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

**Avaliação dos efeitos citogenotóxicos da diamina
cadaverina, presente no necrochorume, por meio
de ensaios com sistemas testes *in vitro* e *in vivo***

RAQUEL VAZ HARA

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

Rio Claro - SP
2016

**Avaliação dos efeitos citogenotóxicos da diamina
cadaverina, presente no necrochorume, por meio de
ensaios com sistemas testes *in vitro* e *in vivo***

RAQUEL VAZ HARA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin Morales

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

Rio Claro - SP
2016

574.88 Hara, Raquel Vaz
H254a Avaliação dos efeitos citogenotóxicos da diamina
cadaverina, presente no necrochorume, por meio de ensaios
com sistemas testes in vitro e in vivo / Raquel Vaz Hara. - Rio
Claro, 2016
135 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales

1. Biologia molecular. 2. Contaminação ambiental. 3.
Allium cepa. 4. Cultura de células. 5. Ratos Wistar. 6.
Genotoxicidade. 7. Mutagenicidade. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação dos efeitos citogenotóxicos da diamina cadaverina, presente no necrochorume, por meio de ensaios com sistemas testes *in vitro* e *in vivo*

AUTORA: RAQUEL VAZ HARA

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
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP

Prof. Dr. MATHEUS MANTUANELLI ROBERTO
Fundação Hermínio Ometto, UNIARARAS

Profa. Dra. BRUNA DE CAMPOS VENTURA CAMARGO
Faculdade Sudoeste Paulista

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

Profa. Dra. LARISSA FONSECA ANDRADE VIEIRA
Departamento de Biologia / Universidade Federal de Lavras - Videoconferência

Rio Claro, 16 de setembro de 2016

Dedico esse trabalho a Deus e aos meus
grandes incentivadores, meus pais
Antônio e Tereza

*“Aqueles que passam por nós,
não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam
um pouco de nós.”*

(O pequeno príncipe - Antoine Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter abençoado a minha vida acadêmica, me dando forças para vencer os obstáculos e por ter colocado em meu caminho pessoas iluminadas que fizeram parte dessa trajetória. Por ser a minha coragem e fé nos momentos de medo - “Tudo posso Naquele que me fortalece...”

Aos meus queridos pais, Tereza e Antônio, pelo apoio, confiança, amor, carinho, companheirismo e, principalmente, por entenderem a minha ausência. Vocês são os grandes responsáveis por essa conquista e me fazem ser a pessoa mais feliz do mundo pelo simples fato de estarem sempre ao meu lado. Amor infinito e incondicional.

Ao meu irmão Ricardo e minha cunhada Maria Angelica, obrigada pela amizade, conversas e brincadeiras.

Aos meus avós, Chyoko Hara, Keizo Hara, Rosa Vaz e Pedro Vaz, pelo exemplo de vida.

A toda a minha família, tios e tias, primos e primas, que não citarei os nomes porque Deus, com toda a sua bondade, me presenteou com uma família grande e que mesmo com alguns distantes estão guardados no meu coração com belas lembranças.

Ao meu namorado Igor Jardim, que chegou no final do segundo tempo, mas foi fundamental para a conclusão desse trabalho. Obrigada pela companhia enquanto eu finalizava esse trabalho, pela paciência, pelo colo, pelos mimos, por me trazer paz, amor e carinho. Te amo demais! E aos seus pais, D. Rosa e Jossue, por me acolherem e cuidarem tão bem de mim, obrigada por tudo!

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marin Morales, por permitir que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa. Sou eternamente grata pela oportunidade. Obrigada pela paciência, dedicação, amizade, apoio, pela orientação e, principalmente, por ser um exemplo de profissional e pessoa.

A todos os meus amigos e colegas mutagênicos: Bairral, Camila, Cris (mini-mini), Cleiton, Franco, Jaque pira (Pedro), Jorge, Laís, Leticia Gigeck, Leticia Gonçalves, Leticia, Bulas, Márcia (Julinha), Maria Tereza, Matheus, Michele, Nádia, Thays, William, Samatha, Priscila, Mileni, pelo convívio mais que especial, pelas risadas e conversas, por fazer meus dias mais alegres. Especialmente, aos meus amigos do “grupo Lab”, pelo convívio fora do laboratório, pelos conselhos, pelos desabafos, vocês se tornaram grandes amigos que eu levarei no meu coração para sempre.

Às amigas de toda vida, Carol, Gabi, Luana e Thaís, sempre presentes em minha vida. Simplesmente uma amizade eterna!

Às amigas “PaSSSas”, Andrea e Talita, por essa amizade que cresce a cada dia, pela parceria, conversas, tapiocas, zumbas, shopping de 12 horas, que venham muito mais aventuras para nós.

À amiga, Maria Tereza, pelo convívio em casa, pela amizade de todas as horas, pela diversão garantida. Obrigada por ser a minha família Rioclarense e me ajudar em todos os momentos.

À amiga Michele, por todas as inúmeras ajudas no inglês e nas traduções. Muito obrigada pela sua amizade.

Ao amigo Franco, pela parceria nesse doutorado, pelas inúmeras idas à Araras, pelas trocas de conhecimento, por ser o braço direito dessa pesquisa, pela amizade, e que tenhamos muito sucesso nas próximas etapas.

Às minhas orientadas, Cris, Gabi, Lais e Katharine, que acompanharam todo o período experimental com os ratos, extremamente responsáveis pelo sucesso desses experimentos, no qual eu muito mais aprendi do que ensinei.

À Profa. Grasiela Severi-Aguiar, por auxiliar nos experimentos com ratos e por abrir as portas da UNIARARAS para a realização dos experimentos.

À UNIARARAS, por permitir o desenvolvimento dos experimentos com ratos e por fornecer todos os materiais utilizados.

À minha co-orientada, Leticia Gigeck, pela oportunidade de orientá-la, com quem eu também aprendo muito.

À amiga Tânia e sua família, uma amizade essencial que quero levar por toda a minha vida. Obrigada por me acolherem nos momentos difíceis, pela amizade, carinho, conversas, preocupações, risadas, bafões, pelos foras, e muitas outras coisas que tornaram essa amizade sólida e sincera.

Ao colega Thiago Gazoni, por trazer as células Speedy para o Brasil e que me auxiliou na implantação dessa linhagem no Laboratório de Mutagênese.

À capes, pelo apoio financeiro.

A todos os professores do departamento de biologia, área biologia celular e molecular, pela transmissão de conhecimento durante o mestrado.

Aos técnicos do departamento de Biologia (Gerson, Roberta e Mônica) e aos técnicos da UNIARARAS (Renata, Pablo, Carol e Dani), obrigada pela ajuda nesse trabalho.

A todos os colegas do departamento de biologia pelo convívio agradável de todos os dias.

Enfim... A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho! **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

A decomposição dos corpos é considerada uma fonte de poluição, devido à produção de um líquido orgânico denominado de necrochorume, que, além de comprometer o meio ambiente, pode causar sérios problemas à saúde humana. Na composição desse líquido, encontra-se a amina biogênica cadaverina ($C_5H_{14}N_2$), uma substância altamente tóxica, produzida durante a putrefação de tecidos orgânicos de corpos em decomposição. Considerando que os cemitérios são locais de disposição de cadáveres e que a decomposição dos corpos gera substâncias tóxicas, como a cadaverina, torna-se muito importante a avaliação dos comprometimentos ambientais que possam ser desencadeados por este contaminante. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e oxidativos de diferentes concentrações da diamina cadaverina, por meio de ensaios ecotoxicológicos realizados com sistemas-teste *in vitro* e *in vivo*. Foram utilizados três sistemas-teste distintos: *Allium cepa*, células de anfíbio (Speedy) e células de hepatoma humano (HepG2) mantidas em cultura e ratos Wistar. Em *A. cepa*, foram aplicados os testes de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN) em células meristemáticas, os quais são indicativos de efeitos genotóxico e mutagênico, respectivamente. Foram testadas as concentrações 61,5, 184,5, 307,5, 430,5 e 553,5 mg/L. A elevada frequência de aderências cromossômicas e células binucleadas inferem uma ação aneugênica para a cadaverina. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa o Índice Mitótico (IM) e no Índice de Mutagenicidade (IMut). Em relação ao teste da resazurina realizado em cultura de células, utilizando células Speedy e HepG2, foi possível observar um efeito citotóxico para ambas as linhagens, sendo as células Speedy mais sensíveis que as células HepG2. O ensaio do cometa realizado com as mesmas linhagens celulares não apresentaram danos significativos no DNA. No entanto, no teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese houve um aumento significativo na frequência de brotos (HepG2 – 184,5 e 307,5 mg/L; Speedy – 30,75, 61,5 e 123,0 mg/L), pontes (Speedy – 30,75, 61,5 e 123,0 mg/L) e MN (HepG2 – 184,5 e 307,5 mg/L; Speedy – 123,0 mg/L), indicando uma ação genotóxica e mutagênica para essa diamina. Os ensaios com ratos machos Wistar, foram realizados com a administração por via oral da cadaverina, nas doses de 15, 30 e 60 mg/Kg/dia, por um período de exposição de 56 dias consecutivos. Para investigar o potencial genotóxico em ratos, foi realizado o ensaio do cometa com sangue periférico, a partir das medições da

intensidade, comprimento e momento da cauda, foi possível observar que a cadaverina não causou diferença significativa de quebras no DNA, comparando-se com o controle negativo. Pelo teste do MN com células de medula óssea foi possível observar que a cadaverina não induziu citotoxicidade, pois não houve diferença significativa na taxa de Eritrócitos policromáticos (PCE)/Eritrócitos normocromáticos (NCE). Já para as frequências de MN em PCE, houve um aumento significativo nos animais tratados com a concentração de 30 mg/Kg de cadaverina, representando uma instabilidade genômica. A partir desses resultados podemos inferir, novamente, uma ação aneugênica da cadaverina. Por fim, foi avaliada a capacidade da cadaverina induzir alterações no equilíbrio redox das células hepáticas de ratos Wistar. Foram quantificados os grupos sulfidrilas (-SH), os níveis de glutathiona (GSH), a atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona S-transferase (GST) e a peroxidação lipídica (método TBARS). Foi possível observar um aumento significativo dos valores quantificados nos ensaios para avaliação dos grupos -SH, para o grupo tratado com 15 mg/Kg de cadaverina. Embora alguns resultados não tenham apresentado diferenças estatisticamente significativas, observamos uma ligeira diminuição nos níveis de GSH e um aumento da peroxidação lipídica, para todas as concentrações testadas. Esses dados indicam que a diminuição da GSH pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), que resultam na peroxidação lipídica no fígado. Quanto às atividades das enzimas CAT, SOD e GST, não houve resultados significativos para nenhuma das concentrações testadas. Portanto, os resultados sugerem que a cadaverina pode apresentar efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e oxidativos, dependendo do organismo testado. Assim, pelos métodos aplicados nesta pesquisa foi possível também inferir alguns mecanismos de ação e, assim, contribuir para o conhecimento da toxicidade da cadaverina, uma vez que há poucos estudos realizados na área ecotoxicológica.

Palavra-chave: *Allium cepa*, Cultura de células, ratos Wistar, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, estresse oxidativo

ABSTRACT

The decomposition of bodies is considered a pollution resource due to the production of an organic liquid denominated as necrochorume that, besides compromising the environment, it can cause serious problems to human health. In the composition of this liquid, the amine cadaverine can be found ($C_5H_{14}N_2$), a highly toxic substance, produced during putrefaction of organic tissues of the bodies in decomposition. Whereas the cemeteries are disposal locals for dead bodies and that the decomposition of the bodies generates toxic substances, like cadaverine, the evaluation of the compromising of the environment, which can be unleashed by this contaminant, becomes very important. Therefore, the present study aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic, mutagenic and oxidative effects of different concentrations of the diamine cadaverine, by ecotoxicological assays performed with the test systems *in vitro* and *in vivo*. Three different test organisms were used: *Allium cepa*, HepG2 and Speedy cells maintained in culture and Wistar rats. With the *A. cepa* organism, tests for chromosomal aberrations and micronucleus in meristematic cells were applied, which are indicatives of genotoxic and mutagenic effects respectively. The concentrations of 61,5, 184,5 e 307,5, 430,5 e 553,5 mg/L were tested. The elevated frequency of chromosomal adherence and binucleated cells infer an aneugenic action to the cadaverine. Besides, there was no statistically significant difference in the Mitotic Index (MI) values and to the Mutagenicity Index (MutI). Regarding the resazurin assay, performed with cell culture, by using human hepatoma cells (HepG2) and amphibian cells (Speedy), it was possible to observe that the cadaverine was cytotoxic for both cell lines, though, the Speedy cells were more sensible than the HepG2 cells. The comet assay performed with the same cell lines did not show significant damages on the DNA. However, in the cytokinesis-block micronucleus technique there was a significant increase in the frequency of nuclear buds (HepG2 – 184,5 e 307,5 mg/L; Speedy – 30,75, 61,5 e 123,0 mg/L), nuclear bridges (Speedy – 30,75, 61,5 e 123,0 mg/L) and MN (HepG2 – 184,5 e 307,5 mg/L; Speedy – 123,0 mg/L), which indicates a genotoxic and mutagenic action to this diamine. The assays with male Wistar rats were performed by oral administration of the cadaverine, in doses of 15, 30 e 60 mg/kg/day, for an exposition period of 56 consecutive days. To investigate the genotoxic potential in rats, the comet assay was performed with peripheral blood and, from the measurements of the intensity, length and moment of the tail, it was possible to observe that the cadaverine did not cause a

significant difference in the DNA breaks when compared to the negative control. By the MN test with bone marrow cells was possible to observe that the cadaverine did not induce cytotoxicity because there was not a significant difference in the Polychromatic Erythrocytes (PCE)/Normochromatic Erythrocytes (NCE) rate. To the MN frequency in PCE, there was a significant increase in the animals treated with the concentration of 30 mg/Kg of cadaverine, considered as an indicative of genomic instability. From these results, we can infer, again, an aneugenic action of the cadaverine. Lastly, the ability of the cadaverine to induce changes in the redox balance of the hepatic cells of Wistar rats was evaluated. The sulfhydryl groups (-SH), GSH levels, the activity of the CAT, SOD, GST enzymes and the lipidic peroxidation (TBARS) were quantified. It was possible to observe a significant increase of the values quantified in the assays to evaluate sulfhydryl groups (-SH), in the group treated with 15 mg/Kg of cadaverine. Although some results have not shown statistically significant difference, it was observed a slight decrease in the GSH levels and an increase in the MDA levels for all tested concentrations. These data indicate that the decrease in the GSH can generate oxygen-reactive species (ERO), which result in the lipidic peroxidation in the liver. Regarding the activity of the enzymes CAT, SOD and GST, there were not significant results for none of the tested concentrations. Thus, the results suggest that the cadaverine can present cytotoxic, genotoxic, mutagenic and oxidative effects, depending on the tested organism. Thereby, by the applied methods in this research, it was also possible to infer some action mechanisms and, thus, contribute to the knowledge of the cadaverine's toxicity, once that a few studies have been performed in the ecotoxicological area.

Keywords: *Allium cepa*, cells culture, Wistar rats, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, oxidative stress

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3R	Replacement, Reduction e Refinement ou Redução, refinamento e substituição
Abs	Absorbância
AC	Aberrações Cromossômicas
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CL	Concentração Letal
CN	Controle Negativo
CO ₂	Dióxido de Carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Controle Positivo
DNTB	5-5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) ou ácido ditionitrobenzoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathiona Reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
HepG2	Células de Hematoma Humano
IDC	Índice de Divisão Celular
IM	Índice Mitótico
LMP	Low Melting Point ou Agarose de baixo ponto de fusão
MDA	Malondialdeído
MEM	<i>Meio Mínimo Essencial Eagle</i> ou Meio essencial mínimo Eagle
MMS	metilmetano sulfonato
MN	Micronúcleo
NCE	Eritrócito Normocromático
NMP	Normal Melting Point ou Agarose normal
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development ou Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCE	Eritrócitos Policromáticos
SBF	Soro Bovino Fetal
-SH	Grupo Sulfidríla
SOD	Superóxido Dismutase
Speedy	Fibroblasto de anfíbio
TBA	thiobarbituric acid ou ácido tiobarbitúrico
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances ou Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
UNEP	United Nations Environmental Program ou Programa das Nações Unidas para o meio ambiente

USEPA	US Environmental Protection Agency ou Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
WHO	World Health Organization ou Organização mundial de saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Cemitério x Contaminação ambiental.....	18
2.2. Necrochorume.....	20
2.3. Aminas Biogênicas	20
2.3.1. Cadaverina	21
2.4. Bioindicadores <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	23
2.4.1. <i>Allium cepa</i>	23
2.4.2. Cultura de células	24
2.4.3. Ratos Wistar	25
2.5. Biomarcadores	27
2.5.1. Teste de aberrações cromossômicas (AC).....	27
2.5.2. Teste de citotoxicidade – Resazurina	28
2.5.3. Ensaio do cometa.....	29
2.5.4. Teste do MN.....	31
2.5.5. Estresse oxidativo.....	32
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Substância Testada.....	36
4.2 Bioensaio com <i>A. cepa</i>	36
4.2.1 Taxa de germinação.....	36
4.2.2 Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em Células Meristemáticas de <i>A. cepa</i>	37
4.3 Bioensaios com Cultura de Células (HepG2 e Speedy)	38
4.3.1 Ensaio de viabilidade celular - Teste da Resazurina	38
4.3.2 Tratamento para o ensaio do cometa e o Teste do MN com bloqueio de citocinese	40
4.3.3 Ensaio do Cometa.....	41
4.3.4 Teste do Micronúcleo	42
4.4 Bioensaios com ratos Wistar.....	43
4.4.1 Eutanásia e coleta de materiais biológicos	44

4.4.2	Ensaio do cometa.....	44
4.4.3	Teste do Micronúcleo em Medula Óssea	45
4.4.4	Quantificação do estresse oxidativo no Fígado	46
5	RESULTADOS.....	50
	Artigo 1: Efeitos genotóxicos da diamina cadaverina, avaliados por meio do sistema teste <i>Allium cepa</i>	51
	Artigo 2: Potencial genotóxico e mutagênico da cadaverina sobre células de fígado humano (HepG2) e células de anfíbio (Speedy).....	66
	Artigo 3: Avaliação da atividade genotóxica e mutagênica da cadaverina para ratos, após exposição oral.....	89
	Artigo 4: Evidências de estresse oxidativo em fígado de ratos Wistar submetidos a diferentes concentrações de cadaverina.....	105
6	CONCLUSÕES GERAIS	118
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

1. INTRODUÇÃO GERAL

Devido ao crescimento urbano e industrial, tem havido um aumento da contaminação ambiental, gerando vários problemas aos ecossistemas e à saúde humana. Essa problemática tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas que visam buscar novas ferramentas que identifiquem o tipo de contaminação, as possíveis prevenções e soluções para o problema (CATETE, 2010). Deste modo, na tentativa de implantar construções ambientalmente corretas e, assim, evitar alterações nos ambientes, os cemitérios estão sendo foco de atenção, devido ao comprometimento que conferem ao ambiente onde se encontram (SILVA et al., 2012).

Atividades industriais, agrícolas e urbanas causam sérios problemas ambientais, devido ao lançamento dos seus resíduos nas águas superficiais. Esses resíduos, muitas vezes, contêm substâncias tóxicas que impactam os recursos hídricos, dificultando a disponibilidade de água de boa qualidade para a população. Devido a esse fato, a água subterrânea representa uma alternativa para o abastecimento público, pois é considerado muito abundante e ainda de boa qualidade. Porém, a contaminação dessa água é praticamente irreversível, devido aos altos investimentos necessários para sua recuperação, à complexidade do tratamento e a demora de se obterem resultados satisfatórios (MATOS, 2001).

O necrochorume é o resíduo líquido gerado pela decomposição cadavérica, comum em cemitérios, pode se infiltrar no solo contaminando essa malha ambiental, ou ainda, ser carregado pela água da chuva até os aquíferos subterrâneos, levando para esses ambientes produtos químicos orgânicos e inorgânicos potencialmente tóxicos (BOUWER, 1978). Essa problemática envolve a necessidade de se estabelecerem critérios rígidos para a manutenção de cemitérios já existentes e para o licenciamento de novas instalações. Sendo assim, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), visando preservar o meio ambiente em torno de cemitérios, elaborou a resolução nº 335/2003, que dispõe critérios específicos para implantação de novos cemitérios e determina um prazo para que os já existentes se adequem às exigências da legislação. Porém, a preocupação com esse tipo de contaminação ainda persiste, uma vez que, mesmo respeitando as medidas de proteção ambiental, os problemas de saúde pública continuam sendo preocupantes (LELI et al., 2012).

Esse líquido produzido pela decomposição dos corpos e principal causador de contaminação ambiental proveniente dos cemitérios, é composto por microorganismos, metais e substâncias orgânicas, como as aminas cadaverina e a putrescina (CAŁKOSIŃSKI et al., 2015). A cadaverina ($C_5H_{14}N_2$) é uma amina biogênica, produzida pela descarboxilação do

aminoácido lisina presente na matéria orgânica. Essa diamina alifática está presente em diversos processos biológicos, como durante o crescimento e o desenvolvimento dos organismos vivos (BAGNI; TASSONI, 2001). Porém, níveis anormais desta substância estão relacionados com o aparecimento de doenças, incluindo o câncer (GERNER; MEYSKENS, 2004). Segundo Stratton et al. (1991), aminas biogênicas putrefativas, como a cadaverina, constituem um grupo que confere biotoxicidade.

Segundo Ribeiro (2003), a avaliação do potencial mutagênico de um composto químico ou físico faz parte dos testes regulatórios da genética toxicológica. Assim, para esse tipo de análise é muito importante a realização de ensaios *in vivo* e *in vitro*, pois eles são ferramentas eficientes na detecção de mutações e alterações cromossômicas, que podem ser aplicadas a diversos organismos como plantas, insetos e mamíferos, dentre estes o homem (BRUSICK, 1987).

A avaliação dos efeitos tóxicos de substâncias químicas, nas mais diferentes concentrações e tempos de exposição, tem sido aplicada em uma variedade de ensaios, incluindo os citogenéticos (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008). A utilização desses testes permite monitorar a extensão de uma poluição e avaliar a toxicidade de uma substância específica (MATSUMOTO, 2004; MATSUMOTO et al., 2006).

Dentre os modelos vegetais superiores, a espécie *A. cepa* tem sido indicada como um eficiente organismo-teste para o desenvolvimento de estudos na área de ecotoxicologia, pois permite avaliar mecanismos de ação e determinar efeitos de substâncias químicas (BIANCHI et al., 2011; MAZZEO et al., 2011; NUNES et al., 2011; HERRERO et al., 2012; BIANCHI et al., 2016; VENTURA-CAMARGO et al., 2016). O teste de *A. cepa* é considerado de fácil execução e as características citogenéticas da espécie são favoráveis para a avaliação das aberrações cromossômicas (KURAS et al., 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

A cultura de células de diversas linhagens de diferentes organismos teste também são utilizadas em muitas pesquisas que envolvem a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de contaminantes ambientais (MAZZEO et al. 2013; MANZANO et al., 2015; BIANCHI et al., 2015; BONOMO et al., 2016). A aplicabilidade de ensaios com esses sistemas-teste apresenta vantagens, por se tratar de uma técnica reprodutível, rápida, sensível e financeiramente acessível (ROGERO et al., 2003).

O uso de animais em pesquisa científica tem contribuído para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Mesmo com o desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas em sistemas *in vitro*, os modelos *in vivo* apresentam vantagens na obtenção de informações dos

efeitos globais que um determinado agente pode desencadear em um organismo (RIBEIRO et al., 1995; SALÉN, 1995; SNITKOFF, 2004). Animais de várias espécies são utilizados como bioindicadores, mas os camundongos e ratos se destacam por serem sistemas biológicos mais conhecidos e muito utilizados cientificamente (CHORILLI et al., 2007).

A associação do ensaio do cometa com o teste do MN, realizados sob as mesmas condições experimentais, é uma estratégia muito interessante para estabelecer uma correlação entre o composto químico e o seu possível efeito no DNA (VAN GORTHEM et al., 1997). Vários estudos têm aplicado esses dois ensaios em diferentes linhagens celulares animais, incluindo células humanas, obtendo resultados satisfatório quanto ao potencial genotóxico e/ou mutagênico de substâncias químicas (VAN GOETHEM et al., 1997; HARTMANN et al. 2001; MAZZEO et al. 2013; BIANCHI et al., 2015; GAJSKI et al. 2016). Em pesquisas toxicológicas, esses ensaios também são aplicados em células de sangue periférico e células de medula óssea de roedores (RIBEIRO et al., 2009).

Segundo Sohal et al. (2002) e Valavanidis et al. (2006), estudos ecotoxicológicos que avaliam o estresse oxidativo são extremamente importantes, uma vez que contaminantes ambientais podem induzir um desequilíbrio redox entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e o sistema de defesa antioxidante. A interferência nesse equilíbrio redox pode causar danos nas estruturas e constituintes celulares, principalmente nos ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (POLI et al., 2004), bem como nas mitocôndrias. Segundo Tsangaris et al. (2011), biomarcadores de estresse oxidativos são sensíveis a contaminantes ambientais e são ferramentas úteis para avaliar a ação de misturas complexas e substâncias químicas.

O presente trabalho avaliou a toxicidade da cadaverina, uma amina biogênica presente no necrochorume que é derivada da putrefação de corpos. O estudo ecotoxicológico das substâncias presentes no necrochorume é extremamente relevante, principalmente, por estar envolvido com a contaminação ambiental que pode comprometer diferentes ecossistemas. Portanto, estudos que avaliem esse tipo de contaminação são de grande importância, pois servem para informar e conscientizar a sociedade e os órgãos de gestão ambiental sobre os efeitos dos constituintes deste tipo de contaminante ainda tão pouco estudado. A falta de conhecimento sobre os potenciais efeitos desses poluentes ambientais, somado ao desconhecimento da sociedade sobre esse assunto, faz com que as medidas necessárias para prevenir e recuperar os ambientes impactados sejam pouco discutidas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Cemitério x Contaminação ambiental

O sepultamento dos corpos teve início no período da idade média como forma de respeito aos mortos em algumas igrejas e, também, por acreditar ser uma maneira de aproximar os vivos e os mortos. Com o aumento significativo da incidência de epidemias (tifo, peste negra, outras) nesses locais foi necessário transferir essa prática para lugares mais distantes (SILVA; MALAGUTTI-FILHO, 2009). No entanto, com o aumento exarcebado da urbanização, atualmente, os cemitérios estão localizados dentro do perímetro urbano e cada vez mais próximos às residências (OLIVEIRA et al., 2013).

O procedimento de sepultamento tem sido realizado durante décadas, mas pouco se sabe que os sepultamentos são fontes de contaminação para o solo e para o lençol freático. A contaminação por substâncias tóxicas no entorno dos cemitérios ocorre de forma sutil e constante, no qual seus contaminantes são distribuídos para todas as áreas próximas dos mesmos (AMORIM; CRUZ, 2014). Segundo Leite (2009), a poluição do lençol freático por cemitérios está entre as mais difíceis de serem detectadas e removidas.

Em geral, um corpo sepultado leva de um a dois anos para se decompor totalmente, mas esse tempo pode variar, dependendo das condições do ambiente e do cadáver. Toda decomposição gera substâncias que, quando introduzidas no meio ambiente, invariavelmente, leva a um comprometimento ambiental, caracterizando, assim, um fator de risco para a saúde pública. Segundo Matos (2001), os cemitérios representam uma fonte considerável de contaminação ambiental, pois podem contaminar as águas subterrâneas pela infiltração de necrochorume até o aquífero, devido ao transporte dos derivados da putrefação dos corpos pelas águas de chuvas infiltradas nas covas ou pelo contato dos corpos com a água subterrânea. A contaminação também pode se dar em águas superficiais, quando estes são instalados em locais inadequados, sem estudos prévios das condições geológicas.

Alguns estudos geológicos, hidrológicos e sanitários estão sendo realizados, no Brasil e no mundo, para avaliar os impactos causados pelo necrochorume no solo e nas águas subterrâneas e superficiais (FINEZA, 2008). Almeida e Macêdo (2005) avaliaram as condições ambientais das águas subterrâneas nas proximidades de um cemitério de Berlim, Alemanha. Os autores observaram que essa água, utilizada para consumo humano, apresentava vetores de doenças. Amorim e Cruz (2014) estudaram a contaminação do lençol freático por percolação do necrochorume proveniente de um cemitério na Bahia, Brasil, e concluíram que as águas subterrâneas sofreram mais impactos pelo necrochorume do que as

águas superficiais. Lozano et al. (2012) realizaram uma pesquisa na cidade de Rondônia, Brasil, a fim de avaliar se o cemitério da região estava interferindo na qualidade da água dos poços utilizados para consumo doméstico pelos moradores. Os autores observaram um aumento significativo de nitrato nas águas dos poços próximos ao cemitério. Rodrigues e Pacheco (2003) investigaram os impactos sobre os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos de águas subterrâneas coletadas próximo a um cemitério de Portugal, e concluíram que os cemitérios podem contribuir para a contaminação das águas subterrâneas. Zume (2011) avaliou a contaminação de águas subterrâneas provocada pela decomposição dos corpos enterrados inapropriadamente no centro-oeste da Nigéria, e sugeriram que as qualidades dessas águas estavam comprometidas.

Nos últimos anos foram publicados alguns estudos que avaliaram os cemitérios como fonte poluidora de aquíferos, porém esses dados são bem escassos e a maioria estão relacionadas com a presença de metais (ÜÇISIK; RUSHBROOK, 1998; RODRIGUES; PACHECO, 2003; MAPANI; SCHREIBER, 2008; OLIVEIRA et al., 2013) ou agentes patológicos como bactérias e vírus (ÜÇISIK; RUSHBROOK, 1998; COLLINS et al., 2005; RODRIGUES; PACHECO, 2003; HYUN-SU; KANGJOO, 2012; OLIVEIRA et al., 2013; ŻYCHOWSKI; BRYNDAL, 2015).

Como as águas superficiais estão cada vez mais poluídas e o consumo desses recursos hídricos tem extrapolado a capacidade de fornecer água para as atividades humanas, as águas subterrâneas vêm representando uma boa estratégia para aquisição de água para consumo humano. Porém, devido a essa demanda, reforça-se a necessidade de esses recursos hídricos serem protegidos da poluição (CETESB, 2013). Um aspecto importante a ser considerado é que, quando lençol freático é contaminado, a sua descontaminação é praticamente irreversível. A recuperação da qualidade de águas subterrâneas exige métodos de tratamento avançados, extremamente complexos, custosos e demorados. Por essa razão, a implantação de cemitérios deve seguir critérios rígidos, estabelecidos pelos órgãos ambientais, que garantam a preservação da qualidade do solo e dos recursos hídricos envolvidos do seu entorno (MATOS, 2001).

Frente a toda essa problemática, em 2003 foi promulgada a Resolução nº 335 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe sobre critérios para o licenciamento ambiental de cemitérios a serem implantados e a normalização e adequação daqueles já existentes. O licenciamento e a fiscalização das áreas de cemitérios é competência dos órgãos ambientais estaduais.

2.2. Necrochorume

O termo “chorume” é usado para caracterizar resíduos líquidos com elevada carga orgânica, derivados da decomposição química e microbiológica de resíduos sólidos depositados em um determinado terreno (MORAIS et al., 2006). O prefixo “necro” está envolvido com o processo de morte, sendo assim, a denominação do necrochorume vem da decomposição de cadáveres (LOZANO et al., 2012).

O necrochorume, após ser liberado no meio ambiente, é considerado o principal agente poluidor em áreas de cemitérios. Segundo Macedo (2004) e Rodrigues et al. (2003), o necrochorume é um composto aquoso que apresenta cor castanho-acinzentada, aspecto viscoso e cheiro forte, constituído por 60% de água, 30% de sais minerais e 10% de substâncias orgânicas. A toxicidade desse líquido está relacionada, principalmente, com os teores de compostos de fósforo e nitrogênio (RAMANÓ, 2001). Além disso, há a presença de metais pesados e aminas, como a cadaverina ($C_5H_{14}N_2$) e a putrescina ($C_4H_{14}N_2$), que são altamente tóxicas, por gerar íons de amônia quando degradadas (NH_4^+) (FINEZA, 2008). O necrochorume pode possuir ainda microrganismos patogênicos na sua constituição (FEITOSA; FILHO, 1997; CASTRO, 2008; MACEDO, 2004).

A liberação do necrochorume ocorre no período de, no mínimo, 2 anos, podendo variar de acordo com os fatores intrínsecos e extrínsecos, que envolvem as condições cadavéricas e o ambiente no qual foram sepultados (PACHECO, 2006). Os fatores intrínsecos estão relacionados com peso, altura, causa da morte do indivíduo sepultado, bem como os tratamentos medicamentosos recebidos, enquanto que os fatores extrínsecos correspondem ao tipo de solo, temperatura, umidade, entre outros (RAMANÓ, 2001). Então, a contaminação do subsolo por necrochorume depende da vulnerabilidade geológica e hidrológica do ambiente (SILVA; MALAGUTTI FILHO, 2009).

A percolação do necrochorume, que decorre na contaminação do lençol freático, representa um risco à saúde da população que faz uso da água de poços artesianos localizados próximos a cemitérios (LOZANO et al., 2012). Além de problemas relacionados ao impacto ambiental e à saúde humana, esse tipo de contaminação também afeta o setor socioeconômico da região (ÜÇISIK; RUSHBROOK, 1998; RODRIGUES; PACHECO, 2003; ŻYCHOWSKI; BRYNDAL, 2015).

2.3. Aminas Biogênicas

As aminas biogênicas são pequenas moléculas formadas durante a descarboxilação de aminoácidos, por meio de biossíntese e processos enzimáticos (DURIE et

al., 1977; KHUHAWAR; QURESHI, 2001; BACHRACH, 2004). São componentes essenciais em células vivas e participam da proliferação, diferenciação e morte celular (HEATHER et al., 2003). Além de serem produzidas nos organismos (animal, vegetal ou microrganismos), podem ser encontradas em vários produtos alimentares, especialmente nos alimentos ricos em proteínas de origem animal e vegetal, bem como em produtos fermentados. As aminas biogênicas, em baixas concentrações, são essenciais para as funções fisiológicas, porém, em concentrações elevadas podem ser consideradas tóxicas (BACH et al., 2012). Os teores elevados das aminas biogênicas, juntamente com os seus conjugados acetílicos, nos fluidos biológicos (urina, secreção vaginal e outros), nos tecidos e em produtos alimentares (carne, peixe e aves), podem ser indicativos de aumento da deterioração orgânica (KHUHAWAR; QURESHI, 2001; KARPAS et al., 2011).

De acordo com Schipper et al. (2003), o nível de aminas biogênicas é maior em células malignas do que em células normais. Assim, uma importante característica dessas aminas é intensificar o crescimento de tumores, fato este que tem levado muitos pesquisadores a investigar fatores que possam inibir a biossíntese dessas substâncias em tecidos cancerosos (BARDÓCZ et al., 1993; MOINARDA et al., 2005; KALAC; KRAUSOVA, 2005). Alguns estudos sugerem que as aminas biogênicas podem interferir em vários processos do desenvolvimento de plantas superiores como na divisão celular, na embriogênese somática, no crescimento das raízes e no desenvolvimento das flores e frutos (EVANS; MALMBERG, 1989; GALSTON; KAUR-SAWHNEY, 1990; SLOCUM; FLORES, 1991). Ainda, elas podem estar envolvidas no aumento de estresse nesses organismos, uma vez que seus níveis aumentam quando os organismos estão expostos a condições de estresse ambiental (SLOCUM; FLORES, 1991; GALSTON; KAUR-SAWHNEY, 1990).

