



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO DA EXPOSIÇÃO
ATMOSFÉRICA AO PÓ DE CROMO TRIVALENTE EM *Rattus norvegicus***

JUSTIJANIO CACIO LEAL TEIXEIRA

FORTALEZA-CE

2021

JUSTIJANIO CACIO LEAL TEIXEIRA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENICO DA EXPOSIÇÃO
ATMOSFÉRICA AO PÓ DE CROMO TRIVALENTE EM *Rattus norvegicus*

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC.

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Helena Serra Azul Monteiro

FORTALEZA-CE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T266i Teixeira, Justijânio Cácio Leal.

Investigação do potencial carcinogênico da exposição atmosférica ao pó de cromo trivalente em *rattus norvegicus* / Justijânio Cácio Leal Teixeira. – 2021.
98 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro .

1. Neoplasias. 2. Riscos Ocupacionais. 3. Cromo. I. Título.

CDD 615.1

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À Prof.^a Dra. Helena Serra Azul Monteiro, que acreditou na viabilidade do meu projeto de pesquisa. Agradeço a oportunidade de tê-la como minha orientadora de doutorado. Tenho muito orgulho de citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional. Obrigado pelos conhecimentos repassados!

Agradeço ao Laboratório de Biologia Molecular e de Estudo de Injúrias Biológicas (LABMINBIO) da Faculdade de Ciências Médicas (FACIME/UESPI), na pessoa do Prof. Dr. Fabrício Pires de Moura do Amaral, por gentilmente me ceder o espaço, acolher o meu projeto de pesquisa e oferecer as condições acadêmicas para o seu desenvolvimento. Obrigado!

Não posso deixar de agradecer também à Dra. Tatiana de Souza Vieira Chaves, pela oportunidade concedida. Tenho muito respeito e admiração pela sua ética, seu conhecimento, pela maneira simples e humilde com que a senhora se relaciona com as pessoas. À senhora, minha eterna gratidão!

A minha querida esposa, Samira, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Obrigado pelo amor, companheirismo, compreensão, incentivo e força. Obrigado por ter sido presente em nosso lar, cuidando dos nossos filhos, no momento em que eu estive ausente.

Aos meus filhos Cácio Filho e Artur, razão da minha existência, crianças que transbordam amor, luz e alegria. Vocês me inspiram a querer ser mais do que fui até hoje.

Aos meus pais, Justiniano e Avani, meu eterno agradecimento pelo amor, incentivo e apoio incondicionais. Obrigado por todo o carinho, pela preocupação constante e, principalmente, por terem me ensinado a ser uma pessoa melhor a cada dia. É um grande orgulho tê-los como meus pais!

Aos meus irmãos, que sempre torceram pela minha vitória e por me fazerem acreditar que esse sonho poderia ser concretizado.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem gentilmente a participação e pelas valiosas contribuições científicas.

Aos professores, pela experiência compartilhada, pelos ensinamentos transmitidos, pelo constante incentivo, e pelo exemplo de profissionais a serem seguidos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e ao CAPES pelo incentivo no desenvolvimento da pesquisa. Obrigado a todos!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O surgimento do Câncer.....	12
Figura 2: Capacidades adquiridas pelas células tumorais.....	13
Figura 3: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*.....	15
Figura 4: Formação de radicais Livres	25
Figura 5: Estresse oxidativo no organismo.....	27
Figura 6: Estresse oxidativo, inflamação e envelhecimento.....	29
Figura 7: Mecanismo do sistema antioxidante.....	32
Figura 8: Presença de uma lesão no DNA, que pode levar ao bloqueio da replicação, é reconhecida por várias proteínas.....	35
Figura 9: Esquematização do teste cometa.....	37
Figura 10: Esquematização do teste de MN.....	39
Figura 11: Cores e detalhes celulares em corte histológico corado com hematoxilina-eosina (H&E).....	41
Figura 12. Esquema estrutural do delineamento experimental.....	46
Figura 13. Alterações histopatológicas em fígado, rins e pulmão dos animais.....	60
Figura 14. Perfil do nível e frequência de danos ao DNA de células da medula óssea de ratos expostos ao cromo (III) 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e ao ar filtrado (HEPA).....	67

Figura 15. Perfil mutagênico em células da medula óssea de ratos expostos ao cromo (III) 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e ao ar filtrado (HEPA).....	70
Figura 16. Percentual de apoptose e necrose em células de medula óssea de ratos expostos ao cromo (III) 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e ao ar filtrado (HEPA).....	72
Figura 17. Possíveis mecanismos de instabilidade genômica e carcinogenicidade induzida pelo cromo (III) em microambiente tecidual.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EROs -Espécies Reativas de Oxigênio

SOD-superóxido dismutase

CAT- Catalase

GPx- glutationa peroxidase

MN- micronúcleos

H&E- hematoxilina e eosina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil comportamental e atividade locomotora dos animais.....	51
Tabela 2. Perfil bioquímico e hematológico dos animais.....	56
Tabela 3. Perfil do peso absoluto de órgãos dos animais.....	58
Tabela 4. Níveis de catalase, superóxido dismutase e glutathione nos animais em exposição ao cromo (III) e ar filtrado (HEPA).....	62
Tabela 5. Níveis dos marcadores de peroxidação lipídica e nitrito.....	65

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	9
1.1 BIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER	9
1.3 ENVOLVIMENTO DOS METAIS NO PROCESSO DE CARCINOGENÊSE.....	14
1.4 CARACTERÍSTICAS DO CROMO	16
1.4.1 A INSTABILIDADE DO GENOMA INDUZIDA PELO CROMO	19
1.5 PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO'S) E ESTRESSE OXIDATIVO	21
1.5.1 CÂNCER E ESTRESSE OXIDATIVO	27
1.5.2 CONSEQUÊNCIAS DO ESTRESSE OXIDATIVO NA SAÚDE E NA DOENÇA	27
1.6 ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	28
1.7 TOXICIDADE E MARCADORES DE DANOS AO DNA.....	31
1.8 TESTE COMETA	33
1.9 TESTE DE MICRONÚCLEOS (MN).....	35
1.10 HISTOLOGIA E COLORAÇÃO H&E	37
1.11 ESTUDOS COMPORTAMENTAIS: CAMPO ABERTO E <i>ROTA ROD</i>	39
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	42
3.2 DELINEAMENTO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO PÓ DE CROMO (III).....	42
3.3 AMBIENTE DE EXPOSIÇÃO ATMOSFÉRICA AO PÓ DE CROMO (III).....	44
3.4 ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	44
3.4.1 TESTE DE CAMPO ABERTO.....	44
3.4.2 TESTE DE <i>ROTA ROD</i>	44
3.5 EUTANÁSIA E COLETA DOS ÓRGÃOS.....	45
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICA, HEMATOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA.....	45
3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE.....	46
3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE	46
3.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE	47
3.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA.....	47
3.11 DETERMINAÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	47
3.12 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE NITRITO	48
3.13 ENSAIO COMETA	48
3.14 TESTE DE MICRONÚCLEOS	48
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 AVALIAÇÃO LOCOMOTORA E COMPORTAMENTAL.....	50
4.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS	52
4.3 PESO DE ÓRGÃOS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	55
4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE.....	58
4.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E NÍVEIS DE NITRITO	61
4.6 INVESTIGAÇÃO DOS DANOS AO DNA	63
4.7 PERFIL DE MUTAGENICIDADE E MORTE CELULAR.....	66
REFERÊNCIAS	72

RESUMO

Investigação do potencial carcinogênico da exposição atmosférica ao pó de cromo trivalente em *rattus norvegicus*.

O cromo é um metal pesado e um contaminante ambiental bem conhecido. O cromo (III) foi inicialmente considerado um agente relativamente não tóxico. Por outro lado, evidências sugerem que este metal pode contribuir com mutações e indução de instabilidade genética, que por sua vez são fatores determinantes para os processos de carcinogênese. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar o potencial de indução de instabilidade genômica e carcinogênese a partir da exposição atmosférica ao pó de cromo (III) em *Rattus norvegicus*. Para tanto, 40 animais foram divididos em dois grupos de exposição: o grupo exposto (n=20, machos) foram expostos por 4 h ao pó de cromo (III) atmosférico na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ diariamente, durante um período total de 14 semanas; o grupo controle foi constituído de 20 animais (machos) expostos ao ar filtrado (HEPA) por igual período de exposição. Durante o período de exposição, os animais foram avaliados quanto aos parâmetros toxicológicos gerais, comportamentais e locomotores, bem como quanto ao desenvolvimento de lesões perceptíveis ou palpáveis. As análises do perfil antioxidante (catalase, superóxido dismutase e glutathione) foram realizadas ao final de cada semana de exposição. Por fim, amostras de sangue foram coletadas para processamento bioquímico e hematológico, bem como fragmentos do pulmão, fígado e rim foram coletados para análise histopatológica. Além disso, amostras de medula óssea foram colhidas para avaliação genotóxica, perfil mutagênico e morte celular. O cromo (III) 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ não produziu alterações comportamentais nos animais expostos. Por outro lado, o cromo produziu alterações histopatológicas em fígado, rins e pulmão. Também, induziu aumento de malondialdeído e nitritos, acompanhado do aumento dos níveis de catalase e superóxido dismutase. De forma contrária, houve redução proeminente dos níveis de glutathione peroxidase e redutase sérica nos animais expostos. Neste estudo, o metal também induziu alterações bioquímicas nos marcadores de função hepática e renal, mas sem alterações hematológicas. O cromo (III) produziu aumento do índice e frequência de danos ao DNA de células da medula óssea dos animais, bem como ocasionou mutagenicidade e aumento da frequência de apoptose e necrose. Este estudo demonstrou os efeitos oxidativos, genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos da exposição atmosférica ao pó de cromo (III). Estes dados contribuirão com informações sobre a instabilidade genética e carcinogenicidade relacionadas aos compostos de cromo, que são relevantes para formulação de estratégias de prevenção de riscos de carcinogenicidade no contexto ocupacional.

Palavras-chave: Cromo. Câncer. Saúde do Trabalhador.

ABSTRACT

Investigation of the carcinogenic potential of atmospheric exposure to trivalent chrome powder in *rattus norvegicus*.

