colhidas e processadas para o ensaio cometa (pH > 13) (TICE et al., 2000, THÁ et al., 2021).

Posteriormente, lâminas recobertas com agarose normal receberam 20 µL de suspensão celular misturados com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 37 ° C. O material foi recoberto com lamínula e colocado a 4°C por 15 minutos. Após a solidificação do gel, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram transferidas para uma cubeta com solução fria de lise (1 mL Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução stock de lise - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM e ~ 8,0 g de NaOH, pH 10,0), mantidos a 4 °C, no escuro, durante 1 hora. Em seguida, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese e cobertas com tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, pH > 13,0), para estabilização, por 20 minutos. Na sequência, as lâminas foram submetidas à eletroforese a 39 V e 300 mA (~ 0.8 V/cm), por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram neutralizadas com três banhos de 5 minutos, em tampão de neutralização (0,4 M de tris-HCL, pH 7,2) e fixadas, durante 10 minutos, em etanol absoluto. No momento da realização das análises, as lâminas foram coradas com GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1 M, e 45 mL de água destilada) e analisadas em microscópio de fluorescência Leica, filtro B – 34 (excitação: $\lambda = 420-490$ nm, barreira: $\lambda = 520$ nm). O ensaio foi realizado em triplicata e a contagem foi feita ao acaso, em objetivas de 40x, onde foram contabilizados 200 nucleóides por

frasco (3 réplicas, duas lâminas com 100 nucleóides cada), totalizando 600 nucleóides por tratamento. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0, considerando os valores médios da porcentagem de DNA presente na cauda do cometa. Inicialmente, foi realizada a normalidade e homogeneidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Foi usada como teste paramétrico, a análise de variância ANOVA – um critério, seguido do post hoc Dunnet. Já o teste de Kruskal-Wallis foi empregado como teste não paramétrico, seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância utilizado nos testes de hipóteses foi de $p < 0,05$.

2.6. Teste de micronúcleo de bloqueio de citocinese (CBMN)

O teste de CBMN foi realizado de acordo com o protocolo de Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações. A descrição do preparo das soluções utilizadas neste ensaio encontra-se apresentada no Apêndice D. 1×10^6 células da linhagem *Speedy* foram cultivadas em frascos de 25 cm², sob as condições descritas no item 2.3, por 24 h. As células foram expostas a 3 diferentes concentrações da associação de CAD e PUT, descritas na tabela 2, por um período de 24 horas. O CN foi realizado com meio de cultura celular e o CP foi realizado com MMS 10 mM, preparado pela diluição de 3,33 µL de MMS (marca: Sigma Aldrich) em 4 mL de PBS. Desta solução, foram pipetados 50 µL, os quais foram acrescentados com 5 mL de meio específico para cada linhagem celular (1×10^{-2} M; 50 µl/5ml). O experimento foi realizado em triplicata.

Após a exposição, as células foram lavadas duas vezes com PBS e 5 mL de meio de cultura completo, contendo 3 µg / mL de citocalasina B. Os frascos foram incubados em temperatura específica para cada linhagem, descritas no item 2.3, por 28 horas (TSUBOY et al., 2007; CHEQUER et al., 2009 e MAZZEO et al., 2016). As células foram colhidas, fixadas com Carnoy (metanol: ácido acético, 3: 1 v / v) e mantidas a 4 °C, antes da sua utilização nos ensaios. Para preparação das lâminas, aproximadamente cinco gotas da cultura foram colocadas em lâminas limpas, contendo um filme de água fria. Após a secagem, as lâminas foram submetidas à hidrólise, com HCl 1N, por 10 minutos, a 60 °C. Em seguida, as lâminas foram expostas, por 2 horas, ao reativo de Shiff, sendo, posteriormente lavadas com água corrente. Após secas, as lâminas foram coradas com Giemsa 5%, por 8 minutos. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz, na ampliação de 1.000X. O ensaio foi realizado em triplicata. Foram contabilizadas 2000 células por réplica, totalizando 6000 células para cada concentração e controles.

Para a avaliação da genotoxicidade das combinações de CAD e PUT, foram

consideradas pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares e para o potencial mutagênico, células binucleadas portadoras de MN (Fenech et al. 2003). A avaliação do índice de divisão celular (IDC) foi realizado pela contabilização de 1.000 células/tratamento. O IDC foi calculado seguindo a fórmula: $IDC = [M1 + (2 \times M2) + (3 \times M3) + (4 \times M4)]/N$, onde M1 – M4 representam os números de células com 1 a 4 núcleos, respectivamente, e N é o número total de células analisadas (EASTMOND; TUCKER, 1989). Para as análises estatísticas, inicialmente, foi realizado o teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Como teste paramétrico, foi usada a análise de variância ANOVA – um critério, seguido do post hoc Dunnet. Já o teste de Kruskal-Wallis foi empregado como teste não paramétrico, seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância utilizado nos testes de hipóteses foi $p < 0,05$.

2.7. Perfil do ciclo celular e fragmentação do DNA por citometria de fluxo

A distribuição do ciclo celular e a porcentagem de células com DNA fragmentado foram avaliadas pelos resultados obtidos nas mensurações do conteúdo de DNA, após a marcação com iodeto de propídio (IP). $2,5 \times 10^5$ células foram cultivadas em placas de 6 poços, sob as condições descritas no item 2.3. As células foram expostas, primeiramente a um período de 24 horas, a 3 diferentes associações (T1, T2 e T3). Como não foram observadas alterações no ciclo celular e de fragmentação de DNA para essas associações, foi também testada uma associação adicional, de maior concentração das aminas (CAD 20% + PUT 10%, representada na Tabela 1 como solução 5). Foi então realizado um novo ensaio com essas 4 associações para os tempos de 24 e 48 horas de exposição (Tabela 3). O CN foi realizado com meios de cultura celular e o CP foi realizado com solução de MMS 10 mM, preparado pela diluição de 3,33 µL de MMS (marca: Sigma Aldrich) em 4 mL de PBS. Desta solução, foram pipetados 50 µL, os quais foram acrescentados com 5 mL de meio específico para cada linhagem celular (1×10^{-2} M; 50 µl/5ml)..

Após os tratamentos, as células foram coletadas por tripsinização e transferidas para tubos de microcentrífuga. Os tubos foram centrifugados a $300 \times g$, por 5 minutos, em temperatura ambiente. Na sequência, as células foram lavadas com solução salina tamponada fosfato (PBS). As células foram fixadas com etanol (70%) em banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a $300 \times g$, durante 5 minutos, à temperatura ambiente e lavadas com solução salina tamponada fosfato (PBS). Em seguida, foram adicionados às células 200 µL da solução de coloração (20 µg/mL de IP),

10 µg/mL de RNase A e 0,1% de Triton X-100, onde foram incubadas, no escuro, em temperatura ambiente, por 30 minutos. As células foram analisadas sob citômetro defluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Foram registrados 10.000 eventos por amostra, usando o canal FL-2A para determinar o conteúdo de DNA das células. As porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo celular foram configuradas a partir dos dados coletados, usando o software BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

Tabela 3: Soluções das diferentes associações de CAD e PUT usadas no ensaio em citometria de fluxo.

Soluções	Cadaverina	Putrescina	Tratamentos
6	10%	0,1%	T1
8	5%	0,1%	T2
9	5%	0,01%	T3
5	20%	10%	T4

As soluções 6, 8, 9 e 5 correspondem aos percentuais baseados na amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de CAD (Til, et al., 1997) e da DL 50 463 mg/kg para ratazanas de PUT, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. As soluções 6, 8, 9 e 5 referem-se aos tratamentos (T) T1, T2, T3 e T4 respectivamente. Fonte: elaborada pela autora (2022).

2.7.1. Análise estatística

No presente estudo, foram realizados três experimentos independentes, com células de diferentes lotes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados dos ensaios foram submetidos às análises estatísticas. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão (SEM). As diferenças entre os tratamentos foram tratadas pelo One-Way ANOVA, seguido pelo teste posthoc de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas usando o software SigmaStat, versão 3.5 para Windows (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando as probabilidades foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

3. Resultados

No presente estudo, foram realizados ensaios com a linhagem celular de fibroblasto de anfíbio (*Speedy*), que forneceram dados que permitem uma melhor compreensão da ação biológica dos dois mais importantes componentes do necrochorume, a cadaverina e a putrescina.

Para esta avaliação, foi primeiramente testada a citotoxicidade de 9 diferentes soluções das aminas CAD e PUT (tabela 1). Por este ensaio, foi possível observar que as soluções de maior concentração de CAD (20%) ou de PUT (10%) foram sempre citotóxicas para as células *Speedy* (Tabela 4), independente da concentração da outra amina associada. A concentração de 10% de CAD foi citotóxica, quando associada às duas maiores concentrações de PUT (10 e 0,1%). As menores concentrações de CAD (5%) não foram citotóxicas, com exceção da associação com a maior concentração de PUT (10%, solução 3 da tabela 1). Pelos ensaios de viabilidade celular é possível sugerir um efeito potencializador ou aditivo da PUT sobre a CAD. Porém, para a certificação deste efeito, deverão ser realizados outros ensaios com citometria de fluxo, como, apoptose com anexina - V, e análise de expressão gênica.

Por estes resultados iniciais de citotoxicidade, foram selecionadas as soluções 6, 8 e 9, cujas viabilidades celulares ficaram entre 80 a 100% (Tabela 4), soluções estas que foram renomeadas como tratamentos 1, 2 e 3 (T1, T2 e T3), para serem usadas nos ensaios do cometa, do MN com bloqueio de citocinese e nas análises em citometria de fluxo.

Tabela 4: Resultados do teste de viabilidade celular (Resazurina) de células *Speedy* expostas a soluções com diferentes associações de CAD e PUT.

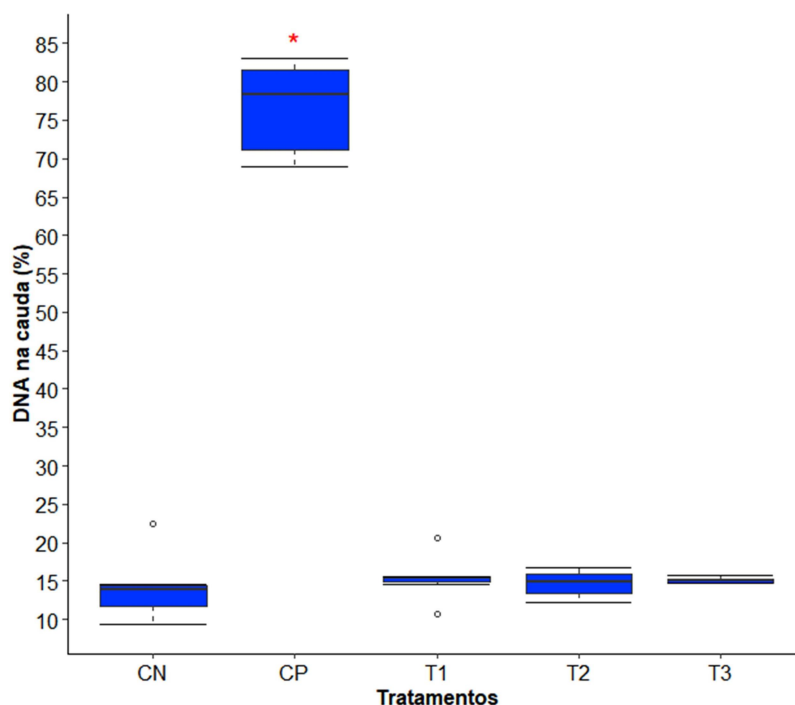
Soluções	Cadaverina	Putrescina	Viabilidade celular
			Média $\pm$ DP
1	20%	0,01%	137,21 $\pm$ 6,91%
2	20%	0,10%	153,13 $\pm$ 12,59%
3	5%	10%	157,98 $\pm$ 5,14%
4	10%	10%	161,55 $\pm$ 10,37%
5	20%	10%	152,44 $\pm$ 12,72%
6	10%	0,10%	80,16 $\pm$ 12,67%
7	10%	0,01%	75,67 $\pm$ 5,83%
8	5%	0,10%	82,51 $\pm$ 5,76%
9	5%	0,01%	84,25 $\pm$ 4,17%

Soluções 1 a 9 correspondem aos percentuais baseados na amplitude inferior e superior ao NOAEL de cadaverina (83mg/Kg) para ratos (Til, et al.,1997) e da DL 50 de putrescina (463 mg/kg) para ratazanas, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. Fonte: elaborada pela autora (2022).

As doses testadas de CAD e PUT não induziram quebra no DNA em células da linhagem de fibroblasto de anfíbio (células *Speedy*).

Os resultados obtidos pelo critério intensidade da cauda mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos testados (T1, T2 e T3) e o CN (Figura 1), resultados estes que possibilitam inferir que essas associações das aminas biogênicas CAD e PUT não apresentaram potencial genotóxico para a linhagem celular *Speedy*.

Figura 1: Resultados do ensaio do cometa em células *Speedy* expostas em três diferentes concentrações de associações de CAD e PUT, previamente selecionadas no ensaio de resazurina.



Porcentagem de DNA na cauda de células *Speedy* expostas a diferentes tratamentos com associações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). T1 = 10% CAD + 0,1% de PUT; T2 = 5% de CAD + 0,1% de PUT; T3 = 5% de CAD + 0,01% de PUT. CN: controle negativo, CP: controle positivo. * estatisticamente significativo em relação ao CN (teste de Kruskal- Wallis/Dunn's ($p < 0,05$)). Fonte: elaborada pela autora (2022).

Baixas doses de CAD associada a PUT causam efeitos genotóxicos e/ou potencial mutagênico em células *Speedy*

A citotoxicidade das associações T1, T2 e T3 foi avaliada pelo ensaio de CBMN, sendo considerado neste teste o Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese (IPBC). Na linhagem celular *Speedy*, as associações testadas (T1, T2 e T3) não apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas ao CN.

A atividade genotóxica/mutagênica das associações testadas (T1, T2 e T3) na linhagem celular *Speedy*, foi avaliada pelo teste do CBMN, onde foram considerados os resultados relacionados à presença (frequência) de MN, formação de brotos nucleares e de pontes em células binucleadas.

Pelos resultados do ensaio do MN, pode-se inferir que o T1 não se apresentou genotóxico para a linhagem celular *Speedy*, pois essa associação não induziu nenhum tipo

de dano para a célula testada. Contudo, pode ser avaliada em T2 a frequência de MN estatisticamente significativa em relação ao CN. Em T2 e T3 a presença de brotos nucleares apresentou dados estatisticamente significativos em comparação aos do CN. Já para a frequência de pontes internucleares, os tratamentos T1, T2 e T3 não diferiram estatisticamente do CN. Por esses resultados, é possível inserir que T2 e T3 foram genotóxicas, sendo que o T2 apresentou ainda potencial mutagênico (Tabela 5 e Figura 2).

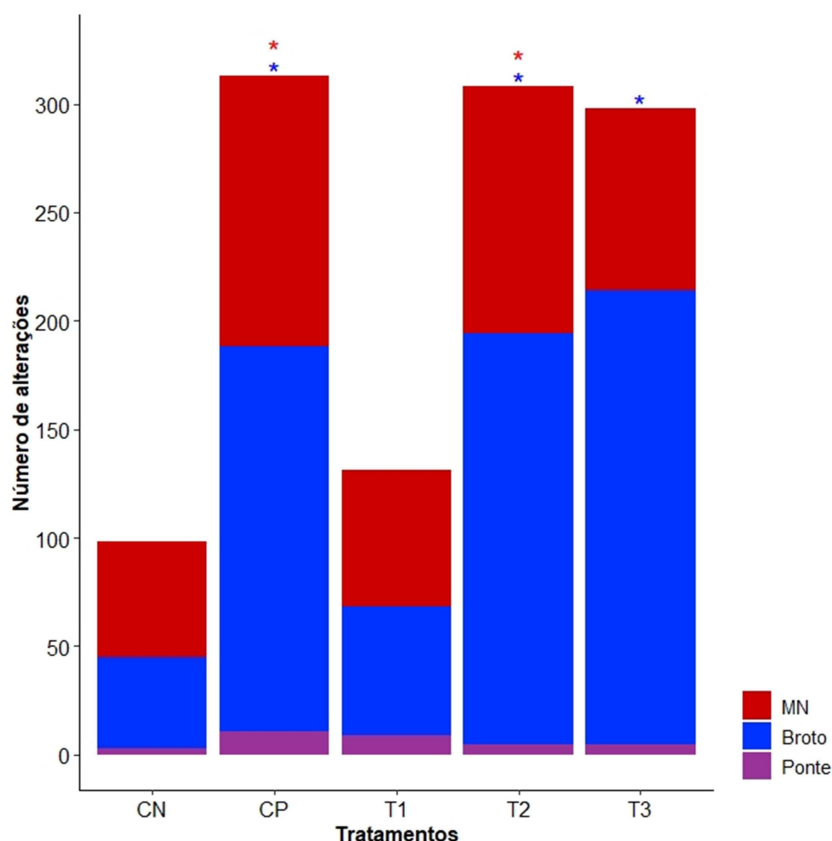
Tabela 5: Índice de proliferação do bloqueio de citocinese (CBPI) e frequência de MN, brotos nucleares e pontes internucleares observadas nas células *Speedy* expostas a diferentes associações das aminas biogênicas CAD e PUT.

	CBPI	MN	Brotos	Pontes
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
CN	1,74±0,06	0,88±0,43	0,70±0,30	0,05±0,05
CP	1,59±0,03*	2,06±0,03*	2,92±0,46*	0,18±0,10
T1	1,80±0,02	1,05±0,10	0,98±0,03	0,15±0,17
T2	1,75±0,01	1,88±0,32*	3,11±0,29*	0,08±0,08
T3	1,69±0,03	1,39±0,38	3,47±0,08*	0,08±0,08

Valores expressos em Média ± Desvio Padrão dos resultados da frequência de alterações do ensaio do MN, para formação de MN, brotos e pontes em células *Speedy* expostas a diferentes tratamentos com associações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). T1 = 10% CAD + 0,1% de PUT; T2 = 5% de CAD + 0,1% de PUT; T3 = 5% de CAD + 0,01% de PUT. CN: controle negativo, CP: controle positivo.

Diferença estatisticamente significativa em relação ao CN (Kruskal-Wallis, () p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001). Fonte: elaborada pela autora (2022).

Figura 2: Resultados das frequências de MN, brotos nucleares e pontes nucleoplasmática observadas em células *Speedy* expostas as associação T1, T2 e T3 de CAD e PUT.



Frequência de alterações do ensaio do MN, para formação de MN, brotose pontes em células *Speedy* expostas a diferentes tratamentos com associações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). T1 = 10% CAD + 0,1% de PUT; T2 = 5% de CAD + 0,1% de PUT; T3 = 5% de CAD + 0,01% de PUT. CN: controle negativo, CP: controle positivo.