2.3.1. Cadaverina

Entre as aminas biogênicas derivadas da decomposição de tecidos biológicos, encontra-se a diamina alifática cadaverina (1,5, diaminopentano), que é produzida por meio da descarboxilação do aminoácido lisina intracelular, pela enzima lisina descarboxilase (HAWEL et al., 1994) (Figura 1). Em concentrações fisiológicas, a cadaverina participa de diversos processos celulares como crescimento e divisão celular, transcrição, tradução e processos de morte celular. Os sítios nucleofílicos dessa amina permitem uma interação com os ácidos nucleicos, os lipídios e as proteínas, afetando a estabilidade dessas moléculas (HUSSAIN et al., 2011).

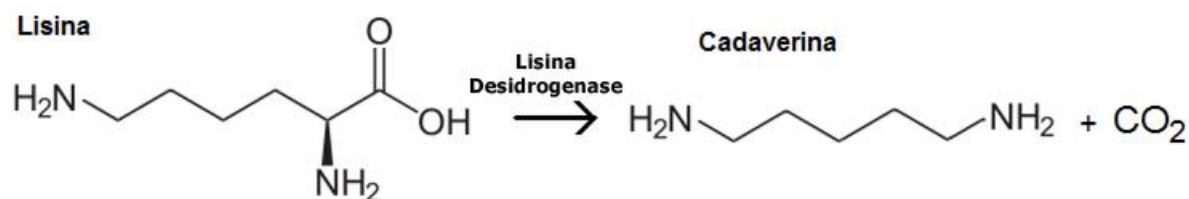


Figura 1. Formação da cadaverina a partir da descarboxilação da lisina pela enzima lisina descarboxilase.

Segundo Jancewicz et al. (2016), a cadaverina está envolvida com diversos processos celulares críticos para os organismos vivos. Em *Escherichia coli*, a cadaverina é usada como um marcador de estresse ácido (HANEBURGER et al., 2012) e além disso, participa do crescimento e desenvolvimento de plantas, atuando na sinalização celular, na resposta ao estresse e na defesa contra insetos (JANCEWICZ et al., 2016). Tem sido relatado que alterações na concentração de cadaverina, em plantas, seja por fatores ambientais ou exposição exógena, pode induzir alterações morfológicas em várias espécies (CAMPESTRE et al., 2011; LIU et al., 2014; STROHM, et al., 2015).

A cadaverina tem sido citada, desde o começo do século passado, como sendo uma substância capaz de produzir inflamações e até mesmo necrose em tecidos vivos. Em altas doses, ela é tóxica para ratos, coelhos e cobaias (VAUGHAN; NOVY, 1902), além de ser considerada um marcador bioquímico para algumas doenças como o câncer, diabetes, artrite e fibrose cística (TETI et al., 2002). Outro efeito importante desta diamina é a intensificação da toxicidade de outras aminas como, por exemplo, a histamina (CHU; BJELDANES, 1981; HUI; TAYLOR, 1985).

Contudo, mesmo sendo reconhecida como uma substância tóxica, ela tem sido pouco estudada quanto ao seu potencial poluidor de solos e de água, e também quanto aos perigos que pode conferir aos organismos eventualmente expostos. Até o momento, existem poucos estudos relatados na literatura que avaliaram a toxicidade ambiental desse composto.

Til et al. (1997) avaliaram a toxicidade aguda e subaguda oral de cinco aminas biogênicas para ratos Wistar. Para a cadaverina, foi observada toxicidade aguda para as concentrações acima de 2.000 mg/L, porém, quando os organismos foram expostos a concentrações mais elevadas, como 10.000 mg/L, eles já apresentaram um pequeno aumento no volume das células hematopoiéticas da série vermelha, um aumento na concentração de hemoglobina e de trombócitos e uma diminuição no nível de potássio no plasma. Os organismos ainda apresentaram uma variação no peso/tamanho de seus órgãos, como o

aumento dos testículos e do coração e a diminuição do fígado. Segundo os autores, como foram observadas pequenas variações no fígado e nenhuma indicação de correlação com alterações histopatológicas, eles concluíram que a cadaverina pode causar alterações na função metabólica do órgão, porém, sem apresentar efeitos hepatotóxicos. Avaliações realizadas por Tabor e Rosenthal (1956), indicaram ausência de efeitos nefrotóxicos em ratos, quando estes receberam cadaverina por via intraperitoneal (3,3 mM/Kg).

Fusi et al. (2008) avaliaram o efeito de várias concentrações da cadaverina, por meio de células epiteliais mamárias de bovino (BME-UV1) e cultura primária tridimensional de parênquima mamário bovino (cultura 3-D). Os autores verificaram que, em ambas as culturas, a concentração mais baixa de cadaverina (10 mM) induziu a proliferação celular, enquanto a mais alta (50 mM) inibiu a proliferação.

Alimentos com altas concentrações de cadaverina apresentam um decréscimo no seu valor nutricional e, quando consumidos em excesso, podem desencadear efeitos adversos em animais (FUSI et al., 2004) e no homem (BARDOCZ, 1993). Segundo Nebelin et al. (1980), a cadaverina e a putrescina podem reagir com o nitrito presente em alimentos a base de carne e formar nitrosaminas carcinogênicas.

2.4. Bioindicadores *in vitro* e *in vivo*

2.4.1. *Allium cepa*

Muitas plantas servem como bioindicadores para avaliação de efeitos genotóxicos e para o monitoramento ambiental, pela alta sensibilidade que apresentam na detecção de toxicidade ambiental por compostos químicos (GRANT, 1999). As raízes são órgão vegetais muito utilizados em estudos que envolvem a ação de substâncias químicas sobre o ciclo celular, pois as células meristemáticas radiculares ficam em contato direto com o agente tóxico (FISKEJO, 1985). Os vegetais são considerados excelentes sistemas-teste para o monitoramento ambiental e são validados, internacionalmente, por pesquisas colaborativas com a “United Nations Environmental Program” (UNEP), a “World Health Organization” (WHO) e a “US Environmental Protection Agency” (USEPA) (GRANT, 1985; GRANT, 1999).

Várias espécies de plantas são utilizadas em ensaios de toxicidade, no entanto, os ensaios com a espécie *A. cepa* são considerados os mais bem estabelecidos na área da citogenética (PALMIERI et al., 2016). Os primeiros ensaios de aberrações cromossômicas, para avaliar a ação de agentes químicos, foram realizados utilizando a espécie *A. cepa*

(LEVAN, 1938). Suas células meristemáticas são homogêneas com cromossomos grandes e em pequeno número ($2n = 16$), facilmente corados, o que permite uma melhor avaliação dos danos cromossômicos e/ou distúrbios na divisão celular (KURAS et al., 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Esse ensaio fornece informações que apresentam uma alta correlação com os outros sistemas biológicos usados para o mesmo fim, como, por exemplo, os testes com mamíferos (CHAUHAN et al., 1999; RANK; NIELSEN, 1994; TEIXEIRA et al., 2003).

Muitos estudos têm considerado o teste de *A. cepa* como uma técnica muito eficaz para determinar a toxicidade e os níveis de poluição no meio ambiente (LIMAN et al., 2010; BIANCHI et al., 2011; MAZZEO et al., 2011; NUNES et al., 2011; HERRERO et al., 2012). Os ensaios com essa espécie fornece, ainda, informações citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas de várias substâncias (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1985; MATSUMOTO, 2004).

A citotoxicidade de uma substância pode ser estimada, de modo eficiente, pela análise do índice mitótico (razão entre as células em divisão celular/número de células observadas) de células meristemáticas de *A. cepa* (FERNANDES et al., 2007). A diminuição do índice mitótico (IM) pode indicar interferência da substância teste nos processos de crescimento e desenvolvimento, enquanto que IM elevados indicam um aumento da divisão celular que, se acontecer de forma descontrolada, pode levar a formação de tumores (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

As aberrações cromossômicas podem ser observadas, nas células meristemáticas de *A. cepa*, em qualquer fase do ciclo celular e podem inferir o modo de ação do agente investigado, quanto a potencialidade de induzir efeito aneugênico ou clastogênico, de acordo com o tipo de aberração encontrada (VIDAKOVIĆ-CIFREK et al., 2002).

2.4.2. Cultura de células

A técnica de cultivo celular teve início no século XX, com o objetivo de estudar, sob condições controladas, o comportamento das células fora do seu organismo natural. O objetivo de sistemas *in vitro* é reproduzir e conservar as características fisiológicas, bioquímicas e genéticas dos tecidos originais, a fim de simular o ambiente *in vivo* (ZUCCO et al., 2004). As vantagens desta técnica sobre métodos *in vivo* é a possibilidade de se limitar o número de variáveis experimentais e obter resultados significativos, em curtos períodos de experimentação (ROGERO et al., 2003). Além disso, não há a necessidade de sacrifícios de animais (CARVALHO, 1996), não ferindo assim as questões éticas em experimentação.

O uso de diferentes linhagens celulares possibilita um direcionamento dos efeitos tóxicos específicos para um órgão alvo (ZUCCO et al., 2004). Segundo Takahashi (2003), ensaios com cultivo celular permitem avaliar o mecanismo de ação de compostos químicos, possibilitando, inclusive, estimar sua ação direta ou indireta sobre o DNA.

Ensaio com cultura de células constitui uma importante ferramenta de investigação básica aplicada à toxicologia (LEWINSKA et al., 2007). O uso desse sistema teste tem sido utilizado com uma ferramenta eficaz para avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de contaminantes ambientais devido à sua alta sensibilidade (LEME et al., 2011; MAZZEO et al., 2013; MANZANO et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2014; BIANCHI et al., 2015).

As linhagens celulares derivadas de tecido humano são consideradas completas e mais confiáveis para a avaliação de riscos toxicológicos (ZUCCO et al., 2004). As células de hepatoma humano (HepG2), comumente utilizadas em pesquisas ecotoxicológicas, são consideradas excelentes ferramentas para detecção de diversas classes de contaminantes ambientais, que podem atuar de forma direta e/ou indireta sobre os organismos (KNASMULLER et al., 1998; 2004). A principal vantagem de se utilizar essa linhagem celular está relacionada com as atividades enzimáticas de Fase I e II, que podem promover a ativação e desintoxicação de substâncias.

Vários tipos celulares têm sido isolados com sucesso, ampliando a gama de possibilidades de uso de culturas celulares na avaliação da ação de xenobiontes no meio biológico. Nesta linha, destaca-se a linhagem celular Speedy, derivada de fibroblasto de anfíbio (*Xenopus tropicalis*), que foi isolada recentemente por Sinzelle et al. (2012). Inicialmente, foram definidas algumas características importantes dessa nova linhagem, cujo cariótipo é geneticamente estável, com número de cromossomos de $2n=21$ (trissomia no cromossomo 10). As células Speedy apresentam um tempo de duplicação de, aproximadamente, 24 horas.

No entanto, Morales (2008) recomenda que outros estudos devem ser realizados para verificar os efeitos de uma substância em sistemas *in vivo*, para que haja uma confirmação dos efeitos encontrados nos ensaios *in vitro*, uma vez que o próprio organismo pode apresentar diversos fatores que se interagem, levando a variações dos resultados.

2.4.3. Ratos Wistar

A experimentação em animais tem fornecido, ao longo do tempo, uma vasta contribuição para o meio científico de diversas áreas, contribuindo para o desenvolvimento de

tecnologias avançadas a serem aplicadas em todas as áreas das biociências. Métodos alternativos têm sido desenvolvidos nos últimos anos, porém o modelo animal ainda apresenta inúmeras vantagens, como uma avaliação do sistema orgânico, como um todo (RIBEIRO et al., 1995; SALÉN, 1995; SNITKOFF, 2004). Várias espécies são utilizadas em pesquisas científicas, sendo os mamíferos roedores os mais utilizados (CHORILLI et al., 2007). O uso de ratos representa 20% do total do número de animais usados em laboratório, ficando atrás somente do uso de camundongos (HARKNESS, WAGNER, 1993).

Um levantamento de dados realizados por Fagundes e Taha (2004) relatou que, no período de quatro anos, os ratos foram os mais utilizados, seguidos pelos camundongos, coelhos, cães, porcos e primatas. Atualmente é difícil estimar o número de animais utilizados em pesquisas científicas, mas, sabe-se que os Estados Unidos são o país que mais desenvolve pesquisas com animais, seguido dos países europeus, do Japão, Canadá e Austrália. O Brasil ainda não possui esse tipo de estimativa, devido ao fato dos testes *in vivo* serem pouco utilizados, quando comparados com outros países (ALVES; COLLI, 2006).

O rato foi o primeiro mamífero utilizado em pesquisas científicas (MATTARAIA; MOURA, 2012). A linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) é um modelo experimental com a vantagem de ser um animal de pequeno porte, com ciclo biológico curto, baixo custo de criação e alto grau de similaridade genética com seres humanos. Cerca de 80% do seu DNA é idêntico ao do homem (RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM, 2004), permitindo a extrapolação de resultados obtidos com os ratos para os seres humanos. Ratos machos são mais utilizados na pesquisa, pois as fêmeas apresentam variações nos níveis hormonais, que influenciam as funções não relacionadas com a reprodução, podendo, assim, interferir nos resultados dos experimentos (SEVERINO et al., 2004).

Ao longo dos anos, as questões éticas sobre o uso de animais em pesquisas científicas vem sendo debatidas, tendo como o maior questionamento o sofrimento que as mesmas possam promover nos animais. Sobre essa questão foi criado um conceito que visa reduzir, refinar e substituir o uso de animais, sendo conhecido mundialmente como a teoria dos 3R (replacement, reduction e refinement) estabelecida por Russel e Burch em 1959. Assim, toda experimentação animal deve substituir o uso de vertebrados por sistemas sencientes, reduzir a quantidade de animais e refinar os cuidados com o desconforto provocado durante o período experimental, sempre que possível. O conceito dos 3R trouxe uma discussão constante no meio científico e alguns pesquisadores consideram essa ideia um estímulo para utilização de outras alternativas experimentais (PAIXÃO, 2001). No entanto, a

experimentação animal está longe de ser eliminada das pesquisas científicas, pois, a utilização de animais em experimentos permite a maior similaridade biológica com o ser humano.

2.5. Biomarcadores

2.5.1. Teste de aberrações cromossômicas (AC)

As aberrações cromossômicas são alterações na estrutura ou no número de cromossomos das células, que ocorrem espontaneamente ou por indução de agentes físicos ou químicos (RUSSEL, 2002). O teste de AC tem sido citado como o mais utilizado e um dos poucos testes capazes de avaliar mutações numéricas e/ou estruturais nas células expostas a uma substância com potencial cancerígeno (RANK et al., 2002). Além disso, esse teste baseia-se na citogenética clássica e pode ser aplicado em vários organismos-teste (LEME et al., 2008). Segundo Fernandes et al. (2009) e Leme et al. (2008), as alterações cromossômicas estruturais ou numéricas são consideradas evidências de efeitos genotóxicos e mutagênicos, induzidos por agentes clastogênicos e/ou aneugênicos.

As aderências cromossômicas são resultantes da ação tóxica de uma substância sobre a célula, causando um dano irreversível e, conseqüentemente, a morte celular (GÖMÜRGEN et al., 2005; TÜRKÖĞLU, 2007). Na sequência da divisão celular, esse tipo de alteração pode formar pontes cromossômicas e, conseqüentemente, quebras cromossômicas (MARCANO et al., 2004). No entanto, terminações cromossômicas coesivas ou rearranjos cromossômicos também podem favorecer o surgimento de pontes cromossômicas (FISKESJO, 1993a).

Devido a ação aneugênica, algumas substâncias podem inativar o fuso mitótico, resultando em células c-metafásicas (FISKESJO, 1985; FISKESJO, 1993a). Além dessa alteração, a ação sobre os constituintes celulares pode acarretar no surgimento de células binucleadas, células com MN (FERNANDES et al., 2007) e células poliploides (FERNANDES et al., 2009). Segundo Saunders et al. (2000), a interrupção ou malformação do fuso mitótico pode causar uma segregação inapropriada dos cromossomos durante a divisão celular. Assim, ocorre uma sequência de eventos que resultam em várias alterações cromossômicas. A falha no fuso mitótico, em conjunto com a interrupção da citocinese, leva a inibição da formação do fragmoplasto em células vegetais que, conseqüentemente, inibe a migração dos cromossomos para os polos opostos resultando em uma célula poliploide (VIDAKOVIĆ-CIFREK, et al., 2002). Outro evento relacionado com a inativação do fuso mitótico é a perda de cromossomos inteiros, que ficam dispersos no citoplasma, podendo

acarretar na formação de células aneuplóides (SHAMINA et al., 2003). Segundo Shimizu et al. (1998) e Fernandes et al. (2007), brotos nucleares podem aparecer em decorrência de células poliploidizadas que tentam eliminar o seu material genético amplificado. Quando esses brotos se desprendem do núcleo, formam então os MN.

Substâncias capazes de causar rupturas dos cromossomos são conhecidas como clastogênicas, devido a sua ação direta sobre a molécula de DNA (GRANT, 1978; CHAUHAN; SUNDARARAMAN, 1990). Fiskesjo (1993b) descreve que quebras cromossômicas estão relacionadas com a formação de fragmentos acêntricos, que podem formar MN nas próximas gerações celulares.

O teste de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* vem sendo usado em diversas pesquisas, com objetivo de estimar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, além de elucidar os mecanismos de ação de substâncias químicas e amostras ambientais (FISKESJO, 1985; RANK; NIELSEN, 1993; 1997; BIANCHI et al., 2011; BAKARE et al., 2012; ARORA et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2015; MAZZEO et al., 2015; BIANCHI et al., 2016; VENTURA-CAMARGO et al., 2016).

Algumas alterações cromossômicas também podem ser observadas em testes com cultura de células, aplicados a diversos tipos de linhagens celulares (MAZZEO et al., 2013; BIANCHI et al., 2015). As pontes nucleoplasmáticas e os brotos nucleares são alterações que podem ser observadas em células mantidas em cultura celular, após a indução de bloqueio da citocinese (FENECH; CROTT, 2002), cuja avaliação da genotoxicidade pode ser mais conclusiva e completa (NERSESYAN et al., 2016). As pontes cromossômicas observadas nesse ensaio permitem inferir a existência de rearranjos cromossômicos (UMEGAKI et al., 2000). Essa alteração ocorre quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos são puxados para polos opostos durante a anáfase. Se não houver quebra desse cromossomo durante a tração, forma-se então uma ponte entre os núcleos filhos, pois a membrana nuclear se reorganiza em volta do material nuclear, permitindo a visualização dessa alteração. Os brotos são derivados da eliminação de DNA amplificado por um mecanismo de reparo, que detecta o DNA em excesso e que não se encaixa na matriz nuclear (FENECH; CROTT, 2002). Assim, Shimizu et al. (1998; 2000) e Fernandes (2007), caracterizaram esse evento como um processo ativo de material amplificado, que fica em um ponto periférico do núcleo.

2.5.2. Teste de citotoxicidade – Resazurina

Testes *in vitro* de viabilidade celular devem ser simples, fáceis, eficientes confiável, seguro, financeiramente acessível e, principalmente, não deve interferir na ação do

composto testado (PERROT et al., 2003). O ensaio de redução da resazurina é recentemente usado nos testes com cultura de células para medir a proliferação celular e a viabilidade em células eucariontes (AHMED et al., 1994, NAJAYAMA et al., 1997), fornecendo informações quanto a citotoxicidade de substâncias químicas (GONZALEZ et al., 2001).

A resazurina é um corante azul não fluorescente que, quando é reduzido dentro das células por oxidorreduções, transforma-se em um corante fluorescente de cor rosa, denominado de resofurina (MAGNANI, 2000). Somente as células viáveis com metabolismo intracelular ativo promovem a conversão da resazurina em resofurina (O'BRIE et al., 2000). Essa conversão é facilitada pelas enzimas mitocondriais, microsossomais ou por enzimas que ficam no citosol (GONZALEZ et al., 2001). A análise dos resultados produzidos pela bio-redução da resazurina pode ser medida pela leitura colorimétrica ou fluorimétrica, no entanto, a sensibilidade é maior quando usado a propriedade fluorescente (PERROT et al., 2003).

Os testes de viabilidade celular realizados com resazurina são considerados simples, rápidos, sensíveis, baratos e precisos (MAGNANI, 2000, O'BRIE et al., 2000). As descrições de literatura apontam que essa substância é não tóxica, estável em meio de cultura e não necessita que as células morram para realizar a medição, o que permite uma análise contínua da proliferação celular e a reutilização dessas mesmas células em outros ensaios (PERROT, et al., 2003; ZHANG et al., 2004). Devido à essas vantagens, o teste da resazurina é considerado mais confiável que outros ensaios clássicos de viabilidade celular, como o ensaio do MTT, que utiliza reagentes que induzem a morte celular para realizar a medição (FIELDS; LANCASTER, 1993).

Esse ensaio já foi realizado em diferentes tipos celulares, para verificar a citotoxicidade de substâncias químicas, tais como fibroblastos (VOYTIK-HARBIN, 1998), linhagens celulares de câncer (PAGÉ et al., 1993; NAKAYAMA et al., 1997), células de rato e linfócitos humanos (DE FRIES; MISTUHASHI, 1995; AHMED et al., 1994) e em cultura de células primária de neurônios (WHITE et al., 1996).

2.5.3. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa é considerado um teste de genotoxicidade rápido, simples e sensível, capaz de detectar danos induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes em DNA de células individuais (PAVLICA et al., 2001; ANDRADE et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2006). Esse teste foi desenvolvido por Ostling e Johanson (1984) e por Speit et al. (2009), e ganhou popularidade por ser um teste capaz de detectar baixos níveis de

danos, bem como reparos, no DNA. Este teste pode ser aplicado em diversos tecidos e/ou tipo celulares. Outras vantagens do teste é que esta técnica requer um pequeno número de células e não necessita que estas estejam em divisão, podendo, então, ser aplicado em qualquer fase do ciclo celular (PAVLICA et al., 2001). Esta técnica é aplicável em ensaios *in vitro*, *in vivo* e indicada, além de outras avaliações, para estudos de biomonitoramento humano (DHAWAN et al., 2009). O International Workgroup on Genetic Toxicology (IWGT) recomenda a inclusão desse ensaio na bateria de testes *in vitro*, por não necessitar de células em proliferação e por fornecer muitas informações a nível de danos no DNA (PFUHLER et al., 2011).

O teste baseia-se na disposição de uma pequena quantidade de células viáveis em lâminas cobertas com agarose que são submetidas a uma corrida eletroforética analisada com microscopia de fluorescência (OLIVE; BANÁTH. 2006). A cabeça do cometa contém DNA de alto peso molecular e a cauda é composta por fragmentos cromossômicos das células com danos no DNA que migraram (OLIVE et al., 1990). A análise do ensaio do cometa é realizada por software especializado que se baseia na medição do deslocamento dos fragmentos de DNA em relação à cabeça do nucleóide, tornando as células danificadas com aspecto assemelhante à forma de um cometa (BAJPAYEE et al., 2013).

O parâmetro momento da cauda faz a relação entre a porcentagem de DNA da cauda e o comprimento da mesma. Essa análise fornece uma quantificação mais sensível que a medição da intensidade da cauda (OLIVE et al.; 1990; 1992; FAIRBAIRN et al., 1995). No entanto, se não houver uma variação no comprimento da cauda das células expostas a um agente, a intensidade de DNA na cauda passa a ser a maneira mais precisa de quantificar os danos (McKELVEY-MARTIN et a., 1993).

O ensaio do cometa tem sido realizado em testes *in vitro*, em várias linhagens celulares de origem animal, incluindo as células humanas, e são utilizados para avaliar a atividade genotóxica de compostos químicos ambientais (PATEL et al., 2007; MAZZEO et al., 2013; CAVALCANTE et al., 2014; MANZANO et al., 2015; BIANCHI et al., 2015). Já o uso do ensaio do cometa *in vivo*, pode ser aplicado em qualquer tipo celular, possibilitando avaliar a genotoxicidade em células específicas, sendo recomendado para acompanhar os resultados positivos obtidos em testes *in vitro*. Para a aplicação deste ensaio são recomendadas várias diretrizes, que estão disponíveis na literatura (TICE et al., 2000; VASQUEZ et al., 2012). Assim, amostras biológicas de roedores são utilizadas com sucesso no ensaio do cometa, para detectar danos no DNA induzidos por exposição química (SASAKI et al., 2000; ROTHFUSS et al., 2010; HOBBS et al., 2015).

2.5.4. Teste do MN

A formação de micronúcleo (MN) pode ocorrer espontaneamente ou de forma induzida, neste último caso devido à exposição de um organismo a uma substância potencialmente mutagênica (HEDDLE et al., 1983). A frequência elevada de MN tem sido relatada como indicativa de efeitos clastogênicos e aneugênicos (FENECH et al., 2003; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). MNs originados de rupturas cromossômicas, durante a divisão celular, ocorrem devido ao efeito clastogênico. A formação de MN que ocorre a partir de perdas cromossômicas, devido à falha no fuso mitótico ou como consequência da poliploidização que tenta expulsar o material genético amplificado, é indicativo de ação aneugênica (FERNANDES et al., 2007). A aplicação desse ensaio, usando método *in vitro* para linfócitos e métodos *in vivo* para células de medula óssea, está incluída nas diretrizes da OCDE (Organisation for Economic Co-operation and Development) para as avaliações toxicológicas de produtos químicos.

Os MN são massas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultante da condensação de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que se perderam durante o processo de divisão celular e, portanto, não são incorporados ao núcleo principal da célula-filha (SCHMID, 1976, AL-SABTI; METCALFE, 1995). São considerados MN clássicos as estruturas circulares de mesma refração que o núcleo, não ligadas a este, e com um tamanho correspondente de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O teste do MN tem sido aplicado na espécie *A. cepa* como um excelente biomarcador em estudos que avaliam o modo de ação de contaminantes químicos (MA et al., 1995; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; BIANCHI et al., 2011; RODRÍGUEZ et al., 2015; MAZZEO et al., 2015; BIANCHI et al., 2016; VENTURA-CAMARGO et al., 2016).

Fenech e Morley (1985) desenvolveram uma alteração no teste do MN para garantir a confiabilidade do mesmo e, assim, eliminar falsos negativos. Para isso, o teste foi ajustado para células que tivessem completado um ciclo celular, após a exposição aos agentes testados. Sendo assim, nos testes realizados com sistema *in vitro* utiliza-se citocalasina B, que leva ao bloqueio da citocinese, mas não evita a divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas, formadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e da proporção de células em divisão (FENECH, 1997; FENECH, 2000; KIRSCH-VOLDERS et al., 2002). O ensaio com bloqueio de citocinese permite avaliar a toxicidade de uma substância pela relação de atrasos no ciclo celular, possibilitando a contagem das primeiras células mitóticas, após exposição a

um agente químico (VAN HUMMELEN; KIRSCH-VOLDERS, 1990). Muitos estudos têm aplicado esse biomarcador em diversas linhagens celulares mantidas em cultura, para avaliar o potencial mutagênico de substâncias e amostras ambientais (MATSUMOTO et al., 2005; CARDOZO et al., 2006; MAZZEO et al., 2010; 2013; ÇELIK et al., 2014; BIANCHI et al., 2015; ŽELJEŽIĆ et al., 2016).

De acordo com Tucker e Preston (1996), o teste do micronúcleo *in vivo* é realizado com as células do sistema hematopoiético, ou seja, linfócitos periféricos e eritrócitos circulantes. Na medula óssea de camundongos e ratos, a expulsão do núcleo dos eritroblastos ocorre algumas horas após a mitose. Os eritrócitos diferenciam em PCE (eritrócitos policromáticos) que, posteriormente, vão maturar em NCE (eritrócitos normocromáticos), células estas que estão presentes na circulação periférica. Os MN não são expulsos junto com o núcleo do eritroblasto e são facilmente observados nos PCE anucleados (MAVOURNIN et al., 1990). Esse ensaio é considerado extremamente importante e recomendado pelas agências regulamentadoras de todo o mundo para avaliar a genotoxicidade (KRISHNA; HAYASHI, 2000; MAISTRO, 2014). Além disso, é possível estimar a proporção entre PCE/NCE, devido aos problemas que podem ocorrer na hematopoiese dos animais tratados, conferindo ao teste um indicativo de citotoxicidade (KRISHNA; HAYASHI, 2000; GOLLAPUDI; MCFADDEN, 1995).

2.5.5. Estresse oxidativo

O oxigênio tem uma atividade fundamental para o metabolismo celular aeróbico, mas ele também gera radicais livres (Espécies Reativas de Oxigênio – ERO), que são reativas com os componentes celulares. Essas ERO, embora possam desempenhar uma ação benéfica nas células, também agem como agentes prejudiciais aos seres vivos (VALKO et al., 2004) e, portanto, devem ser eliminadas da célula por sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), e não enzimáticos, como grupos sulfidrilas ($-SH$) e glutathione reduzida (GSH) (CESARATTO et al., 2004)

A defesa antioxidante tem, então, a função de limitar os níveis intracelulares de espécies reativas, para controlar a ocorrência de danos oxidativos celulares (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SHAMI; MOREIRA, 2004). Como os organismos vivos sofrem ataques constantes por agentes oxidantes, as reações geradas podem levar, então, a um aumento na quantidade de espécies reativas e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo da célula (BURTON; JAUNIAUX, 2011).

A instalação do processo de estresse oxidativo acontece quando há um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, gerando uma excessiva quantidade de radicais livres, associada a uma baixa velocidade de remoção dos mesmos (BARBOSA et al., 2010). Assim, quando esse processo gera radicais livres além da capacidade de a célula eliminá-los, pode haver a reação desses radicais com as biomoléculas, tendo como consequência a perda das suas funções biológicas e/ou a alteração do equilíbrio homeostático, que se manifesta em forma de danos nas células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Os radicais livres são gerados nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma, sendo a mitocôndria a sua principal fonte geradora (GREEN et al., 2004). Dentre os efeitos prejudiciais das ERO estão os danos aos constituintes celulares, como danos às membranas, aos ácidos nucleicos, aos lipídios, às proteínas e a outros componentes celulares (POLI et al., 2004). O aumento da produção de ERO está relacionado com o aumento da atividade dos antioxidantes que agem contra os danos oxidativos (WINSTON; DI GIULIO, 1991), mas quando estas ERO não são eliminadas pelo sistema de defesa antioxidante, a célula pode sofrer danos que, uma vez não reparados, resultam no estresse oxidativo.

Alterações nos níveis de grupos -SH das proteínas totais representam um marcador eficiente para avaliar danos oxidativos (BARBOSA et al., 2010). A GSH é um composto tiol que tem como função proteger as células e os tecidos contra os efeitos oxidativos. Porém, se ocorrer um distúrbio na quantidade de GSH e um aumento nos níveis de agentes oxidantes, há o surgimento de estresse oxidativo, que leva à toxicidade e morte celular. A CAT é uma enzima que tem como função degradar o peróxido de hidrogênio H_2O_2 em água e oxigênio molecular (VALKO et al., 2006). Essa enzima é considerada a mais eficiente em termos energéticos, pois degrada rapidamente as moléculas de H_2O_2 geradas e promove um ganho de energia celular. A SOD é uma enzima intracelular que catalisa a dismutação de O_2^- para O_2 e H_2O_2 (MCCORD; FRIDOVICH, 1969), caracterizada por apresentar um metal na sua estrutura (GILL; TUJETA, 2010). A GST é um antioxidante enzimático que catalisa a conjugação da GSH com compostos tóxicos, interagindo com o seu grupo -SH, que leva a neutralização dos sítios eletrofílicos, para tornar seus produtos mais solúveis em água e menos tóxicos e, assim, facilitar a sua degradação e excreção (HABIG et al., 1974; CARLETTI et al., 2008).

A peroxidação lipídica é considerada o mecanismo que mais causa danos celulares, pois gera grandes quantidades de ERO, com a interferência de fontes endógenas e/ou exógenas, e provocam vários efeitos biológicos (SHAH; IQBAL, 2010). A quebra dos

produtos da peroxidação lipídica resulta na formação de muitos aldeídos reativos, como o MDA, os quais podem reagir com proteínas celulares e também formar adutos de DNA, provocando mutações e alterações nos padrões de expressão gênica (MARNETT, 1999). A quantificação do MDA pode ser analisada pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que foi desenvolvido por Buege e Aust (1978) e vem sendo utilizado em vários estudos que visam avaliar o dano celular causado pelo estresse oxidativo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Considerando que a cadaverina é uma diamina produzida pela decomposição do corpo humano e que esta substância pode causar danos à saúde dos seres vivos, este trabalho tem por objetivo geral avaliar o seu potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico por meio de ensaios realizados com sistemas-testes *in vitro* e *in vivo*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial citotóxico da cadaverina pela análise de alterações nos índices mitóticos em células meristemáticas de *A. cepa*, expostas a diferentes concentrações desse composto químico;
- Avaliar o potencial genotóxico e mutagênico da cadaverina por meio do ensaio de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*, expostas a diferentes concentrações desse composto químico;
- Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da cadaverina por meio do ensaio da resazurina, ensaio do cometa e teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese em células HepG2 (células de hepatoma humano) e Speedy (fibroblasto de *Xenopus tropicalis*);
- Avaliar o potencial genotóxico e mutagênico, por meio do ensaio do cometa em sangue periférico e teste do MN em medula óssea de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações da cadaverina;
- Investigar a patogênese hepática de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de cadaverina, por meio de biomarcadores de estresse oxidativo;
- Identificar e quantificar os diferentes tipos de aberrações cromossômicas nos diferentes organismos testes e inferir os possíveis mecanismos de ação da cadaverina sobre estes sistemas biológicos;
- Avaliar as concentrações de cadaverina que podem interferir na qualidade do meio ambiente e comprometer, assim, a saúde ambiental.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substância Testada

Foram avaliadas diferentes concentrações da amina biogênica cadaverina (1,5-Diaminopentano, 1,5-Pentanodiamina, Pentametilenediamina), fórmula molecular $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, peso molecular 102,18, CAS: 461-94-2, Fluka – pureza 97%, fornecido pela Sigma-Aldrich. A fórmula estrutural está representada abaixo (Figura 2).

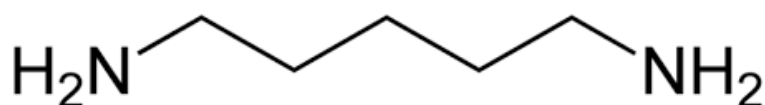


Figura 2: Estrutura química da cadaverina.

4.2 Bioensaio com *A. cepa*

Para a realização dos ensaios com *A. cepa* foram determinadas concentrações de acordo com as informações toxicológica contidas na ficha de segurança do produto. A concentração letal (CL50) da cadaverina apresenta na ficha é de 597 mg/L para *Brachydanio rerio*. Assim, as concentrações utilizadas foram:

- Concentração 1: 553,5 mg/L
- Concentração 2: 430,5 mg/L
- Concentração 3: 307,5 mg/L
- Concentração 4: 184,5 mg/L
- Concentração 5: 61,5 mg/L

4.2.1 Taxa de germinação

As sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em placas de Petri forradas com papel filtro, sob diferentes concentrações da cadaverina. Os controles foram realizados com água de osmose reversa para o controle negativo (CN) e uma solução aquosa de metilmetano sulfonato (MMS – $4 \times 10^{-4}\text{M}$) para o controle positivo (CP).

Após a germinação, quando as radículas atingiram cerca de 1,5 cm, as raízes foram coletadas, fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v) e mantidas em geladeira, até sua utilização na confecção das lâminas.

4.2.2 Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em Células Meristemáticas de *A. cepa*

Para os testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de raiz de cebola, foi adotado o protocolo descrito por Grant (1982), com algumas modificações, como seguem: as raízes fixadas em Carnoy 3:1, após 3 banhos em água destilada, foram hidrolisadas em HCl 1 N a 60° C por 10 minutos e, novamente, lavadas em água destilada. Em seguida, as raízes foram transferidas para frascos escuros contendo reativo de Schiff, onde permaneceram por, aproximadamente, 2 horas. Após este tempo, as raízes passaram por mais alguns banhos em água destilada, para a total retirada do excesso do reativo.

Para a confecção das lâminas foi utilizada a região meristemática, que foi seccionada com o auxílio de um estilete. Em seguida, o material foi recoberto com lamínula e esmagado, suavemente, em uma gota de Carmim Acético (2%). Para obter lâminas permanentes, as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética.