Chromium is a heavy metal and a well known environmental contaminant. Chromium (III) was initially considered a relatively non-toxic agent. On the other hand, evidence suggests that this metal may contribute to mutations in genetic material and induction of genetic instability, which in turn are determining factors for carcinogenesis processes. Thus, the present study aimed to evaluate the potential for induction of genomic instability and carcinogenesis from atmospheric exposure to chromium (III) dust in *Rattus norvegicus*. To this end, 40 animals were divided into two exposure groups: the exposed group (n = 20 males) were exposed for 4 h to atmospheric chromium (III) dust at a concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ daily for a total period of 14 weeks; The control group consisted of 20 animals (males) exposed to filtered air (HEPA) for an equal period of exposure. During the exposure period, the animals were evaluated for general toxicological, behavioral and locomotor parameters, as well as for the development of perceived or palpable lesions. In addition, analyzes of the antioxidant profile (catalase, superoxide dismutase and glutathione) were performed at the end of each week of exposure. Finally, blood samples were collected for biochemical and hematological processing, as well as lung, liver and kidney fragments were collected for histopathological analysis. In addition, bone marrow samples were collected for genotoxic evaluation, mutagenic profile and cell death analysis. Chromium (III) 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ produced no behavioral changes in exposed animals. On the other hand, chromium produced hitopathological changes in the liver, kidneys and lung. Also, it induced an increase ($p < 0.05$) of malondialdehyde and nitrite, accompanied by an increase ($p < 0.05$) of catalase and superoxide dismutase levels. Conversely, there was a prominent reduction in glutathione peroxidase and serum reductase levels in exposed animals. In this study, the metal also induced biochemical changes in liver and renal function markers, but without hematological changes. Also, chromium (III) produced an increase ($p < 0.05$) in the index and frequency of DNA damage to animal bone marrow cells, as well as causing ($p < 0.05$) mutagenicity and an increase ($p < 0.05$) in apoptosis and necrosis frequency. This study demonstrated the oxidative, genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of atmospheric exposure to chromium (III) dust. These data will provide information on the genetic instability and carcinogenicity related to chromium compounds, which are relevant for the formulation of occupational carcinogenesis risk prevention strategies.

Keywords: Chromium. Cancer. Occupational risk

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biologia e epidemiologia do Câncer

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer e esta taxa foi estimada para aumentar para 16 milhões até 2020. Em 2017, quase 13% de todos os cânceres diagnosticados em adultos com 20 anos ou mais eram cânceres raros, definidos neste relatório como câncer com menos de 6 casos por 100.000 pessoas por ano (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

Um tumor é um crescimento anormal de células sem finalidade funcional e com potencial de se espalhar para as células ou órgãos adjacentes ou outras partes do corpo. Nem todos os tumores são cancerosos; na verdade, os tumores benignos não se espalham para outras partes do corpo. Existem muitos tipos de câncer que afetam os humanos e as células cancerosas não apresentam sinais ou sintomas em um estágio inicial de desenvolvimento (WHANG; LEI; HAN, 2018) (**Figura 1**).

Figura 1: O surgimento do Câncer



Fonte: INCA (2019), adaptado

Os cânceres podem ser considerados como um tecido anormal que são caracterizados pelo crescimento de células desordenadas incapazes de formar estruturas funcionais estáveis, que se multiplicam e invadem o organismo. Populações de células cancerosas, ou os seus modelos de linhagens celulares, podem exibir muitas características bioquímicas e biológicas; algumas são comuns à maioria dos tipos de câncer, e algumas são específicas para tipos de

tumores distintos. O câncer leva a problemas de saúde significativos e até a morte em todo o mundo e, portanto, é uma das mais terríveis aflições do mundo (ISLAM et al., 2015). A formação do câncer requer a aquisição de uma série de alterações impulsoras principais (mutações e mudanças epigenéticas nas células cancerosas) (GRAHAM; SOTTORIVA, 2017).

A incidência de novos casos anuais de câncer está aumentando e é previsto que cresça rapidamente. O termo "epidemia de câncer" tem sido usado com frequência, não apenas pela mídia, mas também por periódicos acadêmicos e pela Organização Mundial da Saúde. O problema é particularmente alarmante em países de baixa e média renda. Para alguns países ricos, as taxas de incidência estão se estabilizando (ou diminuindo ligeiramente), porém em níveis muito altos (LUZZATI; PARENTI; RUGHI, 2018).

Hanahan e Weinberg (2011) descreveram as capacidades adquiridas pelas células tumorais durante a carcinogênese que são: sustentação da sinalização proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, fuga da destruição imune, permitem a imortalidade replicativa, promovem a inflamação, ativação da invasão e metástase, induzem a angiogênese, instabilidade genômica e mutação, resistência a morte celular (Figura 2).

Figura 2: Capacidades adquiridas pelas células tumorais.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011)

A formação de uma neoplasia é um processo de várias etapas. Basicamente, este processo envolve a modificação genética do DNA genômico (formação de uma célula mutada) seguida do crescimento seletivo da célula mutada. Este crescimento pode ser estimulado por

um aumento na taxa de divisão celular da célula mutada e / ou uma diminuição na taxa de mortalidade (apoptose) da célula mutada. À medida que a célula mutada se divide ainda mais, mudanças epigenéticas e genéticas adicionais ocorrem na lesão recém-formada (TANAKA et al., 2013).

Os fatores carcinogênicos responsáveis pelo desenvolvimento do câncer são classificados como exógenos ou endógenos. Os fatores exógenos incluem agentes associados à preservação e preparação de alimentos, status socioeconômico, estilo de vida, radiação ionizante e não ionizante, compostos químicos naturais e sintéticos e xenobióticos. incluindo a *Helicobacter pylori*, o vírus de *Epstein-Barr*, papiloma vírus humano, vírus da hepatite B e hepatite C e determinados parasitas, o consumo de álcool, tabaco, ingestão de certos alimentos contaminados com micotoxinas são igualmente responsáveis por causar certos tipos de neoplasias (TANAKA; ISHIKAWA, 2013).

O câncer ocorre por uma série de mutações sucessivas nos genes, de modo que essas mutações alteram as funções celulares. Os compostos químicos têm um papel óbvio na formação de mutações genéticas e células cancerosas. Além disso, o tabagismo envolve vários compostos químicos cancerígenos que levam ao câncer de pulmão (MESSINA et al., 1994; WAGNER et al., 2006).

Curiosamente, substâncias químicas ambientais com propriedades carcinogênicas influenciam direta ou indiretamente o citoplasma e o núcleo das células, e levam a distúrbios genéticos e mutações genéticas (DE HOLANDA MARQUES et al., 2012; MIGLIORATI et al., 2013).

Vírus, bactérias e raios de radiação são outros fatores de carcinogênese, compreendendo cerca de 7% de todos os cânceres. Em geral, o câncer perturba as relações celulares e resulta na disfunção de genes vitais. Esse distúrbio afeta o ciclo celular e leva à proliferação anormal.

Os proto-oncogenes são responsáveis pela divisão e crescimento celular em condições normais, mas tornam-se oncogenes durante a mutação genética, que são os mais perigosos para a existência celular. Além disso, a falta de genes supressores de tumor desencadeia a divisão celular descontrolada. Normalmente, os genes de reparo se traduzem em proteínas e enzimas que possuem propriedades de reparo e mais de 30 tipos de proteínas de reparo detectadas (LORIA; BARRIOS; ZANETTI, 2009).

A remoção da uracila do DNA contorna o dano ao DNA e remove as principais lesões do DNA induzidas pela luz ultravioleta, que são essencialmente as funções dos genes de reparo para reparar o DNA com sucesso (LORIA; BARRIOS; ZANETTI, 2009; MOURA et al., 2014; SENA et al., 2016)

Os fatores carcinogênicos endógenos incluem condições e agentes que causam disfunção do sistema imunológico e subsequente inflamação, como a colite ulcerativa. Estudos epidemiológicos sugerem que o risco de desenvolver câncer varia entre diferentes grupos populacionais e essas diferenças estão associadas a diferenças genéticas e a fatores e hábitos relacionados ao estilo de vida. De fato, a migração de certas populações para novas regiões com diferentes estilos de vida pode resultar no desenvolvimento de novos tipos de câncer não prevalentes naquele grupo (OHSHIMA; TATEMACHI; SAWA, 2003; TIMOFTE, 2017).

Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2020).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (2020) é estimado para o Brasil no triênio 2020-2022, os tipos de câncer mais frequentes em homens, à exceção do câncer de pele não melanoma, serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres, exceto o câncer de pele não melanoma, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) figurarão entre os principais. O câncer de pele não melanoma representará 27,1% de todos os casos de câncer em homens e 29,5% em mulheres (**Figura 3**).

Figura 3: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%	Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%	Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%	Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%	Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%	Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%	Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2020.

Todos os registros de câncer mostram diferenças marcantes na incidência como, por exemplo, a idade e tecidos (LÓPEZ-LÁZARO, 2018). Ao mesmo tempo, já é bem conhecido

que essa é uma patologia relacionada à idade que se desenvolve no limite da proliferação da senescência celular (ERENPREISA; CRAGG, 2007).

1.2 Parâmetros bioquímicos

As dosagens bioquímicas se preocupam com os efeitos das drogas nas vias bioquímicas subjacentes aos processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos e aos processos terapêuticos e toxicológicos subsequentes (HARIKRISHNAN; RANI; BALASUNDARAM, 2003; REID et al., 2004; AL-BULUSHI; SHAWAF; AL-HASANI, 2017).

Substâncias de pequenas moléculas e tóxicos comumente interagem com mais de uma única proteína alvo, cada uma das quais pode ter efeitos únicos no fenótipo celular. Embora a metabolômica não direcionada seja frequentemente aplicada para entender o modo de ação desses produtos químicos, as comparações simples de pares de amostras tratadas e não tratadas são insuficientes para resolver os efeitos da interrupção de dois ou mais alvos protéicos independentes (PRAKASH; DHINGRA; PRIYA, 2012). Dessa forma o fluxo de trabalho para metabolômica de dose-resposta para avaliar produtos químicos que potencialmente afetam várias proteínas com diferentes potências (YILMAZ et al., 2012; AL-BULUSHI; SHAWAF; AL-HASANI, 2017).

Parâmetros hematológicos, incluindo contagens de glóbulos vermelhos e brancos e concentração de hemoglobina, são indicadores clínicos amplamente usados de saúde e doença. Essas características são rigidamente reguladas em indivíduos saudáveis e estão sob controle genético. Mutações em genes-chave que afetam parâmetros hematológicos têm consequências fenotípicas importantes, incluindo múltiplas variantes que afetam a suscetibilidade à doença malárica. No entanto, a maioria das variações nas características hematológicas é contínua e é presumivelmente influenciada por vários loci e variantes com pequenos efeitos fenotípicos (AL-BULUSHI; SHAWAF; AL-HASANI, 2017; WOO et al., 2018)

Parâmetros hematológicos como contagens de glóbulos vermelhos (RBC) e leucócitos (WBC) e concentração de hemoglobina (Hb) são características rigidamente reguladas com alta relevância clínica. Valores fora dos intervalos normais são diagnósticos para distúrbios, incluindo câncer, doenças imunológicas e doenças cardiovasculares. Em humanos, os parâmetros hematológicos têm herdabilidades > 50% (HARIKRISHNAN; RANI; BALASUNDARAM, 2003; ANĐELKOVIĆ et al., 2015).