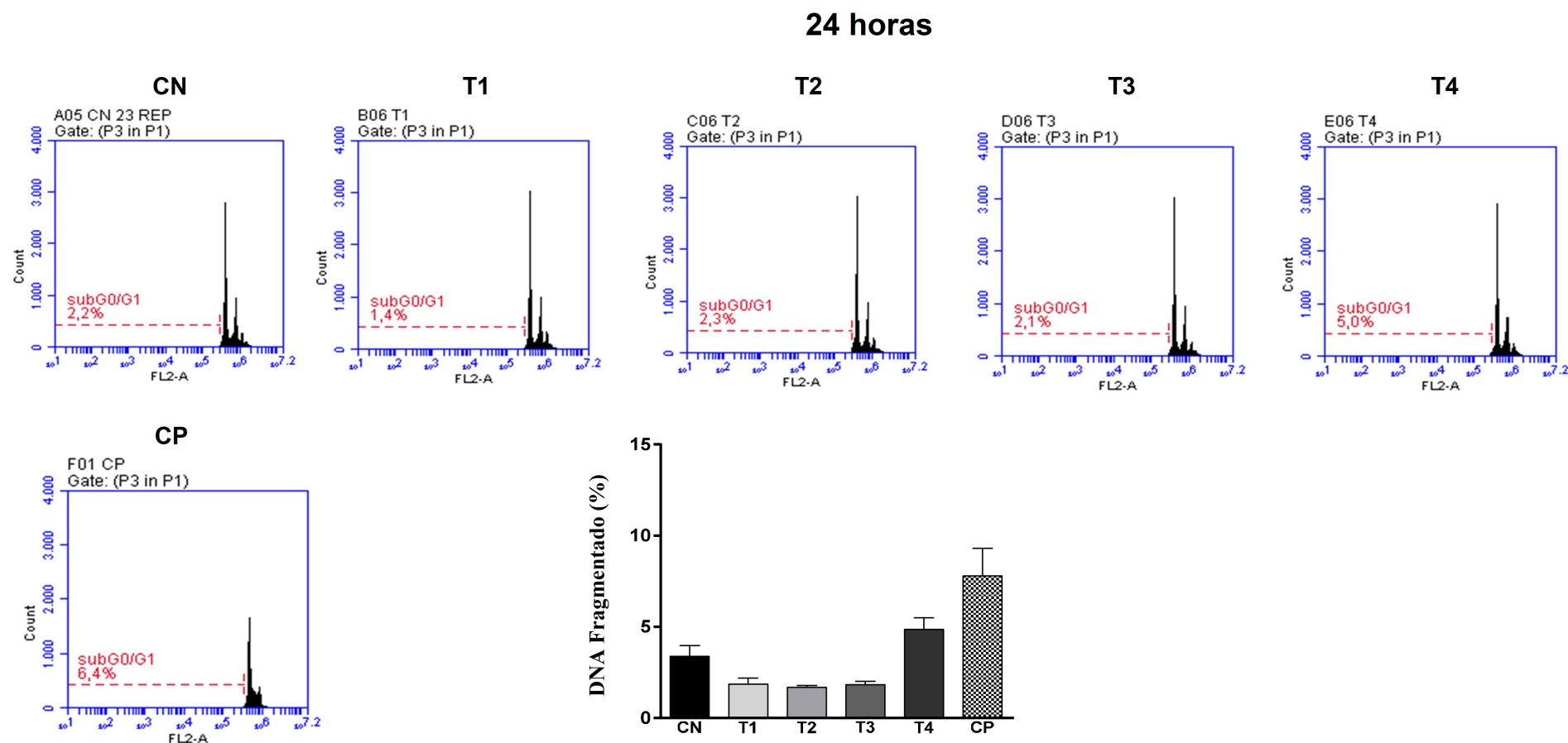
*Estatisticamente significativo em relação ao Controle Negativo (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).

Altas doses de cadaverina e putrescina causam uma parada da fase S e aumentam a porcentagem de células com DNA fragmentado nas células *Speedy*

A ação citotóxica e os efeitos sobre a progressão do ciclo celular de diferentes associações de CAD e PUT foram avaliados por bioensaios realizados com células de fibroblasto de anfíbio (*Speedy*), expostas a 24 e 48 horas de tratamento. Os resultados obtidos nos ensaios de 24 horas de tratamento não exibiram diferenças estatisticamente significativas de fragmentação celular e no ciclo celular, em relação ao CN, para nenhuma das associações testadas (Figuras 3 e 4). Os ensaios realizados com a mesma linhagem celular submetida a tratamentos de 48 horas mostraram que os tratamentos T1, T2 e T3 não induziram alterações significativamente diferentes do controle para o parâmetro fragmentação celular, mas houve um aumento significativo (9%) na

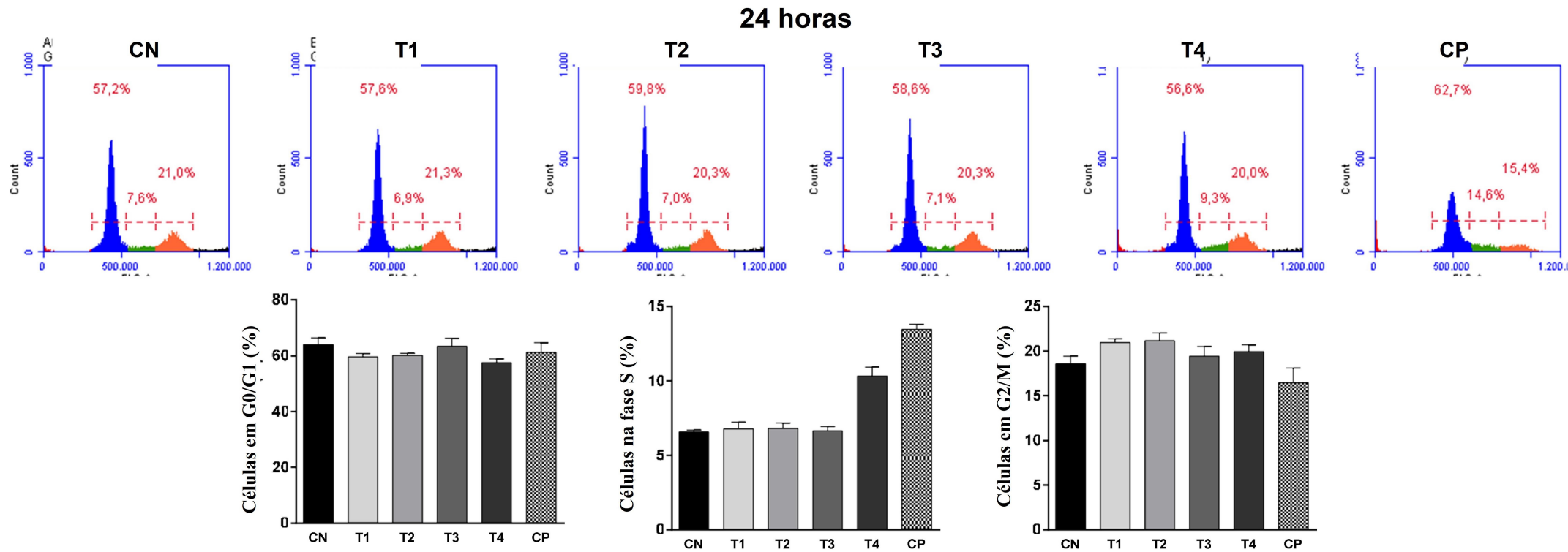
porcentagem das células com DNA fragmentado para a associação T4 (Figura 5). Também foi observado que a combinação de T4 induziu uma parada do ciclo celular na fase que controla a duplicação do DNA (fase S), após 48 horas de tratamento (Figura 6). A associação T4 alterou significativamente a progressão do ciclo celular, aumentando a porcentagem de células na fase S em cerca de 7,8% em T2, quando comparado a CN, para cerca de 12,2% em T4 (Figura 6).

Figura 3: Análise de fragmentação de DNA por coloração IP, avaliada por citometria de fluxo após tratamento com CAD e PUT associadas em células *Speedy* (população de células subG0/G1).



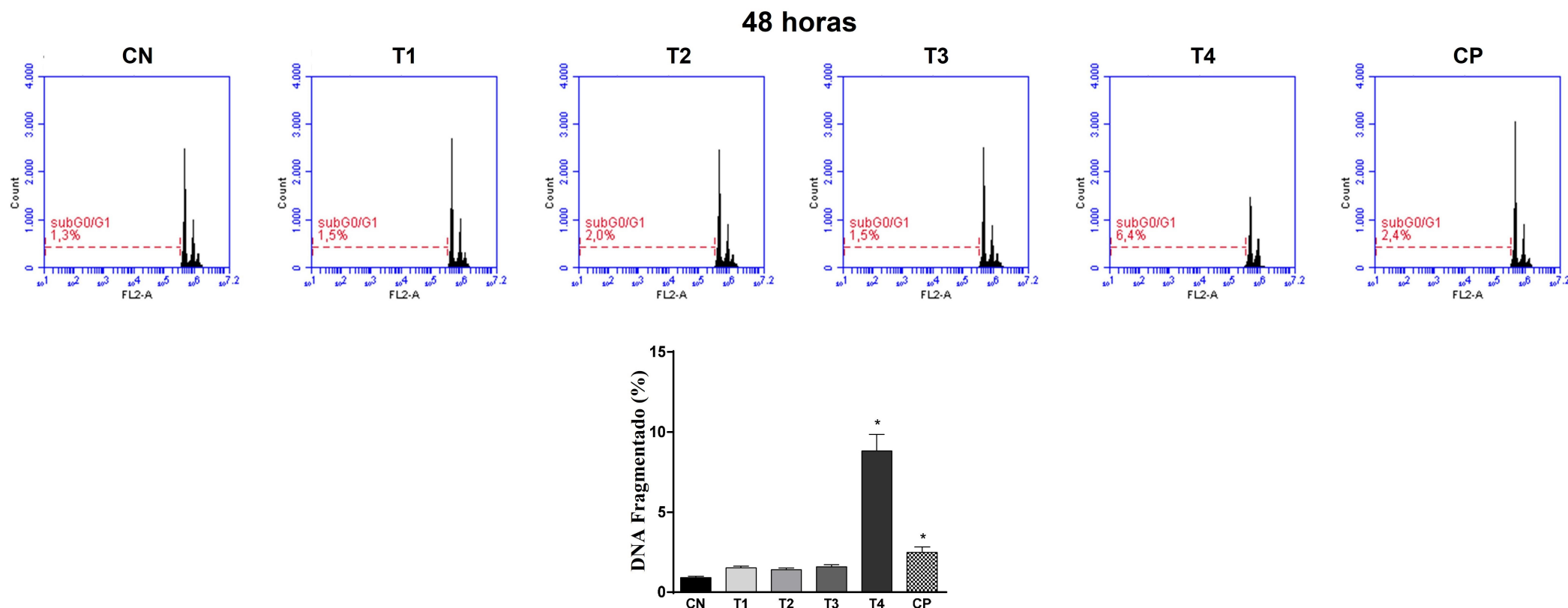
CN. Controle negativo; T1. Associação da solução a 10% de Cadaverina com 0,1% de Putrescina (v/v); T2. Associação da solução a 5% de Cadaverina com 0,1% de Putrescina (v/v); T3. Associação da solução a 5% de Cadaverina com 0,01% de Putrescina (v/v); T4. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v/v); CP. Controle positivo.

Figura 4: Análise do ciclo celular (coloração IP) por citometria de fluxo após tratamento com CAD e PUT associadas em célula *Speedy*



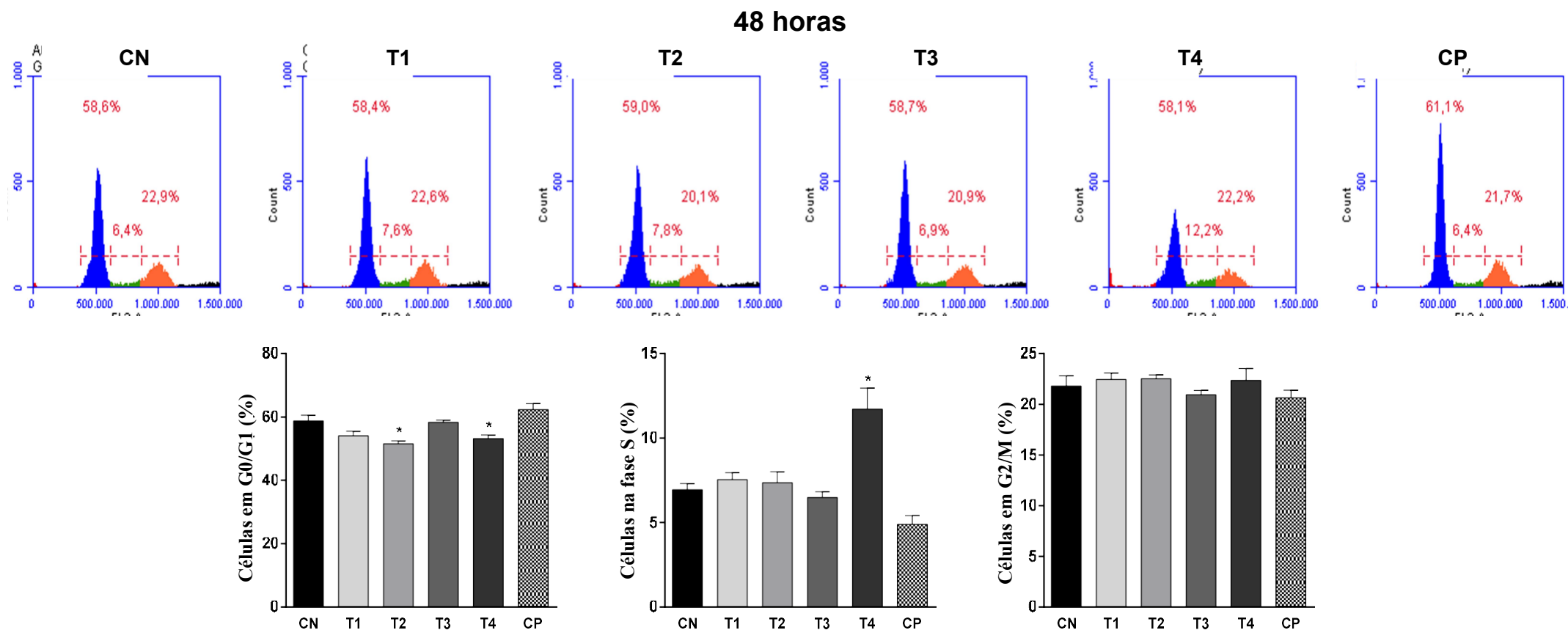
CN. Controle negativo; T1. Associação da solução a 10% de Cadaverina com 0,1% de Putrescina (v/v); T2. Associação da solução a 5% de Cadaverina com 0,1% de Putrescina (v/v); T3. Associação da solução a 5% de Cadaverina com 0,01% de Putrescina (v/v); T4. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v/v); CP. Controle positivo.

Figura 5: Análise de fragmentação de DNA por coloração IP, avaliada por citometria de fluxo após tratamento com CAD e PUT associadas em células *Speedy* (população de células subG0/G1).



CN. Controle negativo; T1. Associação da solução a 10% de Cadaverina com 0,1 de Putrescina (v/v); T2. Associação da solução a 5% de Cadaverina com 0,1% de Putrescina (v/v); T3. Associação da solução a 5% de Cadaverina com 0,01% de Putrescina (v/v); T4. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v:v). CP. Controle positivo.

Figura 6: Análise do ciclo celular (coloração IP) por citometria de fluxo após tratamento com CAD e PUT associadas em células *Speedy*.



CN. Controle negativo; T1. Associação da solução a 10% de Cadaverina com 0,1% de Putrescina (v/v); T2. Associação da solução a 5% de Cadaverina com 0,1% de Putrescina (v/v); T3. Associação da solução a 5% de Cadaverina com 0,01% de Putrescina (v/v); T4. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v/v); CP. Controle positivo.

Assim, 24 horas de exposição das associações de CAD e PUT, para a linhagem celular *Speedy*, pode não ter sido suficiente para induzir efeitos deletérios sobre este modelo de estudo.

4. DISCUSSÃO

Do ponto de vista científico, há um desconhecimento por parte da população sobre os impactos que a decomposição cadavérica, comum nos cemitérios, promove ao ambiente (ANJOS, 2013).

As substâncias orgânicas CAD e PUT, encontradas no necrochorume, apresentam patogenicidade pela sua capacidade de desestabilizar macromoléculas como os ácidos nucleicos, lípidos e proteínas, podendo assim gerar eventos de estresse oxidativo, carcinogenicidade ou mesmo a morte celular (THOMAS; THOMAS, 2001; UNAL; PALAVAN-UNSAL; TUFEKCI, 2008; HUSSAIN et al., 2011; GONÇALVES et al., 2021). Por esse seu potencial reativo com macromoléculas, tornou-se necessário avaliar essa potencialidade sob os sistemas biológicos.

Por esta razão, é de extrema importância a realização de ensaios que permitam avaliar os efeitos dessas aminas sobre o material genético dos organismos, tanto quando se apresentam isoladas, como quando estão em associação, como é o caso do necrochorume. Esse líquido, que se caracteriza como o principal contaminante de ambientes de cemitérios, contém na sua composição as aminas biogênicas CAD e PUT, as quais conferem a ele uma alta toxicidade.

Assim, nesse estudo foi avaliado o potencial genotóxico, pelo ensaio do cometa, de diferentes associações não citotóxicas de CAD e PUT (T1, T2 e T3), sobre células da linhagem celular *Speedy*. Esse teste é sensível e amplamente utilizado para detectar danos primários no DNA, como quebras de simples- fita simples, quebras de dupla-fita, sítios álcali lábeis e ligação cruzada DNA-DNA/DNA-proteína (OLIVE et al., 1990, TICE, 2000, BAJPAYEE et al., 2019 e SILVA et al., 2021).

O parâmetro mais recomendado para fins regulatórios é a porcentagem de DNA na cauda, um parâmetro indicador da quantidade de quebras no DNA (OLIVE 1999; COLLINS, 2008 e KUMARAVEL et al., 2009), o). Os dados do presente estudo apontam que as combinações de CAD e PUT testadas (T1, T2 e T3) não induziram quebras no material genético em células *Speedy*, portanto não foram genotóxicas. No presente estudo também foram realizadas avaliações do Índice de Proliferação celular com Bloqueio da Citocinese (CBPI), da presença de broto e pontes nucleares, além do

teste MN, onde os dois primeiros são indicadores de genotoxicidade e o último de mutagenicidade (FENECH, 2000; OECD, 2014b; OECD, 2017; REN et al., 2017; VERHEYEN; DEUN; MIERT, 2017). Pelo ensaio de CBPI, realizados com a linhagem *Speedy*, os tratamentos T1, T2 e T3 não apresentaram potencial proliferativo, quando comparados ao grupo CN.

Quanto aos parâmetros de genotoxicidade (presença de brotos nucleares) e genotoxicidade e potencial mutagênico (presença de MN), não foram registrados efeitos genotóxicos para a associação das maiores concentrações de CAD e PUT (T1). Já os ensaios realizados com as combinações de menores concentrações das aminas indicaram, para esses mesmos parâmetros, que T2, foi genotóxico e potencialmente mutagênico e T3 foi genotóxico para as células *Speedy*. Nenhuma das associações testadas (T1, T2 e T3) induziram a formação de pontes internucleares.

Os MNs são marcadores biológicos comumente usados para medir danos ao DNA promovidos por agentes químicos (SOMMER et al., 2020 e HEAVEN et al., 2021). Estes podem ser formados por fragmentos acêntricos ou por cromossomos inteiros que não foram incorporadas ao núcleo principal das células, durante o processo de divisão celular, em decorrência de ação aneugênica e/ou clastogênica do agente indutor (FERNANDES et al., 2007).

Os brotos nucleares são estruturas dispostas na periferia externa do núcleo celular, compostas de cromatina que foi amplificada durante a replicação do DNA e, conseqüentemente, expulsa do interior nuclear. Essa alteração é, geralmente, decorrente da ação de substâncias tóxicas sobre as fibras do fuso (efeito aneugênico), impedindo a migração dos cromossomos para os polos opostos, durante o processo de divisão celular. Esse impedimento de migração leva a uma conseqüente poliploidização cromossômica. Esse material amplificado é, então, eliminado do núcleo, sob a forma de brotos (FENECH; CROTT, 2002 e FENECH, 2011). Já as pontes nucleoplasmáticas são originadas de danos não reparados no DNA, que promovem rupturas nessa molécula (efeito clastogênico) (FENECH, 2006).