Foram confeccionadas 10 lâminas por tratamento, onde foram analisadas, no mínimo, 500 células por lâmina. Com essa contagem foram estimados os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da cadaverina. O índice mitótico (IM) foi obtido pela relação entre o número de células em divisão/número total de células observadas. O efeito genotóxico foi avaliado pela presença de AC como aderências, pontes, perdas, brotos nucleares, células binucleadas e outras, e o efeito mutagênico a partir da contabilização de células com quebras cromossômicas e células portadoras de MN.

A comparação dos resultados obtidos pela análise dos parâmetros de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foi realizada de acordo com a distribuição dos dados conferidos pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Em seguida, foi aplicado o teste paramétrico (ANOVA/Tukey) para o parâmetro de citotoxicidade, que apresentou dados com distribuição normal, e o teste não paramétrico (Kruskal-Wallis/Dunn's), para os parâmetros de genotoxicidade e mutagenicidade, que apresentaram dados com distribuição não normal. O software GraphPad Prism (versão 7.00) foi usado para as análises. A diferença de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa, comparando sempre com o grupo CN.

4.3 Bioensaios com Cultura de Células (HepG2 e Speedy)

As células de hepatoma humano - HepG2 (2n=46 cromossomos), obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio MEM (*Meio Mínimo Essencial Eagle*), com solução antibiótica/antimitótica, suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os frascos de 25 cm² (com ventilação de cultivo celular) foram mantidos em temperatura controlada (37° C) em estufa de CO₂ (5%) e umidade de 60%. Inicialmente, foram descongeladas as ampolas 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% e, logo em seguida, foram adicionados 1,5 mL de meio de cultura suplementado, para inativar a tripsina. Após obter a quantidade ideal de células foram realizados o teste da resazurina, ensaio do cometa e teste do MN com bloqueio de citocinese.

As células de fibroblasto de anfíbio (*Xenopus tropicalis*) – Speedy (2n=21 cromossomos), descritas por Sinzelle et al. (2012), foram cedidas gentilmente 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. Para o cultivo das células foi utilizado meio de cultura Leibowitz L-15 diluído em água destilada estéril, na proporção de 1:2, preparado com solução antibiótica/antimicótica e suplementado com 10% de soro bovino fetal. Foram utilizados frascos de 25 cm² sem ventilação, mantidos em temperatura controlada (28°C) em BOD. Inicialmente, as ampolas com a 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 diluído (1:2) e tripsinizadas com Tripsina-EDTA 0,5% por 2 minutos. Em seguida, a tripsina foi inativada com 1,5 mL de meio de cultura suplementado. Quando se obteve a quantidade ideal de células, foram realizados os testes da resazurina, do cometa e do MN com bloqueio de citocinese.

4.3.1 Ensaio de viabilidade celular - Teste da Resazurina

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) é um corante azul com baixa fluorescência que, após ser reduzido nas células vivas, transforma-se em resorufina, que é um corante rosa de alta fluorescência (Figura 3). O teste da resazurina foi realizado como um ensaio inicial para se determinar as concentrações de cadaverina que mantinham a viabilidade das células testadas (HepG2 e Speedy) maior que 80%. Uma vez definidas essas

concentrações, foram realizados os ensaios de genotoxicidade (ensaio do cometa) e de mutagenicidade (teste do MN com bloqueio de citocinese) com essas linhagens celulares.

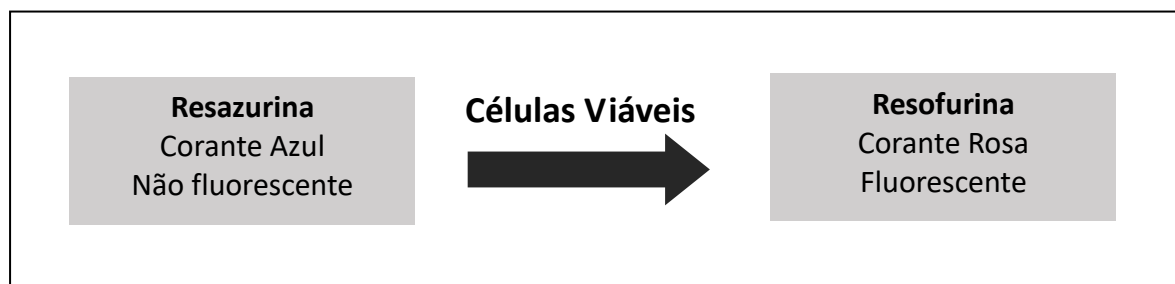


Figura 3: Esquema das características da Resazurina antes e após ação enzimática

Fonte: Elaborado pelo autor

O ensaio foi realizado em placas de Elisa de 96 poços, de acordo com o protocolo proposto por O'Brien et al. (2000), com as seguintes modificações: as placas foram preparadas com $2,34 \cdot 10^6$ células por placa, em um volume total de 100 μL de meio de cultura correspondente de cada suspensão celular, suplementado com soro e incubadas por um período de 24 horas, tempo necessário para ocorrer a adesão das células na superfície dos poços. Após esse período, o meio foi retirado e foram adicionados os tratamentos previamente preparados com meio de cultura sem soro, em um volume final de 200 μL por poço. Nos poços destinados ao CN foi adicionado meio de cultura sem soro e nos poços destinados ao CP houve a adição de uma solução de Triton X-100 (1%), preparado com meio de cultura sem soro. Nos demais poços foram adicionadas as diferentes soluções de cadaverina preparadas com meio de cultura sem soro, nas seguintes concentrações: 553,5 mg/L; 492 mg/L; 430,5 mg/L; 369 mg/L; 307,5 mg/L; 246 mg/L; 184,5 mg/L; 123 mg/L; e 61,5 mg/L (todas as concentrações foram calculadas a partir dos dados de CL50 indicados na ficha de descrição do produto, fornecidos pela Sigma-Aldrich). Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de 24 horas. Em seguida, os tratamentos foram retirados e foram adicionados 200 μL de solução de resazurina (44 μM) diluída em meio de cultura sem soro permanecendo incubadas por 4 horas. A disposição dos tratamentos nas placas seguiu o esquema a seguir (Figura 4).

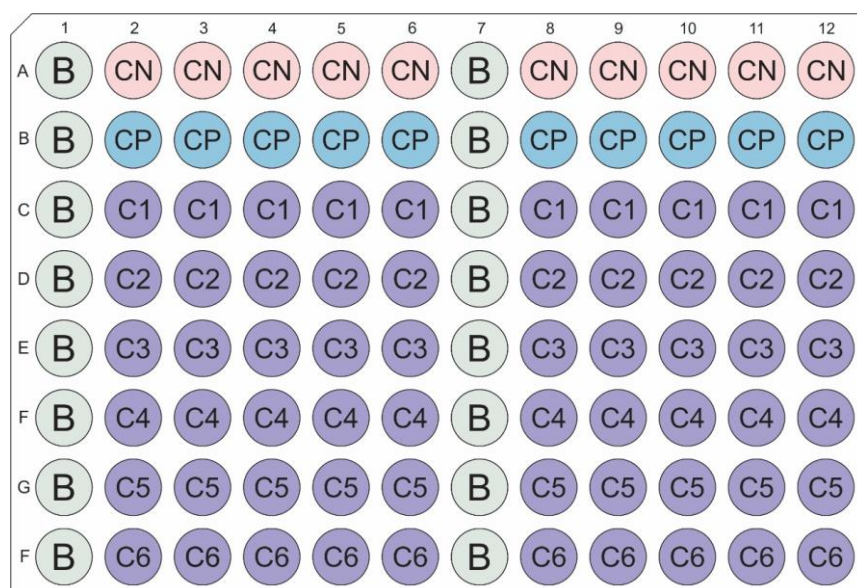


Figura 4: Placas de 96 poços usadas no ensaio de viabilidade celular. B: Branco; CN: Controle Negativo; CP Controle Positivo; C1 a C6: diferentes concentrações da substância estudada.

Fonte: Elaborado pelo autor

A fluorescência foi medida pelo fluorímetro leitor de placa, modelo Infinite M2000 Pro™ plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany), utilizando um comprimento de onda de excitação de 560 nm e um comprimento de onda de emissão 590 nm. A viabilidade foi avaliada com base na comparação das células tratadas com as células não tratadas (CN), onde as concentrações abaixo de 80% de viabilidade foram consideradas citotóxicas.

4.3.2 Tratamento para o ensaio do cometa e o Teste do MN com bloqueio de citocinese

As células HepG2 e Speedy foram submetidas as concentrações consideradas viáveis pelo teste da resazurina, no qual apresentaram viabilidade maior que 80%, para cada linhagem. Os tratamentos foram realizados em triplicata por um período de 24 horas de exposição para as duas linhagens celulares. Os grupos controles e tratados foram realizados, conforme segue na tabela abaixo (Tabela 1):

Tabela 1. Tratamento e concentrações de cadaverina usadas nos ensaios de cometa e MN com culturas celulares.

Linhagem Celular	Tratamento	Concentração
HepG2	Controle Negativo	PBS
	Controle Positivo	MMS - 4×10^{-4} M
	Concentração 1	307,5 mg/L
	Concentração 2	184,5 mg/L
	Concentração 3	61,5 mg/L
Speedy	Controle Negativo	PBS
	Controle Positivo	MMS - 4×10^{-4} M
	Concentração 1	123,0 mg/L
	Concentração 2	61,5 mg/L
	Concentração 3	30,75 mg/L

Legenda: PBS: Tampão fosfato-salino; MMS: metilmetano sulfonato

4.3.3 Ensaio do Cometa

Após o período de crescimento celular foi realizada a confecção dos pré-frascos onde foram semeadas, aproximadamente, 5×10^5 células, que foram incubadas por 24h, referente ao período de estabilização das células nos frascos. Após o tempo de exposição aos tratamentos (24 horas), foi realizada a coleta das células, que foi transferida para tubos de centrífuga e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e a suspensão homogeneizada em 0,5 mL de meio de cultura.

Para o ensaio do cometa, foram montadas lâminas com 20 μ L da suspensão celular + 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 37°C, cobertas com lamínula e refrigeradas por 20 min para solidificar a agarose. Posteriormente, as lâminas foram banhadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8 g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, no escuro, em geladeira a 4 °C por, no mínimo, 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese, contendo uma solução tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, com pH>13) a 4°C, por 20 minutos, para a deslicoidização do DNA. A corrida eletroforética foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300

mA (~ 0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com três banhos de 5 minutos em tampão de neutralização (pH 7,2). Após neutralização, as lâminas foram fixadas (10 min) em etanol absoluto.

As lâminas foram coradas com GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) no momento da análise realizada em microscópio de epifluorescência (Leica, filtro B - 3⁴ (excitação: λ=420 nM – 490 nM, barreira: λ=520 nM) em objetiva de 40x. Foram analisados, ao acaso, 200 nucleóides por frasco (3 réplicas, duas lâminas com 100 nucleóides cada), totalizando 600 nucleóides/tratamento. A quantificação de danos no DNA foi feita pela porcentagem de DNA que estava presente na cauda do cometa. A média dos resultados de cada tratamento foi calculada e submetida ao teste de normalidade D'Agostino & Person e ao teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis/Dunn's (p>0,05), para comparar os efeitos das diferentes concentrações de casadaverina e o controle negativo.

4.3.4 Teste do Micronúcleo

As células HepG2 e Speedy foram semeadas em frascos de cultura com 5x10⁵ células e mantidas em condições controladas por 24 horas. A seguir, as células foram submetidas aos tratamentos com as concentrações de cadaverina pré-estabelecidas, por 24 horas. Após a exposição das células aos tratamentos, todo o conteúdo do frasco foi substituído por meio de cultura novo com 3 µg/mL de citocalasina B, no qual a cultura permaneceu por 28 horas, para obtenção de células binucleadas. As células coletadas foram centrifugadas por 5 minutos a 1.500 rpm, o sobrenadante foi descartado e a suspensão foi homogeneizada em 0,5 mL de meio de cultura. A suspensão celular foi tratada com solução hipotônica de citrato de sódio (0,01%) por 5 minutos. Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado com duas gotas de formaldeído (40%) e centrifugado (1.500 rpm por 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e a suspensão homogeneizada com solução fixadora de Carnoy (3 metanol:1 ácido acético, v:v). Para o preparo das lâminas, a suspensão celular foi centrifugada e, depois, ressuspendida em 0,5 mL de Carnoy, gotejada sobre lâminas pré-lavadas com água destilada e mantidas com um filme de água a 4°C. Após secas em temperatura ambiente, foram coradas com Giemsa 5% por 8 minutos.

Foram contabilizadas 1.000 células binucleadas por réplica, totalizando 3.000 células por tratamento. Apenas as células com membrana nuclear e citoplasmática íntegros, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração

foram registradas. Foram observadas células binucleadas normais e células binucleares 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 500 células por frasco, totalizando 1.500 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 de normalidade D'Agostino & Person e a análise de significância foi realizada pelo teste estatístico paramétrico ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).

4.4 Bioensaios com ratos Wistar

Os ensaios realizados com ratos Wistar foram realizados em parceria com a Prof^a Dr^a Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar, no Centro de Experimentação Animal da Fundação Hermínio Ometto (FHO – Uniararas), instituição que disponibilizou todas as condições e a infraestrutura necessária para a realização dos ensaios. Os animais, provenientes do biotério central da Universidade de Campinas (UNICAMP), foram cedidos gentilmente pela Prof^a Dr^a Mary Anne Heidi Dolger. Nos ensaios, foram utilizados 25 espécimes machos adultos, com peso inicial de 400g, aproximadamente, que permaneceram em caixa de polipropileno por todo período experimental. As condições ambientais foram controladas para temperatura (cerca de $22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade do ar (60%) e ciclo claro/escuro (12 horas). A alimentação foi feita com água filtrada e ração comercial, *ad libitum*.

As concentrações estudadas foram definidas a partir da referência descrita na ficha de segurança do produto fornecido pela empresa Sigma-Aldrich. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais de 5 indivíduos cada. O grupo controle negativo (CN) recebeu apenas água filtrada e os três grupos tratados receberam as concentrações de 15, 30 e 60 mg/kg/dia de cadaverina, cada concentração para um grupo experimental. O grupo controle positivo (CP) foi tratado com água filtrada por todo o período experimental, porém receberam uma injeção intraperitoneal de MMS (20 mg/kg) 24 horas antes da eutanásia, esses animais foram utilizados nos ensaios do cometa e micronúcleo, conforme descrição de Ribeiro et al. (2003). A substância foi administrada via gavagem por um período experimental de 56 dias consecutivos. Segue um resumo dos ensaios realizados com ratos Wistar (Figura 4):

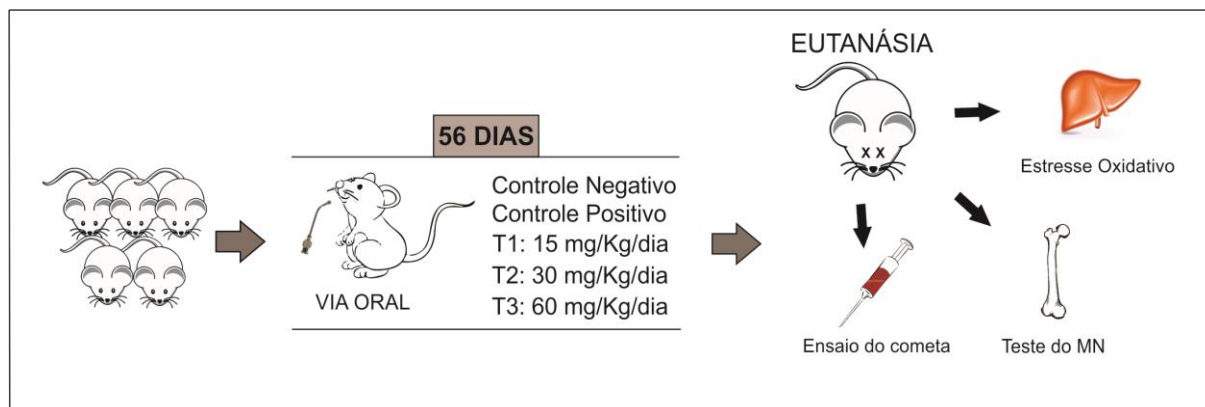


Figura 5: Representação esquemática dos ensaios realizados com ratos Wistar

Fonte: Elaborado pelo autor

Para a realização deste ensaio de experimentação animal, o presente estudo foi submetido à Comissão de Ética em Uso Animal da Fundação Hermínio Ometto (FHO – Uniararas), Araras/SP, com parecer aprovado sob o N° 033/2014. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.4.1 Eutanásia e coleta de materiais biológicos

Para a eutanásia, os animais foram anestesiados com solução de Xilazina (Rompun® - Bayer S.A. – 20 mg/mL) e Cetamina (Ketalar® - Parke, Davis & Co. - 50 mg/mL), administrados por injeção subcutânea. Após total sedação e perda dos sentidos dos animais, foi realizada a labarotomia medial, até a expansão da cavidade torácica, para expor o coração e, assim, realizar a punção cardíaca com auxílio de uma seringa de 5 mL. As amostras de sangue foram utilizadas para o ensaio do cometa. Em seguida, o fígado foi retirado, pesado e acondicionado de forma específica para cada ensaio.

4.4.2 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado com a suspensão celular obtida pela diluição de 20 µL de amostra de sangue em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (37 °C). Em seguida, a suspensão celular foi adicionada sobre lâmina previamente preparada com agarose comum (Normal Melting Point ou NMP), coberta com lamínula e refrigerada por 20 min a 4 °C, para o endurecimento da suspensão celular na lâmina. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram banhadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10,

aproximadamente 8 g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, no escuro, em geladeira a 4 °C por, no mínimo, 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese envolta por gelo, contendo uma solução tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, com pH>13) a 4 °C, por 20 minutos, para a deslicoidização do DNA. A corrida eletroforética foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com três banhos de 5 minutos em tampão de neutralização (pH 7,2). Após neutralização, as lâminas foram fixadas (10 min) em etanol absoluto.

As lâminas foram coradas com GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) no momento da análise em microscópio de epifluorescência Leica, filtro B - 3⁴ (excitação: i=420n-490nM, barreira: I=520nM). Foram analisados, ao acaso, 100 nucleóides por animal (duas lâminas com 50 nucleóides cada), totalizando 500 nucleóides/tratamento, em objetiva de 40x. A porcentagem de DNA na cauda do cometa foi usada como um parâmetro para estimar a quantidade de danos no DNA. A comparação dos resultados foi realizada de acordo com distribuição dos dados conferidos pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Em seguida, foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis/Dunn's (p<0,05), para comparar os grupos tratados com o grupo CN.

4.4.3 Teste do Micronúcleo em medula óssea

A avaliação de MN em células de medula óssea de roedores foi realizada segundo os protocolos descritos por Schmid (1975), Ribeiro (2013) e Maistro (2014), com algumas modificações.

Após a eutanásia dos animais, o fêmur foi retirado, com o auxílio de pinças e tesoura de dissecação de animais, e limpo para a retirada total dos tecidos adjacentes. As epífises foram retiradas para que o canal medular ficasse exposto. A coleta da medula óssea foi realizada com uma seringa contendo 1 mL de soro bovino fetal (SBF), cuja agulha foi introduzida no canal medular, para que o mesmo fosse lavado por várias vezes, até a total retirada da medula óssea. A suspensão medular foi acondicionada em tubos de ensaio, que foram centrifugados por 5 minutos a 1.000 rpm.

Para a confecção das lâminas, foi desprezado o sobrenadante obtido na centrifugação e o pellet foi homogeneizado em 500 µL de SBF novo. O material foi gotejado sobre uma lâmina limpa, para a obtenção das extensões sanguíneas. As lâminas obtidas foram fixadas em álcool 70% por 5 minutos. As células foram coradas para diferenciar eritrócitos policromáticos (PCE) de eritrócitos normocromáticos (NCE). O método de coloração foi realizado com os corantes Wright e Giemsa. Primeiramente, as lâminas foram coradas com

solução pura de Wright por 3 minutos. Posteriormente, foram lavadas com água corrente e colocadas por 1 minuto em solução de Wright com tampão fosfato pH 7,4 (1:1), lavadas novamente em água e colocadas por 10 minutos em uma mistura de tampão fosfato pH 7,4, água destilada e corante Giemsa (10:10:1). A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de corante. As lâminas foram mantidas por um período de sete dias em temperatura ambiente, para a secagem do material e, após esse período, montadas com resina sintética (Entellan®).

As lâminas foram confeccionadas em duplicata, para cada animal, e observadas em microscópio de luz e objetiva de 100x. Foram contabilizados 2.000 PCEs por animal, quantificando a presença de PCE com MN e NCE com MN. Além disso, foram examinados 200 eritrócitos por animal, para determinar a taxa de policromáticos (PCE, imaturos) e normocromáticos (NCE, maduros), parâmetros esses usados como indicativos de toxicidade das células da medula óssea.

Os resultados foram analisados pelo teste de normalidade de D'Agostino & Pearson e análise da significância foi realizada pelo teste paramétrico ANOVA/Tukey ($p < 0,05$), o qual possibilita a comparação dos tratamentos entre si e com o controle negativo.

4.4.4 Quantificação do estresse oxidativo no fígado

4.4.4.1 Quantificação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada a partir de uma curva de calibração realizada com diferentes concentrações de albumina 22% (GORNALL et al., 1949). Após as leituras, obteve-se a fórmula necessária para determinar a concentração proteica: $C = Abs - 0,0144/0,0038$.

Para quantificar as proteínas totais do fígado foi realizado a homogeneização de um pedaço do tecido em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por meio do homogeneizador de tecidos modelo IKA T-18, marca (Biovera). Em seguida, 50 μ L da amostra foram adicionados em 3 mL de biureto. Após 10 minutos, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro ($\lambda = 540$ nm). O ensaio foi realizado em triplicata. A média das absorbâncias foi inserida na equação da reta preestabelecida para a determinação da concentração proteica de cada tecido (GORNALL et al., 1949).

4.4.4.2 Grupos Sulfidrilas reduzidos (-SH)

A quantificação dos níveis de grupos sulfidrilas (-SH) seguiu o procedimento descrito por Ellman (1959), utilizando 1 mg de proteína do tecido homogeneizado com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Primeiramente, a amostra foi adicionada em 2 mL de tampão TRIS- HCl, 25 mM com EDTA 1 mM (pH 8,2). Foram realizadas duas leituras em espectrofotômetro. A primeira leitura foi feita logo após ser adicionado na amostra 20 μ L DNTB 10 mM (5-5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid)) e a segunda leitura após 15 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro ($\lambda = 412$ nm). Todas as amostras foram realizadas em triplicata. A concentração de grupos sulfidrilas (-SH) foi calculada pela equação: $(Abs^{final} - Abs^{inicial}) \times 1,57$ (mM) (ALLAMEH et al., 1997).

4.4.4.3 Glutathiona (GSH)

Os níveis de GSH foram obtidos por meio dos procedimentos descritos por Ellman (1959). Inicialmente, foi preparada uma solução com 200 μ L de tecido homogeneizado com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) e 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA 20 %, EDTA 1 mM), que permaneceu em repouso por 5 minutos para precipitação das proteínas. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 3500 rpm e o sobrenadante (100 μ L) foi adicionado em 2 mL de tampão Tris- HCl 25 mM, com EDTA 1 mM (pH 8,2). Foram realizadas duas leituras em espectrofotômetro. A primeira leitura foi feita logo após ser adicionado 20 μ L DNTB 10 mM na amostra e a segunda leitura realizada após 15 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro ($\lambda = 412$ nm). Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Os níveis de GSH foram calculados por meio da equação $(Abs^{final} - Abs^{inicial}) \times 1,57$ (mM) (ALLAMEH et al., 1997).

4.4.4.4 Glutathiona S-transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada seguindo o método de Habig et al. (1974), onde 1 mg de proteína do tecido homogeneizado foi misturado em 2,7 mL de tampão fosfato + 400 μ L de GSH 0,1 mM. Na sequência, foram adicionados, 400 μ L de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 0,1 mM e a leitura foi realizada imediatamente. O aumento na absorbância foi quantificado em espectrofotômetro ($\lambda = 340$ nm) e as leituras foram observadas com intervalo de 1 minuto por 5 minutos. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

4.4.4.5 Catalase (CAT)

A dosagem da atividade da CAT foi realizada de acordo com o método descrito por Aebi (1974). O ensaio foi realizado com 0,1 mg de proteínas do tecido homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0). A reação foi iniciada com a adição de 200 µL de peróxido de hidrogênio 10 volumes e a leitura foi realizada, imediatamente. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio foi monitorada a cada 30 segundos por 2,5 minutos. As leituras foram realizadas em cubetas de quartzo, em espectrofotômetro ($\lambda = 240$ nm). A atividade foi expressa em unidades de absorvância/minuto. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

4.4.4.6 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de auto-oxidação do pirogalol descrito por Marklund e Marklund (1974). O ensaio foi desenvolvido com 1 mg de proteína do tecido homogeneizado + 2 mL de tampão Tris- HCl, 25 mM com EDTA 1 mM (pH 8,5) + 200 µL de pirogalol 15 mM. A solução foi incubada por 10 minutos e, após esse período, foram adicionados 200 µL de HCl 1N, para encerrar a reação. As amostras foram lidas em espectrofotômetro ($\lambda = 440$ nm). A quantificação de SOD foi determinada de acordo com a quantidade de enzima que inibiu a oxidação do pirogalol. A atividade foi expressa em unidades de absorvância/minuto. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

4.4.4.7 Peroxidação Lipídica (TBARS)

O nível de peroxidação lipídica foi avaliado com a adição de 5 mg de proteínas do homogenato de fígado em 1 mL de água destilada, 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA - 0,67 % preparado em NaOH 50 mM), 10 µL de NaOH 10 M e 500 µL de H₃PO₄ 20%, aquecida em banho-maria por 15 minutos. Na sequência, as amostras foram esfriadas e agitada vigorosamente com 3 mL de n-butanol, para extração do cromógeno. A fase orgânica (com cromógeno) foi separada após centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm. Todas as amostras foram realizadas em triplicata e os valores da absorvância foram obtidos em espectrofotômetro ($\lambda = 535$ nm). A concentração de malondialdeído (MDA) foi calculada usando $ABS = 149.000 M^{-1} cm^{-1}$ (BUEGE; AUST, 1978; GORNALL et al., 1949).

4.4.4.8 Análise estatística

A normalidade de todos os resultados foi realizada pelo teste D'Agostino & Pearson, para verificar se os dados foram distribuídos de forma paramétrica ou não

paramétrica. De acordo com a distribuição dos dados, foi realizada a análise estatística dos resultados pelo teste ANOVA/Tukey para os ensaios de -SH, GSH, SOD, CAT e GST e Kruskal-Wallis para o ensaio de peroxidação lipídica. Em todas as análises foram considerados $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

Artigo 1: Efeitos citogenotóxicos da diamina cadaverina, avaliados por meio do sistema teste *Allium cepa*

Artigo 2: Potencial genotóxico e mutagênico da cadaverina sobre células de anfíbio (Speedy) e células de fígado humano (HepG2)

Artigo 3: Avaliação da atividade genotóxica e mutagênica da cadaverina para ratos, após exposição oral

Artigo 4: Evidências de estresse oxidativo em fígado de ratos Wistar submetidos a diferentes concentrações de cadaverina

Artigo 1: Efeitos citogenotóxicos da diamina cadaverina, avaliados por meio do sistema teste *Allium cepa*

Raquel Vaz Hara¹; Franco Dani Campos-Pereira¹; Maria Aparecida Marin Morales^{1*}

¹UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.
e-mail: mamm@rc.unesp.br

Resumo

A atividade biológica envolvida com a decomposição cadavérica produz um líquido denominado de necrochorume, composto por substâncias tóxicas que podem comprometer as malhas ambientais como o solo e águas subterrâneas e superficiais. Dentre essas substâncias, está a amina biogênica cadaverina. Este trabalho avaliou a ação citotóxica, genotóxica e mutagênica da cadaverina em células meristemáticas de *A. cepa*, submetidas a 5 diferentes concentrações desta substância (61,5, 184,5, 307,5, 430,5 e 553,5 mg/L). Pela análise dos resultados, pode-se observar que a cadaverina não induziu alteração significativa do índice mitótico, porém, as menores concentrações testadas (61,5, 184,5 e 307,5 mg/L) apresentaram um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas, indicando uma atividade genotóxica. As aberrações mais observadas foram aderências cromossômicas e células binucleadas. Quanto às análises de mutagenicidade, não foi observado resultados significativos. Por esses resultados, podemos inferir que a cadaverina, nas menores concentrações testadas, pode apresentar um efeito aneugênico em células meristemáticas de *A. cepa*. Assim, ressalta-se a importância de se estudar os efeitos de baixas concentrações desta amina biogênica devido a genotoxicidade induzidas pelas baixas concentrações de cadaverina apresentadas nesse trabalho para se estimar os danos que ela possa promover em organismos eventualmente expostos a ela.

Palavras-chave: necrochorume; aminas biogênicas; aberrações cromossômicas; micronúcleo

1. Introdução

O crescimento populacional tem contribuído para o aumento da contaminação ambiental. Dentre as atividades antrópicas que poluem o ambiente, os cemitérios se destacam como importantes poluidores de solo e corpos hídricos (superficiais e subterrâneos). O considerável potencial de contaminação dos cemitérios está associado ao acelerado crescimento populacional, que decorre em um alto e crescente índice de sepultamentos (OLIVEIRA, 2013). Assim, embora ainda pouco estudados quanto ao seu potencial de contaminação, os cemitérios são áreas de grande preocupação em relação aos impactos que podem causar tanto nos corpos hídricos como também nos solos de seu entorno (SPONGBERG; BECKS, 2000).

A contaminação das águas subterrâneas pode inviabilizar o uso dessa água para as atividades agrícolas, industriais e de abastecimento público, devido ao seu potencial em causar problemas à saúde humana (PAÍGA; DELERUE-MATOS, 2016). Em 1998, a Organização Mundial da Saúde (OMS) redigiu um relatório sobre os possíveis impactos ambientais e à saúde humana causados por cemitérios, enfatizando a contaminação do solo e das águas subterrâneas, embora existam poucos estudos que avaliam esse tipo de contaminação (CAŁKOSIŃSKI et al., 2015). Os estudos de Kemerich e Borba (2013) reforçam a preocupação com a qualidade das águas subterrâneas, usadas no abastecimento público, apontando para a necessidade de se realizar o monitoramento da qualidade da água do lençol freático, para minimizar os riscos de seu consumo.

Devido aos possíveis impactos que os cemitérios possam conferir ao ambiente e à saúde humana, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) do Brasil elaborou uma Resolução (nº 335/2003) que dispõe sobre os critérios de implantação de novos cemitérios e adequação daqueles existentes, visando reduzir os impactos gerados pelos sepultamentos (KEMERICH et al., 2014).

Essa contaminação conferida pelos cemitérios está relacionada com a produção de compostos químicos tóxicos, formados durante a putrefação dos corpos em decomposição. Durante putrefação cadavérica é formado um líquido denominado de necrochorume que ocorre logo nos primeiros dias da decomposição dos corpos e, conseqüentemente, a contaminação ambiental começa com o escoamento desse líquido (viscoso, acinzentado), que contém substâncias inorgânicas e orgânicas tóxicas, como a amina biogênica cadaverina, além de microrganismos patogênicos (CUESTA, 1986; NEIRA et al., 2008). Assim, substâncias presentes no necrochorume podem acarretar sérias conseqüências ambientais ao atingir as

águas subterrâneas por meio da infiltração da água das chuvas ou pela sua percolação no solo (BOUWER, 1978; FINEZA, 2008).

As aminas biogênicas que são compostos nitrogenados, formados pela descarboxilação de aminoácidos precursores, por meio de biossíntese e processos enzimáticos (DURIE et al., 1977; KHUHAWAR; QURESHI, 2001; BACHRACH, 2004). A cadaverina é uma diamina alifática produzida pela ação da enzima lisina descarboxilase, que medeia a reação de descarboxilação do aminoácido lisina (HAWEL et al., 1994). Em concentrações fisiológicas são componentes essenciais das células vivas, que participam da proliferação, diferenciação e morte celular (HEATHER et al., 2003), porém, em concentrações elevadas podem ser consideradas tóxicas (BACH et al., 2012).

Bioindicadores vegetais, como a espécie *Allium cepa*, são amplamente utilizados para avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos de poluentes ambientais (YI; MENG, 2003; LEME; MARIN-MORALES, 2009). A espécie *A. cepa* se destaca por ser um teste bem estabelecido, com alta sensibilidade e uma boa correlação com células humanas mantidas em cultura (PALMIERI et al., 2006) e com mamíferos (FISKESJO, 1985; GRANT, 1994; RANK; NIELSEN, 1997). O ensaio com células meristemáticas deste organismo teste permite avaliar o potencial citotóxico (índice mitótico - IM), genotóxico (alterações cromossômicas e nucleares) e mutagênico (quebras cromossômicas e/ou MN) de amostras ambientais ou agentes químicos específicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Vários pesquisadores têm empregado com sucesso esse ensaio em avaliação toxicológica de diversas fontes de contaminação ambiental (SAMUEL et al., 2010; BAKARE et al., 2012; MAZZEO et al., 2015; BIANCHI et al., 2016; VENTURA-CAMARGO et al., 2016). Além disso, testes realizados com vegetais são reconhecidos e validados por órgãos ambientais internacionais com a “United Nations Environmental Program” (UNEP), a “World Health Organization” (WHO) e a “US Environmental Protection Agency” (USEPA) (GRANT, 1985; GRANT, 1999).

A diamina cadaverina, mesmo sendo reconhecida como substância tóxica, tem sido pouco estudada quanto ao seu potencial de contaminar solos e corpos d'água, e quanto aos perigos que possa conferir aos organismos eventualmente expostos. Até o momento, não existe na literatura qualquer avaliação da toxicidade ambiental desse composto. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dessa amina sobre o meio biológico, por meio dos testes de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN) realizados com organismo teste *A. cepa*, exposto a diferentes concentrações da amina cadaverina.

2. Materiais e Métodos

2.1. Químico Testado

A substância teste usada neste estudo foi a diamina cadaverina sintética (1,5-Diaminopentano, 1,5-Pentanodiamina, Pentametilenediamina), fórmula molecular $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, massa molecular 102,18, CAS: 461-94-2, Fluka – pureza 97%).

Para a realização dos ensaios com *A. cepa*, foram preparadas diferentes concentrações da cadaverina (553,5 mg/L, 430,5 mg/L, 307,5 mg/L, 184,5 mg/L e 61,5 mg/L) baseadas nas informações toxicológicas contidas na ficha de segurança do produto, fornecida pela Sigma-Aldrich. Todas as concentrações foram diluídas em água ultrapura e preparadas no momento em que o bioensaio foi realizado.

2.2. Organismo Teste

A espécie *A. cepa* (2n=16) foi usada como organismo-teste para avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da diamina cadaverina. Nos ensaios, foram usadas sementes de cebola da marca Isla Park Sementes Ltda., de mesmo lote e variedade (Baia Periforme).

2.3. Bioensaio

As sementes de *A. cepa* (150 por placa) foram germinadas em placas de Petri forradas com papel filtro, diretamente nas concentrações de cadaverina (tratamentos), água ultrapura para o controle negativo (CN) e solução aquosa de metilmetano sulfonato (MMS – Sigma-Aldrich – 4×10^{-4} M), para o controle positivo (CP). Após germinação e com cerca de 1,5 centímetros, as radículas foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v).

Para os testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de raiz de cebola, foi adotado o protocolo descrito por Grant (1982), com algumas modificações. As raízes fixadas foram hidrolisadas em HCl 1 N a 60° C por 10 minutos e transferidas para frascos escuros contendo reativo de Schiff, onde permaneceram por, aproximadamente, 2 horas. As lâminas foram confeccionadas seccionando a região meristemática da raiz, com o auxílio de um estilete. O material foi recoberto com lamínula e esmagado, suavemente, em uma gota de Carmim Acético (2%). Para a obtenção de lâminas

permanentes, as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em resina sintética (Entellan®).