1.3 Envolvimento dos metais no processo de carcinogênese

A carcinogênese induzida por metais causada por exposição ambiental e/ou ocupacional a metais pesados está rapidamente se tornando um problema de saúde global devido ao seu uso crescente em aplicações industriais, agrícolas e farmacêuticas (ZHU; COSTA, 2020). Ao contrário dos contaminantes orgânicos, os metais não podem ser decompostos por microorganismos e tendem a bioacumular em organismos vivos; esta exposição crônica, por sua vez, foi associada a várias doenças malignas em humanos (YANG, 2011; CHEN; DESMARAIS; COSTA, 2019)

O processo de carcinogênese tem sido classicamente descrito em quatro estágios: iniciação, promoção, progressão e metástase (GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, SLASKA, 2012). A iniciação caracteriza-se como o resultado da genotoxicidade que levará ao acúmulo de mutações no DNA. A iniciação do câncer pelos metais envolve com mais frequência a produção de radicais livres que podem potencialmente lesionar o DNA. Este processo pode ocorrer por múltiplos mecanismos, como o ciclo redox, o metabolismo e a indução de genes que produzem espécies reativas (HARRIS; SHI, 2003; ARITA; COSTA, 2009; VALKO et al., 2016). Os produtos de danos oxidativos no DNA são frequentemente lesões de base única, mais notavelmente as modificações do tipo 7,8-di-hidro-8-Oxo-2'-desoxiguanosina. De todos os metais, os sais de cromato produzem a maior resposta genotóxica no menor período de tempo (KIM et al., 2018).

Os sais de cromo também exibem capacidade de formar *crosslinks* entre DNA e proteínas. O ferro, similarmente, é altamente reativo e prontamente capaz de doar ou aceitar elétrons a partir de uma variedade de fontes. É, no entanto, altamente regulado, de tal modo que é improvável que ocorram efeitos genotóxicos ou formação de adutos, excetuando-se em circunstâncias onde há sobrecarga do metal (POURAHMAD et al., 2003; JOMOVA; VALKO, 2011).

A iniciação do câncer, por outro lado, não é apenas o resultado de mutações pontuais. Pode também ser causada por rupturas da cadeia de DNA, que podem resultar em rearranjos cromossômicos, ou através de alterações na reparação do DNA que reduzem a capacidade de reparar lesões não associadas com o metal. Mudanças no controle transcricional de genes específicos, dependente de metais, também podem desempenhar importante papel na carcinogênese (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008; SI; LANG, 2018).

A expressão de genes alterada, por meio da indução de cascatas de sinais específicos é mais frequentemente associada à promoção do câncer (SEVER; BRUGGE, 2015). Os sais de

metal podem alterar a regulação de genes a partir de vários mecanismos, no entanto, mais frequentemente pela ativação de fatores de transcrição ou por mudanças nos padrões de metilação gênica. De modo semelhante, cascatas de sinais podem ser modificadas pela interação de metais com qualquer um dos passos na via, muitas vezes através da ligação direta a receptores ou proteínas intermediárias (BEYERSMANN, 1994; ADAMS et al., 2002).

A progressão tumoral é semelhante ao ponto em que há predomínio de aberrações em mecanismos de controle celular, sendo caracterizada por alterações no fenótipo celular e nos processos metabólicos (QUAIL; JOYCE, 2013). Os metais têm fortes efeitos nas células, particularmente no que se refere ao estado redox. Tanto o cromo como o arsênico têm demonstrado alterar o potencial redox em células de mamífero *in vitro* (KOEDRITH et al., 2013; KIM; KIM; SEO, 2015). Alterações desta natureza podem propiciar maior competitividade destes tipos de células em comparação com as suas contrapartes não neoplásicas, com maior potencial de crescimento (CHERVONA; ARITA; COSTA, 2012).

A fase final da tumorigênese maligna envolve a migração de células cancerosas para outras regiões do corpo. Este processo normalmente objetiva a formação de sítios secundários de colonização por células que apresentam cascatas de sinalização celular alteradas, características fenotípicas indiferenciadas e capacidade proliferativa (QUAIL; JOYCE, 2013; KIM; BAE, 2016). O cádmio, aparentemente, é o único que demonstrou afetar a matriz extracelular de células, interferindo nas caderinas, moléculas responsáveis pela adesão, impedindo a sua formação e subsequentemente permitindo que as células se desloquem para outras regiões (TOKAR; BENBRAHIM-TALLAA; WAALKES, 2011).

Em células transformadas por metal, a expressão persistente de p62 (uma molécula crucial em uma miríade de funções celulares e em eventos moleculares, que incluem estresse oxidativo, inflamação, apoptose, proliferação celular, reprogramação metabólica, que modulam a sobrevivência celular e o crescimento tumoral) e fator 2 relacionado ao eritróide 2 (Nrf2) resulta em resistência à apoptose, angiogênese, microambiente inflamatório e reprogramação metabólica, contribuindo para o mecanismo geral de carcinogênese de metal. A autofagia, um processo intracelular conservado, mantém a homeostase celular ao facilitar a renovação de agregados de proteínas, detritos celulares e organelas danificadas (ZHANG; COSTA, 2021).

Uma característica comum desses carcinógenos metálicos como o cromo, arsênio, cádmio e níquel hexavalente é que todos eles são capazes de causar várias desregulações epigenéticas, que se acredita desempenhar papéis importantes em sua carcinogenicidade. No entanto, como a desregulação epigenética causada pelo carcinógeno metálico contribui para a carcinogênese metálica permanece amplamente desconhecido (WHANG; YANG, 2019).

Cabe ressaltar que as informações toxicológicas sofrem revisões periódicas. Dentre os dados existentes sobre os metais pesados, o cromo (III) carece de novas investigações, principalmente no contexto carcinogênico. Isso se deve à existência de fortes evidências epidemiológicas que põem em dúvida sua segurança, principalmente, em ambientes de trabalho. A seguir, maiores informações serão consideradas sobre este metal.

1.4 Características do Cromo

O cromo é um metal pesado importante do ponto de vista ambiental e é comumente utilizado em várias indústrias, incluindo curtumes, têxteis, chapeamento de cromo, produção de aço e refratários (LEBEDEV; GAVRISH; GUBAYDULLINA, 2019). Os riscos devidos à contaminação ambiental por cromo dependem criticamente do seu estado de oxidação e solubilidade (AHILA ANGELIN; STEVEN JONES; SAM MANOHAR, 2015). O cromo exibe vários estados de oxidação, variando de 0 a +6, o que determina sua reatividade química e, portanto, seu significado ambiental e biológico. Conforme mencionado anteriormente, os estados de oxidação mais comuns para o cromo são +3 e +6 ou equivalentemente cromo trivalente [cromo (III)] e hexavalente [cromo (VI)] (LAL SINGH, 2019).

O cromo (III) é a forma mais estável do elemento devido à sua forte tendência a formar complexos hexacoordenados cineticamente inertes em água, amônia, ácidos orgânicos, sulfato, haletos e ureia, serve como nutriente essencial em plantas e exibe um número significativo de benefícios para a saúde humana e animal (QIANG et al., 2016). O cromo (VI), por outro lado, é ácido e é o estado do cromo mais importante do ponto de vista ambiental. Nesta forma, o cromo é altamente solúvel em água e, portanto, móvel, enquanto que a forma de cromo (III) reduzida é quase insolúvel em água e, portanto, imóvel (KAYA et al., 2016).

Pesquisas anteriores demonstraram que o cromo (VI) é estável em ambiente oxidante com pH acima de 6,0 (KAYA e al., 2016). Em condições de pH 3 a 6, os compostos de cromo (VI) tendem a reduzir para formas mais termodinamicamente estáveis, como o cromo (OH)₃ (ZHANG et al., 2019). Todos os compostos de cromo (VI) são agentes oxidantes fortes, corrosivos e considerados tóxicos e potencialmente cancerígenos (DAS; MISHRA, 2008). A ingestão de grandes quantidades de cromo (VI) pode causar danos nos rins e no fígado e o contato com a pele pode desenvolver ulcerações.

Das várias fontes de cromo no ambiente, as indústrias de curtimentos têm lugar de destaque. Um dos principais problemas emergentes da indústria de curtimento é a eliminação de lamas contaminadas com o cromo (MWINYIHIJA et al., 2006; MWINYIHIJA, 2010). Os

resíduos de curtumes contêm uma mistura complexa de poluentes orgânicos e inorgânicos resultantes de operações como a limpeza, o esmagamento, a divisão, o curtimento e o polimento dos resíduos animais (MWINYIHIJA et al., 2005; MWINYIHIJA et al., 2006).

Os compostos de cromo são ubíquos entre os poluentes inorgânicos como resultado de sua utilização como agentes curtidores, sob a forma de $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ e a falta de uma estratégia adequada de tratamento de águas residuais (REDA, 2015). A partir do cromo total utilizado no processo de curtimento, apenas 60 a 70% são utilizados e o restante, 30 a 40%, são liberados para o ambiente no efluente do curtume (CASSANO et al., 2007). Este uso ineficiente de cromo resulta em águas residuais contendo até 1500-3000 ppm e 500-1000 ppm de cromo por meio das técnicas de curtimento convencional e de alta exaustão, respectivamente.

Estão disponíveis novas técnicas para melhorar a reciclagem do cromo, a fim de que se reduza os impactos para o ambiente, mas estas tecnologias estão limitadas aos países desenvolvidos, considerando o elevado custo operacional e algumas delas demandarem uma grande gestão (SUNDAR; RAO; MURALIDHARAN, 2002). Embora o cromo (III) seja a forma mais esperada nos efluentes do curtume, pode ocorrer um aumento na forma hexavalente como resultado das reações redox que ocorrem na lama, por exemplo, na água por meio de óxidos de manganês e em solos por meio de ligantes móveis, tais como ácido cítrico, ácido dietileno triamina pentaacético (DTPA) e oxidação mediada pelo ácido fúlvico (STEPNIEWSKA; BUCIOR; BENNICELLI, 2004).

A quantidade de cromo em determinado momento depende da intensidade dos processos industriais, da proximidade das fontes, da quantidade de cromo liberada e de fatores meteorológicos (NAUMOVA; MOROZOVA; BORISOV, 2019). O cromo, a partir de fontes que liberem o elemento em partículas relativamente grandes (diâmetro variando de 0,2-50 mm), é depositado localmente e pode migrar por meio de fatores ambientais individuais e particulares. A distância percorrida por um metal depositado no ambiente depende de fatores meteorológicos, topografia e vegetação, por exemplo (ZHANG et al., 2019).