No ensaio do MN, realizado com células *Speedy* expostas a T2 e T3, foram observadas alterações genotóxicas, e ainda em T2 houve indicativo de mutagenicidade, provavelmente decorrente de efeito aneugênico, pois não foram identificadas evidências de formação de ponte por este ensaio, tampouco quebras/rupturas do DNA pelo ensaio do cometa. No entanto, deve-se levar em consideração que as lesões primárias no DNA, como as quebras de fita simples, têm uma “vida curta”, podendo ser visualizadas entre 2e

6 h de exposição (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005; BIANCHI et al., 2015) e, como os ensaios realizados neste estudo foram de 24 horas de exposição, pode não ter sido possível a visualização desses danos.

O teste do MN foi mais sensível para avaliar o potencial genotóxico e mais indicativo de potencial mutagênico que o ensaio do cometa, resultados esses que corroboram outros estudos de avaliação de potencial tóxico realizados com cultura celular (ROBERTO et al., 2016; ZUNEC et al., 2016). Pfau et al. (1999) também observaram em células MCL5 tratadas com a amina aromática heterocíclica, que o teste do MN foi mais sensível que o do ensaio do cometa.

Dessa maneira, a genotoxicidade de compostos químicos pode ser avaliada em diferentes linhagens celulares, por meio de associações entre o teste do cometa e do MN (VAN GOETHEM et al., 1997; MAZZEO et al., 2013; BIANCHI et al., 2015; GAJSKI et al., 2016). Por meio desses ensaios conjuntos, é possível obter informações mais consistentes sobre o mecanismo de ação de uma substância testada (MALUF, 2004).

De acordo com Tewari et al. (2005) e Sommaggio et al. (2018), essas avaliações são indispensáveis, uma vez que elas podem fornecer um prognóstico de possíveis efeitos danosos sobre os seres vivos. A toxicidade de uma substância pode ser estimada por meio da aplicação de metodologias de complexidade variável, usadas sobre determinadas espécies, cujas respostas inferem a ação biológica da substância investigada (LUVIZUTTO, 2008).

No ensaio de citometria de fluxo foram avaliados o perfil do ciclo celular e a fragmentação de DNA, após a coloração com IP. A fluorescência gerada pelo IP no citômetro é diretamente proporcional à quantidade de DNA da célula, possibilitando, assim, determinar a fase do ciclo em que a célula se encontra. As células com menor intensidade de fluorescência são as que apresentam fragmentação do DNA, característica do fenômeno de morte celular (apoptose) (NUNEZ, 2001). Os ensaios realizados com 24 horas de exposição das células às combinações de CAD e PUT não resultaram em danos ao DNA. No entanto, no tempo de 48 horas, a combinação adicional (T4), referente à associação de concentrações mais altas de CAD e PUT, causaram danos no DNA, que levaram às células a apoptose. O tempo de 48 horas de exposição, também inibiu a progressão do ciclo celular, pois levou a parada desse ciclo na fase S, afetando a replicação do DNA. Danos no DNA, causados por fatores externos, podem ativar de pontos de checagem da fase S, que retardam ou interrompem a progressão do ciclo celular, para evitar a divisão celular incorreta (TAMBORLIM et al., 2020). Ainda para o

tempo de 48 horas, para as combinações não citotóxicas (T1, T2 e T3) e genotóxicas (T2 e T3) não levaram a fragmentação do DNA e/ou danos no ciclo celular.

Chen et al. (2015) avaliaram o efeito da putrescina sobre a proliferação celular e apoptose em linhagem celular 2D de fibroblastos de pele humana (HSF), exposta a esta substância por 24 horas. Os autores verificaram que concentrações baixas da amina (0,5, 1,0, 5,0 e 10 µg/mL) induziram proliferação celular e diminuíram a taxa de apoptose, enquanto que altas concentrações (100, 500 e 1000 µg/mL) inibiram a proliferação celular e induziram a apoptose dos fibroblastos. Os autores observaram que a indução de apoptose na linhagem celular HSF teve uma relação concentração dependente.

Del Rio et al. (2019) avaliaram a citotoxicidade das diaminas cadaverina (0 a 150 mM) e putrescina (0 a 160 mM) em células intestinais HT29, para determinar os limites legais dessas diaminas em alimentos. Os resultados deste estudo mostraram que as concentrações mais comumente encontradas nos alimentos foram citotóxicas para as células intestinais estudadas, uma vez que induziram necrose nessas células. Os autores observaram ainda que a citotoxicidade da CAD é duas vezes maior que a da PUT.

Os resultados obtidos no presente estudo com a linhagem celular de fibroblasto de anfíbio (*Speedy*) corroboram os de Chen, et al. (2015), quanto a indução de morte celular pelas concentrações mais altas testadas de CAD e PUT. Porém, os ensaios realizados com as células *Speedy*, expostas a associações de CAD e PUT, mostraram que as alterações do ciclo celular e a fragmentação do DNA ocorreram somente no ensaio com 48 horas de tratamento. A associação T4, aplicada nos ensaios de ciclo celular e fragmentação do DNA, se mostraram extremamente danosas para as células *Speedy*.

No ensaio de exposição por 24 horas foi observado efeito genotóxico para as associações de menor concentração de CAD (T2 e T3). Essa resposta de genotoxicidade observada necessita ser mais investigada, para certificar se a concentração mais alta de CAD teve ou não uma ação tóxica maior, levando a inviabilidade celular. Estudos de toxicidade em andamento, realizados pelo nosso grupo com associações dessas aminas, sugerem que a PUT age como potencializadora da ação tóxica da CAD (dados não publicados).

CAD e PUT em concentrações micromolares estão envolvidas em atividades fisiológicas importantes para o meio biológico (microrganismos, plantas e animais). Essas aminas apresentam sítios nucleofílicos altamente reativos com macromoléculas orgânicas, como os ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (BACH et al., 2012; del RIO et al., 2017; LADERO et al., 2010). Assim, embora essas moléculas participem de

importantes reações fisiológicas em baixas concentrações, elas também podem desequilibrar todo o sistema biológico, quando em altas concentrações.

Esse estudo é pioneiro na utilização da linhagem celular *Speedy* para avaliar toxicidade de compostos químicos. De acordo com os resultados, esse modelo de estudo foi eficaz para estimar a ação tóxica de diferentes concentrações e associações das aminas biogênicas CAD e PUT.

Foi observado no presente estudo que a associação de CAD e PUT causam danos no material genético, mesmo em baixas concentrações. Além disso, o estudo mostrou que produtos da decomposição cadavérica, presentes em ambientes de cemitérios, podem se caracterizar como poluentes ambientais de alta toxicidade. Com isso, reforça-se a necessidade de realização de mais investigações científicas em ambientes cemiteriais.

5. CONCLUSÕES

Com base em todos os resultados obtidos, pode-se inferir que esse estudo contribui para uma melhor compreensão dos efeitos citogenotóxicos de compostos cujos modos de ação ainda são pouco conhecidos, como os das aminas biogênicas CAD e PUT;

O presente estudo é pioneiro, tanto pela investigação de toxicidade de contaminantes de cemitérios, como pelo bioindicador utilizado nesta análise (linhagem celular *Speedy*, obtida de fibroblasto de *Xenopus tropicalis*);

As células *Speedy* têm por característica ser uma linhagem de rápida proliferação, que a torna muito interessante para a obtenção de rápidos diagnósticos ambientais;

A linhagem *Speedy* se mostrou eficiente para investigar os efeitos citogenotóxicos de associações das aminas biogênicas CAD e PUT, um complexo contaminante de áreas cemiteriais;

Foi observado que as aminas CAD e PUT apresentaram alta citotoxicidade para as associações de maiores concentrações testadas para CAD (20 e 10%) e PUT (10 e 0,1%). As associações de 20% de CAD e 10% de PUT foram citotóxicas, independente da concentração da outra bioamina associada. A menor concentração de CAD (5%) só apresentou citotoxicidade, quando associada à maior concentração de PUT (10%);

Pelos resultados obtidos nos ensaios de genotoxicidade, foi possível observar que as baixas concentrações das aminas induzem um efeito aneugênico sobre as células *Speedy*, quando em exposição por 24 h. Já nas exposições celulares por 48 horas, as concentrações mais altas das aminas (CAD 20% e PUT 10%) induziram fragmentação do DNA e parada do ciclo celular na fase S e morte celular. Assim, pode-se inferir que

toxicidade das amins CAD e PUT, para a linhagem *Speedy*, foi tempo dependente de exposição.

Os efeitos observados neste estudo indicam que, mesmo as associações com baixas concentrações de CAD e PUT, podem interagir com o material genético dos organismos eventualmente expostos, que, em um cenário mais realista, pode comprometer o sistema biológico de diferentes espécies.

Com este estudo foi possível observar que essas amins apresentam um alto potencial poluidor, o que traz a reflexão da necessidade de um monitoramento constante dos ambientes de cemitérios, pois nesses locais essas amins são produzidas continuamente, devido ao processo de decomposição cadavérica inerente desses locais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M.; MACÊDO, J. A. B. Parâmetros físico-químicos de caracterização da contaminação do lençol freático por necrochorume. **Seminário de Gestão Ambiental**, v. 1, 2005.

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.

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

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

ANJOS, R. M. Cemitérios: uma ameaça à saúde humana. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. p. 02-07, 2013.

BACH, B. et al. 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.

BAJPAYEE, M.; KUMAR, A.; DHAWAN, A. The comet assay: assessment of *in vitro* and *in vivo* DNA damage. In: **Genotoxicity Assessment**. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 325-345.

BEKEBREDE, A. F. et al. The molecular and physiological effects of protein-derived polyamines in the intestine. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 197, 2020.

BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 231, n. 1, p. 11-30, 1990.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 49, n. 2, p. 3-8, 2000.

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 *in vitro* tests with HepG2 cells and *Salmonella*

- typhimurium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 174-183, 2015.
- BOWES, J. B. et al. Xenbase: a *Xenopus* biology and genomics resource. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2007.
- BRENDLER-SCHWAAB, S. et al. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245-254, 2005.
- CHEQUER, F. M. D. et al. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.676, n. 1-2, p. 83-86, 2009.
- COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p.143-151, 2008.
- 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.
- DEL RIO, B. et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2019.
- DEL RIO, B. et al. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. **Food Chemistry**, v. 218, p. 249-255, 2017.
- 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.
- FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003.
- FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1-2, p. 131-136, 2002.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 600, n. 1-2, p. 58-66, 2006.
- 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.
- 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.
- HUSSAIN, S. S. et al. Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress

- tolerance in plants. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 300-311, 2011.
- GAJSKI, G. et al. Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in human and zebrafish cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 15, p.14739-14750, 2016.
- GONÇALVES, L. R. et al. Another casualty of the SARS-CoV-2 pandemic—the environmental impact. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-16, 2021.
- HEAVEN, C. J. et al. The suitability of micronuclei as markers of relative biological effect. **Mutagenesis**, v. 37, n. 1, p. 3-12, 2022.
- HELLSTEN, U. et al. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. **Science**, v. 328, n. 5978, p. 633-636, 2010.
- HONSCHA, L. C. et al. Bioassays for the evaluation of reclaimed open cast coal mining areas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 21, p. 26664-26676, 2021.
- 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.
- KUMARAVEL, T. S. et al. Comet assay measurements: a perspective. **Cell biology and Toxicology**, 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.
- 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.
- LUVIZUTTO, J. F. L. Estudo da toxicidade oral de 90 dias (doses repetidas) do lodo de estação de tratamento de esgoto (LETE) em ratos wistar. 2008.
- MALUF, S. W. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Clinica Chimica Acta**, v. 347, n. 1-2, p. 15-24, 2004.
- MATOS, B.r; PACHECO, A. Avaliação da ocorrência e do transporte de microrganismos no aquífero freático do cemitério de Vila Nova Cachoeirinha, município de São Paulo. **Águas Subterrâneas**, 2002.
- MAZZEO, D. E. C. et al. Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1030-1036, 2013.
- MAZZEO, D. E. C.i; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic bioassays. **Chemosphere**, v. 163, p. 508-515, 2016.
- 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, A. et al. Metals in the soil of urban cemeteries in Carazinho (South Brazil) in view of the increase in deaths from COVID-19: Projects for cemeteries to mitigate environmental impacts. **Environment, Development and Sustainability**, p. 1-24, 2021.

NUNEZ, R.I. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 3, n. 3, p. 67-70, 2001.

O'BRIEN, J. 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.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 9, p. 779-783, 1990.

OLIVE, P. L. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. **International Journal of Radiation Biology**, v. 75, n. 4, p. 395-405, 1999.

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.

Organization for Economic Cooperation and Development. Test 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Paris, 2012.

Organization for Economic Cooperation and Development. Test 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Paris, 2014b.

Organization for Economic Cooperation and Development. Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014- 2015, Paris, 2017.

PACHECO, A.; Meio ambiente e cemitérios. São Paulo: Editora Senac, 2012. PFAU, W. et al. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 4, p. 545-551, 1999.

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**, v. 83, n. 13-14, p. 495-508, 2020.

REN, N. et al. The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2017.

ROBERTO, M. M. et al. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by *in vitro* study with HTC cells. **Toxicology in Vitro**, v. 33, p. 9-15, 2016.

SILVA, L. M. Os cemitérios na problemática ambiental. **São Paulo: SINCESP & ACEMBRA**, 1995.

SILVA, B. O. et al. Genotoxicity induced by nerol, an essential oil present in citric plants using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and HepG2/C3A cells as a model. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 84, n. 12, p. 518- 528, 2021.

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.

SOMMAGGIO, L. R. D. et al. Evaluation of the potential agricultural use of biostimulated sewage sludge using mammalian cell culture assays. **Chemosphere**, v.199, p. 10-15, 2018.

SOMMER, S.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. Micronucleus assay: the state of art, and future directions. **International journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1534, 2020.

SURRALLÉS, J. et al. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 341, n. 3, p. 169-184, 1995.

TAMBORLIN, L. et al. Characterization of pomegranate peel extracts obtained using different solvents and their effects on cell cycle and apoptosis in leukemia cells. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 10, p. 5483-5496, 2020.

TEWARI, A. et al. Municipal sludge leachate-induced genotoxicity in mice—A subacute study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 587, n. 1-2, p. 9-15, 2005.

THÁ, E. L. et al. Safety aspects of kraft lignin fractions: Discussions on the in chemico antioxidant activity and the induction of oxidative stress on a cell-based *in vitro* model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 977-986, 2021.

TICE, R. R. 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. 206-221, 2000.

TIL, H. P. et al. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 3-4, p. 337-348, 1997.

TSUBOY, M. S. et al. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 8, p. 1650-1655, 2007.

UNAL, M.; PALAVAN-UNSAL, N.; TUFEKCI, M. Effects of polyamines and polyamine biosynthetic inhibitors on mitotic activity of *Allium cepa* root tips. **Acta Biologica Hungarica**, v. 59, n. 1, p. 93-102, 2008.

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. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1-2, p. 31-43, 1997.

VERHEYEN, G. R.; DEUN, K. V.; MIERT, S. V. Testing the mutagenicity potential of chemicals. **Journal of Genetics and Genome Research**, v. 4, 2017.

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

ZHU, S. 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. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 37, n. 1, p. 69-82, 2001.

ŽUNEC, S. et al. Assessment of oxidative stress responses and the cytotoxic and genotoxic potential of the herbicide tembotrione in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 94, p. 64-74, 2016.

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.

ARTIGO 3

Citogenotoxicidade de amins biogênicas presentes no necrochorume sobre a linhagem celular HepG2/C3A

Letícia Rocha Gonçalves¹, Maria Gabriela Franco Lima¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹

1.Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Av. 24-A, 1515, Rio Claro, SP CEP: 13506-900, Brasil.

RESUMO

Após a inumação, os corpos passam por processos de decomposição biológica e química, a qual gera um líquido tóxico, denominado de necrochorume. O necrochorume percola no solo, podendo também atingir compartimentos hídricos superficiais e subterrâneos. Esse líquido tem em sua composição as aminas biogênicas cadaverina (CAD) e putrescina (PUT), que apresentam alto potencial tóxico, devido à sua afinidade de ligação com ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. Essas aminas, em nanoconcentrações, desempenham importantes funções na fisiologia celular, mas, quando em altas concentrações induzem alterações que podem gerar danos e até morte celular. Como o modo de ação dessas aminas ainda é pouco conhecido, estudos que abordem esse tema se tornam de extrema importância. Bioensaios com cultura celular vêm sendo cada vez mais aplicados na toxicologia por serem eficientes para avaliar efeitos de compostos com potencial tóxico, além de serem ensaios que não esbarram em questões éticas, como as experimentações com animais. Neste estudo, foi avaliada a citogenotoxicidade e o potencial mutagênico de associações das aminas biogênicas CAD e PUT para células da linhagem de fígado humano HepG2/C3A. Essa avaliação conjunta se deve à liberação concomitante dessas aminas durante a putrefação cadavérica, portanto por elas estarem presentes no necrochorume. Foram realizados testes de citotoxicidade pelo ensaio de Resazurina e de genotoxicidade e potencial mutagênico pelos ensaios do cometa e do MN com bloqueio de citocinese. O ensaio do MN se mostrou mais efetivo para avaliar a genotoxicidade das aminas do que o ensaio do cometa. Pelo teste do MN foi possível observar que todas as associações testadas foram genotóxicas, com indicativo de mutagenicidade, e que os efeitos de CAD e PUT foram, predominantemente, por aneugenicidade. Contudo, pela presença de pontes nucleoplasmáticas induzidas pela associação de 20% CAD e 10% PUT, pode-se também inferir um efeito clastogênico para essas aminas. Os dados do presente estudo alertam para possíveis comprometimentos à saúde ambiental e humana promovidos pelos contaminantes orgânicos do necrochorume, com destaque para as aminas biogênicas produzidas durante o processo de decomposição cadavérica.

Palavras chave: Cadaverina; contaminantes de cemitério; ensaio da Resazurina; ensaio do cometa; putrescina; teste do Micronúcleo.

1. INTRODUÇÃO

Os cemitérios representam uma das fontes antrópicas de contaminação ambiental, que impactam negativamente a qualidade do solo, das águas superficiais e subterrâneas. Com o aumento da população humana aumenta também a demanda por maiores áreas destinada às necrópolis (KEMERICH et al., 2012; LAUWERS, 2015; NECKEL et al., 2017).

Após o sepultamento de um cadáver, o corpo passa por processos dedecomposição, que geram, para um homem de 70 Kg, cerca de 30 a 40 L de um líquido tóxico, denominado de necrochorume ou produto da coliquação (BACIGALUPO, 2012). A toxicidade do necrochorume se deve à sua composição rica em compostos orgânicos biorreativos, que, quando em concentrações acima das fisiológicas, podem causar sérios danos à biota e consequentemente ao meio ambiente. Dentre os contaminantes do necrochorume que apresentam alta toxicidade, estão as aminas biogênicas cadaverina (CAD - 1,5-pentanodiamina) e putrescina (PUT - 1,4- butanodiamina) (BACHRACH, 2004; COSTA SILVA; FILHO, 2008; OLIVEIRA et al., 2013; GWENZI e CHAUKURA, 2018 e NECKEL, 2020). Nos sepultamentos humanos, além dos derivados da decomposição do cadáver, há também outros contaminantes que se associam aos do necrochorume, como os compostos derivados da decomposição das urnas mortuárias e das vestimentas do cadáver; os resíduos de medicamentos usados em vida pelo indivíduo sepultado; substâncias usadas para a preservação e maquiagem do cadáver, para o funeral; derivados de próteses médicas e dentárias, dentre outras. Essa contaminação adicional pode aumentar a toxicidade do necrochorume, por acrescentar a ele alguns metais pesados ou outras substâncias tóxicastambém detrimenais à vida e ao meio ambiente (GONÇALVES et al., 2021).