Foram confeccionadas 10 lâminas por tratamento e por controle, onde foram analisadas, no mínimo, 500 células por lâmina. Com a análise das lâminas em microscópio de luz, em objetiva de 40x, foram estimados os índices de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da cadaverina. O índice mitótico (IM), obtido pela relação entre o número de células em divisão/número total de células observadas, foi usado como indicativo de citotoxicidade. O efeito genotóxico foi avaliado pela frequência de alterações cromossômicas como aderências, pontes, perdas, brotos nucleares, células binucleadas e outras. O potencial mutagênico da substância foi estimado pela contabilização de células portadoras de quebras cromossômicas e MN.

2.4. Análise estatística

A comparação dos resultados obtidos pela análise dos parâmetros de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foi realizada de acordo com a distribuição dos dados, conferidos pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Em seguida, foi aplicado o teste paramétrico (ANOVA/Tukey), para o parâmetro de citotoxicidade, que apresentou distribuição normal dos dados e o teste não paramétrico (Kruskal-Wallis/Dunn's), para os parâmetros de genotoxicidade e mutagenicidade, que apresentaram distribuição não normal. Para as análises foi usado o software GraphPad Prism (versão 7.00). Os resultados que obtiveram níveis de significância ($p < 0,05$), quando comparados com o controle negativo, foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados e Discussão

A ação genotóxica e/ou mutagênica de uma substância química pode induzir danos genéticos que, quando não reparados, podem afetar as gerações futuras e acarretar em sérios problemas a saúde dos organismos expostos (RIBEIRO, 2003). Diante desse fato, avaliar a capacidade de uma substância reagir com o DNA e os constituintes celulares é extremamente importante para garantir a qualidade ambiental e a diminuição de riscos à saúde humana.

3.1. Índice Mitótico (IM)

O IM é utilizado para estimar se uma dada substância apresenta ação citotóxica sobre um determinado organismo. A citotoxicidade da cadaverina foi estimada pela

comparação entre a frequência de células em divisão celular dos tratamentos e a frequência das células em divisão do controle negativo (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Segundo Fernandes et al. (2007), a citotoxicidade pode ser determinada pelo aumento ou diminuição do IM.

Os efeitos da cadaverina sobre o IM de células meristemáticas de *A. cepa* estão apresentados na Figura 1. No presente estudo, os resultados obtidos não mostraram evidência de diferença estatisticamente significativa entre o IM das raízes expostas às diferentes concentrações da cadaverina e o controle negativo. Assim, concluiu-se que, para o organismo-teste *A. cepa*, a cadaverina não se mostrou citotóxica nas concentrações avaliadas.

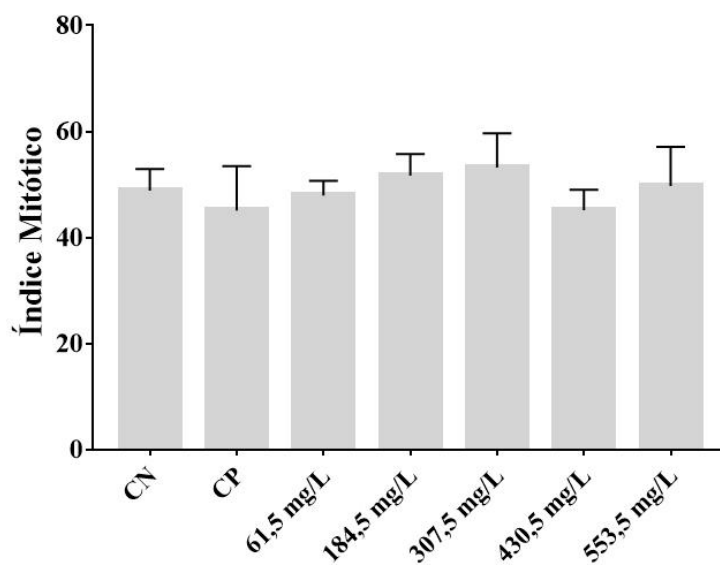


Figura 1: Índice Mitótico de células de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações de cadaverina. CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo.

3.2. Genotoxicidade

A análise de aberrações cromossômicas tem sido muito utilizada por ser um parâmetro que permite avaliar o potencial de substâncias químicas promoverem danos no material genético de um organismo exposto a ela. Segundo Maluszynska e Juchimiuk (2005), as aberrações cromossômicas ocorrem pela ruptura na fita de DNA, que não foi reparada ou foi reparada de forma imprópria. Pelas características cromossômicas que possui, a espécie *A. cepa* se caracteriza em um organismo teste favorável para a observação e avaliação de indução de aberrações cromossômicas por um agente, permitindo, assim, a compreensão dos

mecanismos de ação da substância testada (FISKESJO, 1985; RANK; NIELSEN, 1997; NATARAJAN, 2002).

A frequência e os tipos de aberrações cromossômicas, observados para as diferentes concentrações de cadaverina e para os grupos controle, estão apresentadas na Tabela 1 e ilustradas na figura 2.

De maneira geral, foi registrado um aumento das aberrações cromossômicas nas células das raízes expostas as concentrações de cadaverina, quando comparadas com os resultados encontrados para o controle negativo. Porém, somente as concentrações de 61,5, 184,5 e 307,5 mg/L apresentaram aumento significativo de aberrações cromossômicas totais, em relação ao controle negativo.

No presente estudo, foram observados diferentes tipos de aberrações cromossômicas, tais como brotos nucleares, aderências, perdas e pontes cromossômicas, células binucleadas e células poliploides, sendo que as mais frequentes foram as aderências e as células binucleadas. As frequências de aderências e de células binucleadas não foram, isoladamente, significativas, mas foram as alterações que mais contribuíram para a significância da quantidade total de aberrações cromossômicas. Ventura-Camargo et al. (2016) também relataram a presença de aderências e células binucleadas, em células meristemáticas de *A. cepa*, como sendo as alterações mais frequentes e observaram que após a processo de biodegradação do corante preto (BDCP - Black Dye Commercial Product), os metabolitos formados (que incluem aminas aromáticas) foram mais tóxicos que o próprio contante utilizado na indústria têxtil.

Segundo Vidakovic-Cifrek et al. (2002), as alterações cromossômicas em *A. cepa* são observadas nas diferentes fases do ciclo celular e podem indicar ação aneugênica ou clastogênica, conforme o tipo de alteração encontrada. A ação aneugênica ocorre quando uma substância causa a inativação de algum constituinte celular como, por exemplo, o fuso mitótico, cujo efeito leva a perda de cromossomos inteiros. Já a ação clastogênica é caracterizada pela capacidade de uma substância interagir diretamente com a molécula de DNA, podendo induzir quebras cromossômicas durante a divisão celular (FENECH, 2000). Os resultados obtidos pela exposição de *A. cepa* à cadaverina mostraram uma maior incidência de células com aderência cromossômica e células binucleadas, que pode indicar uma ação aneugênica para essa substância estudada.

As aderências cromossômicas podem ocorrer devido à condensação do DNA ou pela ação de uma substância sobre as fibras de cromatina (OSTERBERG et al., 1984; CHAUHAN et al., 1999). Esse tipo de aberração é resultante de um efeito altamente tóxico,

muitas vezes irreversíveis, e que, provavelmente, pode conduzir a morte celular (LIU et al. 1992; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Essa alteração não envolve diretamente o DNA, mas sim a matriz proteica da cromatina (FERNANDES et al., 2007), que pode impedir a migração dos cromossomos para os polos opostos, indicando uma ação aneugênica (VENTURA-CAMARGO et al., 2016). Além disso, alguns autores têm citado que as aderências podem resultar em alterações secundárias, como pontes anafásicas, já que seus cromossomos tendem a ficar unidos e, conseqüentemente, no momento da separação das cromátides, ocorrem as quebras cromossômicas (MARCANO et al., 2004). Essas pontes cromossômicas derivadas das aderências podem ocorrer em vários cromossomos ao mesmo tempo e persistir até a telófase (GIACOMELLI, 1999).

Frequências elevadas de aderências cromossômicas, que foram observadas neste trabalho, têm também sido relatadas por outros pesquisadores que avaliaram contaminantes ambientais. Martins et al. (2016) também observaram um aumento na frequência de aderências em células meristemáticas de *A. cepa* após o tratamento com solubilizado de lodo de esgoto. Segundo Kapanen et al. (2013), lodo de esgoto pode conter contaminantes orgânicos metais e patógenos.

Como também foi observado um aumento no número de células binucleadas, após exposição à cadaverina, podemos inferir uma possível ação da cadaverina sobre o fragmoplasto, que pode ser explicado pelo fato de que nas células vegetais a parede celular impossibilita o evento convencional de citocinese. Assim, para a divisão do citoplasma, há então a formação de vesículas do Golgi que se unem na porção mediana da célula, dando suporte de membrana (fragmoplasto), para a ancoragem do material da nova parede celular (CHAKRABORTY et al., 2009). A inibição do desenvolvimento da parede celular no final da telófase, resultando em células binucleadas, foi observada por Sudhakar et al. (2001) após avaliar a toxicidade de amostras de efluentes que podem conter compostos orgânicos e inorgânicos.

3.3. Mutagenicidade

Para avaliar o potencial mutagênico da cadaverina, foram contabilizadas as frequências de quebras cromossômicas e de MN, em células meristemáticas de *A. cepa*, que estão apresentados na Tabela 2. Todas as concentrações de cadaverina testadas não induziram diferença estatisticamente significativa para esse parâmetro, quando comparadas ao controle negativo. Esse fato mostra que as alterações cromossômicas encontradas neste trabalho, e

citadas anteriormente, não foram fixadas no organismo exposto. Isso ocorre porque os danos ocasionados no material genético podem ser reparados ou o tipo da lesão pode levar a morte celular e, com isso, não são repassados para as células-filhas, representado pela baixa frequência de MN observado.

O controle positivo foi realizado com solução aquosa de Metilmetano Sulfonato (MMS), segundo indicação de Rank e Nielsen (1997), por ser uma substância reconhecidamente capaz de induzir aberrações cromossômicas e micronúcleos. Nossos dados corroboram a sugestão desses autores, uma vez que o nosso controle positivo com MMS apresentou valores estatisticamente significativos nos índices de genotoxicidade e mutagenicidade. A partir desses dados, podemos afirmar que a espécie *A. cepa*, utilizada neste trabalho, foi sensível a exposição de uma substância tóxica conhecida. Esses resultados ainda são interessantes para validar o lote de sementes utilizados neste estudo, confirmando a sensibilidade da espécie *A. cepa* em responder, positivamente, quando exposta a um agente mutagênico.

Diante dos resultados apresentados e levando em consideração que o sistema-teste *A. cepa* apresenta alta sensibilidade e boa correlação com outros organismos-teste (RANK; NIELSEN, 1994; FÁTIMA; AHMAD, 2006), podemos inferir que a cadaverina tem potencial genotóxico, pois induziu aberrações cromossômicas nas células meristemáticas de *A. cepa*.

Tabela 1: Frequência de aberrações cromossômicas, como indicativo de genotoxicidade em células de *A. cepa*, após exposição a diferentes concentrações da diamina cadaverina

Tratamentos	CN	CP	Cadaverina				
			61,5 mg/L	184,5 mg/L	307,5 mg/L	430,5 mg/L	553,5 mg/L
Broto Nuclear	0,29±0,46	21,24±10,56	0,48±0,93	0,76±0,98	0,10±0,60	0,10±0,30	0,38±0,49
Aderência	0,31±0,10	0,87±0,85	2,76±1,22	2,85±1,09	2,18±0,79	2,70±1,29	2,09±1,22
Ponte	0,09±0,30	0,68±0,80	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,31	0,08±0,25	0,10±0,31
Perda	0,00±0,00	0,75±0,73	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,09±0,27	0,00±0,00
Ponte + Perda	0,09±0,30	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,30	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Ponte + Quebra	0,00±0,00	1,15±0,85	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Célula Binucleada	0,00±0,00	0,00±0,00	2,08±1,57	1,79±1,21	2,63±1,31	1,83±1,07	0,19±0,40
Célula Poliplóide	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,09±0,28
Índice de Genotoxicidade	1,79±1,14	24,69±10,65*	5,31±1,57*	5,49±1,97*	5,12±0,66*	4,79±1,52	2,85±1,32

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; * estatisticamente significativo ($p < 0,05$)

Tabela 2: Frequência de quebras cromossômicas e MN, como indicativo de mutagenicidade observados em células de *A. cepa* após exposição a concentrações da diamina cadaverina

Tratamento	CN	CP	Cadaverina				
			61,5 mg/L	184,5 mg/L	307,5 mg/L	430,5 mg/L	553,5 mg/L
MN	0,00±0,00	34,71±12,47	0,19±0,40	0,30±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	0,19±0,40
Quebra	0,00±0,00	1,35±1,29	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,30	0,00±0,00	0,09±0,28
Índice de Mutagenicidade	0,00±0,00	36,06±13,43*	0,19±0,40	0,30±0,67	0,10±0,30	0,00±0,00	0,28±0,45

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; * estatisticamente significativo ($p < 0,05$)

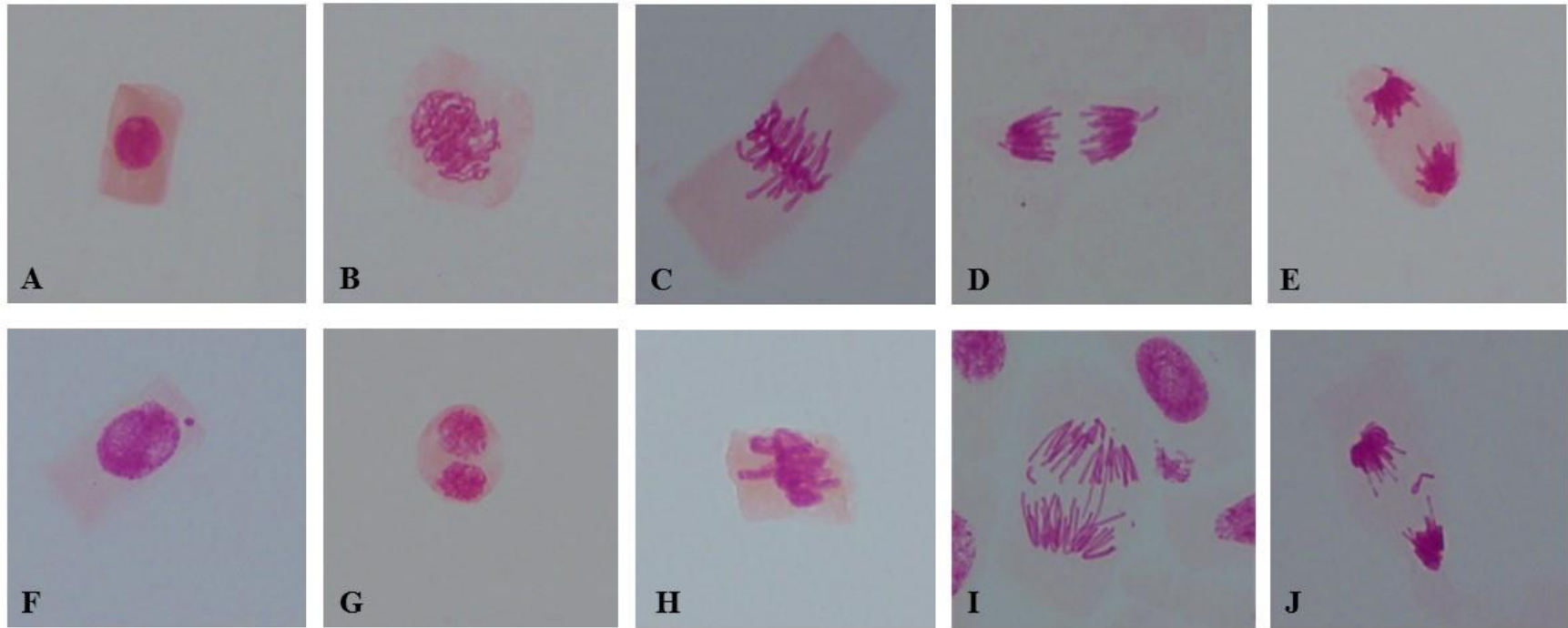


Figura 2: Células meristemáticas de *A. cepa*. A: Interfase; B: Prófase; C: Metáfase; D: Anáfase; E: Telófase; J: Interfase com MN; G: Célula binucleada; H: Metáfase com aderência; I: Anáfase com quebra e ponte cromossômica; J: Telófase com perda cromossômica

4. Conclusões

Pelos resultados do presente trabalho, pode-se observar que a cadaverina não apresentou potencial citotóxico e mutagênico para a espécie *A. cepa*.

A cadaverina apresentou um potencial genotóxico e também a possibilidade de agir nos constituintes celulares, como observado pelas análises de aberrações cromossômicas. A alta frequência de aderências e células binucleadas, observadas após exposição à cadaverina, sugerem que essa substância apresenta uma ação aneugênica e age sobre a estrutura do fragmoplasto, respectivamente.

Essa diamina componente do necrochorume pode ser considerada um poluente ambiental capaz de induzir aberrações cromossômicas nos organismos eventualmente expostos a ela.

Como a espécie *A. cepa* se mostrou um excelente bioindicador de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, pode-se concluir que este estudo contribui com dados importantes a respeito desta diamina, abrindo a possibilidade do desenvolvimento de outros ensaios, realizados com outros materiais biológicos, que complementem as informações aqui apresentadas.

5. Referências Bibliográficas

- BACH, B.; LE QUERE, S.; VUCHOT, P.; GRINBAUMC, M.; BARNAVON, L. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine instability during wine sample storage. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 114–119, 2012.
- BACHRACH, U. Polyamines and cancer: minireview article. **Amino Acids**, v. 26, p. 307–309, 2004.
- BAKARE, A. A.; ADEYEMI, A. O.; ADEYEMI, A.; ALABI, O. A.; OSIBANJO, O. Cytogenotoxic effects of electronic waste leachate in *Allium cepa*. **Caryologia**, v. 65, p. 94–100, 2012.
- BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475-83, 2016.
- BOUWER, H. Groundwater Hydrology. **McGraw-Hill Inc.**, New York, 1978.
- CAŁKOSIŃSKI, I.; PŁONECZKA-JANECZKO, K.; OSTAPSKA, M.; DUDEK, K.; GAMIAN, A.; RYPUŁA, K. Microbiological Analysis of Necrosols Collected from Urban Cemeteries in Poland. **Biomed Res Int.**, v. 2015, 2015.
- CHAKRABORTY, R.; MUKHERJEE, A. K.; MUKHERJEE, A. Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium test*. **Environ Monit Assess**, v. 153, p. 351–357, 2009.

- CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environ Exp Bot.**, v. 42, p. 181–189, 1999.
- CUESTA, J. M. R. de la. Informe solicitado por NEMOSA. Comunicação pessoal não publicada. Madrid, 1986.
- DURIE, B. G. M.; SALMON, S. E.; RUSSELL, D. H. Polyamines as markers of response and disease activity in cancer chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 37, p. 214–222, 1977.
- FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays. **Mutat. Res.**, v. 609, p. 81–91, 2006.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 455, 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. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 88, p. 252–259, 2007.
- 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).
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, 1985.
- GIACOMELLI, F. R. B. Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil, 1999.
- GRANT, W. F. Chromosomal aberration assays in *Allium*. A report of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutat. Res.**, v. 99, p. 273–291, 1985.
- GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutat. Res.**, v. 624, p. 107–112, 1999.
- GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutat. Res.**, v. 310, p. 175–185, 1994.
- GRANT, W. F.; Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency. **Gene-Tox program. Mutation Research**, v. 99, p. 273–291, 1982.
- HAWEL, L. III.; TJANDRAWINATA, R. R.; FUKUMOTO, G. H.; BYUS C.V. Biosynthesis and selective export of 1,5-diaminopentane (cadaverine) in mycoplasma-free cultured mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 7412-7418, 1994.
- HEATHER, M.; WALLACE, A.; FRASER, V. HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochem. J.**, v. 376, p. 1–14, 2003.
- KAPANEN, A.; VIKMAN, M.; RAJASÄRKKÄ, J.; VIRTA, M.; ITÄVAARA M. Biotests for environmental quality assessment of composted sewage sludge. **Waste Manag.**, v. 33, n. 6, p. 1451-6, 2013.
- KEMERICH, P. D. da C.; BIANCHINI, D. C.; FANK, J. C.; BORBA, W. F.; WEBER, D. P.; UCKER, F. E. A questão ambiental envolvendo os cemitérios no Brasil. **Revista Monografias Ambientais – REMOA**, v. 13, n. 5, p. 3777-3785, 2014.

- KEMERICH, P.D.C.; BORBA, W. F. Cemitérios e os problemas ambientais: a dura realidade brasileira. *Revista Conselho em Revista - CREA RS*, v. 10, p. 36-37, 2013.
- KHUHAWAR, M. Y.; QURESHI, G. A. Review: polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *J Chromatogr B*, v. 764, p. 385–407, 2001.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res.*, v. 682, p.71–81.
- LIU, D. H.; JIANG, W. S.; LI, M. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas*, v. 117, p. 23–29, 1992.
- LUBER, J.; DAVIDE, L. C.; MARCUSSI, S. Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. *Water Air Soil Pollut*, v, 227, n. 156, 2016.
- MA, T. H. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutat Res.*, v. 426, p. 103–106, 1999.
- MALUSZYNSKA, J.; JUCHIMIUK, J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Arh Hig Rada Toksikol*, v. 56, p. 177–184, 2005.
- MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of malei hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. *Environ. Res.*, v. 94, p. 221–226, 2004.
- MARTINS, M. N. C.; DE SOUZA, V. V.; SOUZA T. S. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. *Chemosphere*, v. 148, p. 481-6, 2016.
- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. *Ecol Indic.*, v. 56, p. 60–69, 2015.
- NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat. Res.*, v. 504, p. 3–16, 2002.
- NEIRA, D. F.; TERRA, V. R.; VILMA, R.; PRATTE-SANTOS, R.; BARBIÉRI, R. S. Impactos do necroschorume nas águas subterrâneas do cemitério de Santa Inês, Espírito Santo, Brasil. *Natureza on line*, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.
- OLIVEIRA, B.; QUINTEIRO, P.; CAETANO, C.; NADAIS, H.; ARROJA, L.; DA SILVA, E. F.; MATIAS, W. S. Burial grounds' impact on groundwater and public health: an overview. *Water Environ. J.*, v.27, p. 99–106, 2013.
- OSTERBERG, R.; PERSSON, D.; BJURSELL, G. The condensation of DNA by chromium (III) ions. *J Biomol Struct Dyn.*, v. 2, p. 285–290, 1984.
- PAÍGA, P.; DELERUE-MATOS, C. Determination of pharmaceuticals in groundwater collected in five cemeteries' areas (Portugal). *Sci Total Environ.*, v. 569-570, p. 16-22, 2016.
- PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; TRENTO, M. V. C.; ELEUTÉRIO, M. W. F.; RANK, J.; NIELSEN, M. Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat. Res.*, v. 312, p. 17–24, 1994.
- RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.*, v. 390, p. 121–127, 1997.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.), *Mutagênese Ambiental*, **Ulbra**, Canoas, p. 201–219, 2003.

SAMUEL, O. B.; OSUALA, F. I.; ODEIGAH, P. G. C. Cytogenotoxicity evaluation of two industrial effluents using *Allium cepa* assay. **Afr J Environ Sci Technol.**, v. 4, p. 021–027, 2010.

SPONGBERG, A. L.; BECKS, P. M. Inorganic soil contamination from cemetery leachate. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 117, p. 313–327, 2000.

SUDHAKAR, R.; NINGE GOWDA, K. N.; VENU, G. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 66, p. 235-239, 2001.

VENTURA-CAMARGO, B. de C.; DE ANGELIS D. de F.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-32, 2016.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environ. Contam. Toxicol.**, v. 43, p. 284–291, 2002

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutat. Res.**, v. 537, p. 109-114, 2003.

Artigo 2: Potencial genotóxico e mutagênico da cadaverina sobre células de anfíbio (Speedy) e células de fígado humano (HepG2)

Raquel Vaz Hara¹; Franco Dani Campos-Pereira¹; Maria Aparecida Marin Morales^{1*}

¹UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: mamm@rc.unesp.br

Resumo

Os cemitérios são considerados uma fonte de poluição, devido à produção de um líquido orgânico denominado de necrochorume que, além de comprometer o meio ambiente, pode causar sérios problemas à saúde humana. Na composição desse líquido encontra-se a amina cadaverina ($C_5H_{14}N_2$), uma substância considerada altamente tóxica, que é produzida durante a putrefação de tecidos orgânicos de corpos em decomposição. No entanto, não há estudos que avaliem o potencial genotóxico dessa diamina. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* da cadaverina, pelo teste da resazurina (citotoxicidade); teste do cometa (genotoxicidade); e o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (mutagenicidade). Foram testadas, por 24 horas, diferentes concentrações da cadaverina em duas linhagens celulares (células de anfíbio - Speedy e células de hepatoma humano - HepG2) mantidas em cultura. Os resultados mostraram que a cadaverina foi citotóxica para ambas as linhagens, no entanto, as células Speedy foram mais sensíveis que as células HepG2. Quanto ao potencial genotóxico, nenhuma das concentrações testadas apresentou diferença significativa, quando comparadas com o grupo controle, nas duas linhagens celulares testadas pelo ensaio do cometa. Pelo teste do MN, foi observado um aumento significativo de brotos nucleares para as células Speedy e HepG2, e um aumento significativo de pontes nucleoplasmáticas em todas as concentrações testadas nas células Speedy, também indicando um potencial genotóxico. Na avaliação do potencial mutagênico, foi possível observar um aumento significativo na frequência de MN para as maiores concentrações testadas nas duas linhagens celulares. Diante desses resultados, podemos observar que, em condições controladas, a cadaverina pode ter ação citotóxica, genotóxica e/ou mutagênica sobre as células de anfíbios e humanas, deixando um alerta de que áreas de cemitério podem conferir potencial tóxico para o meio ambiente e para a saúde humana.

Palavras-chave: cemitérios, necrochorume, citotoxicidade, ensaio do cometa, teste do micronúcleo

1. Introdução

As áreas de cemitérios podem gerar uma grande carga poluidora e, conseqüentemente, um alto potencial de contaminação ambiental (JONKER; OLIVIER, 2012). A principal causa da poluição gerada por cemitérios é a liberação intermitentemente de um líquido denominado de necrochorume, pelos cadáveres em putrefação, durante o primeiro ano após o sepultamento (KEMERICH et al., 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a maioria dos cemitérios são implantados sem a preocupação dos possíveis riscos que possam causar tanto ao meio ambiente como à população humana ao seu redor. A Resolução do CONAMA nº 335/2003 (Brasil) traz os critérios mínimos a serem seguidos para a implantação de novos cemitérios e os critérios exigidos para a adequação dos cemitérios já existentes.

Segundo Vass et al. (1992), o corpo humano é uma estrutura complexa que, no processo de decomposição, gera vários produtos como gordura, aminoácidos (dentre eles a lisina), ácidos graxos e as aminas cadaverina e a putrescina. A continuidade do processo de degradação gera ainda produtos finais como amônia, sulfeto de hidrogênio, mercaptanos, metano, dióxido de carbono e ácido fosfórico (RODRIGUES; PACHECO, 2003). Nesta degradação após o sepultamento dos corpos, ocorre uma série de alterações. Nas primeiras horas, há a decomposição dos tecidos moles, pelo processo de autólise (VASS et al. 1992). Em seguida, ocorre o processo de fermentação por bactérias endógenas, principalmente as do intestino humano, que inclui, bactérias anaeróbias, na primeira etapa, e, posteriormente, grupos de bactérias facultativas aeróbias e anaeróbias. Além de bactérias, também participam da putrefação dos cadáveres, fungos saprófitos e uma diversificada entomofauna (RODRIGUES; PACHECO, 2003).

A duração das etapas de decomposição do corpo humano pode variar de acordo com os fatores intrínsecos (idade, sexo, altura, entre outros) e fatores extrínsecos (temperatura, tipo de solo, oxigenação, profundidade da cova e presença de insetos), que podem acelerar, retardar ou encerrar esse processo (RODRIGUEZ; BASS, 1985), sendo os extrínsecos, segundo Mann et al. (1990), as variáveis mais importantes do processo de decomposição.

O necrochorume tem a característica de ser facilmente dissolvido em água (PACHECO, 2012). Żychowski (2012), aponta que as águas subterrâneas adjacentes as áreas de cemitérios apresentam uma alta concentração de patógenos derivados da

microbiota e flora intestinal, presença de íons e aminas, além de uma concentração aumentada de gases que são instáveis no ar.

Dentre as substâncias orgânicas presentes nesse líquido, encontra-se, então, a amina cadaverina ($C_5H_{14}N_2$), inicialmente identificada como um produto da decomposição da lisina presente na matéria orgânica, que entra em contato com o meio ambiente por meio da percolação do necrochorume no solo e que pode atingir as águas superficiais e o lençol freático. A cadaverina está envolvida em diversos processos biológicos como o crescimento e o desenvolvimento (BAGNI; TASSONI, 2001) e níveis anormais de cadaverina estão relacionados com o aparecimento de doenças, incluindo o câncer (GERNER; MEYSKENS, 2004).

Mesmo a cadaverina sendo reconhecida como uma substância tóxica, ela tem sido pouco estudada quanto ao seu potencial poluidor de solos e água e quanto aos perigos que ela pode conferir aos organismos eventualmente expostos. Até o momento, não existe na literatura qualquer avaliação da toxicidade ambiental desse composto. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênicos da cadaverina sobre duas linhagens celulares mantidas em cultura e comparar os efeitos citogenotóxicos registrados para a linhagem HepG2, que apresenta protocolos bem estabelecidos para os ensaios da resazurina, cometa e MN, com os efeitos observados na nova linhagem de células de anfíbio, denominada de linhagem Speedy.

Ensaio com cultura de células têm sido amplamente utilizados como sistema-teste em estudos que investigam o potencial genotóxico e mutagênico de poluentes ambientais (ZHANG et al., 2012; MAZZEO et al. 2013; BIANCHI et al., 2015, BONOMO et al., 2016). A linhagem celular HepG2 (derivada de hepatoma humano) apresenta atividade das várias enzimas de fase I e fase II envolvidas na ativação e desintoxicação de substâncias. Este fato caracteriza essa linhagem como uma excelente ferramenta para detectar várias classes de agentes genotóxicos ambientais, que atuam de forma direta e/ou indireta (KNASMULLER et. al., 1998; 2004). Essa linhagem tem sido utilizada em diversas pesquisas, para avaliar, por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo, os potenciais genotóxico e mutagênico, respectivamente, de compostos diversos (MCGUIGAN; LI, 2014; BIANCHI et al., 2015; ŽUNEC et al., 2016). A linhagem celular Speedy, descrita recentemente por Sinzelle et al. (2012), é uma linhagem permanente derivada de fibroblasto, obtida da espécie *Xenopus tropicalis*. Essa linhagem apresenta um cariótipo geneticamente

estável, com o número de cromossomos de $2n=21$ (uma trissomia no cromossomo 10). Seu tempo de duplicação é de, aproximadamente, 24 horas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Substâncias Química Testada

A substância química testada foi a amina biogênica cadaverina (1,5-Diaminopentano, 1,5-Pentanodiamina, Pentametilenediamina, fórmula molecular $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, peso molecular 102,18, Fluka – pureza 97%) e estrutural química representada abaixo (figura 1), comercializada pela Sigma-Aldrich, CAS-No. 462-94-2.

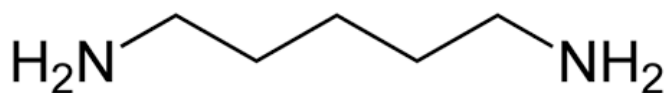


Figura 1: Estrutura química da Cadaverina

2.2. Bioensaios realizados com as linhagens celulares HepG2 e Speedy

As células de fibroblasto de anfíbio (*Xenopus tropicalis*) – Speedy ($2n=21$ cromossomos), descritas em Sinzelle et al. (2012), foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Nicolas Pollet do Institute of Systems & Synthetic Biology – iSSB – Genopole da França e estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Mutagênese Ambiental do Departamento de Biologia da UNESP-IB/Rio Claro/SP. Para o cultivo das células, foi utilizado meio de cultura Leibowitz L-15 diluído em água destilada estéril na proporção de 1:2 e suplementado com 10% de soro bovino fetal. Foram utilizados frascos de cultivo células sem ventilação, mantidos em temperatura controlada (28 °C) em BOD.

As células de hepatoma humano - HepG2 ($2n=46$ cromossomos), obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro. Foram cultivadas em meio MEM (*Meio Mínimo Essencial Eagle*) e suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os frascos de cultivo celular com ventilação (25 cm²) foram mantidos em temperatura controlada (37°C) em estufa de CO₂ (5%) e umidade controlada (60%).

2.2.1. Ensaio de viabilidade celular - Teste da Resazurina

O teste da resazurina, para ambas as culturas celulares, foi realizado como um ensaio inicial para se determinar as concentrações de cadaverina que mantinham

uma viabilidade celular maior que 80% e, posteriormente, realizar os ensaios de genotoxicidade (ensaio do cometa) e mutagenicidade (teste do MN com bloqueio de citocinese). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, de acordo com o protocolo proposto por O'Brien et al. (2000), com algumas modificações. As placas foram preparadas com $2,34 \times 10^6$ células e incubadas por um período de 24 horas, tempo necessário para ocorrer a adesão das células na superfície dos poços. Após esse período, o meio foi retirado e foram adicionados os seguintes tratamentos: CN - meio de cultura sem soro; CP - solução de Triton X-100 (1%), preparada com meio de cultura sem soro; e nos demais poços as diferentes concentrações de cadaverina preparadas com meio de cultura sem soro: 553,5 mg/L; 492 mg/L; 430,5 mg/L; 369 mg/L; 307,5 mg/L; 246 mg/L; 184,5 mg/L; 123 mg/L; e 61,5 mg/L. Essas concentrações foram calculadas de acordo com a referência descrita na ficha de segurança do produto fornecida pela Sigma-Aldrich. Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de 24 horas. Em seguida, foram retirados os tratamentos e adicionados 200 μ L de solução de resazurina (44 μ M), diluída em meio de cultura sem soro, onde as células foram incubadas por 4 horas. A fluorescência foi medida pelo fluorímetro Infinite M2000 Pro™ (Tecan, Crailsheim, Germany), utilizando um comprimento de onda de excitação de 560 nm e um comprimento de onda de emissão 590 nm. A viabilidade foi avaliada com base na comparação das células tratadas com as células não tratadas (CN). As concentrações abaixo de 80% de viabilidade foram consideradas citotóxicas, portanto não utilizadas nos testes de genotoxicidade e mutagenicidade.

2.3.2. Tratamento para o ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade

As células foram submetidas às concentrações que apresentaram viabilidade maior que 80%, determinadas previamente pelo teste da resazurina. As células Speedy foram submetidas às concentrações de 123 mg/L, 61,5 mg/L e 30,75 mg/L. Para a HepG2 foram usadas as concentrações de 307,5 mg/L; 184,5 mg/L e 61,5 mg/L de cadaverina. O controle negativo foi realizado com a adição de PBS no meio de cultura e o controle positivo realizado com uma solução de MMS (4×10^{-4} M), para ambas as culturas celulares. Os tratamentos foram realizados com as duas linhagens celulares, por um período de 24 horas e em triplicata.

2.3.3. Ensaio do Cometa

Após o período de crescimento celular foi realizada a confecção dos pré-frascos, onde foram semeadas, aproximadamente, 5×10^5 células. O material foi mantido em condições ideais de cultivo para cada linhagem celular (Speedy e HepG2) por 24 h, tempo este referente ao período de estabilização das células nos frascos. Após exposição aos tratamentos por 24 horas, foi realizada a coleta da suspensão celular, que foi transferida para tubos de centrífuga e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e a suspensão homogeneizada em 0,5 mL de meio de cultura.