O transporte dentro dos sistemas terrestres e na água é diretamente afetado pela especiação química: formas químicas de cromo e sua afinidade para transformações redox químicas e fotoquímicas, precipitação/dissolução e processos de adsorção/dessorção, por exemplo, ocorrendo em etapas individuais do ciclo biogeoquímico do cromo (ARCARO et al., 2019). Conversão redox do cromo (III) para cromo (VI) pode aumentar o deslocamento do cromo (VI) no solo para os sistemas aquáticos (HOMA; HAILE; WASHE, 2016).

Nos seres humanos e animais, o cromo (III) é considerado um nutriente essencial que desempenha importante papel no metabolismo da glicose, gordura e proteínas por potencializar

a ação da insulina (KE; COSTA, 2007). A forma biologicamente ativa de cromo, denominada cromodulina, é um complexo de oligopeptídeo contendo quatro íons de cromo. Os seres humanos e os animais são capazes de converter compostos inorgânicos de cromo (III) inativos para formas fisiologicamente ativas. Apesar do cromo (III) ter sido reportado como um nutriente essencial, a exposição a níveis elevados por inalação, ingestão ou contato com a pele podem causar alguns efeitos adversos para a saúde humana (ATSDR, 2012).

A toxicidade do cromo (III) é menor do que a forma hexavalente, considerando sua alta solubilidade em água e potente efeito oxidativo (SEDMAN et al., 2006). Diferentes estudos focaram na carcinogenicidade do cromo hexavalente (HOLMES; WISE; WISE, 2008; NICKENS; PATIERNO; CERYAK, 2010), muito embora os mecanismos relacionados à indução de câncer por este composto não estejam completamente esclarecidos (DE FLORA et al., 2008), evidências sugerem que efeitos toxicogênicos e oxidativos estejam envolvidos.

Comparado à forma hexavalente, as influências celulares do cromo trivalente não são muito significantes, em partes, devido a sua maior estabilidade. Além disso, no ambiente extracelular, o cromo (III) tem maior dificuldade em atravessar membranas celulares comparado ao cromo (IV), embora este último, ao ser reduzido à forma trivalente, produz elevada quantidade de espécies reativas de oxigênio, resultando em peroxidação lipídica e danos oxidativos ao material genético (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008; YAO et al., 2008).

As exposições por longos períodos e em baixas concentrações ao cromo (III), são de reconhecimento clínico bem mais difícil, principalmente quando há exposição a múltiplos compostos, situação bastante comum em exposição ocupacional. Há, neste caso, maior dificuldade para o reconhecimento de uma associação causa/efeito. Alguns efeitos foram relatados decorrentes da exposição ao cromo, como indução de apoptose por processos oxidativos em culturas celulares e formação de adutos de cromo ao DNA (QUIEVRYN et al., 2003; REYNOLDS et al., 2009; THOMPSON et al., 2013).

Nesta perspectiva, estudos de susceptibilidade à carcinogênese são essenciais para caracterizar os riscos da exposição ao metal. Além disso, agentes químicos com resultados positivos em testes padrões de genotoxicidade geralmente demonstram mecanismos relacionados à indução de danos ao DNA, por efeitos clastogênicos/aneugênicos, os quais são indicativos de riscos para processos neoplásicos (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013; NIKITAKI et al., 2015; WOOD et al., 2015).

1.4.1 A instabilidade do genoma induzida pelo cromo

A instabilidade do genoma é uma característica chave de boa parte das formas de câncer (PRATYUSH KUMAR; BIDYUT PRAVA; DASH, PATITAPABAN, 2017). Na maioria das neoplasias, a integridade da estrutura e número cromossômico estão comprometidos. A instabilidade genômica refere-se a uma grande variedade de alterações genéticas; Anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais são geralmente referidas como instabilidade cromossômica e eventos que causam erros durante replicação ou reparo de DNA, ocasionando à instabilidade de microsátélites (WISE, 2018). A indução da instabilidade do genoma resulta de defeitos nos mecanismos de vigilância de danos ao DNA, pontos de controle mitóticos e máquinas de reparo de DNA. O acúmulo de alterações genéticas acaba levando as células à transformação maligna (CARDOSO et al., 2021).

Os elementos traço alcançaram grande importância na prevenção do câncer e acredita-se que têm um papel significativo na manutenção do genoma (CHAPPELL; WIKOFF; THOMPSON, 2021). Estes elementos, necessários diariamente, podem ter grandes impactos sobre o genoma quando presente em excesso ou quando deficiente (WISE, 2018). O excesso de íons metálicos podem causar estresse oxidativo e contribuir para a elevação da quantidade de radicais livres; no entanto, muitos deles são necessários em funções fisiológicas e estabilidade do ambiente celular, incluindo a detoxificação de radicais. Assim, para a maioria dos metais, é importante estabelecer um equilíbrio para a manutenção da estabilidade celular e genômica (BAKSHI; PANIGRAHI, 2018).

O cromo tem sido motivo de preocupação, dada a sua carcinogenicidade e sua ocorrência comum (BAKSHI; PANIGRAHI, 2018). A bioquímica completa do cromo é muito complexa e contribui para a sua reatividade e disponibilidade em sistemas biológicos. Nesses sistemas, cromo (VI) é encontrado como o ânion, cromato, que é semelhante ao sulfato e fosfato e é facilmente transportado através da membrana celular (BROWNING; SPEER; WISE, 2017). Alternativamente, o cromo (III) forma grandes moléculas volumosas, tais como complexos ternários com aminoácidos e proteínas em sistemas biológicos que são mal absorvidos pelas células (BAKSHI; PANIGRAHI, 2018). Por outro lado, Cr (VI) tem efeitos cancerígenos e mutagênicos em humanos. Efeitos agudos graves, incluindo distúrbios gastrointestinais, diátese hemorrágica e convulsões podem ocorrer quando da ingestão de 1–5 g de cromato (YANG; CHEN, 2008).

O cromo (VI) é considerado a forma mais potente de cromo no que diz respeito à toxicidade e carcinogenicidade (HOLMES; WISE; WISE, 2008). Entretanto, o cromo (VI) não

interage diretamente com o DNA, mas é a redução intracelular de cromo (VI) a cromo (III) que poderá causar os eventos prejudiciais ao DNA, que levam à transformação neoplásica das células e, finalmente, ao câncer (HU et al., 2021).

A bioquímica básica do cromo (III) já está bem definida. Estudos em diferentes sistemas caracterizaram o papel do cromo (III) em se ligar ao DNA levando a uma diminuição da processividade das DNA polimerases e aumento de erros na replicação, o que podem elevar a frequência de mutações (WAKEEL; XU; GAN, 2020). Uma revisão dos efeitos do cromo (III) demonstra resultados positivos para uma variedade de eventos genotóxicos, incluindo mutagenicidade (DESMARIAS, 2019).

Embora o cromo (III) tenha capacidade de reagir com o DNA, a sua absorção através da membrana celular é fraca, e assim, estudos em culturas celulares são difíceis. A maioria dos experimentos *in vitro* são conduzidas com sais inorgânicos menos ativos, que são mal absorvidos e requerem concentrações de tratamento não relevantes. Além disso, os estudos *in vivo* com o cromo (III) são amplamente negativos quanto a genotoxicidade (BROWNING; SPEER; WISE, 2017).

Estudos sobre tumores de pulmão humano resultantes de exposição crônica ao Cr (VI) mostraram que menos mutações são encontradas em cânceres de pulmão de pacientes que foram expostos ao Cr (VI) do que aqueles que não o foram. Em vez disso, mudanças epigenéticas, como níveis aumentados de metilação do DNA nas regiões promotoras de vários genes supressores de tumor, foram identificadas em tumores de pulmão de trabalhadores expostos ao cromo (VI) (TAKAHASHI et al., 2005). Estudos de laboratório em modelos de cultura de células forneceram evidências adicionais mostrando que a exposição ao Cr (VI) é capaz de causar desregulações epigenéticas, conforme evidenciado pelo aumento da metilação do DNA, alteração dos padrões de modificação pós-tradução da histona (WANG et al., 2018) e alteração da expressão de miRNAs (HUMPHRIES; WANG; YANG, 2016).

Estudos com trabalhadores de curtumes em exposição prolongada ao cromo inorgânico demonstraram evidências de efeitos genotóxicos, incluindo aberrações cromossômicas, formação de micronúcleos e quebras das fitas de DNA (MEDEIROS et al., 2003; MEIBIANA et al., 2008; AMARAL et al., 2015). Além disso, Mancuso (1997) evidenciou que os trabalhadores expostos ao cromo (III) inorgânico têm elevado risco de desenvolver câncer. Este estudo sugere que a exposição a longo prazo seja fundamental para a genotoxicidade induzida por cromo (III).

Outra evidência chama atenção para os efeitos a longo prazo de concentrações fisiologicamente relevantes de cromo (III) em pacientes com implantes de cromo-cobalto

(DESMARIAS, 2019). Neste estudo, os fibroblastos foram tratadas com níveis de cromo equivalentes aos mensurados em pacientes com implantes funcionais e avaliadas quanto à estabilidade cromossômica. As células tratadas com cromo (III) apresentaram elevada instabilidade cromossômica numérica e estrutural. A instabilidade cromossômica foi proposta como mecanismo para a carcinogênese induzida pelo metal (WISE; WISE, 2010; HOLMES; WISE, 2010).

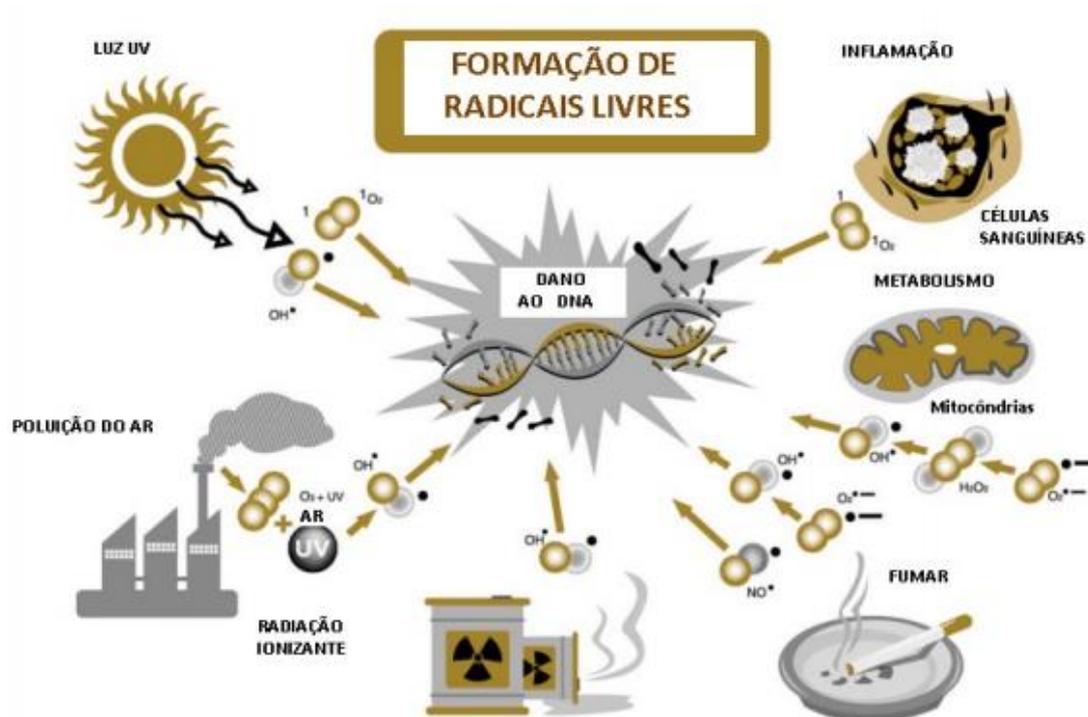
O cromo é amplamente investigado quanto aos seus efeitos deletérios ao DNA, principalmente na forma hexavalente. No entanto, o padrão de deposição de cromo (III) no trato respiratório, assim como seu provável efeito carcinogênico não está esclarecido. Além do mais, deve-se considerar que esse metal é um importante fator de risco para a saúde dos trabalhadores de curtumes ocupacionalmente expostos, principalmente à forma orgânica de cromo (III) ou na forma ligada à proteína (pó de couro). A exposição ocupacional ao cromo (III) aumenta o risco de dermatite, úlceras e perfuração do septo nasal e doenças respiratórias, bem como o aumento dos cânceres pulmonares e nasais (DESMARIAS, 2019)