Em ambientes cemitérios mal estruturados, o necrochorume pode aindaextrapolarm os limites da necrópolis e atingir outros compartimentos ambientais. O necrochorume pode escorrer de sepulturas verticais e contaminar águas superficiais e o solo adjacente à sepultura, ou ainda percolar no solo onde o corpo foi exumado, contaminando, primeiramente, o solo e, por transferência, recursos hídricos subterrâneos e até superficiais. Essa possibilidade de veiculação entre os compartimentos faz deste líquido um preocupante contaminante ambiental.

As aminas biogênicas são componentes essenciais das células vivas, pois participam de eventos de proliferação, diferenciação e morte celular (HEATHER et al., 2003). A CAD e a PUT são aminas produzidas por descarboxilação dos aminoácidos

lisina e ornitina, respectivamente, em processos de biossínteses e enzimáticos (DURIE et al., 1977; KHUHAWAR; QURESHI, 2001). Ambas as aminas apresentam sítios nucleofílicos que interagem com ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, atuando na estabilidade das macromoléculas (HUSSAIN et al., 2011). Também podem atuar como neurotransmissores, ter influência sobre a estabilidade da membrana e sobre a senescência celular (WÓJCIK et al., 2020). Em baixas concentrações, esses compostos são essenciais para as funções fisiológicas, porém, em concentrações elevadas podem ser tóxicas e desencadear vários distúrbios de saúde, que vão desde intolerância a elas até a intoxicação.

A toxicidade das aminas biogênicas em geral está associada à ativação de processos catabólicos, que podem gerar um aumento excessivo de peróxido de hidrogênio, levando a um ambiente de estresse oxidativo nas células (THOMAS; THOMAS, 2001; LADERO et al., 2010; PEGG, 2013; SANZ-VICENTE et al., 2020).

Adicionalmente, essas aminas são responsáveis pela formação de nitrosamidas (carcinógenos reconhecidos). As poliaminas, como a PUT, afetam processos da carcinogênese: seu aumento indica aumento da proliferação celular, diminuição da apoptose e aumento da expressão de genes associados a invasão tumoral e metástase, enquanto que sua supressão está associada à diminuição do crescimento celular, aumento da apoptose e diminuição da expressão de genes envolvidos com a invasão tumoral e a metástase (ANDERSSON e HEBY, 1972; GERNER e MEYSKENS 2004; BULUSHI et al., 2009; del RIO et al., 2019). A CAD e a PUT têm sido citadas também como potencializadoras da toxicidade da histamina (BULUSHI et al., 2009).

Pelo desconhecimento da população, quanto ao potencial poluidor desses ambientes; e pela cultura de visitação de túmulos, que aumenta as possibilidades de exposição humana a contaminantes (KEMERICH et al., 2012 e NECKEL et al., 2021), há uma eminente necessidade de melhor conhecimento dos efeitos tóxicos das aminas biogênicas CAD e PUT (SANZ-VICENTE et al., 2020). Visto que, a contaminação da água e do solo tem como consequência um efeito prejudicial adicional no ecossistema do entorno e principalmente à saúde das pessoas (COLAO et al., 2016).

Os bioensaios são importantes indicadores de contaminação ambiental, portanto muito usados em monitoramento de ambientes impactados (PLAZA et al., 2005 e SOMMAGGIO et al., 2018). Os ensaios realizados com linhagens celulares mantidas em cultura (testes *in vitro*) têm contribuído para o desenvolvimento da toxicologia, sendo uma importante ferramenta para avaliação de efeitos de diferentes agentes sob sistemas

de vertebrados. Esses ensaios possibilitam estimar ações genotóxicas (sobre o DNA) de um agente, tanto quanto induzidos por ação direta como indireta (TAKAHASHI, 2003; LI et al., 2010). Além disso, esses bioensaios são também usados em avaliação de risco à saúde humana, como preditores para controle de risco em áreas urbanas contaminadas (PENTEADO et al., 2021).

A linhagem celular HepG2/C3A (hepatocarcinoma humano) possui enzimas metabolizadoras importantes para a ativação e desintoxicação de compostos tóxicos. Por esta característica, essa linhagem celular é considerada um bioindicador eficaz para avaliar o potencial citogenotóxico e mutagênico de contaminantes (UHL et al., 2000; CHIANG et al., 2011; LEME et al., 2011; LIU et al., 2012; SOMMAGGIO et al., 2018). Essa linhagem, por ser uma importante ferramenta para avaliar os efeitos tóxicos de diversas classes de contaminantes ambientais, e, portanto indicada para estimar a ação de muitos xenobióticos (KNASMULLER et al., 1998; GRONEBERG et al., 2002; ANTOINE et al., 2009), como os deste estudo.

Neste estudo foi avaliado, por meio de ensaios realizados com a linhagem celular HepG2/C3A (ensaio do cometa e teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese), a citogenotoxicidade e mutagenicidade de dois componentes tóxicos do necrochorume, as aminas biogênicas CAD e PUT. Estudos preliminares realizados com essas bioaminas (isoladas), pelo mesmo grupo deste estudo, apontam toxicidade para ambas. Como essas bioaminas são encontradas juntas no necrochorume, o presente estudo avaliou a ação tóxica de associações de diferentes concentrações dessas aminas, sobre as células HepG2/C3A.

2. Material e Métodos

2.1. Substância Testada

Foram avaliadas associações de diferentes concentrações das aminas biogênicas cadaverina (CAD) (1,5-Diaminopentano, 1,5-Pentanodiamina, Pentametilenediamina); fórmula molecular $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$; peso molecular 102,18; CAS: 462-94-2, Fluka – pureza 97%; e da putrescina (PUT) (1,4-butanodiamina); fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2$; peso molecular 88,15 g/mol; CAS No. 110-60-1; pureza de 99,0 %. Ambas fornecidas pela Sigma-Aldrich. Para preparação das soluções, foram utilizadas as concentrações de 40, 30 e 20% de 83mg/L de CAD, concentrações baseadas na amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos (Til et al., 1997) e 70, 60, 30 e 10% da DL50 de PUT para ratazanas (463 mg/kg), descritas na ficha do produto. As porcentagens testadas estão descritas na Tabela 1.

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

Soluções	Cadaverina	Putrescina
1	40%	60%
2	40%	30%
3	40%	10%
4	30%	70%
5	30%	30%
6	30%	10%
7	20%	70%
8	20%	30%
9	20%	10%

As concentrações foram estabelecidas através da amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de CAD (Til, et al.,1997) e da DL 50 463 mg/kg para ratas de PUT, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. Fonte: elaborada pela autora (2022).

2.2. Material biológico

Os ensaios de genotoxicidade e/ou mutagenicidade, realizados no Laboratório de Mutagênese Ambiental (Instituto de Biociências da UNESP em Rio Claro), foram desenvolvidos com as células de hepatoma humano, mantidas em cultura (linhagem HepG2/C3A).

2.3. Cultura de células derivadas de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A)

A linhagem celular HepG2/C3A, adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro e inseridas no banco de células do Laboratório de Mutagênese Ambiental do Departamento de Biologia da UNESP-IB / Rio Claro / SP, foi utilizada como modelo no presente estudo. As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² e cultivadas em 5 mL de meio essencial Eagle modificado por Dulbecco - DMEM (suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de solução de antibiótico- antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL/ estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) em estufa de CO₂ a 37 °C, até atingir 80% de confluência. Sob estas condições, o ciclo celular foi de 24 horas. Os procedimentos e as soluções empregadas para manutenção das células estão apresentados no Apêndice B.

2.4. Teste de viabilidade celular

O ensaio de Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin 3-ona 10-óxido) foi desenvolvido de acordo com o protocolo de O'Brien et al., (2000), com algumas modificações. Neste ensaio, as células foram expostas a nove diferentes soluções de CAD e PUT, preparadas com nove concentrações das diferentes associações de CAD e PUT (tabela 1). $2,34 \times 10^6$ células da linhagem HepG2/C3A foram colocadas em microplacas de 96 poços, onde foram mantidas por 24 h para estabilização, conforme descrito no item 2.3. As células foram incubadas com resazurina ($44 \mu\text{M}$) em estufa de CO_2 (37°C), por 4 h. O controle negativo (CN) foi realizado com meio de cultura celular e o controle positivo (CP) com meio de cultura celular e Triton X-100 a 1%. As placas foram quantificadas em um leitor de placa, modelo Infinite M200 Pro™ plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany), a 590 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. As concentrações testadas (Tabela 1) foram consideradas citotóxicas quando apresentaram valores inferiores a 80%, em relação aos observados para o CN.

2.5. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Tice et al. (2000), com algumas modificações. A descrição do preparo das soluções utilizadas neste ensaio encontra-se apresentada no Apêndice C. 1×10^6 células da linhagem HepG2/C3A foram cultivadas em frascos de 25 cm^2 , sob as condições descritas no item 2.3, por 24 h. As células foram expostas a 3 diferentes associações (soluções) de CAD e PUT, selecionadas a partir do ensaio de viabilidade celular (Tabela 2), por um período de 24 horas. O CN foi realizado com meios de cultura celular e o CP foi realizado com solução de sulfonato de metilmetano (MMS) 10 mM, preparado pela diluição de $3,33 \mu\text{L}$ de MMS (marca: Sigma Aldrich) em 4 mL de PBS. Desta solução, foram pipetados $50 \mu\text{L}$, os quais foram acrescentados com 5 mL de meio específico para cada linhagem celular ($1 \times 10^{-2} \text{ M}$; $50 \mu\text{L}/5\text{mL}$).

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

Soluções	Cadaverina	Putrescina	Tratamentos
6	30%	10%	T1
8	20%	30%	T2
9	20%	10%	T3

As soluções 6, 8 e 9 correspondem aos percentuais baseados na amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de CAD (Til, et al.,1997) e da DL 50 463 mg/kg para ratazanas de PUT, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. As soluções 6, 8 e 9 referem-se aos tratamentos (T) T1, T2 e T3, respectivamente. Fonte: elaborada pela autora (2022).

Após o cultivo, as células foram liberadas da parede dos frascos, utilizando 500 µL de Tripsina-EDTA (0,025%). Posteriormente, o processo foi inativado pela adição de 5 mL de meio completo. As células foram transferidas para tubos de centrifugação e centrifugadas em 1.500 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e 0,5 mL desta solução foi ressuspensionado. As células do controle e com viabilidade $\geq 80\%$ (teste de exclusão com Azul de Trypan) foram colhidas e utilizadas no ensaio do cometa (pH > 13) (TICE et al., 2000 e THÁ et al.,2021).

Para o ensaio do cometa, lâminas cobertas com agarose normal receberam 20 µL de suspensão celular associada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão, a 37 °C. As lâminas com o material foram recobertas com lamínulas, para espalhamento das células, e colocadas em uma geladeira, a 4°C, por 15 minutos. Após a solidificação do gel, as lamínulas foram removidas e as lâminas transferidas para uma cubeta com solução fria de lise (1 mL Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução stock de lise – NaC 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM e ~ 8,0 g de NaOH, pH 10,0), mantida a 4°C, no escuro, por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese e recobertas com tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, pH 13,0), onde permaneceram por 20 minutos, para estabilização. Na sequência, iniciou-se a eletroforese a 39 V e 300 mA (~ 0.8 V/cm), que transcorreu por 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com três banhos, de 5 minutos cada, em tampão de neutralização (0,4 M de tris-HCL, pH 7,2) e fixadas, durante 10 minutos, em etanol absoluto. No momento da realização das análises, as lâminas foram coradas com GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1 M, e 45 mL de água destilada) e analisadas em microscópio de fluorescência Leica, filtro B – 34 (excitação:

i= 420-490 nM, barreira: I=520 nM). O ensaio foi realizado em triplicata e a leitura foi feita randomicamente, em objetivas de 40x. Foram contabilizados 200 nucleóides por frasco (3 réplicas, duas lâminas com 100 nucleóides cada), totalizando 600 nucleóides contabilizados por tratamento, utilizando o *software Comet Assay IV*. As análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prism 8.0*, considerando os valores médios da porcentagem de DNA presente na cauda do cometa. Inicialmente, foi realizada a normalidade e homogeneidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Foi usada como teste paramétrico, a análise de variância ANOVA – um critério, seguido do post hoc Dunnet. Já o teste de Kruskal-Wallis foi empregado como teste não paramétrico, seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância utilizado nos testes de hipóteses foi $p < 0,05$.

2.6. Teste de micronúcleo de bloqueio de citocinese (CBMN)

O teste de CBMN foi realizado utilizando o protocolo descrito por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações. A descrição do preparo das soluções utilizadas neste ensaio encontra-se apresentada no Apêndice D. 1×10^6 células da linhagem HepG2/C3A foram cultivadas em frascos de 25 cm², sob as condições descritas nos itens 2.3, por 24 h. As células foram expostas a 3 diferentes associações de CAD e PUT, descritas na tabela 2, por um período de 24 horas. O CN foi realizado com meios de cultura celular e o CP foi realizado com 50 mL de metilmetano sulfonato (1×10^{-2} M; 50 µL in 5 mL). O ensaio foi realizado em triplicata.

Após a exposição aos tratamentos, os frascos contendo as células foram lavados duas vezes com PBS. Foram adicionados aos frascos 5 mL de meio de cultura completo, contendo 3 µg/mL de citocalasina B. Os frascos foram incubados em estufa de CO₂ (37 °C), conforme descrito no item 2.3, por 28 horas. As células foram então colhidas, fixadas em Carnoy (metanol: ácido acético, 3: 1 v / v) e mantidas a 4 °C, até a sua utilização nos ensaios. Para a preparação das lâminas, aproximadamente cinco gotas da suspensão celular fixada foram colocadas em lâminas limpas, contendo um filme de água fria. Após a secagem das lâminas, estas foram submetidas à hidrólise, com HCL 1N, por 10 minutos, a 60 °C. Em seguida, as lâminas foram expostas por 2 horas no reativo de Shiff, lavadas com água corrente, secas em temperatura ambiente e coradas com Giemsa 5%, por 8 minutos. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz (ampliação de 1.000X). Os ensaios foram realizados em triplicata. Foram contabilizadas um total de 6000 células/tratamento (2000 células/réplica). Para avaliação da genotoxicidade e do

potencial mutagênico das associações testadas das aminas biogênicas CAD e PUT para a linhagem celular HepG2/C3A, foram observadas células binucleadas normais e células binucleadas portadoras de MN, pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares, usando os critérios descritos por Fenech et al. (2003). Para avaliar o índice de divisão celular (IDC), foram contabilizadas 1.000 células/tratamento. O IDC foi calculado seguindo a fórmula: $IDC = [M1 + (2 \times M2) + (3 \times M3) + (4 \times M4)]/N$, onde M1 – M4 representa o número de células com 1 a 4 núcleos, respectivamente, e N é o número total de células analisadas (EASTMOND; TUCKER, 1989). Para as análises estatísticas, inicialmente, foi realizado o teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Como teste paramétrico, foi usada a análise de variância ANOVA – um critério, seguido do post hoc Dunnett. Já o teste de Kruskal- Wallis foi empregado como teste não paramétrico, seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância utilizado nos testes de hipóteses foi $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Para a realização dos ensaios do cometa e CBMN, primeiramente foi realizado o teste de citotoxicidade com a resazurina, que possibilitou a escolha das soluções de CAD e PUT não citotóxicas para as células HepG2/C3A, quando expostas por 24h às associações testadas. Neste teste, foram testadas 9 soluções preparadas com diferentes concentrações de CAD e PUT, onde foram selecionadas 3 delas que apresentaram em viabilidade celular acima de 80% (Tabela 3).

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

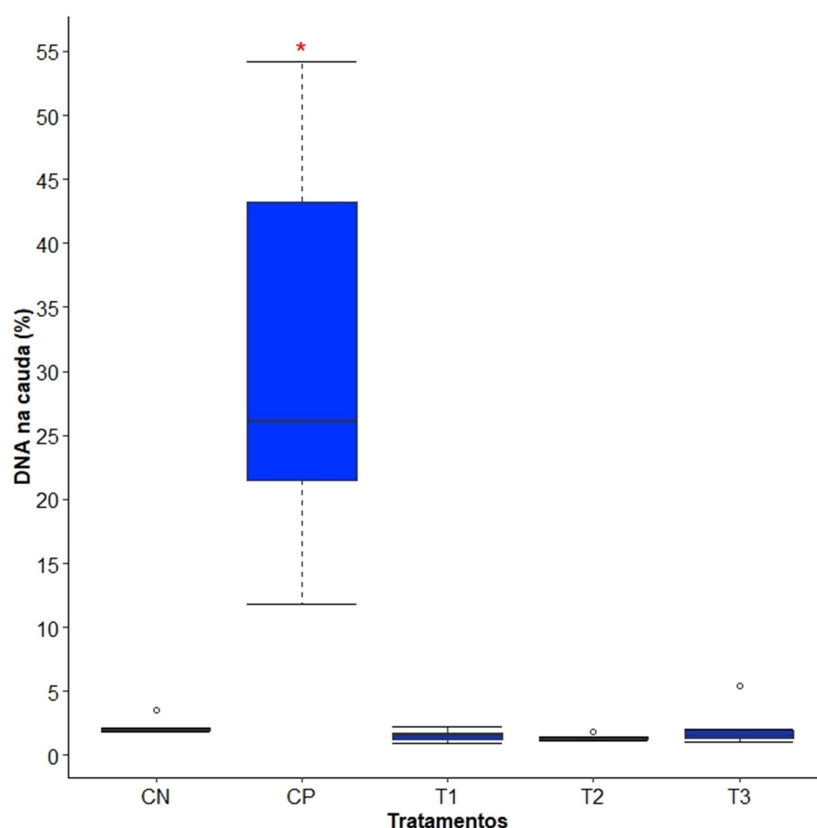
Soluções	Cadaverina	Putrescina	Viabilidade Celular
			Média ± DP
1	40%	60%	64,81±13,26%
2	40%	30%	145,17±75,82%
3	40%	10%	191,25±27,05%
4	30%	70%	73,22±31,44%
5	30%	30%	64,92±23,67%
6	30%	10%	81,16±9,00%
7	20%	70%	186,13±27,91%
8	20%	30%	87,33±12,93%
9	20%	10%	128,00±12,64%

Soluções 1 a 9 correspondem aos percentuais baseados na amplitude inferior e superior ao NOAEL de cadaverina (83mg/Kg) para ratos (Til et al.,1997) e da DL 50 de putrescina (463 mg/kg) para ratazanas, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. Fonte: elaborada pela autora (2022).

As soluções 6, 8 e 9 (Tabela 3), por apresentarem viabilidade celular acima de 80%, foram selecionadas para serem utilizadas nos ensaios do cometa e do MN, sendo renomeadas de T1 (viabilidade celular = 81,16±9,00%), T2 (87,33±12,93%) e T3 (128,00±12,64%), respectivamente.

A genotoxicidade das aminas biogênicas foi avaliada pelo ensaio do cometa e do MN, realizado com células HepG2/C3A. No ensaio do cometa foi observado que as associações de CAD e PUT, nas concentrações testadas, não foram genotóxicas para a linhagem celular HepG2/C3A (Figura 1).

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.