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, foram separados em criotubos, 20 μ L da suspensão celular. Em seguida, foi adicionado, em cada amostra, 20 μ L de Azul de Trypan. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, onde se quantificaram os percentuais das células vivas (brancas) e células mortas (azuis) encontradas em cada um dos quatro quadrantes da câmara.

Para o ensaio do cometa, foram montadas lâminas com 20 μ L da suspensão celular com 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram banhadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8 g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, no escuro, em geladeira a 4 °C por, no mínimo, 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese envolta por gelo, contendo uma solução tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, com pH>13) a 4 °C, por 20 minutos, para a deslicoidização do DNA. A corrida eletroforética foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização (pH 7,2) e fixadas em etanol absoluto.

As lâminas foram coradas com GelRed® (15 μ L de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada), no momento da análise em microscópio de epifluorescência Leica, filtro B - 3⁴ (excitação: $\lambda = 420 \text{ nM} - 490 \text{ nM}$, barreira: $\lambda = 520 \text{ nM}$). Foram analisados, ao acaso, 200 nucleóides por frasco (3 réplicas, duas lâminas com 100 nucleóides cada), totalizando 600 nucleóides/tratamento, em objetiva de 40x. Os danos no DNA foram estimados baseados na intensidade de DNA, comprimento e momento da cauda, medidos pelo software Comet Assay IV. A média dos resultados de cada tratamento foi calculada e

submetida ao teste de normalidade D'Agostino & Person e ao teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis, para comparar os danos entre as células tratadas com cavaderina e o controle negativo.

2.3.4. Teste do Micronúcleo

As células HepG2 e Speedy foram semeadas em frascos de cultura com 5×10^5 células e mantidas em condições controladas por 24 horas. Em seguida, as células foram submetidas aos tratamentos por mais 24 horas. Após a exposição das células aos tratamentos, foi retirado todo o conteúdo do frasco, substituído por meio de cultura novo e adicionado 3 $\mu\text{g/mL}$ de citocalasina B, onde permaneceram, por 28 horas, para obtenção de células binucleadas. As células coletadas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e a suspensão homogeneizada em 0,5 mL de meio de cultura. A suspensão celular foi tratada com solução hipotônica de citrato de sódio (0,01%) e homogeneizada com 2 gotas de formaldeído. Em seguida, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e a suspensão homogeneizada com solução fixadora de Carnoy (3 metanol:1 ácido acético, v:v). Para o preparo das lâminas, a suspensão celular foi ressuspensa em 0,5 mL de Carnoy e gotejada sobre lâminas pré-lavadas com água destilada e com um filme de água, a 4°C. Após secas em temperatura ambiente, foram coradas com Giemsa 5% por 8 minutos.

Foram contabilizadas 1.000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração, por réplica, totalizando 3.000 células por tratamento. Foram observadas células binucleadas normais e células binucleares portadoras de MN, pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares (Figuras 2 e 3), usando critérios descritos por Fenech et al. (2003). Para avaliar o índice de divisão celular (IDC), foram contabilizadas 500 células por frasco, totalizando 1500 células/tratamento. O IDC foi calculado seguindo a fórmula: $\text{IDC} = (\text{M1} + 2\text{M2} + 3\text{M3} + 4\text{M4})/\text{N}$, onde M1 – M4 representa o número de células com 1-4 núcleos, respectivamente, e N o número de células analisadas (EASTMOND; TUCKER, 1989). Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade D'Agostino & Person e a análise de significância foi realizada pelo teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

Na literatura não existem dados publicados sobre o potencial genotóxico e mutagênico das substâncias orgânicas que compõe o necrochorume, incluindo nestas a cadaverina. Devido a esse fato, este estudo procurou as concentrações não citotóxicas da cadaverina, expondo duas linhagens celulares (células Speedy e células HepG2) a essa substância, na tentativa de ampliar os conhecimentos desta diamina, visando, principalmente, compreender os perigos potenciais da contaminação ambiental proporcionada pelo necrochorume produzido pelos cemitérios.

Neste estudo, foi utilizada uma linhagem celular recentemente isolada (células Speedy), para avaliar o potencial citotóxico, genotóxicos e mutagênico da cadaverina. Além disso, foram realizados ensaios com a linhagem HepG2 citados como muito eficientes para avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade de substâncias com mecanismos de ação pouco conhecidos ou até mesmo desconhecidos (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; FIC et al., 2013). As células HepG2 possuem características genotópicas e fenotípicas semelhantes de células de fígado, apresentando metabolismo específico intrínseco (KNASMÜLLER et al., 1998; SCHOONEN et al., 2005; WESTERINK; SCHOONEN, 2007).

Para a avaliação do potencial genotóxico e mutagênico da cadaverina, foi realizado previamente o ensaio de citotoxicidade (teste de viabilidade celular) com resazurina. Por este teste foram estimadas as concentrações de cadaverina que mantinham uma viabilidade celular acima de 80 %, para duas linhagens celular (Speedy e HepG2). Os resultados deste teste serviram como indicativos para as escolhas das concentrações a serem usadas, então, nos testes de genotoxicidade e mutagenicidade com essas células.

3.1. Teste da resazurina

Os efeitos citotóxicos da cadaverina foram avaliados pelo ensaio da resazurina aplicado tanto em células de anfíbio (Speedy) como células de mamífero (HepG2). Em ambas as linhagens celulares foi observado, que a citotoxicidade da cadaverina é diretamente proporcional à sua concentração (Figura 4). As concentrações de cadaverina igual ou menores que 307,5 mg/L exibiram uma viabilidade celular acima de 80 % para HepG2, não sendo então consideradas citotóxicas para essas células. Para

as células Speedy, foi observado viabilidade celular acima de 80 % para as concentrações igual ou menor que 123 mg/L dessa mesma substância. Assim, as células Speedy parecem ter uma maior sensibilidade à ação da cadaverina que as células HepG2.

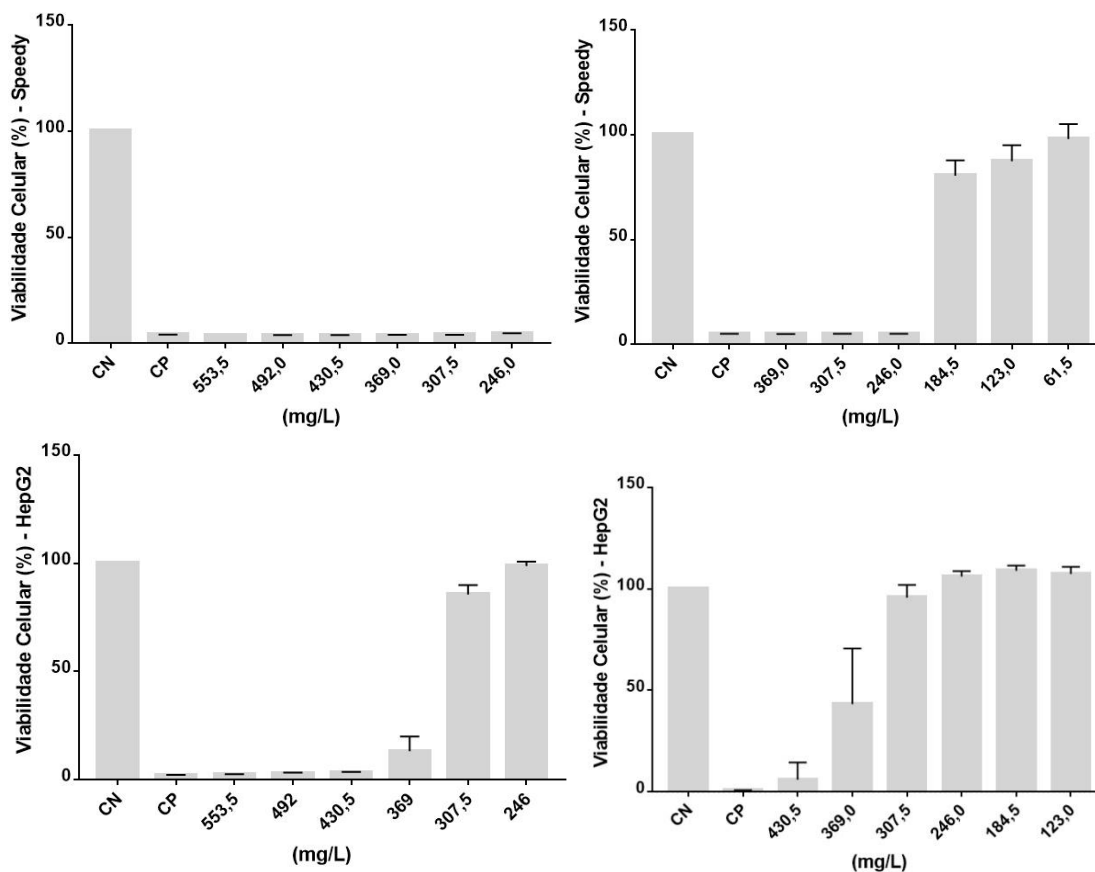


Figura 4: Viabilidade celular avaliada pelos testes da Resasurina, em células de Speedy e HepG2 expostas a diferentes concentrações de cadaverina. CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo.

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se observar que a toxicidade da cadaverina é diferente para cada linhagem celular. Como pode ser visto na Figura 2, nas condições experimentais específicas de cada linhagem, a cadaverina se mostrou mais citotóxica para as células Speedy do que para HepG2. As células Speedy só atingiram viabilidade superior a 80 %, para concentrações bem mais baixas que as indutoras de morte das células HepG2. Esses resultados corroboram com outras pesquisas que compararam o efeito citotóxico de substâncias químicas em linhagens celulares diferentes, evidenciando que cada linhagem responde de maneira específica a diferentes

compostos tóxicos (MCGUIGAN; LI, 2014; GAJSKI et al. 2016; ŽELJEŽIĆ et al., 2016).

As células HepG2 apresentam um mecanismo de desintoxificação de fase I e fase II que gera compostos secundários que podem ou não apresentar efeitos tóxicos. As células Speedy não possuem esse tipo de mecanismo e, assim, pode-se concluir que a maior sensibilidade dessa linhagem pode ter ocorrido devido a esse fato.

3.2. Ensaio do cometa

Para maior confiabilidade nos resultados do ensaio do cometa é necessário que a viabilidade celular seja maior que 80% (ANDERSON; PLEWA, 1998; TICE et al., 2000). Assim, foi realizado o teste de viabilidade celular com azul de Trypan em paralelo ao ensaio do cometa para possibilitar a interpretação correta dos dados. Em nossos ensaios, ambas as linhagens apresentaram viabilidade celular maior que 85%.

Muitas pesquisas têm utilizado o ensaio do cometa com células HepG2 para avaliar o potencial genotóxico de compostos tóxicos (BARILLET et al., 2009; BENHUSEIN et al., 2010). Uhl et al. (1999) desenvolveram um protocolo para o ensaio do cometa com células HepG2, que utiliza um período de 24 horas de exposição das células ao agente químico alvo do estudo. Desta forma, os presentes ensaios seguiram a sugestão metodológica proposta por esses autores e todos os nossos ensaios foram realizados com exposição de 24 horas. Esse tempo de exposição também foi aplicado às células Speedy, para poder comparar os efeitos encontrados nas duas linhagens usadas neste estudo.

Para estabelecer os níveis de danos no DNA nas células Speedy e HepG2, foram utilizados os valores de intensidade da cauda, pois é considerado o parâmetro mais apropriado para avaliar danos, uma vez que indica a quantidade de quebras no DNA (OLIVE, 1999; COLLINS, 2004). Além disso, foram realizadas as mensurações do comprimento e do momento da cauda, para complementar os resultados.

Os resultados obtidos pelo ensaio do cometa em células Speedy e HepG2, expostas às diferentes concentrações de cadaverina por 24 horas, estão descritos na Tabela 1. O controle positivo, realizado com MMS ($4 \times 10^{-4}M$), induziu um aumento significativo de alterações em todas as medidas realizadas, teste este que confirma a eficácia das células Speedy e HepG2 como boas bioindicadoras para a avaliação da ação de agentes genotóxicos. Os níveis de danos no DNA primário observados pela intensidade, comprimento e momento da cauda, foram medidos nas duas linhagens

celulares e ambas não apresentaram aumento significativo, quando comparadas ao controle negativo.

Tabela 1: Resultados do ensaio do cometa, realizado com células Speedy e HepG2, após exposição a diferentes concentrações de cadaverina

	Speedy				
	CN	CP	61,5 mg/L	184,5 mg/L	307,5 mg/L
Intensidade	4,37±0,51	15,46±1,24*	4,35±0,62	5,10±0,89	5,53±2,47
Comprimento	20,18±1,18	48,95±8,28*	22,05±1,47	25,45±2,25	25,63±4,31
Momento	0,32±0,03	2,45±0,42*	0,51±0,17	0,82±0,09	0,77±0,54
Viabilidade Celular	98%	99%	99%	98%	99%
	HepG2				
	CN	MMS	30,75 mg/L	61,5 mg/L	123,0 mg/L
Intensidade	2,01±0,13	54,73±2,02*	4,18±0,59	4,48±0,67	5,90±1,12
Comprimento	22,45±0,98	79,12±6,71*	23,74±0,33	25,33±0,60	26,21±1,50
Momento	0,23±0,03	16,62±1,34*	0,72±0,18	0,79±0,14	1,15±0,33
Viabilidade Celular	96%	85%	96%	98%	98%

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo;

* estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Como o ensaio do cometa não específica as lesões no DNA, é interessante realizar uma investigação adicional para determinar se a substância testada tem outra ação genotóxica. Assim, o teste do MN com bloqueio de citocinese é utilizado para adquirir mais informações sobre a substância testada, já que também é um ensaio bem estabelecido pela genética toxicológica (KIRSCH-VOLDERS et al., 2000; FENECH et al., 2011).

3.3. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese e presença de anormalidade nucleares

Segundo Maluf (2004), a associação do ensaio do cometa e o teste do MN permite investigar a genotoxicidade de produtos químicos de forma mais conclusiva. Vários pesquisadores têm realizado estudos de genotoxicidade de compostos químicos associando esses dois ensaios em diferentes linhagens celulares (VAN GOETHEM et

al., 1997; HARTMANN et al. 2001; MAZZEO et al. 2013; BIANCHI et al., 2015; GAJSKI et al. 2016). Assim, também foi realizado neste estudo o teste do MN, para avaliar diversos parâmetros de danos cromossômicos, simultaneamente, decorrentes de quebras e rearranjos cromossômicos, que persistem por, pelo menos, um ciclo mitótico (SCOLASTICI et al., 2008; ŽELJEŽIĆ et al., 2016). O ensaio do MN é muito utilizado para investigar o potencial mutagênico de produtos químicos, por se tratar de um teste sensível e confiável, que detecta danos citogenéticos (FENECH, 1993; BOLOGNESI, 2003). Os MN podem ser originados de um cromossomo inteiro (ação aneugênica, que age nos constituintes celulares e leva à perda cromossômica); de fragmentos cromossômicos acêntricos (ação clastogênica, que age na molécula de DNA e leva a quebras cromossômicas); ou ainda de amplificação gênica, cujo material amplificado acaba sendo eliminado do núcleo principal, não se integrando, assim, ao núcleo principal (FENECH; MORLEY, 1985; TUCKER; PRESTON, 1996, FERNANDES et al, 2007).

O teste do MN com bloqueio de citocinese permite a detecção de parâmetros associados à instabilidade genômica, que, segundo Morgan (1996), representa um aspecto importante da mutagênese e de transformações genéticas relacionadas com a carcinogênese. Neste estudo, foram avaliados, por meio das frequências de MN, os efeitos da cadaverina sobre a indução de danos que ocorrem devido a alterações cromossômicas estruturais e/ou numéricas; brotos nucleares, indicadores de amplificação gênica e/ou complexos de reparo de DNA, e pontes nucleoplasmáticas, indicadoras de rearranjos cromossômicos, em células binucleadas (FENECH, 2006).

Os efeitos citostáticos da cadaverina, para as ambas linhagens utilizadas (Speedy e HepG2), foram medidos por meio da estimativa do índice de divisão celular (IDC) das células tratadas e dos controles. A cadaverina apresentou potencial proliferativo, quando comparada ao grupo controle negativo, para todas as concentrações testadas na cultura HepG2. Já nos testes realizados com a linhagem Speedy, os tratamentos não mostraram resultados estatisticamente diferentes aos registrados para o grupo controle (Figura 5).

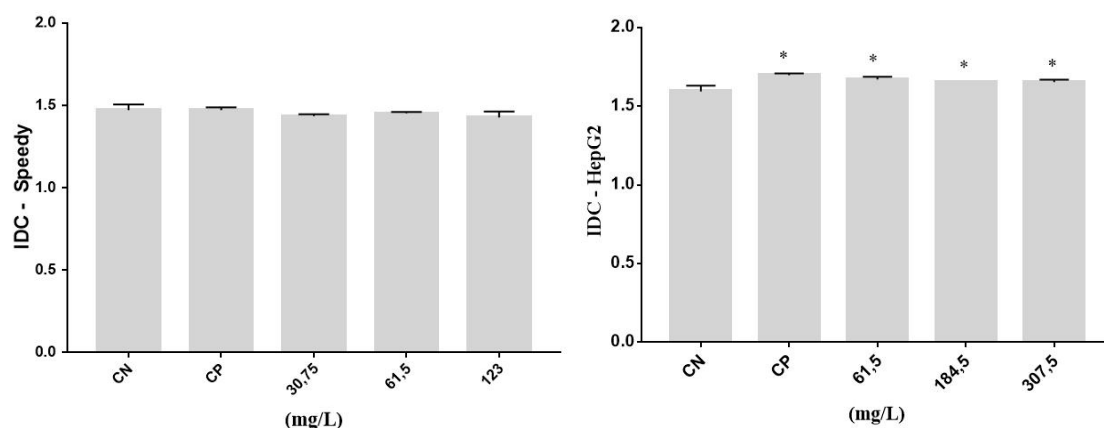


Figura 5: Efeito citostático observado para as culturas celulares Speedy e HepG2 expostas a diferentes concentrações de cadaverina. CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo.

Todos os dados referentes a quantidade de MN por célula binucleada e o índice do total de células binucleadas portadoras de MN estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Neste estudo, foi observado que para ambas as linhagens celulares estudadas, a maioria das células portadoras de MN continham apenas 1 MN. Os resultados de MN, obtidos para os tratamentos realizados com a cadaverina em células Speedy não mostraram aumento significativo de MN, quando comparados com o controle negativo. No entanto, para o teste realizado com esta célula, foi observado, para a maior concentração testada (123,0 mg/L), um número de células portadoras de apenas 1 MN estatisticamente diferente ao registrado no grupo CN. De acordo com os resultados observados, as células HepG2 apresentaram um aumento significativo de MN, em relação ao grupo controle, para as concentrações mais altas testadas para a cadaverina (184,5 mg/L e 307,5 mg/L), indicando um potencial mutagênico da substância para este tipo celular. Diante desses resultados, podemos inferir que a cadaverina possui um potencial mutagênico para as células de fibroblasto de anfíbios e de hepatoma humano mantidas em cultura. Podemos inferir ainda que a cadaverina possui uma ação aneugênica e/ou clastogênica, porém, devem ser realizados mais estudos para confirmar qual é o mecanismo de ação envolvido na sua toxicidade.

Tabela 2: Frequências de MN observadas em células Speedy expostas a diferentes concentrações de cadaverina

Tratamento	MN1	MN2	MN3	Total MN
CN	1,10±0,26	0,07±0,12	0,00±0,00	1,17±0,32
CP	4,33±0,67*	0,07±0,06	0,00±0,00	4,40±0,66*
30,75 mg/L	1,80±0,17	0,00±0,00	0,00±0,00	1,80±0,17
61,5 mg/L	1,80±0,10	0,07±0,012	0,00±0,00	1,87±0,06
123,0 mg/L	2,03±0,15*	0,00±0,00	0,00±0,00	2,03±0,15

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; MN1: Célula binucleada portadora de 1 micronúcleo; MN2: Célula binucleada portadora de 2 micronúcleos; MN3: Célula binucleada portadora de 3 micronúcleos; MN: Micronúcleo

* p<0,05 estatisticamente significativo

Tabela 3: Frequências de MN observadas em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de cadaverina

Tratamento	MN1	MN2	MN3	Total MN
CN	2,03±0,21	0,23±0,06	0,00±0,00	2,27±0,25
CP	6,53±0,42*	0,90±0,75	0,33±0,42	7,77±1,53*
61,5 mg/L	2,77±0,06	0,20±0,17	0,10±0,17	3,07±0,15
184,5 mg/L	4,00±0,35*	0,53±0,49	0,27±0,06	4,80±0,50*
307,5 mg/L	4,40±0,36*	0,67±0,12	0,10±0,10	5,17±0,50*

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; MN1: Célula binucleada portadora de 1 micronúcleo; MN2: Célula binucleada portadora de 2 micronúcleos; MN3: Célula binucleada portadora de 3 micronúcleos; MN: Micronúcleo

* p<0,05 estatisticamente significativo

Os resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5 são referentes à presença de anormalidade nucleares observadas em células Speedy e HepG2, respectivamente, quando essas células foram expostas a diferentes concentrações de cadaverina.

Para as células Speedy, houve indução de broto nucleares e de pontes nucleoplasmáticas, para todas as concentrações de cadaverina testadas (30,75, 61,5 e 123 mg/L). As pontes nucleoplasmáticas também são originadas a partir de danos não reparados no DNA. Somente as células Speedy apresentaram frequência significativa de células binucleadas interligadas com ponte cromossômica, para todas as concentrações de cadaverina. Segundo Fenech (2006), as pontes representam uma medida de rearranjo cromossômico e a capacidade de uma substância induzir esse tipo de anormalidade

nuclear é extremamente relevante. As duas concentrações mais altas de cadaverina (184,5 e 307,5 mg/L) induziram, em células HepG2, a formação de brotos nucleares em frequências estatisticamente significativas, quando comparadas com CN. Segundo alguns autores, os brotos nucleares podem ser originados de amplificação do material genético, decorrente de ação de substâncias sobre as fibras do fuso (efeito aneugênico), o que leva a uma não migração dos cromossomos durante o processo de divisão celular, e a uma consequente poliploidização celular. Esse material poliploidizado é eliminado do núcleo, sob a forma de brotos nucleares (SHIMIZU et al., 1998; SHIMIZU et al., 2000; FERNANDES et al., 2007; FENECH, 2011). Assim, esses dados demonstram, mais uma vez, que as células Speedy parecem ser mais sensíveis a substância química testada.

Tabela 4: Frequências de anormalidades nucleares observadas em células Speedy expostas a diferentes concentrações de cadaverina

Tratamento	Broto	Ponte	B+P	B+MN	P+MN	Total AN
CN	1,17±0,31	1,03±0,15	0,03±0,06	0,00±0,00	0,00±0,00	2,23±0,31
CP	3,37±0,15*	2,37±0,57*	0,13±0,12	0,17±0,06*	0,17±0,06*	6,23±0,49*
30,75 mg/L	3,50±0,56*	2,60±0,36*	0,20±0,12	0,03±0,06	0,00±0,00	6,37±0,67*
61,5 mg/L	3,13±0,06*	2,60±0,17*	0,23±0,12	0,03±0,06	0,00±0,00	6,00±0,20*
123,0 mg/L	3,37±0,06*	2,70±0,75*	0,23±0,10	0,10±0,00	0,00±0,00	6,57±0,81*

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; B: Broto; P: Ponte; MN: Micronúcleo; AN: Anormalidades Nucleares. * estatisticamente significativo (p<0,05)

Tabela 5: Frequências de anormalidades nucleares observadas em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de cadaverina

Tratamento	Broto	Ponte	B+P	B+MN	P+MN	Total AN
CN	1,63±0,55	0,63±0,12	0,00±0,00	0,10±0,17	0,00±0,00	2,37±0,59
CP	3,40±0,30*	1,00±0,10	0,00±0,00	0,43±0,40	0,10±0,06	4,90±0,50*
61,5 mg/L	2,60±0,46	0,57±0,15	0,10±0,10	0,57±0,25	0,00±0,00	3,83±0,85
184,5 mg/L	3,30±0,26*	0,70±0,17	0,00±0,12	0,60±0,10	0,10±0,15	4,80±0,00*
307,5 mg/L	4,13±0,47*	0,60±0,10	0,00±0,12	0,60±0,17	0,10±0,06	5,47±0,85*

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; B: Broto; P: Ponte; MN: Micronúcleo; AN: Anormalidades Nucleares. * estatisticamente significativo (p<0,05)

As células Speedy apresentaram-se mais sensíveis aos efeitos genotóxicos da cadaverina, em comparação com as células HepG2, devido ao aumento significativo no índice total de alterações nucleares. As duas linhagens celulares apresentaram diferenças quanto à quantidade de células binucleadas portadoras de anormalidades nucleares. As células Speedy apresentaram maior índice de AN já nas concentrações menores e as células HepG2 apresentaram níveis significativos em concentrações mais elevadas. Foram observadas altas frequências de brotos nucleares, para as células Speedy expostas à cadaverina, em todas as concentrações testadas (30,75; 61,5 e 123,0 mg/L), e para as células HepG2, nas concentrações 184,5 e 307,5 mg/L.

Com base em todos os nossos resultados, podemos observar que, nas concentrações testadas, a cadaverina induziu efeitos citogenotóxicos em ambas as linhagens celulares, mesmo induzindo baixa citotoxicidade e alterações não significativas nos níveis de danos primários no DNA.

Além disso, pelos resultados obtidos, observou-se que o teste do MN foi mais sensível do que o ensaio do cometa, para avaliar o potencial genotóxico e/ou mutagênico da cadaverina. Outros autores também relataram essa diferença de sensibilidade entre esses mesmos ensaios. Žunec et al. (2016) avaliaram os efeitos genotóxicos do herbicida tembotrione em células HepG2, utilizando o ensaio do cometa alcalino e o teste do MN com bloqueio de citocinese como biomarcadores. Os autores também obtiveram resultados negativos, utilizando o ensaio do cometa e resultados positivos em alguns parâmetros contabilizados pelo teste do MN. A observação do efeito aneugênico desse composto químico é um dado relevante para a pesquisa, mas ainda há necessidade de melhor avaliar o mecanismo de ação dessa substância. Pfau et al. (1999) também demonstraram que o teste do MN pareceu ser mais sensível do que o ensaio do cometa ao comparar seus resultados em células MCL5 tratadas com a amina aromática heterocíclica.

Diante dos resultados obtidos, observou-se que a cadaverina teve efeito diferente sobre as linhagens HepG2 e Speedy, nas condições experimentais. Segundo Želježić et al. (2016), a diferença de indução de danos entre duas linhagens celulares pode estar relacionada com as propriedades tóxicas do produto químico, com as respostas intracelulares do metabolismo, com o tempo de cultura da célula e/ou com o tempo de divisão celular. Além disso, Valentin-Severin et al. (2003) relatou que essas mesmas diferenças também podem contribuir para resultados com sensibilidade opostas entre o ensaio do cometa e do MN.

Por estes resultados e pelo índice total de anormalidades nucleares observadas, ambas as linhagens celulares se mostraram sensíveis aos efeitos genotóxicos da cadaverina, podendo ser consideradas boas indicadoras dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos desta substância.

4. Conclusão

Com base em todos os resultados pode-se concluir que as concentrações testadas de cadaverina induziram efeitos citogenotóxicos em ambas as linhagens celulares, caracterizando a cadaverina como uma substância que merece atenção pelo seu potencial tóxico.

Como os resultados foram obtidos em sistema de cultura de células, não podemos extrapolar diretamente os danos observados para situações *in vivo*, porém, as descobertas presentes neste trabalho contribuem para a interpretação geral da toxicidade da diamina cadaverina. Neste contexto, devem ser realizados estudos futuros, complementares ou com biomarcadores, que possam avaliar com mais detalhes a natureza dos danos no DNA ocasionados por esta substância teste.

Por fim, alerta-se sobre a importância deste trabalho, que relata sobre o potencial poluidor dos cemitérios, devido à produção de necrochorume, exsudato orgânico que possui várias substâncias tóxicas, que podem comprometer o meio ambiente e a saúde humana.

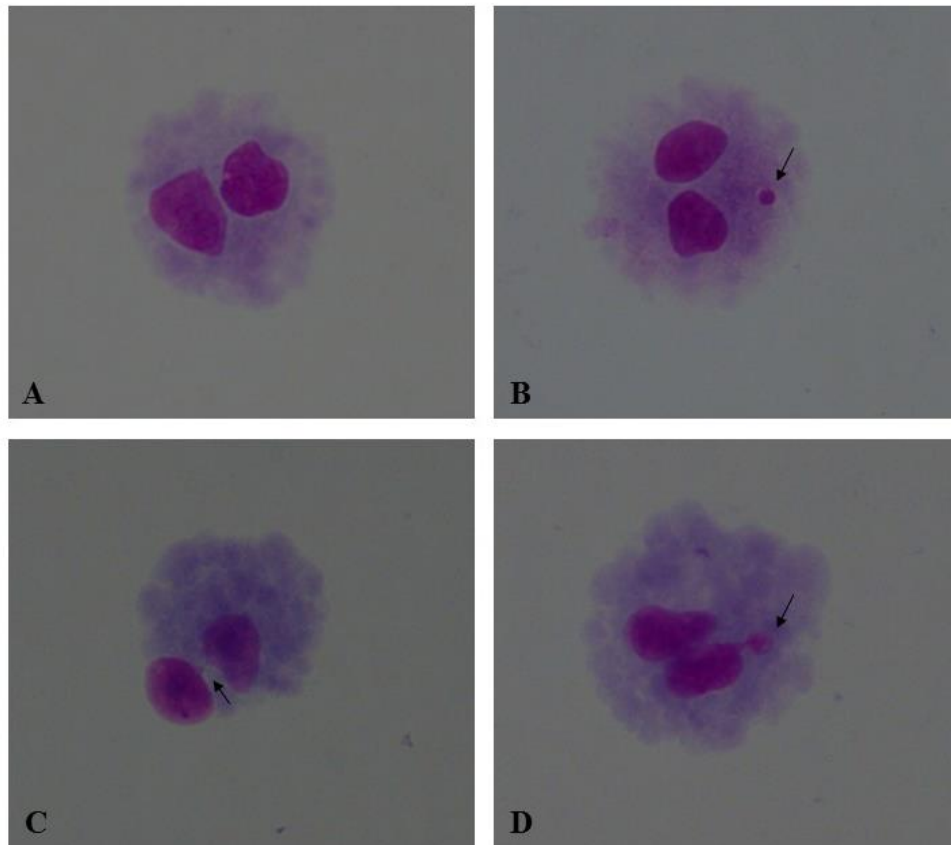


Figura 2: Teste do MN com bloqueio de citocinese em células Speedy. A: Célula Binucleada normal; B: Célula binucleada com MN (seta); C: Célula binucleada com ponte internuclear (seta); D: Célula binucleada com broto nuclear (seta).

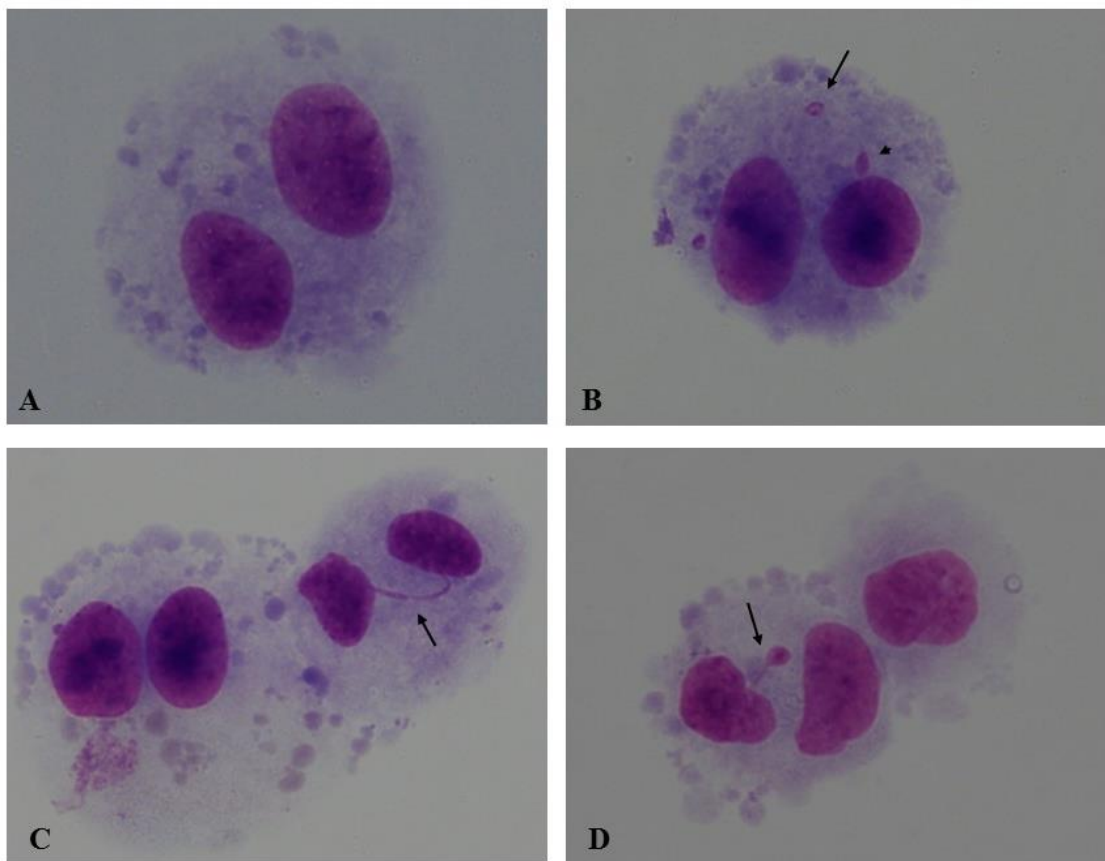


Figura 3: Teste do MN com bloqueio de citocinese em células HepG2. A: Célula Binucleada normal; B: Célula binucleada com MN (seta) e broto nuclear (cabeça de seta); C: Célula binucleada com ponte internuclear (seta); D: Célula binucleada com broto nuclear (seta).

Referências Bibliográficas

- ANDERSON, D.; PLEWA, M. J. The international comet assay workshop. **Mutagenesis**, v. 13, p. 67–73, 1998.
- BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. **Amino Acids.**, v. 20, n. 3, p. 301-17, 2001.
- BARILLET, S.; JUGAN, M. L.; SIMON-DECKERS, A.; LECONTE, Y.; BOIME, N. H.; MAYNE-L'HERMITE, M. SiC nanoparticles cyto- and genotoxicity to Hep-G2 cells. **J. Phys. Conf. Ser.**, v. 170, n. 1, p. 012-016, 2009.
- BENHUSEIN, G. M.; MUTCH, E.; ABURAWI, S.; WILLIAMS, F. M. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. **Libyan J. Med.**, v. 5, 2010.
- 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.
- BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutat Res**, v. 543, p. 251–272, 2003.
- BONOMO, M. M.; MOROZESK, M.; DUARTE, I. D.; ROCHA, L. D.; FERNANDES, M. N.; MATSUMOTO, S. T. Sewage sludge hazardous assessment: chemical evaluation and cytological effects in CHO-k1 cells. **Environ Sci Pollut Res Int.**, n. 23, v. 11, p. 11069-75, 2016.
- EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environ Mol Mutagen.**, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.
- FENECH M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutat Res.**, v. 285, p. 35-44, 1993.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat. Res.** v. 600, p. 58–66, 2006.
- FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLE, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125–132, 2011.
- FENECH, V.; MORLEY, A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 147, p. 29–36, 1985.
- 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, p. 252–259, 2007.

FIC, B.; ŽEGURA, M.; DOLENC, S.; FILIPIČ, M.; MAŠIČ, L. P. Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. **Arh. Hig. Rada Toksikol.**, v. 64, p. 189–200, 2013.