O cromo (III) é considerado um potencial agente genotóxico (LANGÅRD, 1990) em estudos *in vitro* e *in vivo* por interferência no emparelhamento de pares de bases do DNA (FANG et al., 2014), bem como induzir danos ao DNA de fibroblastos humanos (WAKEEL; XU; GAN, 2020). Por outro lado, outras evidências apontam ausência de toxicidade ou genotoxicidade (DESMARIAS, 2019;). A extensa literatura sobre os efeitos genotóxicos dos compostos de cromo (III) adicionam muitos exemplos de informações conflitantes, com dados negativos e positivos frequentemente relatados em sistemas teste similares. Além disso, não há estudos relatando o potencial carcinogênico da exposição atmosférica ao cromo (III), como estratégia de prevenção de riscos ocupacionais. Assim, a presente tese teve como objetivo investigar o risco de instabilidade genética e carcinogenicidade decorrente da exposição atmosférica ao pó de cromo (III) em *Rattus norvegicus*.

1.5 Papel das espécies reativas de oxigênio (ERO's) e estresse oxidativo

Um radical livre é uma molécula ou elemento com um elétron desemparelhado que é extremamente reativo na tentativa de atingir um estado eletronicamente estável. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são derivados de radicais livres de moléculas contendo oxigênio (**Figura 4**) (WAGNER; CHENG; KO, 2018) .

Figura 4: Formação de radicais Livres



Fonte: CUNHA (2018)

O estresse oxidativo descreve quando um sistema apresenta um desequilíbrio entre as reações de oxidação e redução, levando à geração de oxidantes ou moléculas em excesso que aceitam um elétron de outro reagente. Radicais livres participam da sinalização celular como mediadores e reguladores da função vascular (DHARMARAJA, 2017; TABISH; ZHANG; WINYARD, 2018).

Sendo conhecido como um estado em que há um desequilíbrio entre os sistemas de defesa oxidante e antioxidante, o estresse oxidativo geralmente ocorre como consequência da produção elevada de espécies reativas de oxigênio, ou quando o sistema de defesa antioxidante enzimático ou não enzimático (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e vitaminas) é ineficiente, ou uma combinação de ambos (MORIS et al., 2018), cujo impacto/lesão depende do tipo de oxidante, intensidade de produção e capacidade de ação de agentes antioxidantes e sistemas de reparo, estando diretamente relacionado a diversas patologias como disfunções endócrinas, inflamação crônica, doenças cardiovasculares, disfunções imunes, doenças crônicas, câncer e até mesmo a doenças neurodegenerativas (SMITH et al., 2013; RAHAL et al., 2014; LEE et al., 2017).

Nesse contexto espécies reativas de oxigênio incluem radicais livres, como ânion superóxido, radicais lipídicos, radical hidroxila, óxido nítrico e não radicais livres, como

peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e peroxinitrito, que possuem efeitos oxidantes e contribuem para o estresse oxidativo.

A geração de espécies reativas de oxigênio é considerada um evento primário sob uma variedade de condições de estresse. As consequências da formação de EROs dependem da intensidade do estresse e das condições físico-químicas da célula (isto é, estado antioxidante, estado redox e pH) (KIRTONIA; SETHI; GARG, 2020). É geralmente aceito que o oxigênio ativo produzido sob estresse é um fator prejudicial, que causa peroxidação gradual das estruturas lipídicas, inativação da enzima antioxidante e dano oxidativo ao DNA. No entanto, durante os últimos anos, evidências têm se acumulado sobre a participação de EROs e seus produtos oxigenados em uma cascata de transdução de sinal (SURJADINATA; JACOBO-VELÁZQUEZ; CISNEROS-ZEVALLOS, 2021).

Baixas quantidades de EROs são importantes para funções neurológicas normais, entretanto, quando há excesso de EROs e limitação da resposta antioxidante, há oxidação extensa de proteínas e peroxidação lipídica, promovendo formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares, degeneração celular e, conseqüente, declínio funcional. A depleção de fosfolipídios de membrana, como resultado do aumento da peroxidação lipídica e atividade diminuída de enzimas antioxidantes, é a principal causa de doenças neurodegenerativas (SALIM, 2011; PISOCHI; POP, 2015; SALIM, 2016).

No DNA, lesões oxidativas podem ocasionar mutações e contribuir para a iniciação e progressão da carcinogênese em vários estágios (SURJADINATA; JACOBO-VELÁZQUEZ; CISNEROS-ZEVALLOS, 2021; CHOI, 2021). O estresse oxidativo pode causar danos cumulativos no DNA, de forma direta ou indireta, através da peroxidação de lipídios. Além disso, também pode comprometer a resposta antioxidante e os mecanismos de reparo no DNA (KIRTONIA; SETHI; GARG, 2020). Em níveis elevados ou superiores às quantidades de antioxidantes, as espécies reativas de oxigênio podem promover danos a diversas moléculas, dentre as quais o DNA, proteínas, carboidratos e lipídios, desencadeando alterações nas funções celulares normais (CHOI, 2021). O estresse oxidativo pode causar danos cumulativos no DNA, de forma direta ou indireta, através da peroxidação de lipídios. Além disso, também pode comprometer a resposta antioxidante e os mecanismos de reparo no DNA (KIRTONIA; SETHI; GARG, 2020).

O estresse oxidativo, independentemente da causa primária, pode resultar no início de uma série de processos fisiopatológicos que levam a lesão celular e toxicidade. Biomarcadores de estresse oxidativo são extremamente úteis na avaliação da citotoxicidade. Entre eles, a

oxidação intracelular é um dos biomarcadores mais bem caracterizados e explorados usados para detectar o estresse oxidativo (CHOI, 2021).

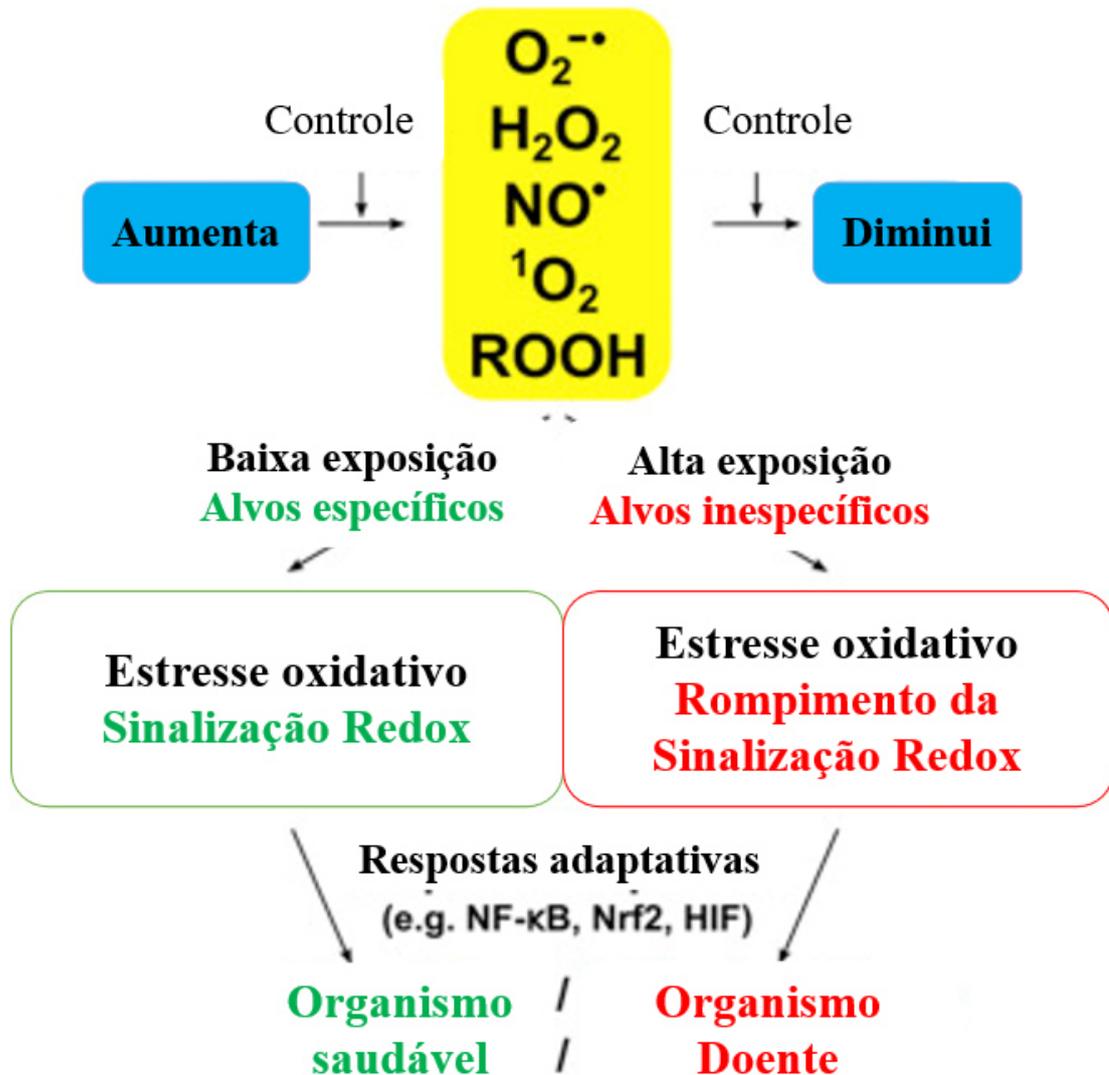
Processos, como fosforilação de proteínas, ativação de vários fatores de transcrição, apoptose, imunidade e diferenciação, são todos dependentes de uma produção adequada de EROs e da presença dentro das células que precisam ser mantidas em um nível baixo, entretanto quando sua produção aumenta, eles começam a mostrar efeitos prejudiciais em estruturas celulares importantes, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Um grande conjunto de evidências mostra que o estresse oxidativo pode ser responsável, com diferentes graus de importância, no aparecimento e/ou progressão de várias doenças (ou seja, câncer, diabetes, distúrbios metabólicos, aterosclerose e doenças cardiovasculares) (PIZZINO et al., 2017; LIGUORI et al., 2018; SINGH et al., 2019).