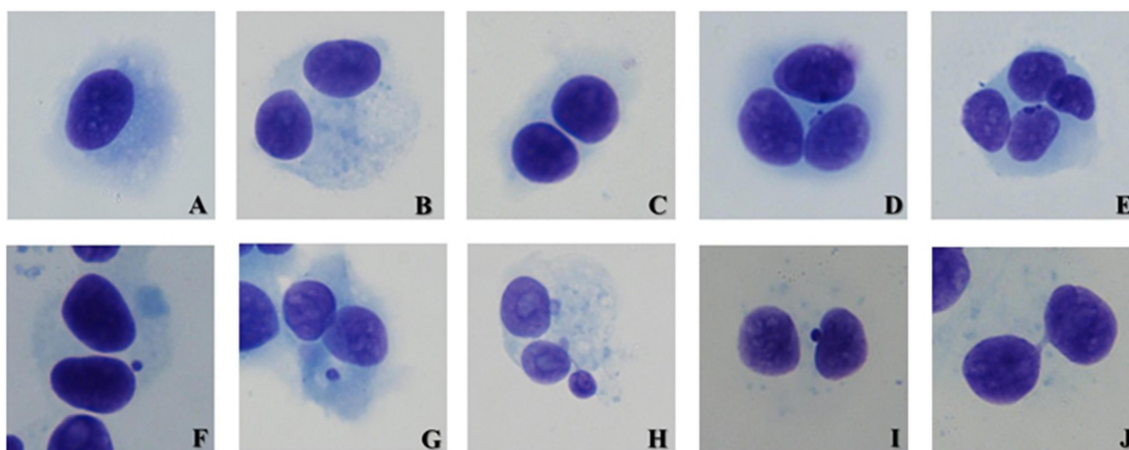
Porcentagem de DNA na cauda de células HepG2/C3A expostas a diferentes tratamentos com associações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). T1 = 30% CAD + 10% de PUT; T2 = 20% de CAD + 30% de PUT; T3 = 20% de CAD + 10% de PUT. CN: controle negativo, CP: controle positivo. * estatisticamente significativo em relação ao CN (teste de Kruskal- Wallis/Dunn's ($p < 0,05$)). Fonte: elaborada pela autora (2022).

No ensaio do MN foi avaliado que para análise do CBPI, obtidos para os tratamentos T1, T2 e T3, não se mostraram estatisticamente diferentes daqueles demonstrados pelo CN. Já para os efeitos de genotoxicidades, os resultados apresentam efeitos genotóxicos, com indicativo de potencial mutagênico para as células HepG2/C3A (Tabela 4).

Estes resultados sugerem que as concentrações conjuntamente testadas de CAD e PUT não alteraram o potencial proliferativo da linhagem celular HepG2/C3A, quando comparados com os do grupo CN. Já para dados de genotoxicidade, obtidos pelo ensaio do MN, brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas, os resultados indicaram que todas as associações testadas de CAD e PUT foram genotóxicas, o que sugere um possível

potencial mutagênico para HepG2/C3A. Em relação à formação de MN, houve um aumento da frequência dessas estruturas para todas as concentrações testadas, quando comparadas ao CN. Para formação de brotos, T1 e T3 apresentaram frequência estatisticamente significativa em relação ao CN e para formação de pontes nucleoplasmáticas, o T3 apresentou frequência estatística significativa, em relação ao CN (Tabela 4 e Figura 2 e 3).

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



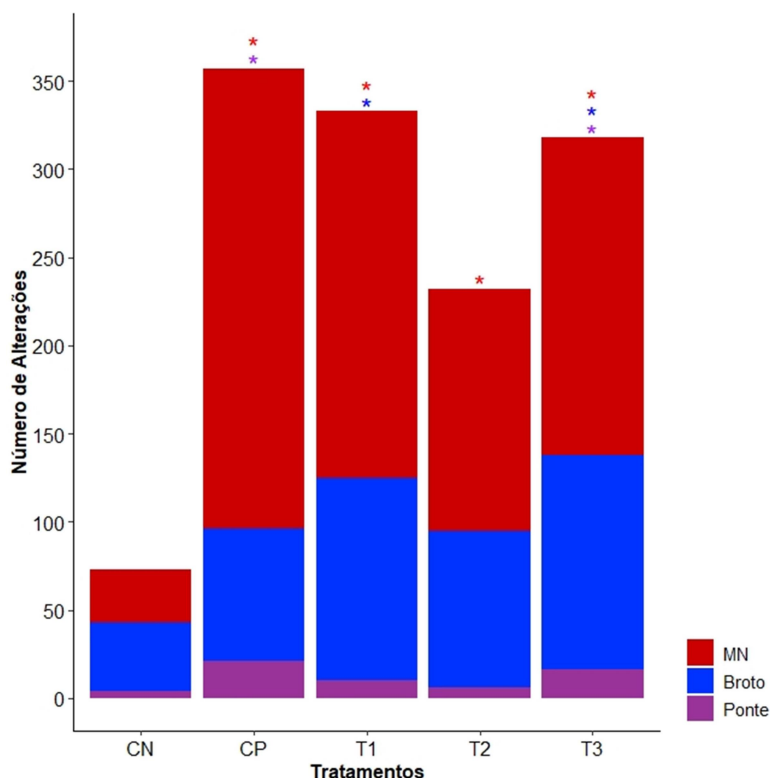
A – célula mononucleada; B e C – células binucleadas normais; D e E células multinucleadas; F e G – células binucleadas com micronúcleo; H e I – células binucleadas com brotos; J – célula binucleada com ponte.

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

	CBPI	MN	Brotos	Pontes
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
CN	1,91±0,09	0,50±0,05	0,65±0,09	0,07±0,06
CP	1,67±0,02*	4,35±0,58***	1,25±0,30	0,35±0,13**
T1	1,90±0,12	3,47±0,41***	1,92±0,39*	0,17±0,03
T2	1,98±0,02	2,28±0,45**	1,48±0,36	0,10±0,00
T3	1,89±0,09	3,00±0,54***	2,03±0,66*	0,27±0,08*

Valores expressos em Média ± Desvio Padrão dos resultados da frequência de alterações do ensaio do MN, para formação de MN, brotos e pontes em células HepG2/C3A expostas a diferentes tratamentos com associações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). T1 = 30% CAD + 10% de PUT; T2 = 20% de CAD + 30% de PUT; T3 = 20% de CAD + 10% de PUT. CN: controle negativo, CP: controle positivo. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao CN para ponte (Kruskal-Wallis, (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001). Fonte: elaborada pela autora (2022).

Figura 3: Resultados das frequências de MN, brotos nucleares e pontes nucleoplasmática observadas em células HepG2/C3A expostas as associação T1, T2 e T3 de CAD e PUT.



Frequência de alterações do ensaio do MN, para formação de MN, brotos e pontes em células HepG2/C3A expostas a diferentes tratamentos com associações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). T1 = 30% CAD + 10% de PUT; T2 = 20% de CAD + 30% de PUT; T3 = 20% de CAD + 10% de PUT. CN: controle negativo, CP: controle positivo. *Estatisticamente significativo em relação ao Controle Negativo (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).

3. DISCUSSÃO

Em áreas cemiteriais podem ocorrer impactos adversos aos diversos compartimentos ambientais correlacionados (solo, águas superficiais e subterrâneas), devido à percolação/escoamento de compostos advindos de sepultamentos. A contaminação promovida pelos cemitérios pode ser uma fonte ainda negligenciada de veiculação de doenças infecciosas perigosas. O desconhecimento da população sobre a influência ambiental promovida pela decomposição cadavérica, que acontece nos cemitérios (ANJOS, 2013; ŻYCHOWSKI et al., 2015; NECKEL et al., 2020; GONÇALVES et al., 2021), intensifica a necessidade e importância de pesquisas deste tipo. O presente estudo traz importantes e inéditas informações sobre os efeitos da contaminação por associações das aminas biogênicas CAD e PUT, compostos estes

presentes no necrochorume, sobre células de hepatoma humano, linhagem celular HepG2/C3A.

As células da linhagem HepG2/C3A são de característica metabolizadora, que apresentam uma alta produção de albumina, aldolase B e piruvato quinase L, compostos estes específicos do tecido hepático. Adicionalmente, embora essas células sejam derivadas de carcinoma hepático, elas têm um desenvolvimento de característica histológica de fígado normal (KELLY, 1994). Devido a esses padrões, são indicadas para serem usadas na avaliação de citogenotoxicidade de contaminantes (LEME et al., 2011; SOMMAGGIO et al., 2018). Os ensaios de genotoxicidade são importantes recursos utilizados para avaliar a potencialidade de compostos químicos induzirem danos ao material genético e, consequentemente, de estarem envolvidos em processos carcinogênicos (TURKEZ et al., 2017).

O ensaio do cometa é amplamente utilizado para análise de potencial genotóxico, por ser capaz de detectar danos primários no DNA (quebras de simples- fita simples, quebras de dupla-fita, sítios álcali lábeis e ligação cruzada DNA-DNA/DNA-proteína) (OLIVE et al., 1990, TICE, 2000; LORENZO et al., 2013; BAJPAYEE et al., 2019, SILVA, et al. 2021). O parâmetro do ensaio do cometa mais recomendado para fins regulatórios é a porcentagem de DNA na cauda, pois este dimensiona a quantidade de quebras que foram promovidas no DNA, após exposição celular a um agente genotóxico (OLIVE, 1999; COLLINS, 2008 e KUMARAVEL et al., 2009).

No presente estudo foram selecionadas três associações não citotóxicas das aminas biogênicas CAD e PUT (T1, T2 e T3 – Tabela 3), para avaliar a genotoxicidade e o potencial mutagênico dessas aminas. Pelo ensaio do cometa, foi observado que não houve danos genotóxicos por quebras do material genético das células HepG2/C3A, após exposição às associações T1, T2 e T3 de CAD e PUT. Del Rio et al. (2019) avaliaram os efeitos tóxicos da CAD e da PUT para células da linhagem celular de intestino humano (HT29) expostas à 24 horas nessas aminas. O estudo mostrou que os resultados dos tratamentos realizados com concentrações iguais ou maiores que o IC50 das aminas não diferiram, estatisticamente dos do CN, dados estes que corroboram os resultados do ensaio do cometa obtidos no presente estudo.

Dados de análises morfológicas, também avaliados no estudo de del Rio et al., (2019) mostraram que, para concentrações acima de 20 mM, de ambas as aminas, houve diminuição na quantidade de células e em 150 a 160 mM essas substâncias induziram, em linhagem celular de intestinais humano, efeito citotóxico por necrose. Com esses

resultados, os autores concluíram que as aminas CAD e PUT têm efeito citotóxico dose-dependente, para a linhagem celular HT29, e que os diferentes bioensaios de toxicidade contribuíram para uma melhor compreensão do modo de ação dessas substâncias.

No presente trabalho, concomitantemente ao ensaio do cometa, foi também realizado o ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN). Com essa técnica, é possível avaliar o índice de proliferação celular, genotoxicidade e o potencial mutagênico de produtos químicos (UDROIU, 2006; HINTZSCHE et al., 2017). Esse ensaio é usado em experimentação *in vitro* e *in vivo* rotineiramente. Em testes *in vitro*, o ensaio é comumente realizado em células de mamíferos, se caracterizando como uma importante ferramenta de investigação de compostos potencialmente danosos à saúde e de avaliação de comprometimento ambiental (FENECH, 2000; HARA; MARIN-MORALES, 2017).

De acordo com Fenech (2006), o ensaio de CBMN foi desenvolvido para avaliar a potencialidade de um agente induzir MN, mas hoje ele também é usado para avaliar outros *endpoint*, como a presença de pontes nucleoplasmáticas (NPB), brotos nucleares (NBUD), morte celular (necrose ou apoptose) e taxa de divisão nuclear (Índice de Proliferação Celular, CBPI). O CBPI indica o número médio de núcleos por ciclo celular (SURRALLÉS et al., 1995; OECD, 2012); a presença de MN, pode inferir o potencial mutagênico de uma substância; e a presença de outros biomarcadores associados com danos ao DNA, como formação de brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas, decorrentes de clastogenicidade ou de aneugenicidade, inferem a genotoxicidade de um agente (FENECH, 2000; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; 2009). Portanto, os MN e alterações nucleares, como pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, são biomarcadores extensivamente utilizados para avaliar eventos genotóxicos e instabilidade cromossômica (FENECH, 2011).

Os resultados do ensaio do MN, realizado no presente estudo com a linhagem celular HepG2/C3A, comprovaram efeito genotóxico para os tratamentos T1, T2 e T3 de CAD+PUT, resultados estes que também indicaram potencial mutagênico para essas aminas, pela alta frequência de MN observado em todos os tratamentos avaliados (Tabela 3). Pelo mesmo ensaio ainda foram observados brotos nucleares para T1 e T3, além de pontes nucleoplasmáticas para T3.

Os MNs podem ser originados de fragmentos provenientes de quebras cromossômicas, perdas de cromossomos inteiros (efeito clastogênicos) ou de expulsão de material genético amplificado (efeito aneugênico) (FENECH, 2000; FERNANDES;

MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; 2009). Os brotos nucleares se originam por um mecanismo celular de remoção de DNA amplificado e/ou em excesso, sendo um biomarcador de genes amplificados ou dosagem de genes alterada (FENECH, 2006, FERNANDES et al., 2007; SOMMAGGIO et al., 2018). A presença de pontes nucleoplasmáticas se caracteriza como importante biomarcador de dano ao DNA, como a presença de cromossomos dicêntricos, rearranjo cromossômico ou fusões terminais dos telômeros, que são indicativos de reparo incorreto do DNA (FENECH, 2006). Ainda de acordo com Fenech (2006), esses danos podem levar a formação de MN, podendo ser considerados indicativos de mutagenicidade.

Pelas alterações observadas no teste do MN, associadas à ausência de danos verificados pelo resultado do ensaio do cometa, sugere-se que os MNs induzidos pelas aminas biogênicas tenham origem por aneugenicidade. Contudo, pela presença de pontes nucleoplasmáticas em T3, pode-se também inferir, de acordo com as citações de Fenech (2006), uma indução de MN por esta associação de CAD e PUT por efeito clastogênico. Portanto, as aminas biogênicas, moléculas orgânicas que em concentrações micromolares são de grande importância fisiológica, apresenta níveis de toxicidade quando em concentrações elevadas assim como avaliado em outros trabalhos, para diferentes organismos (BACH et al., 2012; MICHALSKI, et al. 2021).

Os resultados do presente estudo corroboram estudos feitos com outros sistemas testes. Unal et al. (2008), em seus estudos com células meristemáticas de *A. cepa*, expostas a ação de aminas biogênicas (putrescina), observaram efeitos genotóxicos, com baixa frequência de pontes nucleoplasmáticas e células binucleadas e alta frequência de poliploidização. A poliploidia é resultante de falha na polimerização de microtúbulos (efeito aneugênico), que decorre na interrupção da citocinese (FERNANDES et al., 2007; 2009). Gumurgen et al. (2005), observaram efeitos aneugênicos para as aminas putrescina, espermina e spermidina, quando expuseram raízes de *A. cepa* a diferentes concentrações dessas aminas, em diferentes tempos (12, 24 e 48 horas). Os autores observaram que a principal alteração encontrada foi aderência cromossômica, a qual pode ser resultante de falhas na desdespolimerização do fuso mitótico, o que caracteriza também em um efeito aneugênico (FERNANDES et al., 2009). Estudos de Tabur e Demir (2010), realizados com o bioindicador *Hordeum vulgares* (*cevada*), exposto a 10µM de diferentes aminas biogênicas, dentre elas a CAD e a PUT, mostraram que essas duas aminas induziram alterações cromossômicas de origem clastogênica (pontes nucleoplasmáticas) e aneugênica (multipolaridade).

A partir dos resultados descritos por outros autores e os dados do presente estudo, é possível inferir que as associações de CAD e PUT testadas aqui, induzem tanto danos aneugênicos como danos clastogênicos. Assim, os resultados dos ensaios de genotoxicidade e do potencial mutagênico avaliados neste estudo, indicam que a CAD e PUT interferiram no fuso mitótico, confirmando que ambas as aminas biogênicas têm diferentes efeitos sobre os cromossomos. Isso pode ser explicado pelas características químicas das aminas biogênicas que, de acordo com Lenis et al. (2017), são compostos policationicos, que apresentam afinidade de ligação com complexos aniônicos, como DNA, RNA, ATP e fosfolipídios, e alterarem a carga dos nucleotídeos.

De acordo com os resultados do teste do MN, pode-se observar que este teste foi mais sensível que o ensaio do cometa, para avaliar a genotoxicidade e o potencial mutagênico das aminas biogênicas estudadas. Além disso, foi observado, por este teste, uma intensificação dos efeitos genotóxicos (frequência das alterações nucleoplasmáticas) proporcional à diminuição das concentrações presentes nas associações de CAD e PUT avaliadas. As aminas biogênicas, em concentrações micromolares, são importantes para a manutenção da viabilidade celular e a integridade dos processos metabólicos do organismo, pois estão associadas aos eventos de replicação do DNA e de síntese proteica (TETI et al., 2002; WÓJCIK et al., 2020). No entanto, concentrações elevadas dessas aminas, como as testadas neste estudo, são genotóxicas, como comprovado pelos danos induzidos ao DNA das células da linhagem celular HepG2/C3A.

A partir dos efeitos observados para as associações de CAD e PUT avaliadas no presente estudo, é possível inferir que essas aminas, quando atingem o meio ambiente, podem causar severos impactos aos organismos expostos. O modelo *in vitro* usado neste estudo se mostrou indicado para avaliar a toxicidade de associações de CAD e PUT, e alertar sobre os perigos da contaminação características de cemitérios, pois essas aminas são compostos presentes em altas concentrações no *nerochorume*.

4. CONCLUSÕES

Com base em todos os resultados obtidos, pode-se inferir que esse estudo contribui, efetivamente, para uma melhor avaliação dos efeitos genotóxicos e potencial mutagênico de contaminantes comuns de ambientes cemiteriais (cadaverina e putrescina), cujos modos de ação ainda são pouco conhecidos.

Células da linhagem HepG2/C3A expostas por 24 horas a diferentes associações de CAD e PUT indicaram que essas aminas são genotóxicas, com indicativo de potencial

mutagênico. Os danos induzidos por estas aminas ao material genético foram tanto de origem aneugênica quanto clastogênica, confirmando descrições de outros autores, que utilizaram outros bioindicadores como modelos.

O estudo ainda destaca que as aminas biogênicas CAD e PUT, quando associadas entre si, podem apresentar alta toxicidade para organismos eventualmente expostos a elas, o que alerta para os perigos das contaminações por exsudados humanos derivados da putrefação cadavérica, comuns de ambientes de cemitérios.

Uma vez que as aminas biogênicas CAD e PUT fazem parte da composição do necrochorume e, conseqüentemente, podem estar presentes no meio ambiente, estudos dessa natureza trazem importantes informações a serem consideradas para o aprimoramento da legislação ambiental relacionada aos ambientes de cemitérios, bem como para os perigos ocupacionais que este tipo de contaminação pode promover sobre a saúde dos trabalhadores desses locais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, G.; HEBY, O. Polyamine and nucleic acid concentrations in Ehrlich ascites carcinoma cells and liver of tumor-bearing mice at various stages of tumor growth. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 48, n. 1, p. 165-172, 1972.

ANJOS, R. M. (2013) Cemitérios: uma ameaça a saúde humana? Disponível em: <<https://portal.crea-sc.org.br/cemiterios-uma-ameaca-a-saude-humana/?print=pdf>>. Acessado em 13 maio de 2017.

ANTOINE, D. J. et al. Mechanism-based bioanalysis and biomarkers for hepatic chemical stress. **Xenobiotica**, v. 39, n. 8, p. 565-577, 2009.

BACIGALUPO, R. Cemitérios: fontes potenciais de impactos ambientais. **História, Natureza e Espaço-Revista Eletrônica do Grupo de Pesquisa NIESBF**, v. 1, n. 1, p. 05, 2012.

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

BACH, B. et al. 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.

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.

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 in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 174-183, 2015.