GAJSKI, G.; GERIĆ, M.; ŽEGURA, B.; NOVAK, M.; NUNIĆ, J.; BAJREKTAREVIĆ, D.; GARAJ-VRHOVAC, V.; FILIPIČ, M. Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in human and zebrafish cells. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 23, n. 15, p. 14739-50, 2016.

GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L. JR. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nat Rev Cancer.**, v. 4, n. 10, p. 781-92, 2004.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H. J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 843–858, 2001.

JONKER, C.; OLIVIER, J. Mineral contamination from cemetery soils: case study of Zandfontein Cemetery, South Africa. **Int J Environ Res Public Health.**, v. 9, n. 2, p. 511-20, 2012.

KEMERICH, P. D. C.; SILVA, J. L. S.; BORBA, W. F.; FLORES, C. E. B.; BARROS, G.; GERHARDT, A. E.; RODRIGUES, A. C.; SILVA, R. F.; FLORES, B. A.; UCKER, F. E. Concentrações de metais em solo ocupado por cemitério - uso da técnica de espectrometria de fluorescência de raios-x por energia dispersiva – EDXRF. **Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM, Santa Maria Revista Monografias Ambientais – REMOA**, v. 14, n. 1, p. 2875 – 2889, 2014.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M. JR.; LORGE, E.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VON DER HUDE, W.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Environ Mol Mutagen.**, v. 35, n. 3, p. 167-72, 2000.

KNASMULLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B.J. 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.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutat. Res.**, v. 402, p. 185–202, 1998.

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, p. 15–24, 2004.

MANN, R. W.; BASS, W. M.; MEADOWS, L. Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. **J Forensic Sci.**, v. 35, n. 1, p. 103-111, 1990.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecol Indic.**, v. 56, p. 60–69, 2015.

MAZZEO, D. E.; MATSUMOTO, S. T.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS, D. de F.; MARIN-MORALES, M. A. Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1030-6, 2013.

MCGUIGAN, C. F.; LI, X. F. Cytotoxicity and genotoxicity of phenazine in two human cell lines. **Toxicol In Vitro**, v. 28, n. 4, p. 607-15, 2014.

MORGAN, W. F.; DAY, J. P.; KAPLAN, M. I.; MCGHEE, E. M.; LIMOLI, C. L. Genomic instability induced by ionizing radiation. **Radiat Res.**, v. 146, p. 247-258, 1996.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**, v. 267, p. 5421–6, 2000.

PACHECO, A. Meio ambiente & cemitérios. São Paulo: **Editora Senac**, 2012.

PFAU, W.; MARTIN, F. L.; COLE, K. J.; VENITT, S.; GROVER, P. L.; MARQUARDT, H. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 545–551, 1999.

RODRIGUES, L.; PACHECO, A. Groundwater contamination from cemeteries cases of study. **Environmental 2010: Situation and Perspectives for the European Union**, v. 2003, p. 1- 6, 2003.

RODRIGUEZ, W.C. 3rd; BASS, W. M. Decomposition of buried bodies and methods that aid in their location. **J Forensic Sci.**, v. 30, v. 3, p. 836-852, 1985.

SCHOONEN, W. G.; DE ROOS, J. A.; WESTERINK, W. M.; DÉBITON, E. Cytotoxic effects of 110 reference compounds on HepG2 cells and for 60 compounds on HeLa, ECC-1 and CHO cells. II mechanistic assays on NAD(P)H, ATP and DNA contents. **Toxicol. Vitro**, v. 19, n. 4, p. 491–503, 2005.

SCOLASTICI, C.; ALVES DE LIMA, R. O.; BARBISAN, L. F.; FERREIRA, A. L. A.; RIBEIRO, D. A.; SALVADORI, D. M. F. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 510–514, 2008.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **J. Cell Biol.**, v. 140, p. 1307–1320, 1998.

SHIMIZU, N.; SHIMUARA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutat. Res.**, v. 448, p. 81–90, 2000.

SINZELLE, L.; THURET, R.; HWANG, H. Y.; HERSZBERG, B.; PAILLARD, E.; BRONCHAIN, O. J.; STEMPLE, D. L.; DHORNE-POLLET, S.; POLLET, N.

Characterization of a novel *Xenopus tropicalis* cell line as a model for *in vitro* studies. **Genesis.**, v. 50, n. 3, p. 316-24, 2012.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; Kobayashi, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206–221, 2000.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutat Res.**, v. 365, p. 147-59, 1996.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutat. Res.**, v. 441, n. 2, p. 215–224, 1999.

VALENTIN-SEVERIN, I.; LE HEGARAT, L.; LHUGUENOT, J. C.; LE BON, A. M.; CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutat. Res.**, v. 536, n. 1–2, p. 79–9, 2003.

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 affects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutat. Res.**, v. 392, p. 31–43, 1997.

VASS, A. A.; BASS, W. M.; WOLT, J. D.; FOSS, J.; AMMONS, J. T. Time since death determinations of human cadavers using soil solution. **J Forensic Sci.**, v. 37, n. 5, p. 1236-1253, 1992.

WESTERINK, W. M.; SCHOONEN, W. G. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 21, p. 1581–1591, 2007.

ŽELJEŽIĆ, D.; MLADINIĆ, M.; ŽUNEC, S.; LUCIĆ VRDOLJAK, A.; KAŠUBA, V.; TARIBA, B.; ŽIVKOVIĆ.T.; MARJANOVIĆ, A. M.; PAVIČIĆ, I.; MILIĆ, M.; ROZGAJ, R.; KOPJAR, N. Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocytes and an HepG2 cell line. **Food Chem Toxicol.**, v. S0278-6915, n. 16, p. 30265-4, 2016.

ZHANG, Y.; YING, J.; CHEN, J; HU, C. Assessing the genotoxic potentials of roxarsone in V79 cells using the alkaline Comet assay and micronucleus test. **Mutat Res.**, v.741, n. 1-2, p. 65-9, 2012.

ŽUNEC, S.; KAŠUBA, V.; PAVIČIĆ, I.; MARJANOVIĆ, A. M.; TARIBA, B.; MILIĆ M, Kopjar N, Pizent A, Vrdoljak AL, Rozgaj R, Želježić D. Assessment of oxidative stress responses and the cytotoxic and genotoxic potential of the herbicide tembotrione in HepG2 cells. **Food Chem Toxicol.**, v. 94, p. 64-74, 2016.

ŻYCHOWSKI, J. Impact of cementeries on groundwater chemistry. **A review. Catena.**, v. 93, p. 100–114, 2012.

Artigo 3: Avaliação da atividade genotóxica e mutagênica da cadaverina para ratos, após exposição oral

Raquel Vaz Hara¹, Katarine Outeiro Bortolotti², Gabriela Luiz Toffolo², Lais de Moraes Santos²; Cristiane Baghin Morandim²; Franco Dani Campos-Pereira¹, Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar, Maria Aparecida Marin Morales^{1*}

¹UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

² FHO-UNIARARAS – Fundação Hermínio Ometto, Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 - Jd. Universitário, CEP: 13607-339, Araras, SP, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: mamm@rc.unesp.br

Resumo

Cadaverina é uma amina biogênica presente em necrochorume, muito comum em regiões de cemitério, por ser derivada de putrefação dos corpos. Embora os compostos presentes no necrochorume, e em especial a cadaverina, sejam pouco conhecidos e estudados, é sugerido que o necrochorume possa comprometer os ecossistemas edáficos e aquáticos localizados próximos aos cemitérios, tanto pela sua percolação no solo como por seu escoamento superficial. Como não existem dados sobre os efeitos genotóxico e mutagênico da cadaverina, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito toxicológico deste composto em ratos machos Wistar (sistema teste *in vivo*), por um período de exposição de 56 dias consecutivos. A diamina cadaverina foi administrada por via oral em doses de 15, 30 e 60 mg/kg/dia. Para investigar o potencial genotóxico foi realizado o ensaio do cometa com sangue periférico e, para a avaliação do potencial mutagênico e citotóxico, foi realizado o teste de micronúcleo com células de medula óssea. Pelos resultados obtidos com o ensaio do cometa, pode-se observar que a cadaverina não promoveu diferença significativa de quebras no DNA, quando comparados ao controle negativo. No entanto, a concentração de 30 mg/kg induziu um aumento significativo na frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleo (PCE-MN), que é um indicativo de instabilidade genômica. Além disso, não houve diferença significativa na taxa de PCE/NCE (eritrócitos normocromáticos) entre os grupos tratados com cadaverina e o grupo controle negativo. De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que a cadaverina não apresentou efeito citotóxico e genotóxico, porém há fortes indicativos de ação aneugênica sobre ratos Wistar. Pelos resultados obtidos com este organismo-teste, torna-se necessária a realização de ensaios específicos que possam rastrear os mecanismos de ação da cadaverina, uma vez que os relatos da sua toxicidade ainda são pouco conhecidos.

Palavras-Chave: Necrochorume, aminas biogênicas, ensaio do cometa, micronúcleo, PCE, NCE

1. Introdução

Os cemitérios surgiram a partir do século XVIII. A princípio, foram instalados em locais abertos e longe do perímetro urbano, mas, com o crescimento acelerado da urbanização, essas áreas começaram a fazer parte do perímetro urbano (SILVA; MALAGUTTI, 2008). Com isso, foi se instaurando uma maior atenção e preocupação ambiental em torno dessas regiões e começaram a ser considerados alguns aspectos como as condições do solo, drenagem, proximidade com locais habitados e o perigo de contaminação da água (SPONGBERG; BECKS, 2000).

Em 2003, foram estabelecidos no Brasil os critérios para o licenciamento ambiental de cemitérios, tanto para implantação de novos cemitérios como para a normalização de cemitérios já existentes, que estão dispostos na Resolução do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) de N° 335, que designa aos órgãos ambientais estaduais a obrigatoriedade de fiscalização. Essa resolução alerta para a importância da necessidade de monitorar essas áreas, principalmente dos cemitérios mais antigos, cuja implantação antecedeu a vigência dessa resolução CONAMA.

Logo após a morte de um organismo, é iniciada uma série de processos químicos, que resulta em várias alterações na estrutura e na composição do corpo humano (BYARD et al., 2008). Nas primeiras semanas da decomposição ocorre a formação de gases nos tecidos, que podem acarretar em ruptura das cavidades orgânicas e, conseqüentemente, a liberação de um líquido chamado de necrochorume (CUESTA, 1986). O necrochorume, é uma solução aquosa rica em sais minerais e substâncias orgânicas degradáveis, de cor castanho acinzentada, viscosa, de cheiro forte e com grau variado de patogenicidade (NEIRA et al., 2008). Segundo Fineza (2008), os metais e as diaminas (cadaverina e putrescina) presentes no necrochorume são os principais constituintes que podem causar toxicidade para os organismos expostos. Com o decorrer do tempo e dos fatores ambientais, esse líquido pode percolar no solo e contaminar tanto as águas superficiais como as subterrâneas (RODRIGUES; PACHECO, 2003; FINEZA, 2008).

Segundo a CETESB (2013), a qualidade das águas superficiais vem sendo constantemente comprometida pela intensa carga poluidora que recebe, o que dificulta o seu uso em diversas atividades e proporciona um alto custo para o seu tratamento. Assim, as águas subterrâneas vem sendo uma alternativa viável para o abastecimento público, devido à sua abundância, à sua qualidade e ao seu baixo custo de captação. Porém, quando as águas subterrâneas são influenciadas pelos cemitérios, elas podem conter uma carga de microrganismos típicos da flora intestinal, além de íons e aminas, como a putrescina e a

cadaverina (TREDoux et al., 2004; CALKOSIŃSKI et al., 2015), que comprometem a qualidade dessa água de abastecimento.

Aminas biogênicas são compostos nitrogenados produzidos por microrganismos (principalmente bactérias), por meio da ação de descarboxilases que atuam sobre determinados aminoácidos, removendo o grupo carboxila para formar a amina correspondente mais CO₂ (GARDINI et al., 2016). Segundo Stratton et al. (1991), aminas biogênicas putrefativas, tais como a cadaverina e a putrescina, constituem um grupo de aminas biogênicas que confere biotoxicidade. Entre os compostos orgânicos derivados da decomposição, encontra-se a diamina alifática cadaverina (1,5, diaminopentano) que é produzida pela descarboxilação do aminoácido intracelular lisina, pela enzima lisina descarboxilase (HAWEL et al., 1994).

Os sistemas testes *in vivo* têm sido considerados como ferramentas adequadas e interessantes para avaliação de riscos genotóxicos de contaminantes ambientais, devido a interação que ocorre entre alguns fatores intrínsecos dos organismos e a característica da substância avaliada, como a toxicocinética e processos de reparo do DNA, que tornam esse sistema eficaz para complementar dados obtidos pelos ensaios desenvolvidos com sistemas *in vitro* (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Segundo Alves et al. (2014), testes toxicogenéticos são úteis para avaliar se uma dada substância age direta ou indiretamente sobre o DNA dos organismos, causando danos herdáveis que possam colocar em risco a saúde dos seres humanos. O ensaio do cometa é um teste que vem sendo aplicado em diversas pesquisas com células de mamíferos, para detectar danos no DNA (TICE et al., 2000; HARTMANN et al., 2003; ALVES et al., 2014; DE BOECK, et al., 2015; LONE et al., 2016). De acordo com Collins et al. (2008), essa técnica é fácil e sensível para detectar quebras de fita simples e sítios alcaliláveis em células individuais. Já o teste do micronúcleo (MN) vem sendo aplicado para avaliar a capacidade de uma substância de induzir alterações cromossômicas estrutural/numérica (SCHMID, 1975). Esse método também tem sido usado em estudos toxicológicos gerais de substâncias químicas, por fornecer informações complementares a outros testes realizados (HAYASHI et al., 2004; KASAMOTO et al., 2013; ZHONG et al., 2014; NEVES et al., 2016).

Como os cemitérios são considerados fontes de contaminação do solo, de águas superficiais e subterrâneas, e de ecossistemas localizados próximos a eles, devido à decomposição de cadáveres enterrados de forma inadequada no subsolo; pelo fato de existirem poucos estudos relacionados aos possíveis efeitos genotóxicos dos componentes do necrochorume, em especial aos da diamina cadaverina, o objetivo desse trabalho foi investigar

o potencial genotóxico e mutagênico desta diamina sobre um sistema teste de roedores (ratos Wistar - sistema *in vivo*), por meio de dois métodos clássicos da genética toxicológica, o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo, na tentativa de elucidar a ação deste composto sobre os organismos que possam estar eventualmente expostos a eles.

2. Materiais e Métodos

2.1. Substâncias Química Testada

A amina biogênica cadaverina (1,5-Diaminopentano, 1,5-Pentanodiamina, Pentametilenediamina), com fórmula estrutural representada abaixo (Figura 1), usada neste trabalho foi comercializada pela Sigma-Aldrich (CAS-No. 462-94-2, Fluka – pureza 97%).

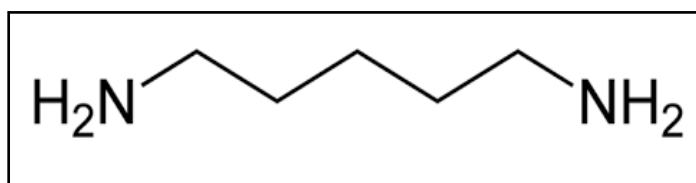


Figura 1: Estrutura química da Cadaverina

2.2. Bioensaios com ratos Wistar

Os experimentos com a cadaverina foram realizados com ratos Wistar de, aproximadamente, 120 dias de idade e do sexo masculino, com peso de ± 400 g. Os animais foram obtidos no biotério central da UNICAMP (Universidade de Campinas – SP, Brasil) e alojados em caixas de polietileno no Centro de Experimentação Animal da Fundação Hermínio Ometto (FHO – Uniararas), local onde os ensaios *in vivo* foram realizados. Todo o período experimental foi mantido em condições controladas de temperatura (cerca de $22\pm 2^\circ\text{C}$), umidade do ar (60%), ciclo claro/escuro (12 horas), alimentação (ração comercial, oferecida *ad libitum*) e disponibilidade de água filtrada (*ad libitum*).

As concentrações estudadas foram definidas a partir da referência descrita na ficha de segurança do produto (Sigma-Aldrich). Os animais foram subdivididos em cinco grupos experimentais de 5 indivíduos cada. O grupo controle negativo recebeu apenas água filtrada e os três grupos tratados receberam concentrações de 15, 30 e 60 mg/kg/dia de cadaverina. A substância teste foi administrada via gavagem, por um período experimental de 56 dias consecutivos. O grupo controle positivo foi tratado com água filtrada por todo o período experimental, porém os animais receberam também uma injeção intraperitoneal de MMS (20 mg/kg), 24 horas antes da eutanásia, conforme indicação de Ribeiro et al. (2003).

Para a permissão da realização dos ensaios de experimentação animal, o presente estudo foi, primeiramente, submetido à Comissão de Ética em Uso Animal da Fundação Hermínio Ometto (FHO – Uniararas) Araras/SP, recebendo parecer (Nº 033/2014) aprovado. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2.1. Eutanásia e coleta de materiais biológicos

Para a eutanásia, os animais foram previamente anestesiados com solução de Xilazina (Rompun® - Bayer S.A. – 20 mg/mL) e Cetamina (Ketalar® - Parke, Davis & Co. - 50 mg/mL), administrados por injeção subcutânea. Após total sedação e perda dos sentidos, foi realizada a labarotomia medial até a expansão da cavidade torácica, para expor o coração e, assim, realizar a punção cardíaca com auxílio de uma seringa de 5 mL. As amostras de sangue foram utilizadas para realizar o ensaio do cometa. Em seguida, o fêmur foi retirado, para realizar o teste do MN com medula óssea.

2.2.2. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado segundo o método descrito por Hartmann e Speit (1997), com algumas modificações. A suspensão celular foi obtida pela diluição de 20 µL de amostra de sangue em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (37 °C). Em seguida, a suspensão celular foi adicionada sobre uma lâmina previamente preparada com agarose comum, coberta com lamínula e refrigerada por 20 min a 4 °C. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram banhadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8 g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, no escuro, em geladeira a 4 °C por, no mínimo, 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese envolta por gelo, contendo uma solução tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, com pH>13) a 4 °C, por 20 minutos, para a deselcoídização do DNA. A corrida eletroforética foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com três banhos de 5 minutos em tampão de neutralização (pH 7,2). Após neutralização, as lâminas foram fixadas (10 min) em etanol absoluto.

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) no momento da análise por microscópio de epifluorescência Leica, filtro B - 3⁴ (excitação: i=420 nM – 490 nM, barreira: I=520 nM).

Foram analisados, ao acaso, 100 nucleóides por animal (duas lâminas com 50 nucleóides cada), totalizando 500 nucleóides/tratamento, em objetiva de 40x, utilizando o Software Comet Assay IV. A porcentagem de DNA na cauda do cometa foi usada como um parâmetro para estimar a quantidade de danos no DNA. As médias da intensidade, comprimento e momento da cauda, de cada tratamento, foram calculadas e submetidas ao teste estatístico.

2.2.3. Teste do Micronúcleo em Medula Óssea

A avaliação de MN em células de medula óssea de roedores foi realizada segundo os protocolos descritos por Schimid (1975), Ribeiro (2013) e Maistro (2014), com algumas modificações.

Após a eutanásia dos animais, foi retirado o fêmur e foram cortadas as epífises, para que o canal medular ficasse exposto. A coleta da medula óssea foi realizada com uma seringa contendo 1 mL de soro bovino fetal (SBF), cuja agulha foi introduzida no canal medular, para que o mesmo fosse lavado por várias vezes, até obter toda a retirada da medula óssea. A suspensão medular foi acondicionada em tubos de ensaio, que foram centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm.

Para a confecção das lâminas, o sobrenadante foi desprezado, a suspensão foi homogeneizada em 500 µL de SBF novo e, com auxílio de uma pipeta Pasteur, o material foi gotejado sobre uma lâmina limpa, para a confecção das extensões sanguíneas. As lâminas obtidas foram fixadas em álcool 70% por 5 minutos e coradas para diferenciar eritrócitos policromáticos (PCE) de eritrócitos normocromáticos (NCE). Para a coloração, as lâminas foram submersas em uma solução pura de Wright por 3 minutos, posteriormente lavadas com água corrente e colocadas, por 1 minuto, em solução de Wright com tampão fosfato pH 7,4 (1:1), lavadas novamente em água e colocadas, por 10 minutos, em uma mistura de tampão fosfato pH 7,4, água destilada e corante Giemsa (10:10:1). As lâminas foram montadas com Entellan®, para preservar as características morfológicas das células.

Foram analisadas, em microscópio de luz e objetiva de 100x, 2 lâminas por animal. Foram contabilizados 2000 PCEs por animal, quantificando nesta contagem a presença de PCE com MN (Figura 2). Além disso, foram examinados 200 eritrócitos por animal, para determinar as taxas de PCE (eritrócitos imaturos) e NCE (eritrócitos maduros), usados como indicadores de toxicidade para as células da medula óssea.

2.2.4. Análise estatística

A comparação dos resultados foi realizada de acordo com distribuição dos dados conferidos pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Em seguida, foi aplicado o teste paramétrico ANOVA/Tukey (teste do MN), para dados com distribuição normal e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis/Dunn's (ensaio do cometa), para dados com distribuição não normal. O software GraphPad Prism (versão 7.00) foi usado para as análises. A diferença de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa, comparando-se sempre com o grupo controle negativo.

3. Resultados

3.1. Ensaio do Cometa

As médias da intensidade, do comprimento e do momento da cauda no ensaio do cometa, realizado em células de sangue periférico de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de cadaverina e os controles, estão relatadas na Tabela 1.

Com a análise dos resultados, foi possível observar que as três diferentes concentrações de cadaverina testadas em ratos Wistar não induziram danos significativos, para os parâmetros medidos pelo software, comparados com os resultados do grupo controle negativo. Quando as células foram expostas às concentrações da substância testada, a maioria delas não apresentou nucleóides com fragmentação evidente de DNA.

Além disso, os resultados obtidos no grupo controle positivo, tratado com MMS, foi comparado com o grupo controle negativo. Nesta análise, pode-se observar que o MMS induziu aumento significativo nos danos no DNA, evidenciado pelo aumento da intensidade de DNA na cauda do cometa. Frente a isso, concluímos que esse aumento de danos no DNA validou o organismo teste e o delineamento experimental aplicados nessa pesquisa, para detectar efeitos genotóxicos.

Tabela 1: Danos no DNA como indicativos de genotoxicidade da cadaverina em sangue periférico de ratos Wistar, medidos pelo ensaio do cometa

Tratamentos	Cauda do cometa		
	Intensidade	Comprimento	Momento
CN	0,73±0,13	15,55±1,70	0,05±0,01
CP	6,28±1,28*	20,22±1,52	0,59±0,14*
15 mg/kg	1,20±0,18	14,34±0,55	0,08±0,01
30 mg/kg	1,62±0,32	15,68±0,76	0,11±0,03
60 mg/kg	0,65±0,18	15,03±0,63	0,05±0,01

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo. * estatisticamente significativo ($p < 0,05$)

3.2. Teste do MN

A frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos (PCE-MN), que avaliou o potencial mutagênico da cadaverina e a razão PCE/NCE, que avaliou a citotoxicidade da substância teste em células de medula óssea de ratos Wistar, estão apresentadas na Tabela 2.

O número de células micronucleadas aumentou, significativamente, para tratamento de 30 mg/kg de cadaverina, mostrando que, nessa concentração, a cadaverina pode estar induzindo instabilidade genômica nos organismos expostos. Embora a maior concentração testada (60 mg/Kg) tenha apresentado níveis de MN cerca de duas vezes maior que a frequência observada no grupo controle negativo, esses resultados não foram significativos, quando submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis/Dunn's.

Já a relação da taxa de PCE/NCE, realizada em paralelo com a contagem de PCE-MN, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com o grupo controle negativo. Sendo assim, nas concentrações testadas, a cadaverina não induziu citotoxicidade em células de medula óssea de ratos Wistar,

Tabela 2: Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCE-MN) e relação de PCE/NCE, observados em células de medula óssea de ratos Wistar (R) tratados com diferentes concentrações de cadaverina e respectivos controles.

Tratamentos	Número de PCE-MN por animal					PCE-MN Média±DP	PCE/NCE Média±DP
	R1	R2	R3	R4	R5		
CN	6	2	6	2	3	3,80±2,05	0,93±0,17
CP	16	12	15	11	17	14,20±2,59*	1,09±0,18
15 mg/kg	4	5	4	5	6	4,80±0,84	1,29±0,19
30 mg/kg	10	7	11	9	9	9,20±1,48*	1,28±0,05
60 mg/kg	4	11	8	5	7	7,00±2,74	1,17±0,34

Foram analisadas 2000 células. DP: Desvio Padrão; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; PCE-MN: eritrócitos policromáticos com MN; PCE/NCE: eritrócito policromático / eritrócito normocromático.
* estatisticamente significativo (p<0,05)

4. Discussão

Neste estudo, foram avaliados os efeitos da cadaverina para ratos Wistar (sistema *in vivo*), expostos por um período de 56 dias, por via oral, por ser esta a via mais provável de contaminação humana.

A potencialidade de uma substância causar efeitos genotóxicos pode implicar na sua potencialidade de também estar envolvida com a iniciação da carcinogênese (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998). Segundo Hagmar et al. (1998), o aumento da genotoxicidade está associado a um possível aumento de risco de câncer. Assim, muitos pesquisadores vêm realizando estudos na área da genética toxicológica, para avaliar o potencial genotóxico de substâncias químicas, cujos resultados alcançados se mostram satisfatórios para essa avaliação. O potencial genotóxico de químicos ambientais, sobre células de mamíferos, pode ser estimado por diversos ensaios, tais como os que identificam mutações, quebras, danos e/ou reparo no DNA e aberrações cromossômicas que envolvem quebras e perdas de cromossomos (ICH, 1997).

Diversas pesquisas realizadas para avaliar o potencial genotóxico de contaminantes ambientais têm associado dois diferentes biomarcadores, sendo que muitas delas têm associado o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo, por esses métodos serem considerados complementares e eficientes para determinação dos efeitos ocasionados por químicos ambientais e misturas complexas (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

O ensaio do cometa, *in vivo*, vem sendo cada vez mais empregado para estimar os efeitos genotóxicos de substâncias químicas e amostras ambientais (HARTMANN et al., 2003; VENTURA et al., 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2010; BRENDLER-

SCHWAAB et al., 2005; HOBBS et al., 2015; EZZI et al., 2016). Segundo Smith et al. (2008), esse ensaio apresenta vantagens como a sua fácil aplicabilidade em diversos tipos de tecido e/ou células, para detectar danos no DNA, que incluem as quebras de fita simples e sítios álcali-lábeis.

No presente estudo, os resultados do ensaio do cometa em células sanguíneas de ratos, indicaram que nenhuma das concentrações testadas foram capazes de interagir com a molécula de DNA e causar a fragmentação desta macromolécula. Sendo assim, pelo ensaio do cometa pode-se inferir que as concentrações testadas de cadaverina não apresentaram potencial genotóxicos para ratos Wistar.

Outro ensaio realizado neste trabalho foi o teste do micronúcleo, teste este usado para avaliar a capacidade da cadaverina induzir aberrações cromossômicas, inferidas pela indução de MN, que podem indicar perda da estabilidade genômica. O teste em eritrócitos de medula óssea em roedores é um dos mais aplicados em pesquisas desenvolvidas na área da citogenética (KASAMOTO, et al., 2013; ZHONG et al. 2014; KRAYNAK et al., 2015; CHAUHAN et al., 2016). A formação de MN pode ocorrer: 1. devido à interação direta do químico com a molécula de DNA, acarretando em quebras cromossômicas que formam fragmentos acêntricos (efeito clastogênico); 2. devido à perda de cromossomos inteiros resultante da ação da substância sobre os constituintes celulares, como por exemplo, o fuso mitótico (efeito aneugênico) (MacGREGOR et al., 1987; FENECH, 2000; AL-SABTI; METCALFE, 1995); 3. ou por amplificação do material genético, devido à poliploidização derivada de uma ação aneugênica mais drástica, que envolve a não segregação dos cromossomos para os polos da células, no momento da divisão celular (FERNANDES et al, 2007).

O aumento significativo de células com alterações no material genético indica instabilidade genômica, que é um processo envolvido com eventos mutagênicos e transformações associadas a carcinogênese (MORGAN et al. 1996). Pelos resultados obtidos nos ensaios envolvendo as diferentes concentrações de cadaverina, observamos uma elevada frequência de PCE-MN para as maiores concentrações testadas (30 e 60 mg/L). No entanto, somente a concentração de 30 mg/kg de cadaverina induziu um aumento estatisticamente significativo, quando comparado com o controle negativo, indicando que esta concentração pode causar mudanças no material genético de ratos Wistar, provavelmente por ação aneugênica. Esta ação é sugerida pelos resultados positivos observados no teste do MN, mas negativos para o ensaio do cometa. Assim, sugere-se que outros ensaios devam ser realizados para confirmar o modo de ação sugerido para a cadaverina sobre o sistema *in vivo* avaliado.

Além disso, outro parâmetro que pode ser investigado pelo teste do MN é a taxa de PCE/NCE, que indica a citotoxicidade nas células de medula óssea por meio do índice de atividade mitótica (NAIK et al., 2013). Neste estudo, a cadaverina não induziu alteração significativa na taxa de PCE/NCE quando comparamos os grupos tratados com o grupo não tratado (CN).

Como já citado, os estudos que envolvem o potencial genotóxico e mutagênico da diamina cadaverina são escassos na literatura. Til e colaboradores (1997) avaliaram a toxicidade aguda e subaguda oral para ratos Wistar de cinco aminas biogênicas. Para a cadaverina, concentrações acima de 2000 mg/L apresentaram uma baixa toxicidade aguda. Porém, quando os organismos foram expostos a concentrações mais altas (10.000 mg/L), eles apresentaram um pequeno aumento no volume das células vermelhas do tecido hematopoiético, além de um aumento na concentração de hemoglobina e de trombócitos e uma diminuição no nível de potássio no plasma. Os organismos ainda apresentaram uma variação no peso/tamanho de seus órgãos, como aumento dos testículos e do coração e a diminuição do fígado. Segundo os autores, como foram observadas pequenas variações no fígado e nenhuma indicação de correlação com alterações histopatológicas, eles concluíram que a cadaverina pode causar alterações na função metabólica do órgão, porém, sem apresentar efeitos hepatotóxicos. As avaliações realizadas por Tabor e Rosenthal (1956) para esta mesma diamina também indicaram que, quando a cadaverina foi administrada intraperitonalmente em ratos (3,3 mM/kg), ela não induziu efeitos nefrotóxicos nestes animais.

Assim, acredita-se que os dados já publicados, citados acima, associados aos resultados do presente estudo, podem servir de incentivo para novas pesquisas a serem realizadas com esta importante diamina. Novos estudos podem complementar o entendimento de seu efeito mutagênico e a importância que essa substância pode ter na contaminação ambiental.

5. Conclusão

Esta foi a primeira vez que a amina biogênica cadaverina teve seu potencial genotóxico e mutagênico investigado em sistema *in vivo*. Os resultados indicaram, pelo ensaio do cometa, que a diamina não induziu aumento significativo de quebras no DNA. No entanto, houve um indicativo de ação mutagênica para a dose de 30 mg/kg da cadaverina, observado pelo teste do MN, possivelmente decorrente de uma possível ação aneugênica desta diamina. Esses dados indicam que a cadaverina pode ser uma das substâncias que confere a toxicidade

ao necrochorume e, conseqüentemente, pode estar envolvida com o comprometimento da contaminação ambiental proporcionada por cemitérios. Assim, as áreas de cemitérios devem ser monitoradas, quanto ao seu potencial de contaminação, para que os ecossistemas ao seu redor não sejam comprometidos. Além disso, precisam ser realizados mais estudos que possam complementar os resultados obtidos neste trabalho e assim, poder inferir, com mais consistência, o mecanismo de ação dessa substância.

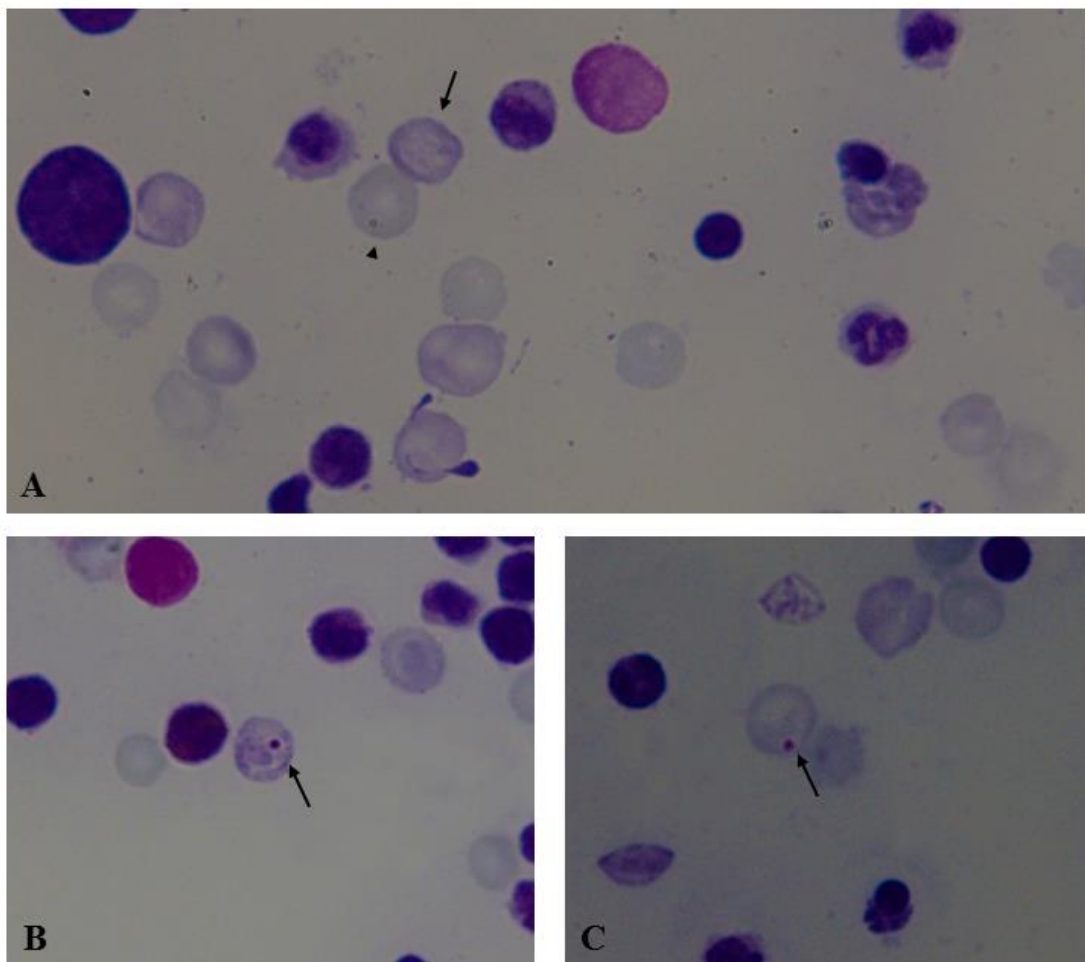


Figura 2: Teste do MN em células de medula óssea de ratos Wistar, submetidos a diferentes concentrações da diamina cadaverina. A: Eritrócito policromático (seta) e eritrócito normocromático (cabeça de seta); B e C: Eritrócito policromático com MN (seta).