Os EROs são produzidas principalmente pelas mitocôndrias, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, ou seja, $O_2^{\bullet -}$ pode ser formado pela respiração celular, pelas lipoxigenases (LOX) e pelas ciclooxigenases (COX) durante o metabolismo do ácido araquidônico e por células endoteliais e inflamatórias e apesar do fato de que essas organelas têm uma capacidade intrínseca de eliminação de EROs é importante notar que isso não é suficiente para atender à necessidade celular de eliminar a quantidade produzida pela mitocôndria (SINGH et al., 2019).

Os radicais livres são gerados a partir de fontes endógenas e exógenas, sendo a ativação de células imunológicas, inflamação, isquemia, infecção, câncer, exercícios excessivos, estresse mental e envelhecimento responsáveis pela produção de radicais livres endógenos. Entretanto as fontes exógenas ocorrem como resultado da exposição a poluentes ambientais, metais pesados (Cd, Hg, Pb, Cr, Fe e As), certas drogas (ciclosporina, tacrolimus, gentamicina e bleomicina), solventes químicos, cozimento (carne defumada, óleo usado e gordura), fumaça de cigarro, álcool e radiações. Quando esses compostos exógenos penetram no corpo, eles são degradados ou metabolizados e radicais livres são gerados como subprodutos (TABISH; ZHANG; WINYARD, 2018).

A baixa exposição de células e organismos é utilizada para a sinalização redox abordando alvos específicos, enquanto a alta exposição resulta na interrupção da sinalização redox e/ou danos a alvos inespecíficos (**Figura 5**) (SURJADINATA; JACOBO-VELÁZQUEZ; CISNEROS-ZEVALLOS, 2021).

Figura 5: Estresse oxidativo no organismo



Fonte: Adaptado de TABISH; ZHANG; WINYARD (2018)

O estresse oxidativo descreve quando um sistema apresenta um desequilíbrio entre as reações de oxidação e redução, levando à geração de oxidantes ou moléculas em excesso que aceitam um elétron de outro reagente. Radicais livres participam da sinalização celular como mediadores e reguladores da função vascular (DHARMARAJA, 2017; TABISH; ZHANG; WINYARD, 2018).

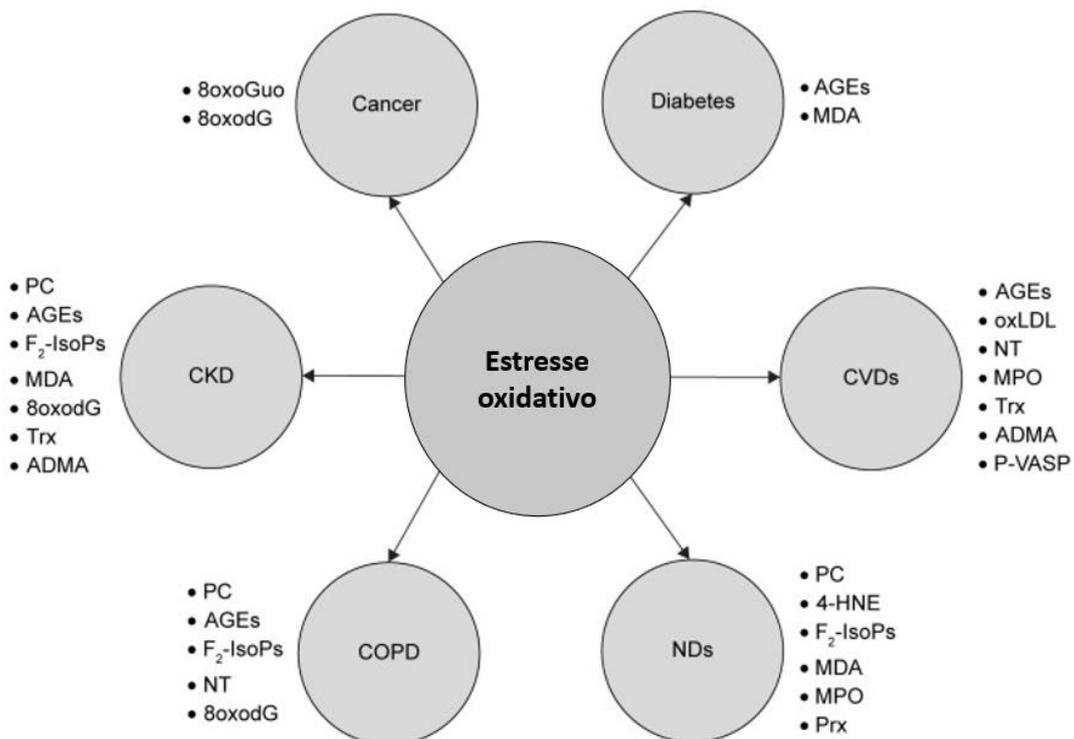
O estresse oxidativo, independentemente da causa primária, pode resultar no início de uma série de processos fisiopatológicos que levam a lesão celular e toxicidade. Biomarcadores de estresse oxidativo são extremamente úteis na avaliação da citotoxicidade. Entre eles, a

oxidação intracelular é um dos biomarcadores mais bem caracterizados e explorados usados para detectar o estresse oxidativo (CHOI, 2021).

O envelhecimento é a perda progressiva das funções dos tecidos e órgãos ao longo do tempo. A teoria dos radicais livres do envelhecimento, mais tarde denominada como teoria do estresse oxidativo do envelhecimento, é baseada na hipótese baseada no dano estrutural de que as perdas funcionais associadas à idade são devido ao acúmulo de dano oxidativo às macromoléculas (lipídios, DNA e proteínas) (XIE et al., 2019; SENONER; DICHTL, 2019).

Em síntese, dada a estreita relação entre estresse oxidativo, inflamação e envelhecimento, a teoria da oxidação-inflamatória do envelhecimento ou oxi-inflamação-envelhecimento foi proposta: o envelhecimento é uma perda da homeostase devido a um estresse oxidativo crônico que afeta especialmente os reguladores sistemas, como os sistemas nervoso, endócrino e imunológico. A consequente ativação do sistema imunológico induz um estado inflamatório que cria um círculo vicioso em que o estresse oxidativo crônico e a inflamação se alimentam e, conseqüentemente, aumenta a morbimortalidade relacionada à idade (Figura 6) (LIGUORI et al., 2018).

Figura 6: Estresse oxidativo, inflamação e envelhecimento



Fonte: LIGUORI et al., 2018 (Adaptado)

1.5.1 Câncer e estresse oxidativo

O aparecimento do câncer em humanos é um processo complexo, que requer alterações celulares e moleculares mediadas por gatilhos endógenos e / ou exógenos. Já é bem conhecido que o dano oxidativo ao DNA é um dos estímulos responsáveis pelo desenvolvimento do câncer (LIGUORI et al., 2018).

O câncer pode ser impulsionado e / ou promovido por anormalidades cromossômicas e ativação oncogênica determinada pelo estresse oxidativo. As bases hidrolisadas do DNA são subprodutos comuns da oxidação do DNA e são consideradas um dos eventos mais relevantes na carcinogênese química (CENINI; LLORET; CASCELLA, 2019).

A formação desse tipo de aduto prejudica o crescimento celular normal, alterando o perfil transcriptômico fisiológico e causando mutações gênicas. O estresse oxidativo também pode causar uma quantidade variada de modificações contra a estrutura do DNA, por exemplo, lesões de base e açúcar, ligações cruzadas de proteína de DNA, quebras de fita e locais sem base. Por exemplo, tabagismo, poluentes ambientais e inflamação crônica são fontes de danos oxidativos ao DNA que podem contribuir para o aparecimento de tumores (TAN et al, 2019).

O estresse oxidativo resultante de razões de estilo de vida também pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento do câncer, conforme sugerido pela forte correlação entre o consumo de gordura na dieta (um fator que expõe o organismo a maior risco de peroxidação lipídica) e as taxas de mortalidade por diferentes tipos de câncer (TAN; NORHAIZAN; LIEW, 2018).

1.5.2 Consequências do estresse oxidativo na saúde e na doença

O campo da pesquisa do estresse oxidativo na saúde e na doença atraiu o interesse inicial. A relação com o processo de envelhecimento e as estratégias de defesa antioxidante foram examinadas. Os processos redox e, portanto, o estresse oxidativo, fornecem uma contribuição importante para a rede de doenças humanas, as “doenças”. Os enormes esforços para estudar o papel e o impacto do estresse oxidativo em condições normais e patológicas resultaram em um grande corpo de conhecimento, que em última instância contribuirá para a medicina redox (TAN et al, 2019).

Existem muitos campos ativos de pesquisa em desenvolvimento em estresse oxidativo apenas para citar como áreas divergentes como ruído e estresse emocional, a poluição do ar no antropoceno e o processo de envelhecimento. O progresso foi facilitado substancialmente pela

disponibilidade de novas técnicas de imagem não invasivas (TAN; NORHAIZAN; LIEW, 2018).

O estresse oxidativo é suspeito de ser importante em doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, depressão, autismo e esclerose múltipla (SCHOOTS et al., 2018).

Evidências indiretas por meio do monitoramento de biomarcadores, como espécies reativas de oxigênio e produção de espécies reativas de nitrogênio, indicam que o dano oxidativo pode estar envolvido na patogênese dessas doenças, enquanto o estresse oxidativo cumulativo com interrupção da respiração mitocondrial e danos mitocondriais estão relacionados à doença de *Alzheimer*, doença de *Parkinson* e outras doenças neurodegenerativas (SIMUNKOVA et al., 2018).

Acredita-se que o estresse oxidativo esteja relacionado a certas doenças cardiovasculares, uma vez que a oxidação do LDL no endotélio vascular é um precursor para a formação de placas. O estresse oxidativo também desempenha um papel na cascata isquêmica devido à lesão de reperfusão de oxigênio após hipóxia. Essa cascata inclui derrames e ataques cardíacos. O estresse oxidativo também foi implicado na síndrome da fadiga crônica (SCHOOTS et al., 2018). O estresse oxidativo também contribui para a lesão do tecido após irradiação e hiperóxia, bem como no diabetes (SIMUNKOVA et al., 2018).