BULUSHI, I. A. et al. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation—a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 49, n. 4, p. 369-377, 2009.

- CHEQUER, F. M. D. et al. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 676, n. 1-2, p. 83-86, 2009.
- CHIANG, S. et al. Safrole-2', 3'-oxide induces cytotoxic and genotoxic effects in HepG2 cells and in mice. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, n. 2, p. 234-241, 2011.
- COLAO, A.; MUSCOGIURI, G.; PISCITELLI, P. Environment and health: not only cancer. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 7, p. 724, 2016.
- COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.
- 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.
- DEL RIO, B. et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2019.
- DURIE, B. G.M.; SALMON, S. E.; RUSSELL, D. H. Polyamines as markers of response and disease activity in cancer chemotherapy. **Cancer research**, v. 37, n. 1, p. 214-221, 1977.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 600, n. 1-2, p. 58-66, 2006.
- 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.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.
- 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.
- GAJSKI, G. et al. Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in human and zebrafish cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 15, p. 14739-14750, 2016.
- 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.
- GONÇALVES, L. R. et al. Another casualty of the SARS-CoV-2 pandemic—the environmental impact. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-16, 2021.

- GRONEBERG, D. A.; GROSSE-SIESTRUP, C.; FISCHER, A. In vitro models to study hepatotoxicity. **Toxicologic pathology**, v. 30, n. 3, p. 394-399, 2002.
- GWENZI, W. et al. Sources, behaviour, and environmental and human health risks of high-technology rare earth elements as emerging contaminants. **Science of the Total Environment**, v. 636, p. 299-313, 2018.
- HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State–Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321-330, 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. 183-188, 1997.
- HEATHER, M. W.; ALISON, V. F.; ALUN, H. A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochem J**, v. 376, n. 1, p. 1-14, 2003.
- HINTZSCHE, H. et al. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85-98, 2017.
- HUSSAIN, S. S. et al. Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 3, p. 300-311, 2011.
- 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. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- KEMERICH, P. D. da C. et al. Valores anômalos de metais pesados em solo de cemitério. **Revista Ambiente & Água**, v. 7, p. 140-156, 2012.
- KHUHAWAR, M. Y.; QURESHI, G. A. Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. **Journal of chromatography B: biomedical sciences and applications**, v. 764, n. 1-2, p. 385-407, 2001.
- KNASMÜLLER, S. et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 315-328, 2004.
- KUMARAVEL, T. S. et al. Comet assay measurements: a perspective. **Cell biology and toxicology**, 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.
- LAUWERS, M. The birth of the cemetery: sacred places and land of the dead in the medieval West. **Campinas: EdUnicamp**, v. 1, n. 1, 2015.
- LEME, D. M. et al. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 8, p. 2148-2155, 2011.
- LENIS, Y. Y. et al. Physiological importance of polyamines. **Zygote**, v. 25, n. 3, p. 244-255, 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, J. et al. Polychlorinated biphenyl quinone metabolites lead to oxidative stress in HepG2 cells and the protective role of dihydrolipoic acid. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 6, p. 841-848, 2012.

LORENZO, Y. et al. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. **Mutagenesis**, v. 28, n. 4, p. 427-432, 2013.

MAISANABA, S. et al. Induction of micronuclei and alteration of gene expression by an organomodified clay in HepG2 cells. **Chemosphere**, v. 154, p. 240-248, 2016.

MALUF, S. W. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis–block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Clinica Chimica Acta**, v. 347, n. 1-2, p. 15-24, 2004.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic bioassays. **Chemosphere**, v. 163, p. 508-515, 2016.

MAZZEO, D. E. C. et al. Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1030-1036, 2013.

MICHALSKI, R.; PECYNA-UTYLSKA, P.; KERNERT, J. Determination of ammonium and biogenic amines by ion chromatography. A review. **Journal of Chromatography A**, v. 1651, p. 462319, 2021.

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, A. et al. Environmental damage and public health threat caused by cemeteries: a proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. **urbe. Revista Brasileira de Gestão Urbana**, v. 9, p. 216-230, 2017.

NECKEL, A. et al. Hazardous elements in the soil of urban cemeteries; constructive solutions aimed at sustainability. **Chemosphere**, v. 262, p. 128248, 2021.

NECKEL, A. et al. Metals in the soil of urban cemeteries in Carazinho (South Brazil) in view of the increase in deaths from COVID-19: Projects for cemeteries to mitigate environmental impacts. **Environment, Development and Sustainability**, p. 1-24, 2021.

O'BRIEN, J. 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.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 9, p. 779-783, 1990.

OLIVE, P. L. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. **International journal of radiation biology**, v. 75, n. 4, p. 395-405, 1999.

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.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD 405. Acute eye irritation/corrosion, 2012.

- PEGG, A. E. Toxicity of polyamines and their metabolic products. **Chemical research in toxicology**, v. 26, n. 12, p. 1782-1800, 2013.
- PENTEADO, J. O. et al. Health risk assessment in urban parks soils contaminated by metals, Rio Grande city (Brazil) case study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111737, 2021.
- PLAZA, G. et al. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v. 59, n. 2, p. 289-296, 2005.
- SANZ-VICENTE, I. et al. Smartphone-interrogated test supports for the enzymatic determination of putrescine and cadaverine in food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 18, p. 4261-4271, 2020.
- SILVA, B. O. et al. Genotoxicity induced by nerol, an essential oil present in citric plants using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and HepG2/C3A cells as a model. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 84, n. 12, p. 518-528, 2021.
- SOMMAGGIO, L. R. D. et al. Evaluation of the potential agricultural use of biostimulated sewage sludge using mammalian cell culture assays. **Chemosphere**, v. 199, p. 10-15, 2018.
- SURRALLÉS, J. et al. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 341, n. 3, p. 169-184, 1995.
- TABUR, S.; DEMIR, K. Protective roles of exogenous polyamines on chromosomal aberrations in *Hordeum vulgare* exposed to salinity. **Biologia**, v. 65, n. 6, p. 947-953, 2010.
- TAKAHASHI, C. S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. **Mutagênese Ambiental. ULBRA, Canoas**, p. 151-172, 2003.
- TETI, D.; VISALLI, M.; MCNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho) physiological conditions. **Journal of Chromatography B**, v. 781, n. 1-2, p. 107-149, 2002.
- THÁ, E. L. et al. Safety aspects of kraft lignin fractions: Discussions on the in chemico antioxidant activity and the induction of oxidative stress on a cell-based in vitro model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 977-986, 2021.
- 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.
- TICE, R. R. 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. 206-221, 2000.
- TIL, H. P. et al. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 3-4, p. 337-348, 1997.
- TSUBOY, M. S. et al. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 8, p. 1650-1655, 2007.

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.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 2, p. 201-204, 2006.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 468, n. 2, p. 213-225, 2000.

UNAL, M.; PALAVAN-UNSAL, N.; TUFEKCI, M. Effects of polyamines and polyamine biosynthetic inhibitors on mitotic activity of *Allium cepa* root tips. **Acta Biologica Hungarica**, v. 59, n. 1, p. 93-102, 2008.

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. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1-2, p. 31-43, 1997.

WÓJCIK, W.; ŁUKASIEWICZ, M.; PUPPEL, K. Biogenic amines: formation, action and toxicity—a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 7, p. 2634-2640, 2021.

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.

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 amins 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. RTPPrimerDB: 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.

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.

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.

8. DADOS ADICIONAIS

Os dados adicionais serão posteriormente descritos e discutidos em um novo capítulo, em formato de artigo científico para continuidade dessa tese, utilizando a linhagem celular HepG2/C3A.

8.1. Dados adicionais de resultados em células HepG2/C3A

Resultados da análise do perfil de expressão de genes e de citometria de fluxo, referente à linhagem celular HepG2/C3A expostas a diferentes associações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT), por 24 horas, para RT-qPCR, e por 24 e 48 horas, para o ensaio de citometria de fluxo.

8.1.1. Soluções para análise do perfil da expressão de genes e de citometria de fluxo

Nas tabelas 1 e 2, estão descritas as diferentes concentrações (em %) das associações de CAD e PUT usadas nas análises do perfil da expressão de genes e de citometria de fluxo. Dados referentes aos resultados dos ensaios de Resazurina, linhagem celular HepG2/C3A, descrito na tabela 3 do capítulo 3 (artigo 3) desta tese.

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%.

Soluções	Cadaverina	Putrescina	Tratamentos
6	30%	10%	T1
8	20%	30%	T2
9	20%	10%	T3

As soluções 6, 8 e 9 correspondem aos percentuais baseados na amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de CAD (Til, et al.,1997) e da DL 50 463 mg/kg para ratas de PUT, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. As soluções 6, 8 e 9 referem-se aos tratamentos (T) T1, T2 e T3, respectivamente. Fonte: elaborada pela autora (2022).

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

Soluções	Cadaverina	Putrescina	Tratamentos
6	30%	10%	T1
8	20%	30%	T2
9	20%	10%	T3
4	30%	70%	T4

As soluções 6, 8, 9 e 4 correspondem aos percentuais baseados na amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de CAD (Til, et al.,1997) e da DL 50 463 mg/kg para ratazanas de PUT, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. As soluções 6, 8, 9 e 4 referem-se aos tratamentos (T) T1, T2, T3 e T4 respectivamente. Fonte: elaborada pela autora (2022).

8.2. Resultados do perfil de expressão de genes em células HepG2/C3A

Os dados brutos das análises de expressão gênica estão descritos nas tabelas 3 e 4 a seguir. Os resultados apresentados em gráficos do perfil dos genes analisados estão apresentados no Apêndice F.

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.

Nome dos genes	Genes	Controle Negativo (CN)	T1	T2	T3
		Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Danos no DNA					
Reparo por excisão	ERCC1	1 $\pm$ 0,030	1,825 $\pm$ 0,326***	1,073 $\pm$ 0,016	1,441 $\pm$ 0,016*
Checkpoint Quinase 1	CHEK1	1 $\pm$ 0,314	0,760 $\pm$ 0,136	0,313 $\pm$ 0,109**	0,397 $\pm$ 0,006**
Metabolismo de Xenobióticos					
Citocromo P450 família 1	CYP1A1	1 $\pm$ 0,297	0,498 $\pm$ 0,009**	0,365 $\pm$ 0,020**	0,244 $\pm$ 0,006***
Estresse Oxidativo					
Glutathione S transferase Mu4	GSTM4	1 $\pm$ 0,055	0,575 $\pm$ 0,015***	0,324 $\pm$ 0,018***	0,254 $\pm$ 0,001***
Glutathione Redutase	GSR	1 $\pm$ 0,003	0,163 $\pm$ 0,015***	0,156 $\pm$ 0,010***	0,016 $\pm$ 0,001***
Superóxido Dismutase	SOD1A	1 $\pm$ 0,619	0,373 $\pm$ 0,173	1,218 $\pm$ 0,001**	0,348 $\pm$ 0,001
Catalase	CAT	1 $\pm$ 0,034	0,448 $\pm$ 0,074***	0,274 $\pm$ 0,008***	0,135 $\pm$ 0,003***
Morte Celular					
Proteína tumoral P53	p53	1 $\pm$ 0,110	0,517 $\pm$ 0,003***	0,33 $\pm$ 0,002***	0,318 $\pm$ 0,011***
c-Myc	c-Myc	1 $\pm$ 0,086	0,897 $\pm$ 0,002***	0,513 $\pm$ 0,111***	0,539 $\pm$ 0,123
Apoptose					
Caspase 3	CASP3	1 $\pm$ 0,014	0,711 $\pm$ 0,020***	0,433 $\pm$ 0,015***	0,347 $\pm$ 0,006***
Caspase 9	CASP9	1 $\pm$ 0,035	0,931 $\pm$ 0,023	0,446 $\pm$ 0,786***	0,319 $\pm$ 0,032***

T1 (30% Cadaverina (CAD) + 10% Putrescina (PUT)); T2 (20% CAD + 30% PUT) e T3(20% CAD + 10% PUT). Os percentuais correspondem aos percentuais baseados na amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de CAD (Til, et al.,1997) e da DL 50 463 mg/kg para ratazanas de PUT, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao CN (ANOVA (*)) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$). Fonte: elaborada pela autora (2022).

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.

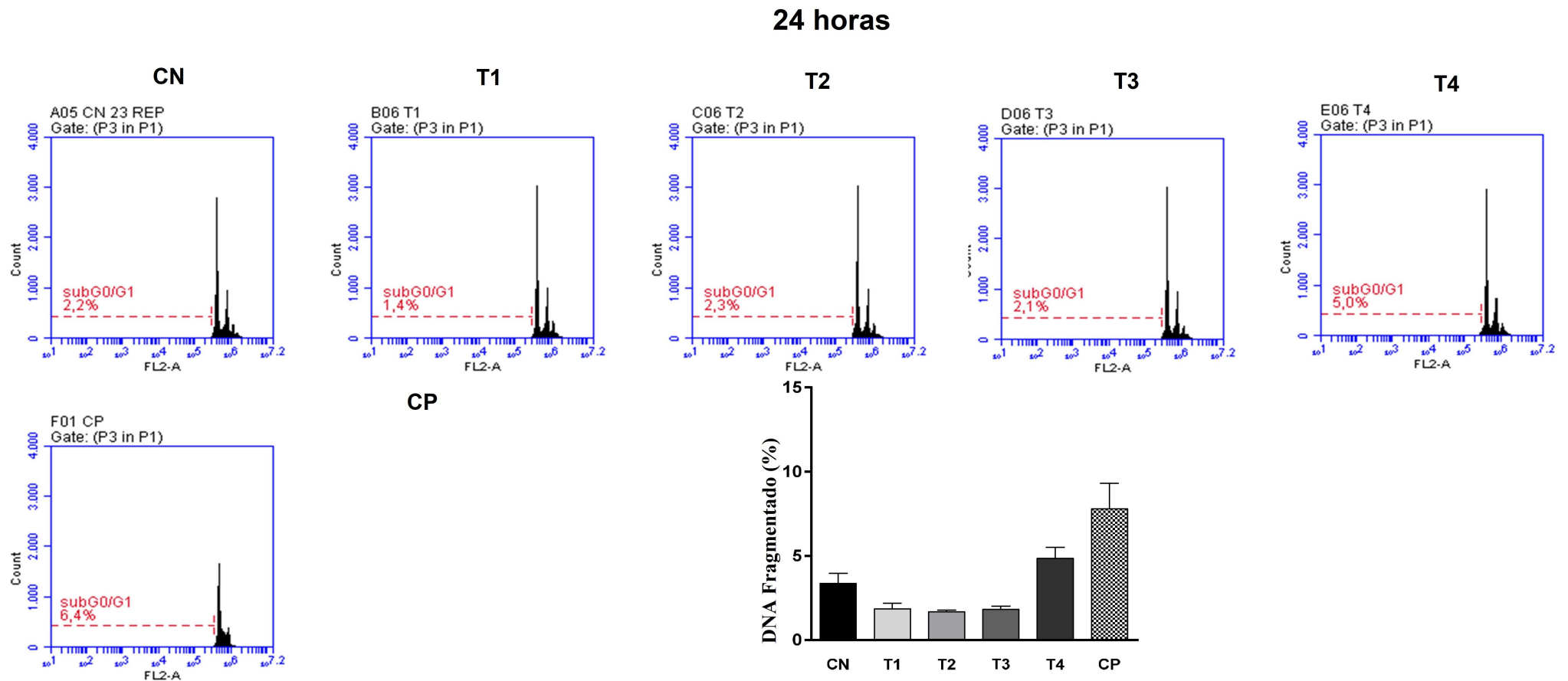
Nome dos genes	Genes	Expressão inibida	Super expressão
Danos no DNA			
Reparo por excisão	ERCC1		T1 e T3
Checkpoint Quinase 1	CHEK1	T2 e T3	
Metabolismo de Xenobióticos			
Citocromo P450 família 1	CYP1A1	T1, T2 e T3	
Estresse Oxidativo			
Glutathione S transferase Mu4	GSTM4	T1, T2 e T3	
Glutathione Redutase	GSR	T1, T2 e T3	
xido DismutaseCatalase	SOD1A		T2
	CAT	T1, T2 e T3	
Morte Celular			
Proteína tumoral P53	p53 c-	T1, T2 e T3	
c-Myc	Myc	T1, T2 e T3	
Apoptose			
Caspase 3	CASP3	T1, T2 e T3	
Caspase 9	CASP9	T2 e T3	

T1 (30% Cadaverina (CAD) + 10% Putrescina (PUT)); T2 (20% CAD + 30% PUT) e T3 (20% CAD + 10% PUT). Os percentuais correspondem aos percentuais baseados na amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos de CAD (Til, et al.,1997) e da DL 50 463 mg/kg para ratas de PUT, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. Fonte: elaborada pela autora (2022).

8.3. Análise de citometria de fluxo na linhagem celular HepG2/C3A

Análise por citometria de fluxo: fragmentação de DNA por coloração IP na linhagem celular HepG2/C3A, após tratamentos com associações de CAD e PUT, por 24 horas (população de células sub G0/G1).

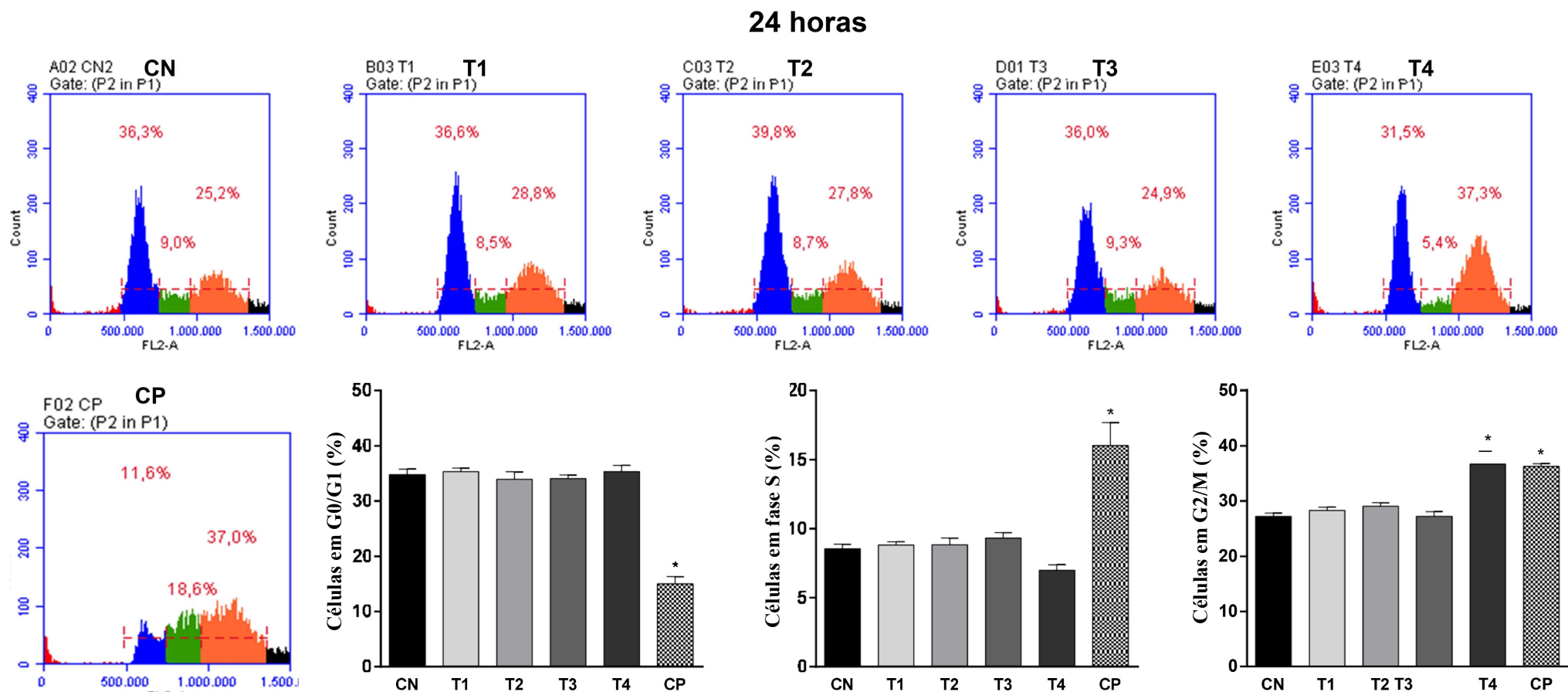
Figura 1: Análise de fragmentação de DNA por coloração IP, avaliada por citometria de fluxo após tratamento com CAD e PUT em células HepG2/C3A (população de células subG0/G1)



CN. Controle negativo; T1. Associação da solução a 30% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v/v); T2. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 30% de Putrescina (v/v); T3. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v/v); T4. Associação da solução a 30% de Cadaverina com 70% de Putrescina (v/v); CP. Controle positivo.