Referências Bibliográficas

- AL-SABTI K.; METCALFE C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121-135, 1995.
- ALVES, A. B.; DOS SANTOS, R. S.; CALIL, S. de S.; NIERO, R.; LOPES, J. da S.; PERAZZO, F. F.; ROSA, P. C.; ANDRADE, S. F.; CECHINEL-FILHO, V.; MAISTRO, E. L. Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract *in vivo* and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. **J Ethnopharmacol.**, v. 153, n. 3, p. 694-700, 2014.
- BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245-54, 2005.
- BYARD, R. W.; FARRELL, E. R.; SIMPSON, E. Diagnostic yield and characteristic features in a series of decomposed bodies subject to coronial autopsy. **Forensic Sci Med Pathol**, v. 4, p. 9–14, 2008.
- CAŁKOSIŃSKI, I.; PŁONECZKA-JANECZKO, K.; OSTAPSKA, M.; DUDEK, K.; GAMIAN, A.; RYPUŁA, K. Microbiological analysis of necrosols collected from urban cemeteries in Poland. **Biomed Res Int.**, v. 2015, 2015.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>, 2013
- CHAUHAN, L. K.; VARSHNEY, M.; PANDEY, V.; SHARMA, P.; VERMA, V. K.; KUMAR, P.; GOEL, S. K. ROS-dependent genotoxicity, cell cycle perturbations and apoptosis in mouse bone marrow cells exposed to formulated mixture of cypermethrin and chlorpyrifos. **Mutagenesis**, 2016.
- COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143–151, 2008.
- CUESTA, J. M. R. de la. Informe solicitado por NEMOSA. Comunicação pessoal não publicada. Madrid, 1986.
- DE BOECK, M.; VAN DER LEEDE, B. J.; DE VLIETGER, K.; GEYS, H.; VYNCKIER, A.; VAN GOMPEL, J. Evaluation of p-phenylenediamine, o-phenylphenol sodium salt, and 2,4-diaminotoluene in the rat comet assay as part of the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)-initiated international validation study of *in vivo* rat alkaline comet assay. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.**, v. 786-788, p. 151-7, 2015.
- EZZI, L.; BELHADJ, S. I.; HAOUAS, Z.; SAKLY, A.; GRISSA, I.; CHAKROUN, S.; KERKENI, E.; HASSINE, M.; MEHDI, M.; BEM, C. H. Histopathological and genotoxic effects of chlorpyrifos in rats. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 23, n. 5, p. 4859-67, 2016.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat Res**, v. 455, 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, p. 252–259, 2007.
- 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).

- HAGMAR, L.; BONASSI, S.; STROMBERG, U.; BROGGER, A.; KNUDSEN, L. E.; NORPPA, H.; REUTERWALL, C. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). **Cancer Res.**, v. 58, p. 4117-4121, 1998.
- HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.
- HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicol Lett.**, v. 90, n. 2-3, p. 183-8, 1997.
- HAWEL, L. III, TJANDRAWINATA, R.R., FUKUMOTO, G.H.; BYUS C.V. Biosynthesis and selective export of 1,5-diaminopentane (cadaverine) in mycoplasma-free cultured mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 7412-7418, 1994.
- HAYASHI, M, TICE, R. R.; MACGREGOR, J. T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D. H.; KIRSCH-VOLDERS, M.; OLESON JR., F. B.; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutat. Res.**, v. 312, p. 293-304, 1994.
- HOBBS, C. A.; RECIO, L.; STREICKER, M.; BOYLE, M. H.; TANAKA, J.; SHIGA, A.; WITT, K. L. Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.**, v. 786-788, p. 172-81, 2015.
- HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity of petroleum refinery effluents using the comet assay in *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 5, n. 1, p. 75-79, 2010.
- ICH (1997) Genotoxicity, a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals guideline s2b. international. conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.
- KASAMOTO, S.; MASUMORI, S.; HAYASHI, M. *In vivo* micronucleus assay in mouse bone marrow and peripheral blood. **Methods Mol Biol.**, v. 1044, p. 179-89, 2013.
- KRAYNAK, A. R.; BARNUM, J. E.; CUNNINGHAM, C. L.; NG, A.; YKORUK, B. A.; BENNET, B.; STOFFREGEN, D.; MERSCHMAN, M.; FREELAND, E.; GALLOWAY, S. M. Alkaline comet assay in liver and stomach, and micronucleus assay in bone marrow, from rats treated with 2-acetylaminofluorene, azidothymidine, cisplatin, or isobutyraldehyde. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.**, v. 786-788, p. 77-86, 2015.
- KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 155-166, 2000.
- LONE, M. I.; NAZAM, N.; HUSSAIN, A.; SINGH, S. K.; DAR, A. H.; NAJAR, R. A.; AL-QAHTANI, M. H.; AHMAD, W. Genotoxicity and immunotoxic effects of 1,2-dichloroethane in Wistar rats. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol**, 2016.
- MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutat Res.**, v. 189, p. 103-112, 1987.
- MAISTRO, E. L. The *in vivo* rodent micronucleus test. L.M. Sierra, I. Gaivão (Eds.), Genotoxicity and DNA Repair: a Practical Approach, Methods in Pharmacology and Toxicology, **Springer Science+Business Media**, New York, p. 103-113, 2014.

- MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutat. Res.**, v. 399, p. 135-147, 1998.
- MORGAN, W. F.; DAY, J. P.; KAPLAN, M. I.; MCGHEE, E. M.; LIMOLI, C. L. Genomic instability induced by ionizing radiation. **Radiat Res.**, v. 146, p. 247-258, 1996.
- NAIK, P.; ROZMAN, H. D.; BHAT, R. Genoprotective effects of lignin isolated from oil palm black liquor waste. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 135–141, 2013.
- NEIRA, D. F.; TERRA, V. R.; VILMA, R.; PRATTE-SANTOS, R.; BARBIÉRI, R. S. Impactos do necroschorume nas águas subterrâneas do cemitério de Santa Inês, Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.
- NEVES, C. S.; GOMES, S. S.; DOS SANTOS, T. R.; DE ALMEIDA, M. M.; DE SOUZA, Y. O.; GARCIA, R. M.; OTONI, W. C.; CHEDIER, L. M.; VICCINI, L. F.; DE CAMPOS, J. M. The phytoecdysteroid β -ecdysone is genotoxic in Rodent Bone Marrow Micronuclei and *Allium cepa* L. Assays. **J Ethnopharmacol.**, v. 11, n. 177, p. 81-4, 2016.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental. 1 ed. Brasil: ULBRA, p. 355, 2003.
- RODRIGUES, L.; PACHECO, A. Groundwater contamination from cemeteries cases of study. **Proceedings of Environmental 2010: Situation and Perspectives for the European Union**; Porto, Portugal., 2003.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 31, p. 9–15, 1975.
- SILVA, R. w. c.; MALAGUTTI, W. M. F. Cemitérios como áreas potencialmente contaminadas. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 9, p. 26-35, 2008.
- SMITH, C. C.; ADKINS, D. J.; MARTIN, E. A.; O'DONOVAN, R. Recommendations for design of the rat comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, p. 233-240, 2008.
- SPONGBERG, A. L.; BECKS, P. M. Inorganic soil contamination from cemetery leachate. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 117, p. 313–327, 2000.
- 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.
- TABOR, C. W.; ROSENTHAL, S. M. Pharmacology of spermine and spermidine. Some effects on animals and bacteria. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 116, p. 139-155, 1956.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.-C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206–221, 2000.
- TIL, H. P.; FALKE, H. E.; PRINSEN, M. K.; WILLEMS, M. I. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 337-348, 1997.
- TREDOUX, G.; CAVÉ, L.; ENGELBRECHT, P. Groundwater pollution: Are we monitoring appropriate parameters? **Water SA**, v. 30, n. 5, 2004.
- VENTURA, B.C.; DE ANGELIS, D. de F.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae)

detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 42–51, 2008.

ZHONG, Z.; HU, Z.; GAO, L.; XIA, D.; JIANG, Y. Spontaneous micronucleus formation in an integrated bone marrow micronucleus assay in Wistar Han Rats. **J Environ Immunol Toxicol.**, v. 1, n. 4, p. 159-166, 2014.

Artigo 4: Evidências de estresse oxidativo em fígado de ratos Wistar submetidos a diferentes concentrações de cadaverina

Raquel Vaz Hara¹, Gabriela Luiz Toffolo², Katarine Outeiro Bortolotti², Cristiane Baghin Morandim², Lais de Moraes Santos², Franco Dani Campos-Pereira¹, Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar, Maria Aparecida Marin Morales^{1*}

¹UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

² FHO-UNIARARAS – Fundação Hermínio Ometto, Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 - Jd. Universitário, CEP: 13607-339, Araras, SP, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: mamm@rc.unesp.br

Resumo

O necrochorume é um líquido resultante do processo de decomposição de cadáveres e é considerado um potente poluente ambiental que se percola no solo e atinge o lençol freático. Esse composto, apresenta alto grau de patogenicidade, devido à presença de substâncias orgânicas tóxicas, como a cadaverina e a putrescina. Essas aminas biogênicas, mesmo presentes em pequenas quantidades nos seres vivos, são produzidas em maior quantidade pela hidrólise proteica de tecidos orgânicos dos corpos em decomposição. Compostos químicos podem atuar no equilíbrio redox intracelular pelo aumento dos agentes oxidativos que não foram eliminados pelo sistema de defesa antioxidante, ocasionando danos nas células que, quando não reparados, resultam no estresse oxidativo. Este trabalho avaliou a capacidade da cadaverina induzir alterações no equilíbrio redox nas células hepáticas de ratos Wistar. Foram testadas as concentrações de 15, 30, 60 mg/kg/dia de cadaverina, administradas por via oral por 56 dias consecutivos. Foram quantificados os grupos sulfidrilas (-SH), os níveis de GSH, a atividade das enzimas CAT, SOD, GST e a peroxidação lipídica (TBARS). Em todos os grupos testados foi observado que houve um aumento nos níveis dos grupos -SH, porém, esse aumento só foi estatisticamente significativo para a concentração de 15 mg/kg. Embora os níveis de GSH dos grupos tratados não tenham apresentado resultados significativos, foi possível observar uma diminuição dos mesmos quando estes foram comparados com o CN. Quanto as atividades das enzimas CAT, SOD e GST, não houve resultados significativos para nenhuma das concentrações testadas. Foi observado um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) para todas as concentrações testadas pelo ensaio TBARS, porém esses resultados não foram estatisticamente significativos. Diante desses resultados, fica o alerta de que, em determinadas concentrações, a cadaverina pode ser um indutor de estresse oxidativo em células hepáticas de mamíferos.

Palavras-chave: Necrochorume, cemitério, enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica, danos oxidativos.

1. Introdução

Aminas biogênicas têm origem biológica e ocorrem naturalmente em microrganismos, plantas e animais, atuando em diversos processos metabólicos com diferentes funções fisiológicas (SILLA SANTOS, 1996). Esse grupo de aminas são classificadas de acordo com o número de grupamentos amina que possuem na sua estrutura química (CARDOZO et al. 2013). Segundo Giroto et al. (2010), essas aminas se classificam em monoaminas (tiramina e feniletilamina); diaminas (histamina, serotonina, triptamina, cadaverina) e poliaminas (putrescina, espermina e espermidina). Embora as aminas biogênicas sejam necessárias para desenvolver as funções fisiológicas de diferentes organismos, quando em concentrações elevadas, elas podem também apresentar efeitos tóxicos (SHALABY, 1996).

A cadaverina pertence ao grupo das diaminas, substâncias orgânicas que possuem dois grupos amina em uma cadeia alifática, formada pela descarboxilação bacteriana do aminoácido lisina (ONAL, 2007). Essa diamina é produzida, também, pela hidrólise proteica, durante a putrefação de tecidos orgânicos de corpos em decomposição. Até hoje, são raros os dados da literatura sobre a toxicidade da cadaverina, principalmente, com relação aos efeitos biológicos que possam ser decorrentes da exposição a este composto pela contaminação ambiental.

Muitas substâncias químicas apresentam potencial tóxico e, quando lançadas no meio ambiente, podem comprometer os ecossistemas e a saúde humana (DEGUCHI et al., 2007). Dentre as fontes de contaminação do meio ambiente estão as áreas de cemitérios. O principal veículo de contaminação dos cemitérios é o necrochorume, um líquido derivado da decomposição cadavérica, gerado no primeiro ano de sepultamento. Segundo Silva (1998) e Matos (2001), o necrochorume é um composto de aparência viscosa e coloração castanho-acinzentada, rico em sais minerais e substâncias orgânicas degradáveis. Esse líquido pode conter substâncias capazes de causar sérios impactos ambientais, devido ao aumento da carga de substâncias orgânicas e inorgânicas que disponibilizam nos solos e nas águas subterrâneas (UCISIK; RUSHBROOK, 1998), dentre elas as aminas biogênicas cadaverina e a putrescina.

As características geológicas do terreno, tais como o tipo de solo, a profundidade do lençol freático e presença de rochas com fraturas, podem contribuir para a percolação do necrochorume no solo, decorrendo na contaminação das águas subterrâneas (SILVA; MALAGUTTI FILHO, 2010). Diante dessa problemática, o Conselho Nacional do Meio

Ambiente (CONAMA) implementou uma legislação (CONAMA nº 335) que dispõe de critérios legais para a implantação de cemitérios no Brasil.

Klobucar et al. (2003) destaca, em seu trabalho, a necessidade cada vez maior de se avaliar as potencialidades tóxicas dos químicos ambientais, por meio de ensaios realizados com organismos vivos sensíveis, que sejam capazes de auxiliar na determinação da periculosidade biológica desses contaminantes.

Várias lesões que ocorrem nos órgãos, incluindo os danos hepáticos, estão envolvidos com mecanismos oxidativos, que decorrem na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis também pelo processo de morte celular (JAESCHKE et al., 2012). A formação de ERO é a grande responsável pelos danos que comprometem as macromoléculas intracelulares, no qual estão incluídas as oxidações proteicas, peroxidação lipídica e danos nos ácidos nucleicos (KEHRER, 1993). Quando a célula fica exposta à ação de substâncias tóxicas, é acionado um sistema de defesa vital para a sua sobrevivência (JAESCHKE, 2010). Segundo Limon-Pacheco e Gonsebatt (2009), enzimas antioxidantes, como a catalase e a superóxido-desmutase, atuam na remoção catalítica de radicais livres, como um importante mecanismo de defesa contra os danos oxidativos. No entanto, a toxicidade de uma substância química pode interferir nesse mecanismo, elevando a concentração de ERO e diminuindo a capacidade de sua remoção pelo sistema de defesa antioxidante (HALLIWELL, 2009).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da cadaverina induzir danos oxidativos em células hepáticas de ratos Wistar, por meio da quantificação dos grupos Sulfídricos (-SH), da Glutathione reduzida (GSH), da atividade das enzimas Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione S-transferase (GST) e do nível de peroxidação lipídica (níveis de MDA).

2. Materiais e Métodos

2.1. Substâncias Química Testada

A substância avaliada nesse estudo foi a diamina cadaverina (1,5-Diaminopentano, 1,5-Pentanodiamina, Pentametilenediamina) sintetizada pela marca Fluka (97% de pureza) e comercializada pela Sigma-Aldrich (CAS-No. 462-94-2) (Figura1).

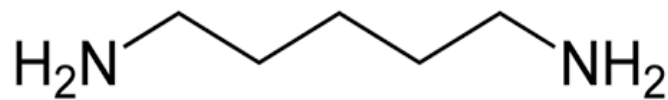


Figura 1: Estrutura química da Cadaverina

2.2. Bioensaios com ratos Wistar

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos com, aproximadamente, 120 dias de idade e 400 g de massa corpórea, adquiridos no biotério central da Universidade de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos no Centro de Experimentação Animal da Fundação Hermínio Ometto (FHO – Uniararas) em condições ambientais controladas para temperatura (cerca de $22\pm 2^\circ\text{C}$), umidade do ar (60%) e ciclo claro/escuro (12 horas). A alimentação foi feita com água filtrada e ração comercial, *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=5): O Grupo controle negativo, que recebeu água filtrada por todo o período experimental; Grupo Tratado 1, que recebeu 15 mg/kg/dia de cadaverina; Grupo Tratado 2, que recebeu 30 mg/Kg/dia de cadaverina; e Grupo Tratado 3 que recebeu 60 mg/kg/dia de cadaverina. As concentrações foram definidas a partir da referência descrita na ficha de segurança do produto, fornecido pela empresa Sigma-Aldrich. O tratamento foi realizado por 56 dias consecutivos e as doses foram administrados por via oral (gavage).

Antes da eutanásia, os animais foram anestesiados com solução de Xilazina (Rompun® - Bayer S.A. – 20 mg/mL) e Cetamina (Ketalar® - Parke, Davis & Co. - 50 mg/mL), aplicados por injeção subcutânea. A retirada do fígado foi realizada a partir da labarotomia medial até exposição total da cavidade torácica.

O presente estudo teve a aprovação da Comissão de Ética em Uso Animal da Fundação Hermínio Ometto (FHO – Uniararas) Araras/SP, protocolo N° 033/2014. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2.1. Quantificação do estresse oxidativo no Fígado

2.2.1.1. Avaliação do estresse oxidativo no fígado

O fígado foi homogeneizado em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por meio do homogeneizador de tecidos (modelo IKA T-18, marca Biovera), para quantificar o total de proteína de cada amostra. A concentração de proteína foi medida de acordo com o método do

biureto descrito por Gornall et al. (1949). De acordo com o valor obtido, foram realizados, em triplicata, todos os ensaios de estresse oxidativo.

A quantificação dos níveis de grupos sulfidrila reduzidos (-SH) e GSH seguiram o procedimento descrito por Ellman (1959). Para o -SH foi utilizado o fígado homogeneizado, tampão TRIS-HCl, 25 mM com EDTA 1 mM (pH 8,2) e DNTB (5-5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid), a leitura foi realizada imediatamente e após 15 minutos. A quantificação de GSH foi realizada com o preparo de uma solução com o tecido homogeneizado e ácido tricloroacético (TCA 20 %, EDTA 1 mM). Após a precipitação das proteínas, o sobrenadante foi misturado com tampão TRIS- HCl 25 mM, com EDTA 1 mM (pH 8,2) e DNTB 10 mM, a leitura foi realizada imediatamente e após 15 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 412 nm. A concentração de grupos -SH e GSH foram calculadas pela equação: $(Abs_{final} - Abs_{inicial}) \times 1,57$ (mM) (ALLAMEH et al., 1997).

A atividade da GST foi avaliada seguindo o método de Habig et al. (1974) e o aumento na absorbância foi quantificado em 340 nm e as leituras foram realizadas a cada minuto de um total de 5 minutos. A dosagem da atividade da CAT foi realizada de acordo com o método descrito por Aebi (1984) usando peróxido de hidrogênio. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio foi monitorada a cada 30 segundos, por 2 minutos e meio em comprimento de onda de 240 nm e a atividade foi expressa em unidades de absorbância/minuto. A atividade da SOD foi avaliada pelo método de auto-oxidação do pirogalol descrito por Marklund e Marklund (1974). A quantificação de SOD foi determinada de acordo com a quantidade de enzima que inibiu a oxidação do pirogalol medida a 440 nm. A peroxidação lipídica foi avaliada pela quantidade de MDA calculada usando a fórmula: $\lambda_{535} = 149.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BUEGE; AUST, 1978; GORNALL et al., 1949).

2.2.1.2. Análise estatística

A normalidade de todos os resultados foi realizada pelo teste D'Agostino & Pearson, para verificar se os dados foram distribuídos de forma paramétrica ou não paramétrica. A análise estatística dos resultados foi realizada de acordo com a distribuição dos dados, pelos testes ANOVA/Tukey (ensaios de -SH, GSH, SOD, CAT e GST) e Kruskal-Wallis/Dunn's (ensaio de peroxidação lipídica). Em todas as análises, os resultados foram considerados estatisticamente significativo quando apresentavam o valor de $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussões

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ERO excede a capacidade do sistema de defesa antioxidante remover essas espécies tóxicas das células (LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009). Os danos induzidos pelas ERO podem afetar os principais componentes celulares, como os ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, alterando as suas funções em células, tecidos e órgãos (SIES, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Assim, a exposição das células e tecidos a substâncias químicas pode gerar EROs que ativam as vias de sinalização de estresse (SINGHAL et al., 2015). Estas vias de estresse integram-se com vias de sinalização adicionais, para controlar as respostas celulares a estímulos extracelulares (YADAV et al., 2008; DALLEAU et al., 2013; SINGHAL et al., 2015).

As sequências de eventos promovidos pela sinalização de estresse oxidativo têm contribuído para o processo de envelhecimento e o aumento da incidência de doenças neurodegenerativas, cânceres, diabetes e arterosclerose, devido à incapacidade celular de desintoxicação das espécies reativas de oxigênio (HAUPTMANN et al., 1996; SIES, 1999).

Ensaio de estresse oxidativo, realizados com marcadores enzimáticos (como a catalase, superóxido dismutase, glutatona S-transferase) e não enzimáticos (como grupos sulfidrila, glutatona reduzida e malondialdeído) permitem monitorar o grau da lesão hepática e a detecção precoce de doenças (CESARATTO et al., 2004). Neste contexto, os ensaios realizados no presente estudo trazem novas e importantes informações sobre os efeitos ocasionados no fígado de ratos Wistar machos expostos à diferentes concentrações da diamina cadaverina.

Alterações nos níveis de grupos sulfidrila das proteínas totais (-SH) representam um marcador eficiente para avaliar danos oxidativos (BARBOSA et al., 2010). De acordo com os resultados obtidos, observou-se um aumento nos níveis de -SH para os animais tratados com 15 e 30 mg/kg de cadaverina, porém, somente o grupo 15 mg/kg apresentou uma diferença estatisticamente significativa, quando comparado com o grupo controle (Figura 1A).

A GSH protege as proteínas, evitando a oxidação do grupo tiol, por interagir de forma direta com as espécies reativas ou pela GST de forma indireta (LAUTERBURG et al., 1984; DENEKE; FANBURG, 1989; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Em mamíferos, a síntese de GSH ocorre, principalmente, no fígado e representa, em condições fisiológicas, cerca de 90% da GSH total (LAUTERBURG et al., 1984; DENEKE; FANBURG, 1989). Os grupos tratados com cadaverina apresentaram uma ligeira, mas não significativa diminuição nos níveis de GSH, quando comparados com os resultados do grupo controle (Figura 1B). O

esgotamento dos níveis de GSH intracelular pode prejudicar a viabilidade celular, uma vez que ela está envolvida com diversas funções celulares.

Uma possibilidade da diminuição da GSH pode ser a possível interação das EROs geradas pela cadaverina de se ligarem a um local crítico da proteína formadora de poros da membrana externa da mitocôndria, conforme citado por Toninello et al. (2004) em sua revisão sobre aminas biogênicas. Provavelmente, essas proteínas sejam as mesmas usadas por monoaminas e poliaminas, que decorre, assim, no efeito inibidor registrado (TONINELLO et al., 2004).

Hauptmann et al. (1996) citaram que os peróxidos de hidrogênios gerados durante a oxidação de aminas biogênicas, na membrana mitocondrial externa, podem causar dano oxidativo ao DNA mitocondrial, com potenciais implicações para o envelhecimento e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Pelos estudos realizados por Toninello et al. (2004), esse efeito pode ser explicado pela transição de permeabilidade mitocondrial (MPT), que, na sua revisão sobre monoaminas, pode ter sido induzida por um mecanismo da oxidação do grupo amina das monoaminas pela flavoenzima mitocondrial monoamina-oxidase (MAO). Ainda segundo o autor, a GSH inibe esse efeito e pode promover um inchaço mitocondrial, em decorrência da abertura dos poros na membrana da mitocôndria. Assim, níveis reduzidos de GSH aumentam a quantidade de ERO, resultando em uma resposta como segundo mensageiro, ou pode acelerar os danos mitocondriais e processos apoptóticos (HAMMOND et al., 2007).

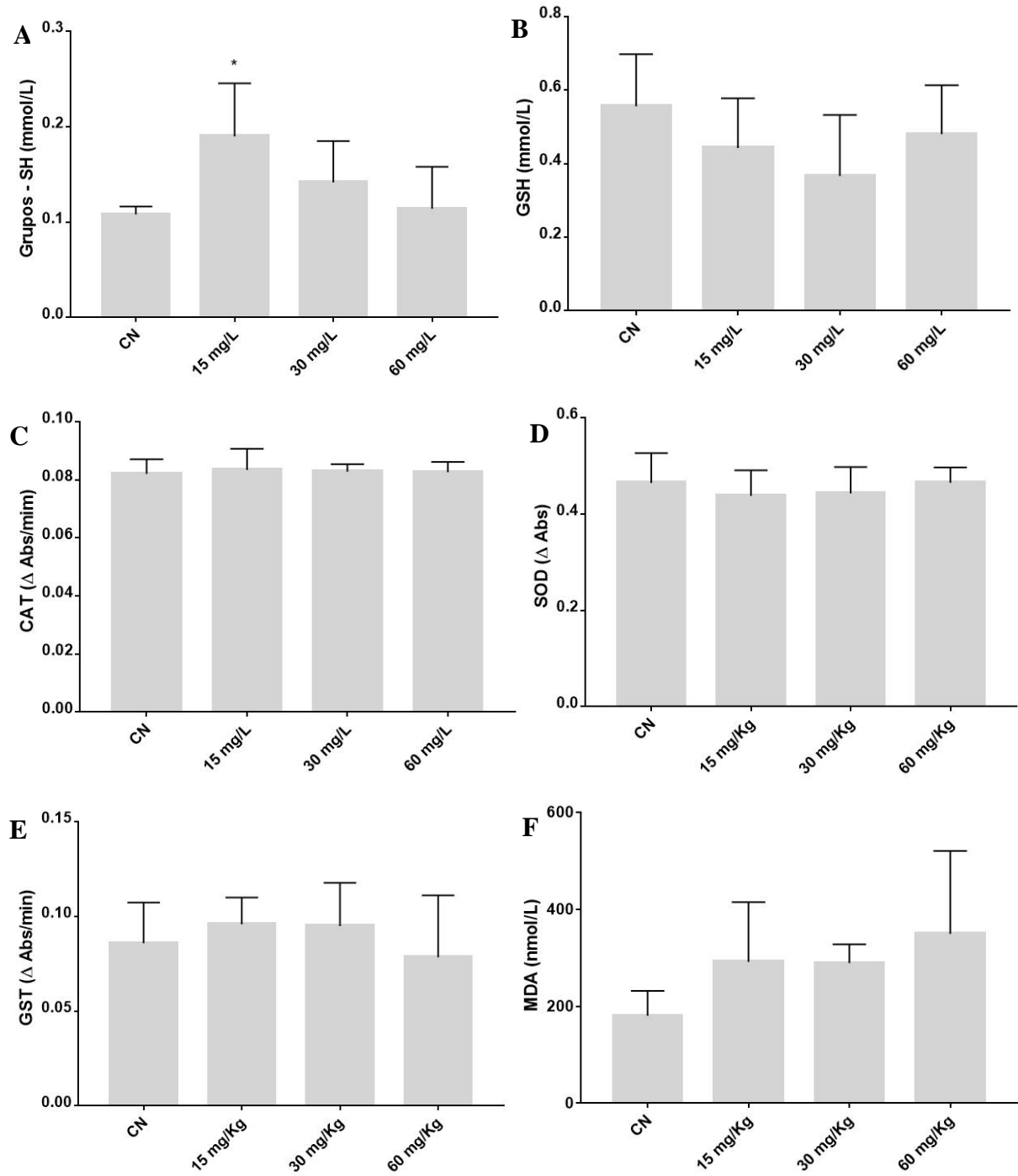
A remoção catalítica de ERO por enzimas antioxidantes é considerada um importante mecanismo de defesa contra os danos oxidativos induzidos por compostos tóxicos (LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009). Para investigar a influência da cadaverina no mecanismo de defesa antioxidante das células hepáticas, foram quantificadas as atividades da CAT, SOD e GST. A CAT exerce um papel importante nas organelas celulares, como nos peroxissomos, por apresentar um grupo heme, que faz a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e O_2 , resultando na eliminação do H_2O_2 (LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009). Já as SOD são proteínas que contêm metais capazes de catalisar a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009). Segundo Leeuwenburgh e Ji (1995), as atividades da SOD também são mais elevadas no fígado. Após a quantificação da atividade dessas enzimas, realizadas nesse trabalho, observou-se que todas as enzimas não apresentaram variações significativas nas suas atividades, entre os animais tratados e o grupo CN, demonstrando que a substância teste não interfere nos mecanismos de proteção exercida por essas enzimas (Figura 1C, 1D e 1E).

A GST pertence à família de enzimas multifuncionais que estão envolvidas com reações de biotransformação de fase II, que protege as células e os tecidos da ação dos danos oxidativos, por meio da desintoxicação de compostos ou metabólitos eletrolíticos derivados de processos oxidativos celulares (SHARMA et al., 2004; HAYES et al., 2005; ZIMNIAK; SINGH, 2006). O presente estudo mostrou que não houve mudanças significativas na atividade da GST no fígado de todos os ratos tratados com cadaverina.

Para avaliar a peroxidação lipídica no tecido hepático, foi realizada a medição do nível de malondialdeído (MDA), que representa o produto final da peroxidação lipídica na lesão oxidativa no fígado (CESARATTO et al., 2004). A dosagem de MDA evidencia uma ação danosa no genoma humano, sendo considerado um agente potencialmente genotóxico e clastogênico (RUEFF et al., 1989). Os níveis de MDA não apresentaram alterações significativas nos grupos tratados, mas foi possível observar um aumento em todos os grupos tratados com cadaverina, quando comparados ao grupo CN. O aumento da peroxidação lipídica é considerada um evento inicial do estresse oxidativo, que está relacionado com várias lesões no tecido, pela oxidação de ácidos graxos, morte celular e surgimento de muitas doenças agudas e crônicas (BASU, 2003).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que, mesmo não estatisticamente significativos, a cadaverina pode estar associada com um aumento da peroxidação lipídica e uma diminuição dos níveis de GSH. Segundo Nandi et al. (2005), o aumento no nível de TBARS e a diminuição da concentração de GSH indicam elevada geração de ERO, no qual resulta na peroxidação lipídica no fígado. Esses dados mostram a importância de estudos que avaliem o potencial oxidativo de agentes que induzem a formação de ERO e, conseqüentemente, acelera os processos patológicos, incluindo a carcinogênese (FENG et al., 2004; POLI et al., 2008). Vários estudos na área de carcinogênese tem relacionado as respostas às EROs do órgão exposto e o desenvolvimento de tumores (YAMAMOTO et al., 1997; MIZOI et al., 2005; KINOSHITA et al., 2007).

Figura 1: Efeitos nos níveis dos grupos sulfidrilas (A), glutaciona reduzida (B), catalase (C), superóxido dismutase (D), glutaciona S-transferase (E) e TBARS (F) de fígado de ratos Wistar submetidos a diferentes concentrações de cadaverina.



* estatisticamente significativo ($p < 0,05$)

4. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que a cadaverina pode atuar no equilíbrio redox, induzindo a lipoperoxidação e mostrando uma tendência em alterar os níveis dos antioxidantes não enzimáticos (-SH e GSH), mesmo não sendo estatisticamente significativos, no tecido hepático de ratos Wistar. Porém, nas concentrações aqui testadas, a cadaverina não interferiu na atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GST), uma vez que os níveis obtidos nos grupos tratados foram semelhantes aos encontrados no grupo CN. Estudos do potencial oxidativo das substâncias presentes no necrochorume são extremamente importantes e necessárias, pois pouco se sabe sobre a toxicidade dessas substâncias. Este trabalho mostra que, em determinadas concentrações, a cadaverina pode causar estresse oxidativo para o tecido hepático. Assim, reforça-se que o necrochorume deve ser visto com um poluente ambiental que exige medidas mitigadoras da sua contaminação, para que haja um maior cuidado em relação à sua dispersão para o solo e águas subterrâneas.

Referências Bibliográficas

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Meth. Enzymol.**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ALLAMEH, A.; VANSOUN, E. Y.; ZARGHI, A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Mech. Ageing Dev.**, v. 95, p. 71–79, 1997.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. DE C. G.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BASU, S. The enigma of *in vivo* oxidative stress assessment: isoprostanes as an emerging target. **Scand J Food Nutr.**, v. 51, n. 2, p. 48–61, 2007.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v. 52, p. 302–310, 1987.
- CESARATTO, L.; VASCOTTO, C.; CALLIGARIS, S.; TELL, G. The importance of redox state in liver damage. **Ann. Hepatol.**, v. 3, n. 3, p. 86–92, 2004.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)**. Resolução nº 335, de 3 de abril de 2003. Dispõe sobre o licenciamento ambiental de cemitérios. Disponível em: <<http://www.aguaseguas.ufjf.br/RESOLUCAO%20conama335%20CEMITERIOS.pdf>>.
- DALLEAU, S.; BARADAT, M.; GUÉRAUD, F.; HUC, L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4 hydroxynonenal (HNE) in the balance. **Cell Death Diff.**, v. 20, p. 1615–1630, 2013.
- DEGUCHI, Y.; TOYOIZUMI, T.; MASUDA, S.; YASUHARA, A.; MOHRI, S.; YAMADA, M.; INOUE, Y.; KINAE, N.; Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutation Research**, v. 627, p. 178–185, 2007.

- DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. L163–L173, 1989.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, V. 82, p. 70–77, 1959.
- FENG, Z.; HU, W.; TANG, M. S. Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells. A possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, p. 8598–8602, 2004.
- GIROTO, J. M.; MASSON, M. L.; HARACEMIV, S. M. C. Biogenic amines in sausages and other foods. *Braz J Food Technol*, v. 13, n.1, p. 1-10, 2010.
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, V. 177, p. 751–766, 1949.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem.**, v. 249, n. 22, p. 7130-9, 1974.
- HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 46, n. 5, p. 531–542, 2009.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford **University Press**, New York (Eds.), p. 105–245, 1999.
- HAMMOND, C. L.; MARCHAN, R.; KRANCE, S. M.; BALLATORI, N. Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 19, p. 14337-47, 2007.
- HAUPTMANN, N.; GRIMSBY, J.; SHIH, J. C.; CADENAS, E. The Metabolism of Tyramine by Monoamine Oxidase A/B Causes Oxidative Damage to Mitochondrial DNA. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 335, n. 2, p. 295–304, 1996.
- HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase super gene family: regulation of GST and contribution of the isozymes to cancer chemoprevention and drug resistance. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, p. 445–600, 1995.
- JAESCHKE, H. Antioxidant defense mechanisms. In: McQueen, C. A. (Ed.), *Comprehensive toxicology*, **Oxford, UK: Academic**, v. 9, p. 319–337, 2010.
- JAESCHKE, H.; MCGILL, M. R.; RHANDRAN, A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. **Drug Metab Rev.**, v. 44, n. 1, p. 88-106, 2012.
- KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit Rev Toxicol**, v. 23, p. 21–48, 1993.
- KINOSHITA, A.; WANIBUCHI, H.; WEI, M.; YUNOKI, T.; FUKUSHIMA, S. Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell proliferation via generation of oxidative stress by organic arsenicals contributes to their carcinogenicity in the rat liver and bladder. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 221, p. 295–305, 2007.
- KLOBUCAR, G. I. V.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPES, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 1523, 2003.
- LAUTERBURG, B. H.; ADAMS, J. D.; MITCHELL, J. R. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. **Hepatology**, v. 4, p. 586–590, 1984.

- LEEUEWENBURGH, C.; JI, L. L. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 316, p. 941–949, 1995.
- LIMON-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutat. Res.**, v. 674, n. 1–2, p. 137–147, 2009.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, p. 469-474, 1974.
- MATOS, B.A. Avaliação da ocorrência e do transporte de microrganismo no aquífero freático do cemitério de Vila Nova Cachoeirinha, município de São Paulo. São Paulo, Tese (Doutorado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) – **Escola Politécnica, Universidade de São Paulo**, p. 113, 2001.
- MIZOI, M.; TAKABAYASHI, F.; NAKANO, M.; AN, Y.; SAGESAKA, Y.; KATO, K.; OKADA, S.; YAMANAKA, K. The role of trivalent dimethylated arsenic in dimethylarsinic acid-promoted skin and lung tumorigenesis in mice: tumor-promoting action through the induction of oxidative stress. **Toxicol. Lett.**, v. 158, p. 87–94, 2005.
- NANDI, D.; PATRA, R. C.; SWARUP, D. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress nad biochemical alterations in rats. **Toxicology**, v. 211, n. 1-2, p. 26–35, 2005.
- ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1475–1486, 2007.
- POLI, G.; SCHAUR, R. J.; SIEMS, W. G.; LEONARDUZZI, G. 4-Hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. **Med. Res. Rev.**, v. 28, p. 569–631, 2008.
- RUEFF, J.; LAIRES, A.; BRÁS, A.; BORBA, H.; CHAVECA, T.; GASPAR, J. DNA damage and oxygen species. DNA repair mechanisms and their biological implications in mammalian cells. **Plenum Press**, p. 171–81, 1989.
- SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.
- SHARMA, R.; YANG, Y.; SHARMA, A.; AWASTHI, S.; AWASTHI, Y. C. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 6, n. 2, p. 289–300, 2004.
- SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 916–921, 1999.
- SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **Int J Food Microbiol.**, v. 29, n. 2-3, p. 213-31, 1996.
- SILVA, L.M. Cemitérios: fonte potencial de contaminação dos aquíferos livres. In: Congresso Latino Americano de hidrologia subterrânea, Montevideo. Memórias. Montevideo: ALHSUD, v. 2, p. 667-681, 1998.
- SILVA, R. W. C.; MALAGUTTI FILHO, W. Application of electrical imaging in the study of contamination from cemeteries. **Geociênc.**, v. 29, n.3, 2010.