É provável que o estresse oxidativo esteja envolvido no desenvolvimento do câncer relacionado à idade. As espécies reativas produzidas no estresse oxidativo podem causar danos diretos ao DNA e, portanto, são mutagênicas, podendo também suprimir a apoptose e promover proliferação, invasividade e metástase. A infecção por *Helicobacter pylori*, que aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no estômago humano, também é considerada importante no desenvolvimento do câncer gástrico (SIMUNKOVA et al., 2018).

1.6 Enzimas antioxidantes

A maioria das enzimas é feita predominantemente de proteínas, seja uma única cadeia de proteína ou muitas dessas cadeias em um complexo de múltiplas subunidades. Muitas vezes, as enzimas também incorporam componentes não proteicos, como íons metálicos ou moléculas orgânicas especializadas conhecidas como cofator (por exemplo, trifosfato de adenosina). Muitos cofatores são vitaminas, e seu papel como vitaminas está diretamente ligado ao seu uso na catálise de processos biológicos dentro do metabolismo (MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE

metabólicas graves e danos às macromoléculas biológicas (CHAHAL et al., 2018; LORENZO et al., ALI et al., 2020).

O sistema antioxidante natural é classificado em dois grupos principais, enzimático e não enzimático. Os antioxidantes enzimáticos são compostos por um número limitado de proteínas, como catalase, glutathione peroxidase, bem como superóxido dismutase (SOD), juntamente com algumas enzimas de suporte. Os antioxidantes não enzimáticos incluem antioxidantes de ação direta, que são extremamente importantes na defesa contra estresse oxidativo ((MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE CASTRO, 1999; CHAHAL et al., 2018; LORENZO et al., 2018; MIHAILOVIĆ et al., 2021).

As células implantam um sistema de defesa antioxidante baseado principalmente em componentes enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), para se proteger do dano celular induzidos por radicais livres (LIGUORI et al., 2018). Essas enzimas antioxidantes podem servir como biomarcadores redox em várias doenças humanas, pois são as primeiras a indicar o estado redox por meio de processos de oxidação / redução (TABISH; ZHANG; WINYARD, 2018; LAM, 2020).

A maioria deles inclui ácido ascórbico e lipóico, polifenóis e carotenóides, derivados de fontes dietéticas. A própria célula sintetiza uma minoria dessas moléculas (REYHANI POUL; JAFARPOUR; SAFARI, 2018).

Foi relatado em estudos epidemiológicos que muitos dos compostos antioxidantes possuem atividades anti-inflamatórias, anti-ateroscleróticas, antitumorais, antimutagênicas, anti-carcinogênicas, antibacterianas e antivirais em maior ou menor grau. Em muitos casos, o aumento do estresse oxidativo está amplamente associado ao desenvolvimento e progressão do diabetes e suas complicações, que geralmente são acompanhadas por aumento da produção de radicais livres ou falha da defesa antioxidante (REYHANI POUL; JAFARPOUR; SAFARI, 2018; WANG et al., 2017; WANG SHARIFI-RAD et al., 2018; SHARIFI-RAD et al., 2020; MIHAILOVIĆ et al., 2021)

Vários antioxidantes são fornecidos ao corpo humano por meio da dieta, tanto vegetariana quanto não vegetariana. As vitaminas C e E, o β -caroteno e a coenzima Q são os antioxidantes mais famosos da dieta alimentar, dos quais a vitamina E está presente nos óleos vegetais e é encontrada em abundância no gérmen de trigo. É uma vitamina lipossolúvel, absorvida no intestino e transportada no plasma pelas lipoproteínas. Fora das 8 formas isoméricas de estado natural da vitamina E, o α -tocoferol é a forma isomérica mais comum e potente. Sendo lipossolúvel, a vitamina E pode prevenir eficazmente a peroxidação lipídica da membrana plasmática (GUO et al., 2020; ALKADI, 2020).

1.7 Toxicidade e Marcadores de Danos ao DNA

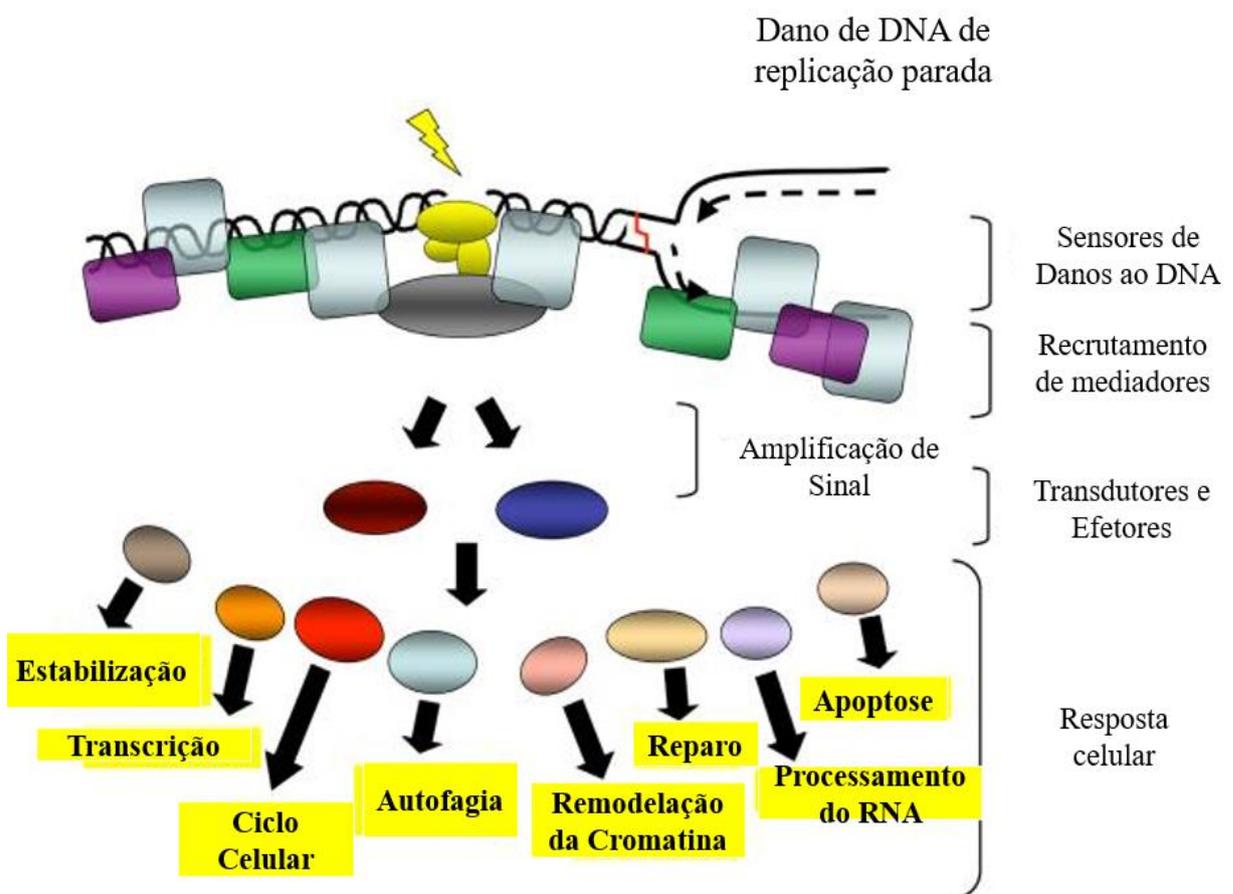
A toxicidade é conhecida como a medida do potencial tóxico de uma substância (OECD, 2015). Testes que classificam a toxicidade sistêmica aguda são empregados para analisar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação (FISHER et al., 2019). Diversos produtos farmacêuticos são moléculas quirais e comercializados na forma de misturas racêmicas dos respectivos enantiômeros, estes muitas vezes exibem diferentes propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas e as suas formas enantioméricas diferentes pode levar a diferentes atividades toxicológicas (SORENSEN et al., 2016). A aceitação de um teste de toxicidade como uma ferramenta analítica eficaz requer garantias de padronização e validação do procedimento experimental para avaliar sua sensibilidade, exatidão ou precisão (PAGE et al., 2020).

Os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos. Esses testes diferem na duração e nas respostas finais que são medidas. Os testes de toxicidade aguda são utilizados para medir os efeitos de agentes tóxicos sobre o organismo teste durante um curto período de tempo. Eles têm como objetivo estimar a dose ou concentração de um agente tóxico que seria capaz de produzir uma resposta específica mensurável em um organismo-teste ou população, em um período de tempo relativamente curto, geralmente de 24 a 96 h. Os efeitos tóxicos medidos em testes de toxicidade aguda incluem qualquer resposta exibida por um organismo-teste ou população resultante de um estímulo químico (RONCO; BÁEZ; GRANADO, 2004).

Testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste. O fato de uma substância química não produzir efeitos tóxicos em testes de toxicidade aguda não indica que ela não seja tóxica para eles. Testes de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações sub-letais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras (JAMES; ROBERTS; WILLIAMS, 2000).

Para combater as ameaças representadas por danos ao DNA, as células desenvolveram mecanismos - chamados coletivamente de resposta ao dano ao DNA para detectar lesões no DNA, sinalizar sua presença e promover seu reparo. Células defeituosas nesses mecanismos geralmente exibem sensibilidade aumentada para agentes que danificam o DNA e, como descrito mais abaixo, muitos desses defeitos causam doenças humanas. Embora as respostas sejam diferentes para diferentes classes de lesões de DNA, elas geralmente ocorrem por um programa geral comum (JACKSON; BARTEK, 2009) (**Figura 8**). Embora nos concentremos no reparo do DNA e na sinalização de danos ao DNA separadamente, enfatizamos que eles operam coletivamente e compartilham muitos componentes

Figura 8: Presença de uma lesão no DNA, que pode levar ao bloqueio da replicação, é reconhecida por várias proteínas.



Fonte: Adaptado de JACKSON; BARTEK (2009)

A avaliação da toxicidade genética é de importância para identificar e caracterizar o papel de mutágenos e carcinógenos na saúde humana, além disso para avaliar a mensuração de

danos primários, de mutações em genes, danos em cromossomos para avaliação de riscos de instabilidade genética e de efeitos carcinogênicos (ZEIGER, 2015; JIANG et al., 2018), uma vez que, para ser altamente eficaz, as intervenções dentro das redes biológicas devem ser múltiplas, mas extremamente seletivas, para poupar os órgãos normais de efeitos colaterais prejudiciais (AZMI, 2012; ATIENZAR; NICOLAS, 2018).