Análise por citometria de fluxo: ciclo celular por coloração IP na linhagem celular HepG2/C3A, após tratamentos com associações de CAD e PUT, por 24 horas.

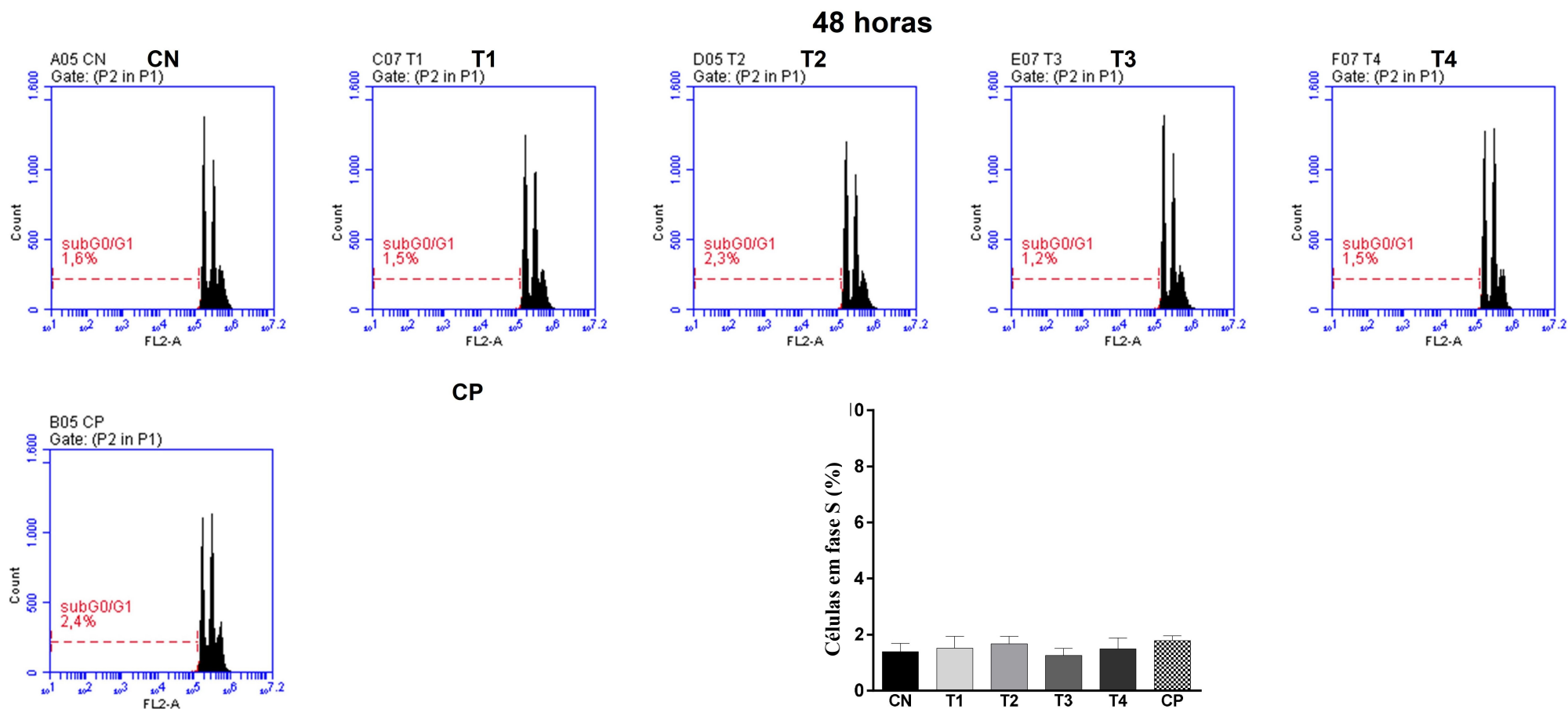
Figura 2: Análise do ciclo celular (coloração IP) por citometria de fluxo após tratamento com CAD e PUT associadas em células HepG2/C3A.



CN. Controle negativo; T1. Associação da solução a 30% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v/v); T2. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 30% de Putrescina (v/v); T3. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v/v); T4. Associação da solução a 30% de Cadaverina com 70% de Putrescina (v/v); CP. Controle positivo.

Análise por citometria de fluxo: fragmentação de DNA por coloração IP na linhagem celular HepG2/C3A, após tratamentos com associações de CAD e PUT, por 48 horas (população de células subG0/G1).

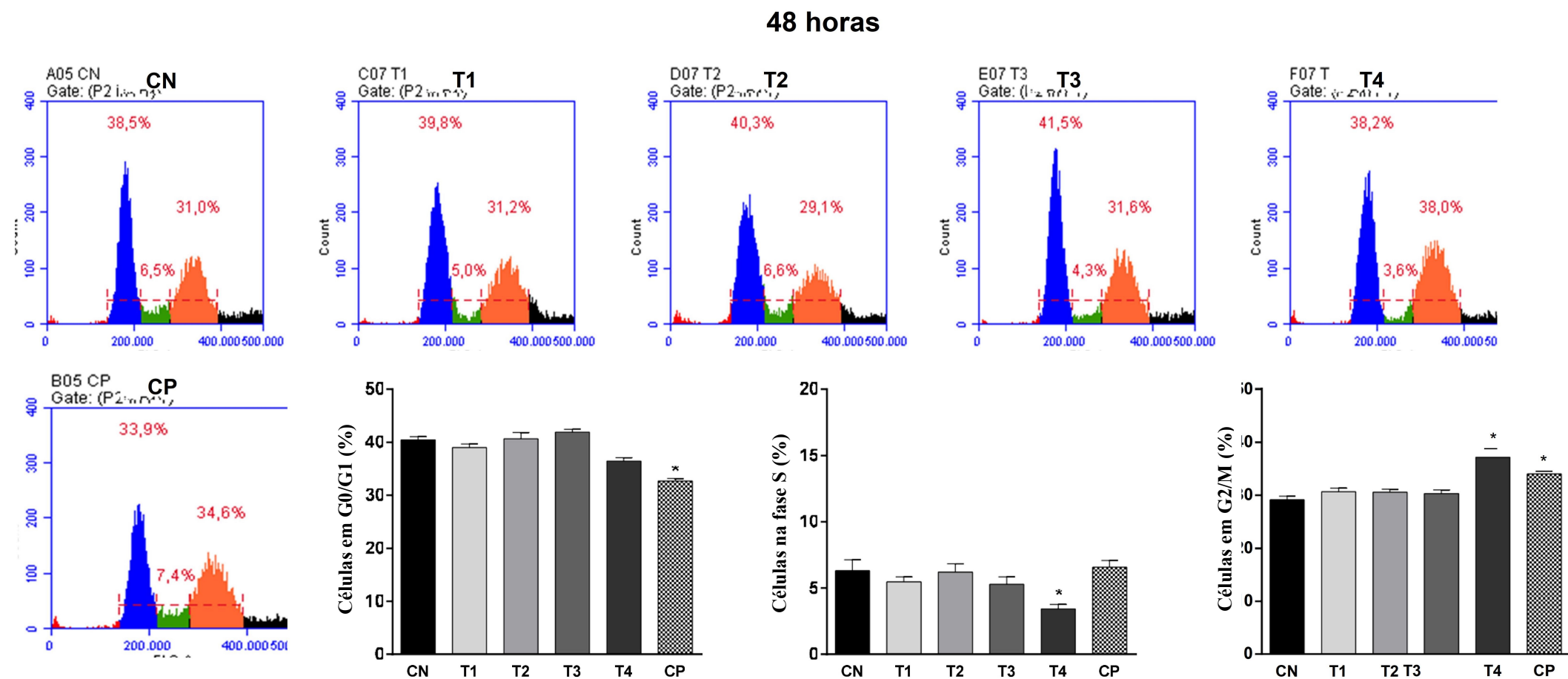
Figura 3: Análise de fragmentação de DNA por coloração IP, avaliada por citometria de fluxo após tratamento com CAD e PUT associadas em células HepG2/C3A (população de células subG0/G1)



CN. Controle negativo; T1. Associação da solução a 30% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v/v); T2. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 30% de Putrescina (v/v); T3. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v/v); T4. Associação da solução a 30% de Cadaverina com 70% de Putrescina (v/v); CP. Controle positivo.

Análise por citometria de fluxo: Ciclo celular por coloração IP na linhagem celular HepG2/C3A, após tratamentos associações de CAD e PUT, por 48 horas.

Figura 4: Análise do ciclo celular (coloração IP) por citometria de fluxo após tratamento com CAD e PUT associadas em células HepG2/C3A.



CN. Controle negativo; T1. Associação da solução a 30% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v/v); T2. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 30% de Putrescina (v/v); T3. Associação da solução a 20% de Cadaverina com 10% de Putrescina (v/v); T4. Associação da solução a 30% de Cadaverina com 70% de Putrescina (v/v); CP. Controle positivo.

APÊNDICE – MATERIAL SUPLEMENTAR

APÊNDICE A – CONCENTRAÇÕES DE CADAVERINA (CAD) E PUTRESCINA (PUT) UTILIZADAS EM DIFERENTES UNIDADES (% e mg/Kg)

Tabela 1 – Descrição das concentrações utilizadas em diferentes unidades (% e mg/Kg). Para CAD as concentrações tiveram como base a amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos (Til, et al.,1997) e para PUT, a DL50 de 463 mg/kg para ratazanas, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto.

Cadaverina	mg/Kg	Putrescina	mg/Kg
40%	33,2	70%	324,1
30%	24,9	60%	277,8
20%	16,6	30%	138,9
10%	8,3	10%	46,3
5%	4,15	0,10%	0,46
		0,01%	0,046

Concentrações selecionadas para CAD foram baseados na amplitude inferior e superior ao NOAEL 83mg/Kg para ratos (Til, et al.,1997) e de PUT, a DL50 - 463 mg/kg para ratazanas, de acordo com a ficha técnica de segurança do produto. Fonte: elaborada pela autora (2022).

APÊNDICE B - PROCEDIMENTOS E SOLUÇÕES PARA MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR *Speedy*

1. Preparo de soluções para a manutenção das células *Speedy*

1.1. Meio de cultura LEIBOWITZ L-15 incompleto

Em um balão volumétrico de 1L, dissolver um pacote do meio de cultivo em 500 mL de água ultrapura e acrescentar a solução de antibiótico-antimicótico (penicilina-streptomicina, 10.000U.I/10mg – marca: Cutilab). Agitar a mistura e completar o volume para 1,5 L com água ultrapura. Corrigir o pH para 7,7, utilizando solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. Filtrar em membrana de porosidade 0,22 µm e aliquotar em frascos de vidro de 100 mL. Armazenar os frascos em geladeira, entre 2 a 6 °C.

1.2 Meio de cultura LEIBOWITZ L-15 completo

Em fluxo laminar, adicionar soro bovino fetal (marca: Cutilab) estéril ao meio LEIBOWITZ L-15 incompleto, em uma proporção de 10%. Armazenar os frascos em geladeira, entre 2 a 6 °C.

1.3. Solução de tampão fosfato salino (PBS)

Dissolver, em balão volumétrico, 0,2 g de cloreto de potássio (marca: Exôdo científica), 0,2 g de fosfato monobásico de potássio (marca: Synth), 8,0 g de cloreto de sódio (marca: LS Chemicals) e 1,15 g de fosfato dibásico de sódio anidro (marca: Nuclear) em 1000 mL de água ultrapura. Manter sob agitação até a completa solubilização. Corrigir o pH para 7,4 com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. Aliquotar a solução de PBS em frascos de vidro de 250 mL e autoclavar por 20 minutos a 120 °C/1atm. Armazenar a solução em geladeira.

1.4. Tripsina EDTA Solution 10X

Diluir tripsina – EDTA (marca: Sigma) em PBS, na proporção 2:8 (tripsina e PBS).

1.5. Solução de congelamento

Em fluxo laminar, preparar o soro com complemento inativado. Para isso, descongelar frascos com 50 mL de soro bovino fetal (marca: Cutilab), armazenados em freezer (previamente aliquotados) , colocar em banho-maria a 56 °C, por 1 hora, agitando suavemente a cada 15 minutos. Retirar o soro do banho-maria e resfriar em temperatura

ambiente. Em fluxo laminar, adicionar 10% de dimetilsulfoxido estéril (marca: Exôdo científica) ao volume desejado do soro com o complemento inativado. Armazenar a solução a -20 °C (freezer).

2. Manutenção das células *Speedy*

2. 1. Repique

Antes de iniciar o manuseio das células *Speedy*, ligar o banho-maria a 27 °C e colocar o meio LEIBOWITZ L-15 completo, a solução de PBS e a tripsina (item 1.4), que estavam armazenados na geladeira/freezer. Passar álcool 70% no fluxo e ligar a UV por 20 minutos. Decorrido este tempo, já pode iniciar o manuseio das células no fluxo. Para isso, retirar primeiramente o frasco de cultura da estufa de CO₂. No fluxo, desprezar o meio e lavar 2 vezes com 5 mL de PBS. Retirar o excesso com auxílio de micropipeta monocal. Adicionar 500 µL de tripsina (item 1.4), fechar e deitar o frasco para cobrir toda a superfície de células confluentes e aguardar, por 1 minuto, em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, desprender as células com leves batidas no fundo do frasco. Após o desprendimento, inativar imediatamente a tripsina, com 1,5 mL de meio LEIBOWITZ L-15 completo. Passar a suspensão celular por micropipeta monocal de 1 mL para obtenção de células isoladas. Dividir as células em novos frascos de cultura, ainda com auxílio de micropipeta monocal de 1 mL. Cada frasco de cultura confeccionado deve conter 5-7 mL de meio LEIBOWITZ L-15 completo, Incubar em estufa a 28 °C, sem injeção de CO₂.

2.2. Congelamento das células *Speedy*

Primeiramente, separar os tubos criogênicos e identificá-los com o tipo celular e data do experimento. Em seguida, ligar o banho-maria a 28 °C e colocar o meio LEIBOWITZ L-15 completo, a solução de PBS e a tripsina (item 1.4), que estavam armazenados na geladeira/freezer. A solução de congelamento deve ser descongelada a temperatura ambiente e não deve ser colocada no banho-maria. Passar álcool 70% no fluxo e ligar a UV, por 20 minutos. Decorrido este tempo, iniciar o manuseio das células no fluxo. Retirar o frasco de cultura da estufa e, no fluxo, desprezar o meio e lavar 2 vezes com 5 mL de PBS. Retirar o excesso com micropipeta monocal de 1 mL. Adicionar 500 µL de tripsina (item 1.4), fechar e deitar o frasco para cobrir toda a superfície de células confluentes e aguardar, por 1 minuto a TA. Decorrido esse tempo, desprender as células com leves batidas no fundo do frasco. Após o desprendimento, inativar imediatamente a tripsina, com 1,5 mL de meio LEIBOWITZ L-15 completo. Transferir a suspensão celular para tubo

Falcon estéril e centrifugar, por 10 minutos a 1000 rpm. Após a centrifugação, desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet com 2 mL da solução de congelamento. Dividir o conteúdo do tubo Falcon em 2 tubos criogênicos. Levar os tubos criogênicos imediatamente para o freezer -80 °C, por até 16 horas (tempo ideal: 10 horas). Após este período, acondicionar os tubos criogênicos em nitrogênio líquido.

2.3. Descongelamento das células *Speedy*

Antes de iniciar o manuseio das células, ligar o banho-maria a 28 °C e colocar o meio LEIBOWITZ L-15 completo, a solução de PBS que estavam armazenados na geladeira. Passar álcool 70% no fluxo e ligar a UV, por 20 minutos. Decorrido este tempo, já pode iniciar o manuseio das células no fluxo. Remover o tubo criogênico do nitrogênio líquido e coloca-lo em banho-maria a 28 °C, apenas até descolar o pellet (não esperar ficar totalmente descongelado). Verter o pellet de células ainda congelado em 10 mL de meio LEIBOWITZ L-15 completo. Homogeneizar a suspensão celular com auxílio de micropipeta monocal de 1 mL e centrifugar, por 10 minutos a 1000 rpm. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 1 mL de meio LEIBOWITZ L-15 completo. Transferir a suspensão celular para um frasco de cultura com 9 mL de meio LEIBOWITZ L-15 completo e incubar, a 28 °C, em estufa sem injeção de CO₂.

APÊNDICE C - PROCEDIMENTOS E SOLUÇÕES PARA MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR HepG2/C3A

1. Soluções para manutenção de células HepG2/C3A

1.1. Meio DMEM incompleto

Em um balão de 1 000 mL, dissolver 9,77 g de meio DMEM (marca: Cultilab), 2,2 g de bicarbonato de sódio (marca: Qhemis) e 4,5 g de glicose (marca: Impex) em 800 mL de água ultrapura e agitar até completa dissolução. Adicionar 1 mL da solução de antibiótico antimicótico (penicilina - streptomicina, 10.000U.I/10mg, marca: Cultilab), agitar e completar o volume para 1 000 mL com água ultrapura. Corrigir o pH para 7,2, utilizando solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. Filtrar em membrana estéril de porosidade 0,22 µm e aliquotar em frascos de vidro de 100 mL. Armazenar os frascos em geladeira, entre 2 a 6 °C.

1.2. Meio de cultura DMEM completo

Em fluxo laminar, adicionar soro bovino fetal (marca: Cultilab) estéril ao meio DMEM em uma proporção de 10%. Armazenar os frascos em geladeira, entre 2 a 6 °C.

1.3. Solução de tampão fosfato salino (PBS)

Dissolver, em balão volumétrico, 0,2 g de cloreto de potássio (marca: Exodo científica), 0,2 g de fosfato monobásico de potássio (marca: Synth), 8,0 g de cloreto de sódio (marca: LS Chemicals) e 1,15 g de fosfato dibásico de sódio anidro (marca: Nuclear) em 1000 mL de água ultrapura. Manter sob agitação até a completa solubilização. Corrigir o pH para 7,4, com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. Aliquotar a solução de PBS em frascos de vidro de 250 mL e autoclavar por 20 minutos a 120 °C/1 atm. Armazenar a solução em geladeira.

1.4. Tripsina EDTA 0,25%

Esterilizar a solução de Tripsina EDTA 0,25% (marca: Sigma) por filtração em membrana com tamanho de poro de 0,22 µm e aliquotar em frascos de vidro pequenos (50 mL). Armazenar os frascos de geladeira.