SINGHAL, S. S.; SINGH, S. P.; SINGHAL, P.; HORNE, D.; SINGHAL, J.; AWASTHI, S. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 289, n. 3, p. 361-70, 2015.

TONINELLO, A.; SALVI, M.; MONDOVÌ, B. Interaction of biologically active amines with mitochondria and their role in the mitochondrial-mediated pathway of apoptosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 17, 2004.

UCISIK, A. S.; RUSHBROOK, P. The impact of cemeteries on the environment and public health: an introductory briefing. Denmark: **WHO Regional Office for Europe**, 11 p., 1998.

YADAV, U. C.; RAMANA, K. V.; AWASTHI, Y. C.; SRIVASTAVA, S. K. Glutathione level regulates HNE-induced genotoxicity in human erythroleukemia cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 227, p. 257-264, 2008.

YAMAMOTO, S.; Wanibuchi, H.; HORI, T.; Yano, Y.; MATSUI-YUASA, I.; OTANI, S.; CHEN, H.; YOSHIDA, K.; KURODA, K.; ENDO, G.; FUKUSHIMA, S. Possible carcinogenic potential of dimethylarsinic acid as assessed in rat *in vivo* models: a review. **Mutat. Res.**, v. 386, p. 353–361, 1997.

ZIMNIAK, P.; SINGH, S. P. Families of glutathione transferases, in Toxicology of Glutathione Transferases (Awasthi, Y.C., Ed.), **CRC Press**, Boca Raton, FL, p. 11–26, 2006.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Pelos resultados obtidos nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, realizados com diferentes concentrações de cadaverina aplicadas a diferentes sistemas testes, pode-se concluir que:

- A utilização de diferentes bioindicadores e biomarcadores contribuíram para uma análise mais completa e significativa dos riscos que a cadaverina pode promover ao ambiente e aos organismos expostos.

- As concentrações de 61,5, 184,5 e 307,5 mg/L da cadaverina foram genotóxicas para as células meristemáticas de *A. cepa*, devido ao aumento de aberrações cromossômicas, como aderências cromossômicas e células binucleadas, que indicam uma ação aneugênica dessa substância. Todas as concentrações testadas de cadaverina não apresentaram efeito citotóxico e mutagênico para esse mesmo organismo-teste.

- Os ensaios realizados com células HepG2 e Speedy mantidas em cultura, mostraram um efeito citotóxico da cadaverina para ambas as linhagens. Também se observou que as células Speedy foram mais sensíveis que as células HepG2 para a ação da cadaverina.

- A avaliação da genotoxicidade da cadaverina, por meio do ensaio do cometa, não demonstrou efeito da substância sobre o DNA, confirmando que a genotoxicidade observada para *A. cepa* foi devido a ação aneugênica dessa substância. Porém, no teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese, a cadaverina apresentou efeito mutagênico, confirmado pela elevada frequência de MN, e efeito genotóxico, pelo aumento dos índices de brotos nucleares e pontes núcleoplasmáticas, para ambas as linhagens. Esses dados também corroboraram a ação aneugênica da substância, pois os efeitos observados para os três sistemas testes, indicam uma ação da cadaverina mais relacionada ao aparelho mitótico da célula do que propriamente com o DNA, confirmando a ação aneugênica proposta.

- As concentrações de cadaverina estudadas não foram genotóxicas para ratos Wistar, pelos ensaios realizados com sangue periférico pelo ensaio do cometa. Pelo teste do MN com células de medula óssea, observou-se que a cadaverina não induziu citotoxicidade, uma vez que não houve mudança significativa na relação entre eritrócitos policromáticos (PCE)/eritrócitos normocromáticos (NCE). No entanto, a frequência de MN em PCE, apresentou um aumento significativo nos animais tratados com concentração de 30 mg/Kg de cadaverina, considerado um indicativo de instabilidade genômica. Esses dados confirmam a ação da cadaverina, observada para os outros sistemas-teste, e reforça a sua aneugenicidade.

- O ensaio do cometa e o teste do micronúcleo, realizados em sistemas *in vitro* e *in vivo*, demonstraram ser eficientes e complementares na avaliação genotóxica e mutagênica de substâncias químicas;

- Quanto ao potencial oxidativo da cadaverina, avaliado em células hepáticas de ratos Wistar, pode-se inferir que a cadaverina pode influenciar nos índices dos grupos -SH, GSH e provocar a peroxidação lipídica. As atividades enzimáticas da CAT, SOD e GST não foram comprometidas, após os indivíduos serem expostos à cadaverina;

- Pela variedade de efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e oxidativos ocasionados pela cadaverina, acredita-se que a sua presença no ambiente deve ser considerada uma preocupação de risco ambiental;

Esse trabalho buscou reunir o maior número de dados possíveis para contribuir com o conhecimento toxicológico da cadaverina, que tem sido pouco estudada como um contaminante ambiental e, assim, incentivar a realização de outras pesquisas com essa substância e em ambientes impactados por cemitérios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth. Enzymol.**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A New Rapid and Simple Nonradioactive Assay to Monitor and Determine the Proliferation of Lymphocytes—An Alternative to [H-3] Thymidine Incorporation Assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211–224, 1994.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M. Jr.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.
- ALLAMEH, A.; VANSOUN, E. Y.; ZARGHI, A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Mech. Ageing Dev.**, v. 95, p. 71–79, 1997.
- ALMEIDA, A. M.; MACÊDO, J. A. B. Parâmetros físico-químicos de caracterização da contaminação do lençol freático por necrochorume. Seminário de Gestão Ambiental, 2005.
- AL-SABTI K.; METCALFE C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, n. 2-3, p. 121-135, 1995.
- AMORIM, Q. S. D.; CRUZ, C. F. Avaliação da contaminação de lençóis freáticos por necrochorume – Cachoeira- Bahia/Brasil. **Científico**, v. 14, n. 27, 2014.
- 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.
- ARORA, K.; NAMRATA, S.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. Evaluation of Genotoxic Risks Due to Temporal Changes in Soil Urea: Using *Allium cepa* L. Root Tip Bioassay. **Cytologia**, v. 79, n. 1, p. 85–93, 2014.
- BACH, B.; LE QUERE, S.; VUCHOT, P.; GRINBAUMC, M.; BARNAVON, L. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine instability during wine sample storage. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 114–119, 2012.
- BACHRACH, U. Polyamines and cancer: minireview article. **Amino Acids**, v. 26, 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. 301-17, 2001.
- BAKARE, A. A.; ADEYEMI, A. O.; ADEYEMI, A.; ALABI, O. A.; OSIBANJO, O. Cytogenotoxic effects of electronic waste leachate in *Allium cepa*. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, v. 65, n. 2, 94–100, 2012.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. Br.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; M., RODRIGUES, V. P.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v.23, n. 4, p. 629-643, 2010
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BARDÓCZ, S. The role of dietary polyamines. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 47, p. 683–690, 1993.
- BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 826–833, 2011.

- 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*. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 120, p. 174-83, 2015.
- BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475-83, 2016.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.**, v. 12, n. 12, p. 123-30, 1999.
- BONOMO, M. M.; MOROZESK, M.; DUARTE, I. D.; ROCHA, L. D.; FERNANDES, M. N.; MATSUMOTO, S. T. Sewage sludge hazardous assessment: chemical evaluation and cytological effects in CHO-k1 cells. **Environ Sci Pollut Res Int.**, n. 23, v. 11, p. 11069-75, 2016.
- BOUWER, H. Groundwater Hydrology, **McGraw-Hill Inc.**, New York, 1978.
- BRUSICK, D. **Principles of Genetic Toxicology**. 2 ed., Estados Unidos: Plenum Publishing Corporation, p. 1-432, 1987.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v. 52, p. 302–310, 1987.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, p. 287–299, 2011.
- CAŁKOSIŃSKI, I.; PŁONECZKA-JANECZKO, K.; OSTAPSKA, M.; DUDEK, K.; GAMIAN, A.; RYPUŁA, K. Microbiological Analysis of Necrosols Collected from Urban Cemeteries in Poland. **Biomed Res Int.**, v. 2015, p. 169573, 2015.
- CAMPESTRE, M. P.; BORDENAVE, C. D.; ORIGONE, A. C.; MENÉNDEZ, A. B.; RUIZ O. A.; RODRÍGUEZ, A. A.; MAIALE, S. J. Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls. **J. Plant Physiol.**, v. 168, p. 1234–1240, 2011.
- CARDOZO, T.R.; ROSA, D.P.; FEIDEN, I.R.; ROCHA, J.A.V.; D'AVILA DE OLIVEIRA, N.C.; PEREIRA, T.S.; PASTORIZA, T.F.; MARQUES, D.M.; LEMOSA, C.T.; TERRA, N.R.; VARGAS, V.M.F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, v. 603, p. 83–96, 2006.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722-5, 2008.
- CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BUCCIARELLI, T.; BOCCIO, P. D.; FEDERICI, L.; ILIO, C. D. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90, p. 48-57, 2008.
- 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.
- CASTRO, D. L. Caracterização geofísica e hidrogeológica do cemitério bom jardim, fortaleza – CE. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 26, p. 251-271, 2008.
- CATETE, C. P. Investigações ambiental e forense com os métodos geofísicos radar de penetração do solo, polarização induzida e eletrorresistividade no Cemitério do Tapanã, Belém/Pará. Dissertação, 2010.

- CAVALCANTE, D. G.; DA SILVA, N. D.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A.; MARTINEZ, C. B. Cytotoxic, biochemical and genotoxic effects of biodiesel produced by different routes on ZFL cell line. **Toxicol In Vitro**, v. 28, n. 6, p. 1117-25, 2014.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264–271, 2005.
- ÇELİK, A.; EKINCI, S. Y.; GÜLER, G.; YILDIRIM, S. In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test and comet assay. **DNA Cell Biol.**, v. 33, n. 3, p. 148-54, 2014.
- CESARATTO, L.; VASCOTTO, C.; CALLIGARIS, S.; TELL, G. The importance of redox state in liver damage. **Annals of Hepatology**, v. 3, n. 3, p. 86-92, 2004.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>, 2013.
- CHAUHAN, L. K. S.; SUNDARARAMAN, V. Effects of substituted ureas on plant cells. I. Cytological effects of isopruturon on the root meristem cells of *A. cepa*. **Cytologia**, v. 55, p. 91–98, 1990.
- CHAUHAN, L.; SAXENA, P.; GUPTA, S. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environ. Exp. Bot.**, v. 42, p. 181–189, 1999.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.
- CHU, C. H.; BJELDANES, L. F. Effect of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro. **J Food Sci**, v. 47, p. 79–80, 1981.
- COLLINS, K. E.; CRONIN, A. A.; RUEEDI, J.; PEDLEY, S.; JOYCE, E.; HUMBLE, P. J.; TELLAM, J. H. Fate and transport of bacteriophage in UK aquifers as surrogates for pathogenic viroses. **Eng. Geol.**, v. 85, p. 33–38, 2005.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 335, de 03 de abril de 2003. Dispõe sobre o licenciamento ambiental de cemitérios. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=359>.
- DE FRIES, R.; MISTUHASHI, M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of Alamar Blue assay to 3H-thymidine incorporation assay. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 9, p. 89 95, 1995.
- DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biol Toxicol.**, v. 25, p. 5–32, 2009.
- DURIE, B. G. M.; SALMON, S. E.; RUSSELL, D. H. Polyamines as markers of response and disease activity in cancer chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 37, p. 214–222, 1977.
- EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environ Mol Mutagen.**, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem.* **Biophys.**, V. 82, p. 70–77, 1959.
- EVANS, P. T.; MALMBERG, R. L. Do polyamines have roles in plant development? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, v. 40, p. 235–269, 1989.

- FAGUNDES, P. R. Legislação Previdenciária. [Teresina]: Curso Professor Paulo Roberto Fagundes, 2004.
- FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The Comet assay: A comprehensive review. **Mutation Res.**, v. 339, p. 37–59, 1995.
- FEITOSA, F. A. C.; FILHO, J. M. Hidrogeologia conceitos e aplicações. **CPRM, LABHID, UFPE**. Fortaleza, 412p, 1997.
- FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65–75, 2003.
- FENECH, M.; MORLEY, A. A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios**, v. 43, p. 233–246, 1985.
- FENECH, M.; The advantage and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v.392, p.11-18, 1997.
- FENECH, M.; The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.
- 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. **Mutat Res.**, n. 504, n. 1-2, p. 131-6.
- 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. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 88, 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. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 72, p. 1680–1686, 2009.
- FIELDS, R. D.; LANCASTER, M. V. Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. **Am Biotechnol Lab**, v. 11, p. 48–50, 1993.
- 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, Trabalho de dissertação, 2008.
- FISKESJÖ, G. Technical methods section. Allium test I: a 2-3 Day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v. 8, p. 461–470, 1993a.
- FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **HEREDITAS**, v. 102, p. 99–112, 1985.
- FISKESJÖ, G. The Allium cepa in wastewater monitoring. **Environ. Toxicol. Water**, v. 8, p. 291–298, 1993b.
- FUSI, E.; BALDI, A.; CHELI, F.; REBUCCI, R.; AYUSO, E.; SEJRSEN, K.; PURUP, S. Effects of putrescine, cadaverine, spermine, spermidine and β -phenylethylamine on cultured bovine mammary epithelial cells. **Ital.J.Anim.Sci.**, v. 7, p. 131-140, 2008.
- FUSI, E.; ROSSI, L.; REBUCCI, R.; CHELI, F.; DI GIANCAMILLO, A.; DOMENEGHINI, C.; PINOTTI, L.; DELL'ORTO, V.; BALDI, A. Administration of biogenic amines to saanen

kids: effects on growth performance, meat quality and gut histology. **Small Ruminant Res.**, v. 53, p. 1-7, 2004.

GAJSKI, G.; GERIĆ, M.; ŽEGURA, B.; NOVAK, M.; NUNIĆ, J.; BAJREKTAREVIĆ, D.; GARAJ-VRHOVAC, V.; FILIPIĆ M. Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in human and zebrafish cells. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 23, n. 15, p. 14739-50, 2016.

GALSTON, A. W.; KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines in plant physiology. **Plant Physiol**, v. 94, p. 406–410, 1990.

GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L. JR. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nat Rev Cancer.**, v. 4, n. 10, p. 781-92, 2004.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GOLLAPUDI, B. B.; MCFADDEN, L. G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 347, p. 97–99, 1995.

GÖMÜRGEN, A. N.; MUTLU, F. S. Bozcuk, 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.

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.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, V. 177, p. 751–766, 1949.

GRANT, W. F. Chromosomal aberration assays in *Allium*. A report of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutat. Res.**, v. 99, p. 273–291, 1985.

GRANT, W. F. Chromosome aberrations in plant as monitoring system. **Environ. Health Perspect.**, v. 27, p. 37–43, 1978.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutat. Res.**, v. 624, p. 107–112, 1999.

GRANT, W. F.; Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency. Gene-Tox program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 110-8, 2004.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases – the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem.**, v. 249, n. 22, p. 7130-9, 1974.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

- HANEBURGER, I.; FRITZ, G.; JURKSCHAT, N.; TETSCH, L.; EICHINGER, A.; SKERRA, A.; GERLAN, U.; JUNG, K. Deactivation of the *E. coli* pH stress sensor CadC by cadaverine. **J. Mol. Biol.**, v. 424, p. 15–27, 2012.
- HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H. J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 843–858, 2001.
- HAWEL, L. III, TJANDRAWINATA, R.R., FUKUMOTO, G.H.; BYUS C.V. Biosynthesis and selective export of 1,5-diaminopentane (cadaverine) in mycoplasma-free cultured mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 7412-7418, 1994.
- HEATHER, M.; WALLACE, A.; FRASER, V. HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochem. J.**, v. 376, p. 1–14, 2003.
- HEDDLE, J. A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J. T. E.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v. 123, p. 61–118, 1983.
- HERRERO, O.; PÉREZ MARTÍN, J. M.; FERNÁNDEZ FREIRE, P.; CARVAJAL LÓPEZ, L.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M. J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 743, p. 20–24, 2012.
- HOBBS, C. A.; RECIO, L.; STREICKER, M.; BOYLE, M. H.; TANAKA, J.; SHIGA, A.; WITT, K. L. Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.**, v. 786-788, p. 172-81, 2015.
- HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluente. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 2090–2095, 2009.
- HUI, J. Y.; TAYLOR, S. L. Inhibition of in vivo histamine metabolism in rats by foodborne and pharmacologic inhibitors of diamine oxidase, histamine N-methyltransferase, and monoamine oxidase. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 81, p. 241–249, 1985.
- HUSSAIN, S. S.; ALI, M.; AHMAD, M.; SIDDIQUE, K. H. M. Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 300–311, 2011.
- HYUN-SU, K.; KANGJOO, K. Microbial and chemical contamination of groundwater around livestock mortality burial sites in Korea – a review. **Geosci. J.**, v. 16, p. 479–489, 2012.
- JANCEWICZ, A. L.; GIBBS, N. M.; MASSON, P. H. Cadaverine’s Functional Role in Plant Development and Environmental Response. **Front Plant Sci.**, v. 7, p. 870, 2016.
- KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v. 90, p. 219-230, 2005.
- KARPAS, Z.; LITVIN, O.; COHEN, G.; MISHIN, J.; ATWEH, E.; BURLAKOV, A. The reduced mobility of the biogenic amines: trimethylamine, putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. **Int. J. Ion Mobil. Spec.**, v.14, p. 3–6, 2011.
- KHUHAWAR, M. Y.; QURESHI, G. A. Review: polyamines as cancer markers: applicable separation methods. **J Chromatogr B**, v. 764, p. 385–407, 2001.

- KIRSCH-VOLDERS, M.; The CB in vitro micronucleus assay in human lymphocytes. **Mutation Research**, v.392, p.1-2, 1997.
- KNASMULLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B.J. 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.
- KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutat. Res.**, v. 402, p. 185–202, 1998.
- KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 155–166, 2000.
- KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWIŃSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 211–221, 2006.
- LEITE, E. B. Análise físico-química e bacteriológica da água de poços localizados próximo ao cemitério da comunidade de Santana, ilha de maré, Salvador-BA. **Candombá – Revista Virtual**, v. 5, n. 2, p. 132-148, 2009.
- LELI, I.T.; ZAPAROLI, F.C.M.; SANTOS, V.C.; OLIVEIRA, M.; REIS, F.A.G.V. Estudos ambientais para cemitérios: indicadores, áreas de influência e impactos ambientais. **Bol. Geogr.**, v. 30, n. 1, p. 45-54, 2012.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutat. Res.**, v. 650, p. 80–86, 2008.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutat Res.**, v. 682, p.71–81.
- LEVAN, A. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, 471–486, 1938.
- LEWINSKA, A.; LEWINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Total antioxidant capacity of cell culture media. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 781-786, 2007.
- LIMAN, R.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and *Allium* test. **Chemosphere**, v. 80, p. 1056–1061, 2010.
- LIU, T.; DOBASHI, H.; KIM, D. W.; SAGOR, G. H. M.; NIITSU, M.; BERBERICH, T.; KUSANO, T. *Arabidopsis* mutant plants with diverse defects in polyamine metabolism show unequal sensitivity to exogenous cadaverine probably based on their spermine content. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v. 20, p. 151–159, 2014.
- LOZANO, J. G.; DALLA COSTA, C. A. M.; LABADESSA, A. S. As consequências sanitárias ocorridas pela contaminação do lençol freático por necrochorume: um estudo de caso no cemitério São Sebastião em Ariquemes-RO. **Revista Fiar: Revista do Núcleo de Pesquisa e Extensão**, v. 1 n. 1, p. 17-39, 2012.

- MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, H.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185–195, 1995.
- 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 Res Protoc**, n. 5, p. 266–72, 2000.
- MAISTRO, E. L. The in vivo rodent micronucleus test. L.M. Sierra, I. Gaivão (Eds.), *Genotoxicity and DNA Repair: a Practical Approach*, Methods in Pharmacology and Toxicology, **Springer Science+Business Media**, New York, p. 103–113, 2014.
- MANZANO, B. C.; ROBERTO, M. M.; HOSHINA, M. M.; MENEGÁRIO, A. A.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 22, n. 2, p. 1399–407, 2015.
- MAPANI, B. S.; SCHREIBER, U. Management of city aquifers from anthropogenic activities: example of the Windhoek aquifer, Namibia. **Phys. Chem. Earth**, v. 33, p. 674–686, 2008.
- MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of malei hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environ. Res.**, v. 94, p. 221–226, 2004.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, p. 469–474, 1974.
- MARNETT, L. J. Lipid peroxidation — DNA damage by malondialdehyde. **Mut. Res.-Fund. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 424, p. 83–95, 1999.
- MATOS, B. A. Avaliação da ocorrência e do transporte de microorganismo no aquífero freático do Cemitério Vila Nova Cachoeirinha, Município de São Paulo. 2001. 114 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- MATSUMOTO, S. T. Study on the Influence of Potentially Genotoxic Tannery Effluents on the Contamination of Water Resources in the Region of Franca-SP, Ph.D. Thesis. State University of São Paulo/São José do Rio Preto – SP, p. 216 (in Portuguese), 2004.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. 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, p. 148–158, 2006.
- MATSUMOTO, S. T.; RIGONATO, J.; MANTOVANI, S. M.; MARIN-MORALES, M. M. Evaluation of the genotoxic potential due to the action of an effluent contaminated with Chromium, by the Comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, v. 58, n. 1, 2005.
- MATTARAI, V. G. M.; MOURA, A. S. A. M. T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 42, n. 8, p. 1490–1496, 2012.
- MAVOURNIN, K. H.; BLAKEY, D. H.; CIMINO, M. C.; SALAMONE, M. F.; HEDDLE, J. A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. **A**

- report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat Res.**, v. 239, n. 1, p. 29-80, 1990.
- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecol Indic.**, v. 56, p. 60–69, 2015.
- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, p. 13–18, 2011.
- 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.; MATSUMOTO, S. T.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS, D. de F.; MARIN-MORALES, M. A. Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1030-6, 2013.
- MC CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 60409–60455, 1969.
- McKELVEY-MARTIN, V. J.; GREEN, M. H. L.; SCHMEZER, P.; POOL-ZABEL, B. L., DE MÉO, M. P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. **Mutation Res.**, v. 288, p. 47–63, 1993.
- MOINARDA, C.; CYNOBERA, L.; DE BANDTA, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clin Nutr.**, v. 24, p. 184–197, 2005.
- MORAIS, J. L.; SIRTORI, C.; ZAMORA, P. G. P. Tratamento de chorume de aterro sanitário por fotocatalise heterogênea integrada a processo biológico convencional. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, 2006.
- MORALES, M. M. Métodos alternativos a utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.
- NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the alamar blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **J. Immunol. Methods**, v. 204, p. 205–208, 1997.
- NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **J. Immunol. Methods**, v. 204, p. 205-208, 1997.
- NEBELIN, E.; PILLAI, S.; LUND, E.; THOMSEN, J. On the formation of N-nitrosopyrrolidine from potential precursors and nitrite. **IARC Sci Publ**, v. 31, p. 183–193, 1980.
- NERSESYAN, A.; FENECH, M.; BOLOGNESI, C.; MIŠÍK, M.; SETAYESH, T.; WULTSCH, G.; BONASSI, S.; THOMAS, P.; KNASMÜLLER, S. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by *in vivo* exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. **Mutation Research**, 2016.
- NUNES, E. A.; LEMOS, C. T.; GAVRONSKI, L.; MOREIRA, T. N.; OLIVEIRA, N. C. D.; SILVA, J. Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, v. 84, p. 47–53, 2011.

- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**, v. 267, p. 5421–6, 2000.
- OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v. 1, p. 23 – 29, 2006.
- OLIVE, P. L.; BANITH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the "Comet" assay. **Radiat. Res.**, v. 122, p. 86-94, 1990.
- OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANFITH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. **Exptl. Cell Res.**, v. 198, p. 259-260, 1992.
- OLIVEIRA, B.; QUINTEIRO, P.; CAETANO, C.; NADAIS, H.; ARROJA, L.; SILVA, E. F.; MATIAS, M. S. Burial grounds' impact on groundwater and public health: an overview. **Water Environ. J.**, v. 27, p. 99–106, 2013.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 123, p. 291–298, 1984.
- PACHECO, A. Os cemitérios e o ambiente. São Paulo: [s.n.], 2006.
- PAGÉ, B.; PAGÉ, M.; NOËL, C. A new fluorimetric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. **Int. J. Oncol.**, v. 3, p. 473-476, 1993.
- PAIXÃO, R. L. Experimentação animal: razões e emoções para uma ética (tese). Rio de Janeiro, Fiocruz, 2001.
- PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M.; DOS SANTOS, G. L.; DAVIDE, L. C. Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 9, n. 133, p. 442-447, 2016.
- PATEL, S.; BAJPAYEE, M.; PANDEY, A. K.; PARMAR, D.; DHAWAN, A. *In vitro* induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. **Toxicol In Vitro**, v. 21, n. 8, p. 409–1418, 2007.
- PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I.; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D.; Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research**, v.490, p.209–214, 2001.
- PERROT, S.; DUTERTRE-CATELLA, H.; MARTIN, C.; WARNET, J.; RAT, P. 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.
- PFUHLER, S.; FELLOWS, M.; VAN BENTHEM J.; CORVI, R.; CURREN, R.; DEARFIELD, K.; FOWLER, P.; FRÖTSCHL, R.; ELHAJOUJI, A., LE HÉGARAT, L.; KASAMATSU, T.; KOJIMA, H.; OUÉDRAOGO, G.; SCOTT, A.; SPEIT, G. *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: summary of an IWGT workshop. **Mutat Res**, v. 723, n. 2, p. 101–107, 2011.
- POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling, **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1163–1182, 2004.

RANK, J.; LOPEZ, L. C.; NIELSEN, M. H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acedine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v. 36, p. 13–18, 2002.

RANK, J.; NIELSEN, M. Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutat. Res.**, v. 312, p. 17–24, 1994.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as tool in screening of the genotoxicity of complex mixture. **Hereditas**, v. 118, p. 49–53, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutat. Res.**, v. 390, p. 121–127, 1997.

RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM, Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, v. 428, p. 493–521, 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RIBEIRO, J. C.; ANDRADE, S. F.; BASTOS, J. K.; MAISTRO, E. L. Avaliação do potencial genotóxico da fração clorofórmica de cascas do caule de *Austroplenckia populnea* em células de roedores *in vivo*. **Braz. J. Biol.**, v. 69, n. 4, p. 1141–1147, 2009.

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

RIBEIRO, S. M. L.; CAMPOS, P.; TIRAPEGUI, J. O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. **Rev Farm Bioquím Univ São Paulo**, v. 31, n. 1, p. 21–8, 1995.

RODRIGUES, J. A.; TRAJANO, A. S. A.; NAVAL, L. P.; SILVA, G. G.; QUEIROZ, S. C. B. Avaliação preliminar do comportamento do aquífero freático no cemitério São Miguel do Município de Palmas. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Santa Catarina, 2003.

RODRIGUES, L.; PACHECO, A. Groundwater contamination from cemeteries cases of study. **Proceedings of Environmental 2010: Situation and Perspectives for the European Union**; Porto, Portugal., 2003.

RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FERREIRA, R. A.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438–42, 2015.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. 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.

ROTHFUSS, A.; O'DONOVAN, M.; BOECK, M.; BRAULT, D.; CZICH, A.; CUSTER, L. HAMADA, S.; PLAPPERT- HELBIG, U.; HAYASHI, M.; HOWE, J.; KRAYNAK, A. R.; VAN DER LEEDE, B. J.; NAKAJIMA, M.; PRIESTLEY, C.; THYBAUD, V.; SAIGO, K.; SAWANT, S.; SHI, J.; STORER, R.; STRUWE, M.; VOCK, E.; GALLOWAY, S. Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies. **Mutat. Res.**, v. 702, p. 40–69, 2010.

- RUSSEL, P. J. Chromosomal mutation. B. Cummings (Ed.), Genetics, Pearson Education Inc., San Francisco, p. 595–621, 2002.
- RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principle of humane experimental technique. Londres: Ufaw, 1992.
- SALÉN, J. C. W. Animal models: principles and problems. In: Rollin BE, Kessel ML. The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species. 3rd.ed. Boston: CRC Press, 560p, 1995.
- SASAKI, Y. F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 30, p. 629–799, 2000.
- SAUNDERS, W. S.; SHUSTER, M.; HUANG, A.; GHARAIBEH, B.; ENYENIHI, A. H.; PETERSEN, I.; GOLLIN, S. M. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. **Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 303–308, 2000.
- SCHIPPER, R. G.; ROMIJN, J. C.; CUIJPERS, V. M.; VERHOFSTAD, A. A. Polyamines and prostatic cancer. **Biochem Soc Trans**, v. 31, p. 375–380, 2003.
- SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLANDER, A. Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection. New York: Plenum Press, p. 31-53, 1975.
- SEVERINO, G.S. FOSSATI, I. A.; PADOIN, M. J.; GOMES, C. M.; TREVIZAN, L.; SANVITTO, G. L.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; LUCION, A. B. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases in females. **Physiology and Behavior**, v. 81, n. 3, p. 489-498, 2004.
- SHAH, M. D.; IQBAL, M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 48, n. 12, p. 3345-53, 2010.
- SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-36, 2004.
- SHAMINA, N. V.; SILKOVA, O. G.; SERIUKOVA, E. G. Monopolar spindles in meiosis of intergeneric cereal hybrids. **Cell Biol. Int.**, v. 27, p. 657–664, 2003.
- SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **J. Cell Biol.**, v. 140, p. 1307–1320, 1998.
- SHIMIZU, N.; SHIMUARA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutat. Res.**, v. 448, p. 81–90, 2000.
- SILVA, C. de O.; RODRIGUES, L. B. de O.; OLIVEIRA, R. S. Impactos ambientais causados pelo necrochorume do cemitério municipal da cidade de São José da Laje/AL. **Revista Científica do IFAL**, v. 3, n. 2, 2012.
- SILVA, R. W. da C.; MALAGUTTI FILHO, W. Cemitérios: fontes potenciais de contaminação. **Ciência Hoje**, v. 44, n. 263, p. 24-29, 2009.
- SINZELLE, L.; THURET, R.; HWANG, H. Y.; HERSZBERG, B.; PAILLARD, E.; BRONCHAIN, O. J.; STEMPEL, D. L.; DHORNE-POLLET, S.; POLLET, N.

- Characterization of a novel *Xenopus tropicalis* cell line as a model for in vitro studies. **Genesis.**, v. 50, n. 3, p. 316-24, 2012.
- SLOCUM, R. D.; FLORES, H. E. Biochemistry and physiology of polyamines in plants. **CRC Press**, Boca Raton, 1991.
- SNITKOFF, G. G. Testes biológicos. In: Gennaro AR. Remington: a ciência e a prática da farmácia. 20.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.556-68, 2004.
- SOHAL, R. S.; MOCKETT, R. J.; ORR, W. C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p. 575–586, 2002.
- 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.
- 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.
- STROHM, A. K.; VAUGHN, L. M.; MASSON, P. H. Natural variation in the expression of ORGANIC CATION TRANSPORTER 1 affects root length responses to cadaverine in *Arabidopsis*. **J. Exp. Bot.**, v. 66, p. 853–862, 2015.
- TABOR, C. W.; ROSENTHAL, S. M. Pharmacology of spermine and spermidine. Some effects on animals and bacteria. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 116, p. 139-155, 1956.
- TAKAHASHI, C.S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. In: Mutagênese Ambiental, Canoas: Ulbra, p. 151-172, 2003.
- TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in vitro and in vivo assays. **Gen. Mol. Biol.**, v. 26, p. 551–555, 2003.
- TETI, D.; VISALLI, M.; MCNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)-physiological conditions. **J. Chromatogr. B**, v. 781, p. 107–149, 2002.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, p. 206–221, 2000.
- TIL, H. P.; FALKE, H. E.; PRINSEN, M. K.; WILLEMS, M. I. Acute and Subacute Toxicity of Tyramine, Spermidine, Spermine, Putrescine and Cadaverine in Rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 337-348, 1997.
- TSANGARIS, C.; VERGOLYAS, M.; FOUNTOULAKI, E.; GONCHARUK, V. V. Genotoxicity and oxidativ estress biomarkers in *Carassius gibelio* as endpoints for toxicity testing of Ukrainian polluted river waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2240–2244, 2011.
- TUCKER, J.D.; PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. **Mutat. Res.**, v. 365, p. 147-159, 1996.
- TÜRKOĞLU, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Muta.**, v. 626, p. 4–14, 2007.
- 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.

- UMEGAKI, K.; FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. **Mutagenesis**, v. 15, n. 3, p. 261–269, 2000.
- VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178–189, 2006.
- VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem**, v. 266, p. 37–56, 2004.
- VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.
- 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.
- VAN HUMMELEN, P.; KIRSCH-VOLDERS, M. An improved method for the in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes. **Mutation Res.**, v. 147, p. 29–36, 1990.
- VASQUEZ, M. Z. Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. **Mutat Res**, v. 747, p. 142–156, 2012.
- VAUGHAN, V. C.; NOVY, F. G. Cellular toxins or the chemical factors in the causation of disease. **LEA BROTHERS & COMPANY PHILADELPHIA**, 4^o Ed., New York, 1902.
- VENTURA-CAMARGO, B. de C.; DE ANGELIS D. de F.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-32, 2016.
- VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environ. Contam. Toxicol.**, v. 43, p. 284–291, 2002.
- VOYTIK-Harbin, S. L.; BRIGHTMAN, A. O.; WAISNER, B.; LAMAR, C. H.; BADYLAK, S. F. Application and evaluation of the Alamar Blue assay for cell growth and survival of fibroblasts. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 34, p. 239–246, 1998.
- WHITE, M. J.; DICAPRIO, M. J.; GREENBERG, D. A. Assessment of neuronal viability with Alamar Blue in cortical and granule cell cultures. **J. Neurosci. Methods**, v. 70, p. 195–200, 1996.
- WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquat. Toxicol.**, v. 19, p. 137–161, 1991.
- ŽELJEŽIĆ, D.; MLADINIĆ, M.; ŽUNEC, S.; LUCIĆ VRDOLJAK, A.; KAŠUBA, V.; TARIBA, B.; ŽIVKOVIĆ, T.; MARJANOVIĆ, A. M.; PAVIČIĆ, I.; MILIĆ, M.; ROZGAJ, R.; KOPJAR, N. Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocytes and an HepG2 cell line. **Food Chem Toxicol.**, 2016.
- 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.

ZUCCO, F.; DE ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in vitro**, v. 18, p. 153-163, 2004.

ZUME, J. T. Assessing the potential risks of burial practices on groundwater quality in rural north-central Nigeria. **J Water Health**, v. 9, n. 3, p. 609-16, 2011.

ŻYCHOWSKI, J.; BRYNDAL, T. Impact of cemeteries on groundwater contamination by bacteria and viruses – a review. **J. Water Health**, v. 13, p. 285–301, 2015.