1.5. Solução de congelamento

Em fluxo laminar, preparar o soro com complemento inativado. Para isso, descongelar os frascos com 50 mL de soro bovino fetal (marca: Cultilab) armazenados em freezer (previamente aliquotados) e, posteriormente, coloca-los em banho-maria a 56 °C, por 1 hora, agitando suavemente a cada 15 minutos. Retirar o soro do banho-maria e resfriar em temperatura ambiente. Em fluxo laminar, adicionar 10% de dimetilsulfóxido estéril (marca: Exôdo científica) ao volume desejado do soro com o complemento inativado. Armazenar a solução a -20 °C (freezer).

2. Manutenção das células HepG2/C3A

2.1. Repique das células HepG2/C3A

Antes de iniciar o manuseio das células HepG2/C3A, ligar o banho-maria a 37 °C e colocar o meio DMEM completo, a solução de PBS e a tripsina 0,25%, que estavam armazenados na geladeira. Passar álcool 70% no fluxo e ligar a UV, por 20 minutos. Decorrido este tempo, já pode-se iniciar o manuseio das células no fluxo. Retirar o frasco de cultura da estufa de CO₂. No fluxo, desprezar o meio e lavar 2 vezes com 5 mL de PBS. Retirar o excesso com auxílio de pipeta Pasteur. Adicionar 500 µL de tripsina 0,25%, fechar e deitar o frasco para cobrir toda a superfície de células confluentes. Colocar novamente na estufa a 37 °C, por 5 minutos. Decorrido os 5 minutos, retirar o frasco da estufa e desprender as células com leves batidas no fundo do frasco. Após o desprendimento, inativar imediatamente a tripsina, com 1,5 mL de meio DMEM completo. Passar a suspensão celular por seringa de insulina estéril de 1 mL ,para obtenção de células isoladas. Dividir as células em novos frascos de cultura, com auxílio de pipeta Pasteur. Cada frasco de cultura confeccionado deve conter 5 mL de meio DMEM completo. Incubar a 37 °C em estufa com injeção de 5 % de CO₂.

2.2. Congelamento das células HepG2/C3A

Antes de iniciar o manuseio das células, ligar o banho-maria a 37 °C e colocar o meio DMEM completo, a solução de PBS e a tripsina 0,25%, que estavam armazenados na geladeira. A solução de congelamento deve ser descongelada a temperatura ambiente e não deve ser colocada no banho-maria. Passar álcool 70% no fluxo e ligar a UV, por 20 minutos. Decorrido este tempo, já pode iniciar o manuseio das células no fluxo. Para isso, retirar o frasco de cultura da estufa de CO₂ e, no fluxo, desprezar o meio e lavar 2 vezes com 5 mL de PBS. Retirar o excesso com pipeta Pasteur. Adicionar 500 µL de tripsina

0,25%, fechar e deitar o frasco. Colocar novamente na estufa a 37 °C, por 5 minutos. Decorrido os 5 minutos, retirar o frasco da estufa e desprender as células com leves batidas no fundo do frasco. Após o desprendimento, inativar imediatamente a tripsina, com 1,5 mL de meio DMEM completo. Passar a suspensão celular por seringa de insulina estéril de 1 mL, para obtenção de células isoladas. Transferir a suspensão celular para tubo Falcon estéril e centrifugar, por 10 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet com 2 mL da solução de congelamento. Dividir o conteúdo do tubo Falcon em 2 tubos criogênicos., Levar os tubos criogênicos imediatamente para o freezer -80 °C, por 10 horas. Após este período, acondicionar os tubos criogênicos em nitrogênio líquido.

2.3. Descongelamento das células HepG2/C3A

Antes de iniciar o manuseio das células, ligar o banho-maria a 37 °C e colocar o meio DMEM completo, que estava armazenado na geladeira. Passar álcool 70% no fluxo e ligar a UV, por 20 minutos. Decorrido este tempo, já pode iniciar o manuseio das células no fluxo. Remover o tubo criogênico do nitrogênio líquido e coloca-lo em banho-maria a 37 °C, apenas até descolar o pellet (não esperar ficar totalmente descongelado). Verter o pellet de células ainda congelado em 10 mL de meio DMEM completo. Homogeneizar a suspensão celular com auxílio de pipeta Pasteur e centrifugar, por 10 minutos a 1500 rpm. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 1 mL de meio DMEM completo. Transferir a suspensão celular para um frasco de cultura com 9 mL de meio DMEM completo e incubar a 37 °C em estufa com injeção de 5 % de CO₂.

APÊNDICE D - SOLUÇÕES PARA O ENSAIO DO COMETA

1. Agarose Comum

Em um béquer, adicionar 3 g de agarose comum (Ultra Pure TMAgarose, marca: Invitrogen) e 200 mL de PBS. Ferver em forno micro-ondas, até a completa dissolução da agarose. Caso esta não seja utilizada imediatamente para a pre-gelatinização das lâminas, aguardar o resfriamento e a solidificação da mesma, para o posterior armazenamento em geladeira. Esta solução deve ser utilizada para a pre-gelatinização das lâminas. Para isso, derreter a agarose armazenada em forno micro-ondas e colocar em banho-maria a 60 °C. Mergulhar as lâminas na agarose, até atingir a parte fosca, e remover o excesso do lado oposto, com auxílio de papel higiênico. Depositar as lâminas pré-gelatinizadas em uma superfície reta para a secagem. Deixar secar e armazenar as lâminas em geladeira.

2. Agarose LMP (Low Melting Point)

Em um béquer, adicionar 0,25 g de agarose de baixo ponto de fusão- LMP (marca: Invitrogen) e 50 mL de PBS. Ferver em forno micro-ondas, até a completa dissolução da agarose. Aliquotar em frascos de 5 mL, aguardar a solidificação e armazenar em geladeira.

3. Solução Lise Estoque

Em um béquer, dissolver 73,05 g de cloreto de sódio, 18,6 g de EDTA-titriplex (marca: Dinamica); 0,6 g de Tris (marca: Sigma) em 445 mL de água ultrapura. Para a completa solubilização, o pH deve ser corrigido para 10, com a adição de solução de hidróxido de sódio. Armazenar a solução de lise estoque a temperatura ambiente, em frasco âmbar.

4. Solução Lise Final

Em uma proveta, adicionar 1 mL de Triton X-100 (marca: Impex), 10 mL de dimetilsulfoxido (marca: Êxodo científica) e 89 mL da solução de lise estoque. Com auxílio de um papel parafilme, agitar a solução. Transferir para a cubeta de vidro horizontal e armazenar em geladeira.

5. EDTA 200 mM

Dissolver em um béquer, 7,45 g de EDTA-tritriplex (marca: Dinamica) em 100 mL de água ultrapura. Corrigir o pH 10,0, com a adição de solução de hidróxido de sódio.

6. NaOH 10N

Dissolver em um béquer, 40 g de hidróxido de sódio (marca: Impex) em 100 mL de água ultrapura. Armazenar a temperatura ambiente, em frasco plástico protegido de luz.

7. Tampão de eletroforese

Em um béquer, adicionar 5 mL de EDTA-tritriplex 200 mM, e 30 mL de NAOH 10N em 1000 mL de água ultrapura. Verificar se o pH está maior que 13. Preparar 1,5 L na hora da utilização. O tampão deve estar gelado no momento do uso. Para isso, reservar água ultrapura na geladeira no dia anterior a corrida.

8. Solução de Neutralização

Dissolver, em um béquer, 24,25 g de Tris (marca: LGC Biotecnologia) em 475 mL de água ultrapura. Corrigir o pH para 7,5, com solução de ácido clorídrico. Armazenar em temperatura ambiente ou em geladeira, em frasco de vidro.

9. Solução de GelRed

Em um frasco recoberto com papel alumínio, adicionar 15 µL da solução de GelRed (marca: Biotium), 5 mL de solução de cloreto de sódio-NaCl 1M (preparada pela dissolução de 58,43 g de NaCl - marca: LS Chemicals – em 1 L de água ultrapura) e 45 mL de água ultrapura.

APÊNDICE E - RESULTADOS DO ENSAIO DO COMETA PARA AS LINHAGENS CELULARES *Speedy* (tabela 1) e HepG2/C3A (tabela 2)

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 *Speedy*).

<i>Speedy</i>	Intensidade (%) de DNA na cauda
	Média ± DP
CN	1,242 ± 0,286
CP	27,868 ± 4,666*
T1	1,419 ± 0,748
T2	1,035 ± 0,122
T3	1,547 ± 0,582

Valores expressos em Média ± Desvio Padrão dos resultados da porcentagem de DNA na cauda de células *Speedy* expostas a diferentes tratamentos com associações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). T1 = 10% CAD + 0,1% de PUT; T2 = 5% de CAD + 0,1% de PUT; T3 = 5% de CAD + 0,01% de PUT. CN: controle negativo, CP: controle positivo. * estatisticamente significativo em relação ao CN (teste de Kruskal- Wallis/Dunn's (p<0,05).

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).

HepG2/C3A	Intensidade (%) de DNA na cauda
	Média ± DP
CN	2,749 ± 0,551
CP	31,770 ± 16,285*
T1	3,533 ± 1,616
T2	1,997 ± 0,566
T3	2,662 ± 1,600

Valores expressos em Média ± Desvio Padrão dos resultados da porcentagem de DNA na cauda de células HepG2/C3A expostas a diferentes tratamentos com associações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). T1 = 30% CAD + 10% de PUT; T2 = 20% de CAD + 30% de PUT; T3 = 20% de CAD + 10% de PUT. CN: controle negativo, CP: controle positivo. * estatisticamente significativo em relação ao CN (teste de Kruskal- Wallis/Dunn's (p<0,05).

APÊNDICE F - SOLUÇÕES PARA O ENSAIO DO MICRONÚCLEO

1. Citocalasina B, solução mãe (2 mg/ml)

Em fluxo laminar, adicionar em frasco estéril, 5 mg de citocalasina B (marca: Sigma) e 2,5 mL de dimetilsulfóxido (marca: Exôdo científica) estéril. Homogeneizar e fechar o frasco. Recobrir o frasco com papel alumínio, identificar e armazenar a -20 °C (freezer).

2. Citocalasina B, solução uso (350 µg/ml)

Em um frasco de congelamento estéril, adicionar o 1,65 mL de PBS estéril e 350 µL da solução mãe de citocalasina B. Fechar e recobrir o frasco com papel alumínio, identificar e armazenar a -20 °C (freezer).

3. Solução Hipotônica de Citrato de Sódio 0,01%

Em um béquer, dissolver o 1 g de citrato de sódio (marca: Impex) em 100 mL de água deionizada. Agitar até completa solubilização. Armazenar em frasco de 100 mL na geladeira. A solução de citrato de sódio 0,01% deve ser utilizada gelada na colheita do teste do micronúcleo. Esta solução hipotônica incha as células, facilitando a visualização dos micronúcleos.

4. Fixador Carnoy

Em uma proveta misturar 3 partes de álcool etílico absoluto (marca: Synth) para 1 parte de ácido acético glacial (marca: LS Chemicals). Preparar no momento do uso.

5. Giemsa

Em frasco âmbar, misturar 3 g de Giemsa (marca: Shynth) com 162 mL de glicerina (marca: Shynth). Deixar em banho-maria a 60 °C, *overnight*. Posteriormente, adicionar 252 mL de metanol (marca: Ecibra) e homogeneizar. Filtrar e armazenar, em geladeira, em frasco de vidro âmbar. Em uma proveta, misturar 50 mL de água com 2,5 mL da solução de Giemsa. Esta solução deve ser preparada no momento da utilização. Para a coloração, cobrir as lâminas com o corante, por 5 minutos. Lavar com água corrente e deixar secar a temperatura ambiente.

APÊNDICE G – RESULTADOS DO ENSAIO DE EXPRESSÃO GÊNICA PARA A LINHAGEM CELULAR HepG2/C3A

Figura 1: Apresentação gráfica do perfil de expressão de genes relacionados a danos no DNA e metabolismo de xenobióticos em 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.

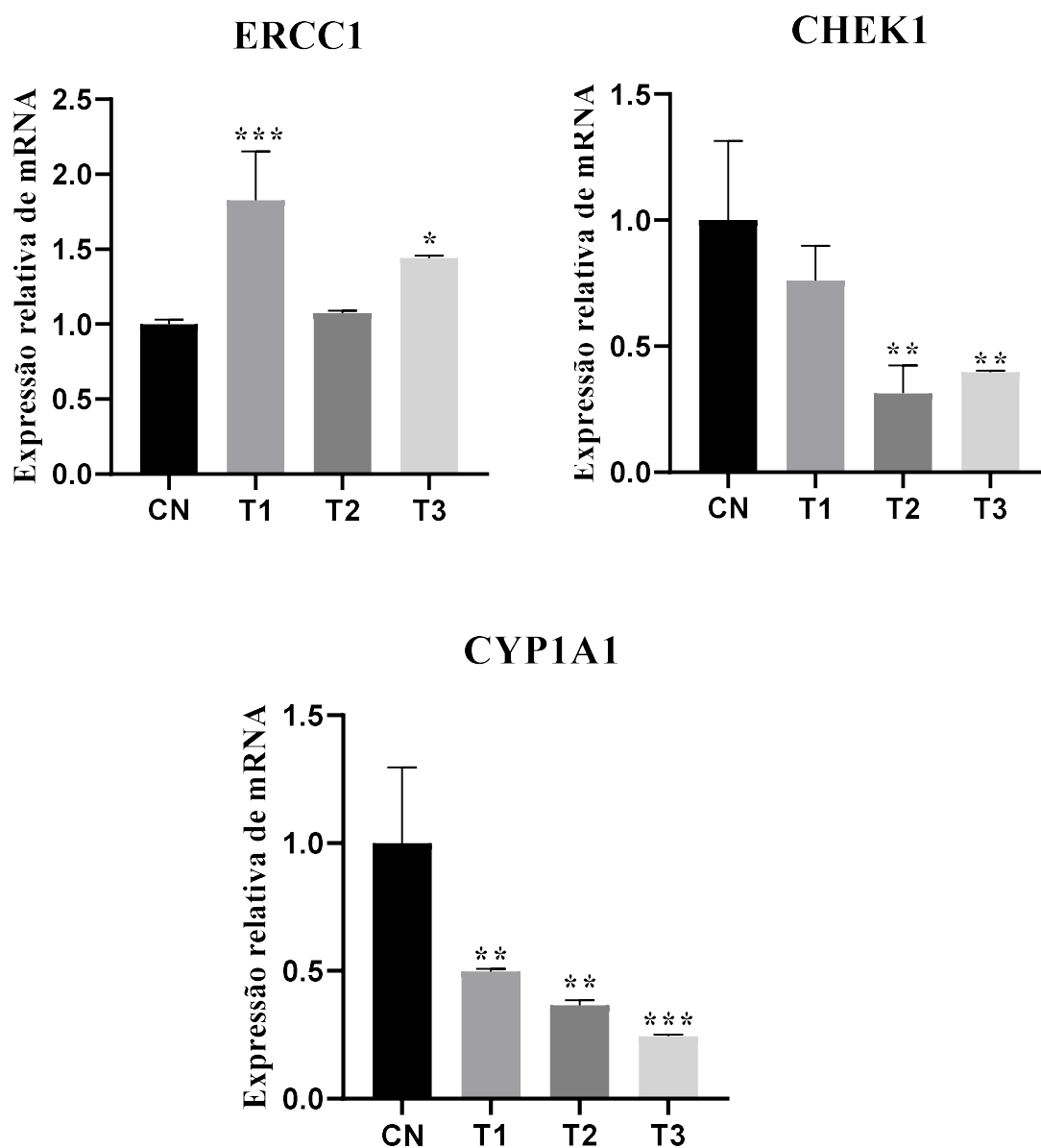


Figura 2: Apresentação gráfica do perfil de expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em células HepG2/C3A, expostas a diferentes concentrações da associação de CAD e PUT (Tabela 3). Os resultados foram normalizados com o gene endógeno da β -actina.

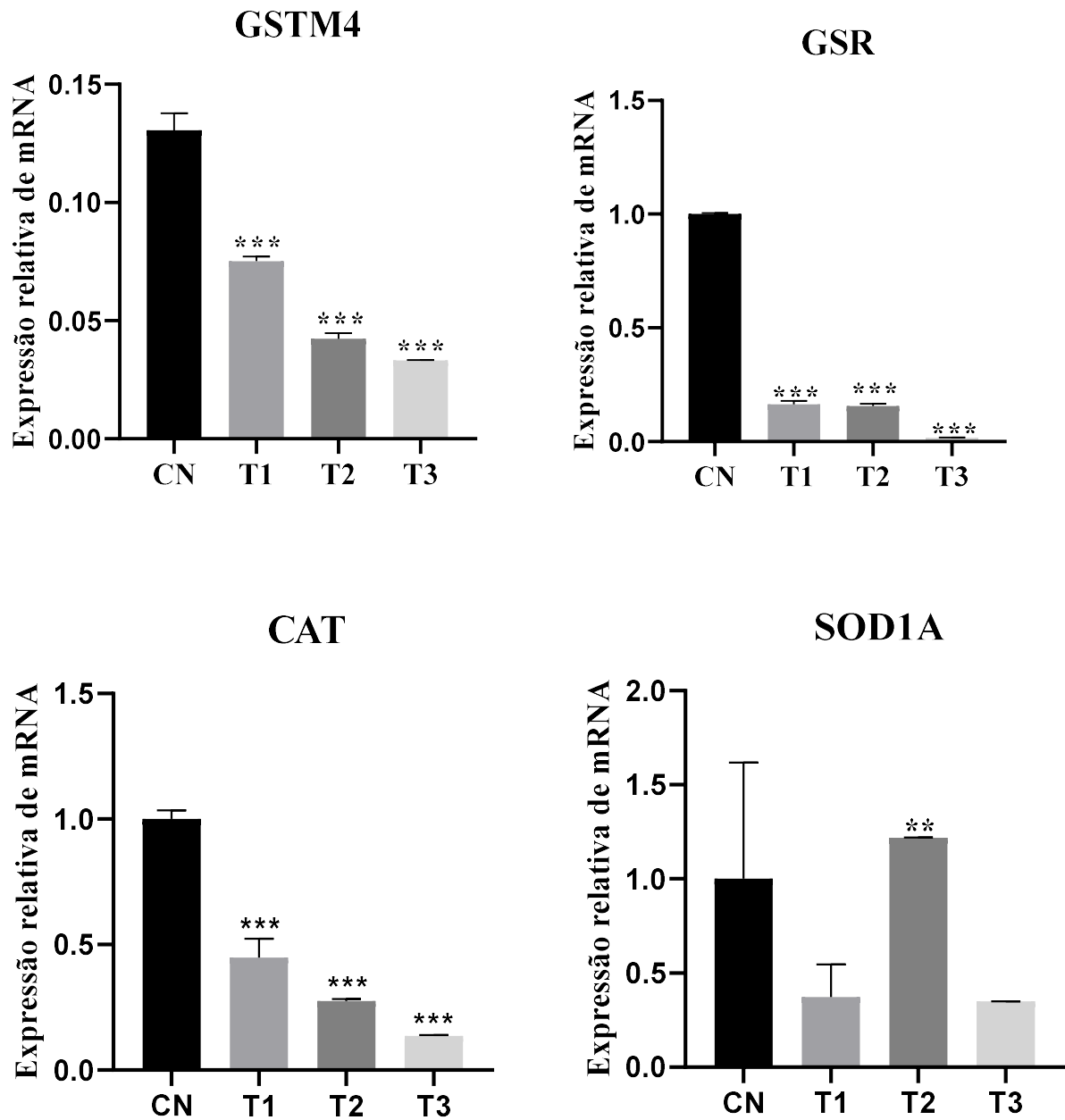


Figura 3: Apresentação gráfica do perfil de expressão de genes relacionados a morte celular e apoptose em células HepG2/C3A, expostas a diferentes concentrações da associação de CAD e PUT (Tabela 3). Os resultados foram normalizados com o gene endógeno da β -actina.