1.8 Teste cometa

O Eletroforese em gel de célula única também chamado de teste cometa ou ensaio cometa foi desenvolvido como um método para a detecção de danos na molécula de DNA e está ganhando enorme popularidade devido ao seu amplo espectro de aplicações (KOPPEN et al., 2017; AZQUETA et al., 2020). Sendo extensivamente utilizado como uma ferramenta básica em diversas pesquisas, incluindo biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo ao DNA, ecotoxicologia genética, genotoxicidade de novos produtos químicos e/ou naturais, monitoramento de doenças genéticas, danos oxidativos (MØLLER et al., 2020). Ainda é utilizado para avaliar protocolos terapêuticos para mensuração do potencial genotóxico de drogas isoladas ou em associação (ROSATI et al., 2020).

O teste cometa tornou-se um dos métodos padrão para avaliar danos no DNA, com aplicações em genotoxicidade, testes de biomonitorização humana e epidemiologia molecular, sendo assim fundamental na pesquisa em danos e reparação do DNA (AZQUETA et al., 2020). Usado em todo o mundo para detectar danos no DNA induzidos por agentes genotóxicos (KOPPEN et al., 2017).

O que tornou o ensaio do cometa tão popular é provavelmente o seu baixo custo, versatilidade e confiabilidade na geração de resultados. Por exemplo, a medição de DNA danificado por oxidação é muito fácil com o ensaio do cometa modificado por enzima, ao passo que pode ser uma experiência frustrante medir nucleobases de DNA oxidado por técnicas cromatográficas que tendem a quebrar quando você menos precisa (AFANASIEVA; SIVOLOB, 2018).

O ensaio do cometa, é um método para avaliar o dano e reparo do DNA quantitativamente, no nível de células individuais. Uma grande vantagem do ensaio é que as quebras de fita de DNA e algumas modificações de base podem ser medidas usando corantes, em vez de marcação radioativa de células (MATZENBACHER et al., 2018).

O ensaio requer nucleoides (DNA genômico celular superenrolado), mas não células em proliferação, e o ensaio é, portanto, aplicável a qualquer linha celular ou tecido a partir do qual uma suspensão de célula única possa ser obtida, incluindo células diferenciadas. Ele pode ser usado em uma ampla gama de aplicações *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* (KÖNEN-ADIGÜZEL; ERGENE, 2018)

O ensaio cometa padrão detecta quebras de fita de DNA e lesões que são convertidas em quebras de fita de DNA sob as condições alcalinas do ensaio (ou seja, locais lábeis alcalinos) (KOPPEN et al., 2018).

O que tornou o ensaio do cometa tão popular é provavelmente o seu baixo custo, versatilidade e confiabilidade na geração de resultados. Por exemplo, a medição de DNA danificado por oxidação é muito fácil com o ensaio do cometa modificado por enzima, ao passo que pode ser uma experiência frustrante medir nucleobases de DNA oxidado por técnicas cromatográficas que tendem a quebrar quando você menos precisa (**Figura 9**) (MATZENBACHER et al., 2018).

Figura 9: Esquematização do teste cometa



Fonte: Pesquisa do autor

Também demonstrou o desejo de desenvolver melhores maneiras de quantificar o nível de dano ao DNA do que a medição do comprimento da cauda do cometa. A utilidade do momento da cauda como descritor de ensaio do cometa tem sido debatida ao longo dos anos e agora não é recomendado como descritor primário para danos ao DNA no ensaio do cometa (MØLLER, 2018).

A porcentagem de DNA na cauda do cometa é normalmente considerada como o descritor mais fácil de entender entre os vários tipos de descritores que podem ser obtidos por análise de imagem, embora a pontuação manual também seja confiável e não haja consenso sobre qual descritor melhor descreve o nível de dano ao DNA no ensaio do cometa (UEDA, 2020).

Uma das principais aplicações do ensaio do cometa *in vivo* é avaliar a genotoxicidade local, por exemplo, no (primeiro) local do tecido de contato para compostos com biodisponibilidade sistêmica pobre e para compostos de vida muito curta ou seus metabólitos (MØLLER, 2018). Além disso, a avaliação dos efeitos genotóxicos em órgãos diretamente expostos pode abordar certos cenários de exposição humana. Os órgãos alvo a este respeito incluem cavidade nasal ou oral, pulmão, esôfago, mucosa do estômago, duodeno ou pele (UEDA, 2020).

1.9 Teste de micronúcleos (MN)

O teste do micronúcleo é amplamente utilizado para estimar o dano citogenético induzido por agentes químicos ou físicos. Embora a maioria dos trabalhos publicados até agora tenham realizado esse ensaio em espécies de mamíferos (principalmente roedores), o teste do micronúcleo se mostrou uma ferramenta útil também com amostras retiradas de não mamíferos. Em particular, permite detectar as propriedades genotóxicas de compostos presentes no meio aquático. Tanto a pesquisa de laboratório (para avaliar a genotoxicidade de xenobióticos) e estudos *in situ* (para avaliar a qualidade da água) envolveram várias espécies de invertebrados (IGL et al., 2019; SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020).

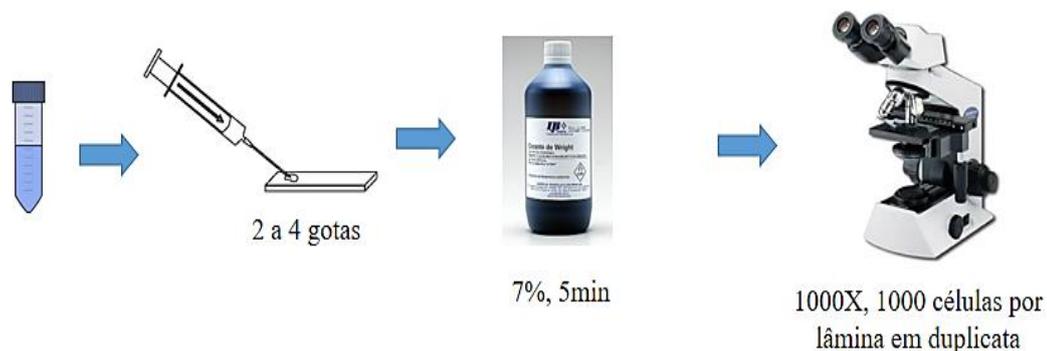
Os micronúcleos (MN) são derivados de fragmentos de cromossomos decorrentes de aberrações estruturais assimétricas ou representam cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo na divisão celular. Fragmentos acêntricos são mais frequentemente vistos após a irradiação de células, enquanto cromossomos inteiros são mais frequentes em MN de ocorrência espontânea ou após indução por venenos do fuso sem qualquer tratamento

clastogênico, como foi demonstrado pela coloração de anticorpo (SANDOVAL-HERRERA et al., 2021).

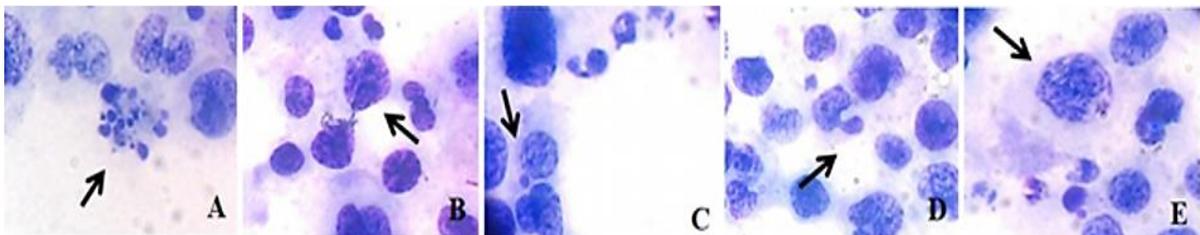
Os micronúcleos podem ser analisados em células tratadas ou não com bloqueio do processo de citocinese (SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020), trata-se de um tipo de dano cromossômico ou anomalia mitótica que possui origem de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, devido a lesões do DNA não reparadas ou reparadas erroneamente, ou de erros durante o fuso mitótico com separação malsucedida dos cromossomos (**Figura 10**) (RUIZ-RUIZ et al., 2020).

Também tem sido usado para investigar a instabilidade cromossômica em humanos que apresentam mutações em genes que são necessários para o reparo de danos no DNA, como no caso da anemia de Fanconi e da ataxia teleangiectasia (BENVINDO-SOUZA et al., 2020; SANDOVAL-HERRERA et al., 2021).

Figura 10: Esquematização do teste de MN



Parâmetros avaliados:



Frequência de apoptoses (A), pontes nucleoplasmáticas (B), micronúcleos (C), brotos nucleares (D) e necroses (E)

Fonte: Pesquisa do autor

Durante a fase da anáfase da mitose eles não são capazes de interagir com o eixo formado na citocinese e, dessa forma, não são incorporados aos núcleos filhos (THORNE,

2020). O teste de MN permite detectar a ação de agentes clastogênicos (pequeno micronúcleo) e aneugênicos (grande micronúcleo), os MN apresentam-se envoltos por uma membrana nuclear, sendo caracterizado como um artefato nuclear, pequeno e separado (SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020).

1.10 Histologia e coloração H&E

A histopatologia é o exame de tecidos biológicos para observar o aparecimento de células doentes em detalhes microscópicos, geralmente envolve uma biópsia, que é um procedimento que envolve a coleta de uma pequena amostra de tecido, geralmente realizada por um patologista especialista em diagnósticos de doenças (APPLE, 1984; GURCAN, 2009; ÇAYIR, 2018).

A técnica envolve a preparação de lâminas histológicas, que é indiscutivelmente o elemento mais integrante do processo. Essas lâminas serão as que serão examinadas ao microscópio e, portanto, sua preparação meticulosa não é tarefa fácil (GURCAN, 2009; ÇAYIR, 2018).

A preparação de lâminas histológicas é geralmente um processo de cinco estágios; as etapas são: fixação, processamento, incorporação, seccionamento e, por último, mas não menos importante, coloração (AUNG et al., 2004; FELDMAN; WOLFE, 2014).

O corte em particular é importante, pois fatias suficientemente finas devem ser preparadas para permitir a observação clara e precisa dos mínimos detalhes da célula, considerando que a microscopia eletrônica ou a microscopia de luz analisam a microestrutura detalhada do tecido (FELDMAN; WOLFE, 2014).

Dessa forma a secção normalmente envolve o uso de instrumentos chamados micrótomos - que podem ser combinados com unidades de congelamento ou criostatos se forem necessários cortes congelados - que cortam em uma medida conhecida como micron (μm), e a espessura dos cortes necessários varia dependendo das técnicas de análise e outros fatores, como o tipo de tecido (APPLE, 1984; GURCAN, 2009; BANCROFT; LAYTON, 2012)

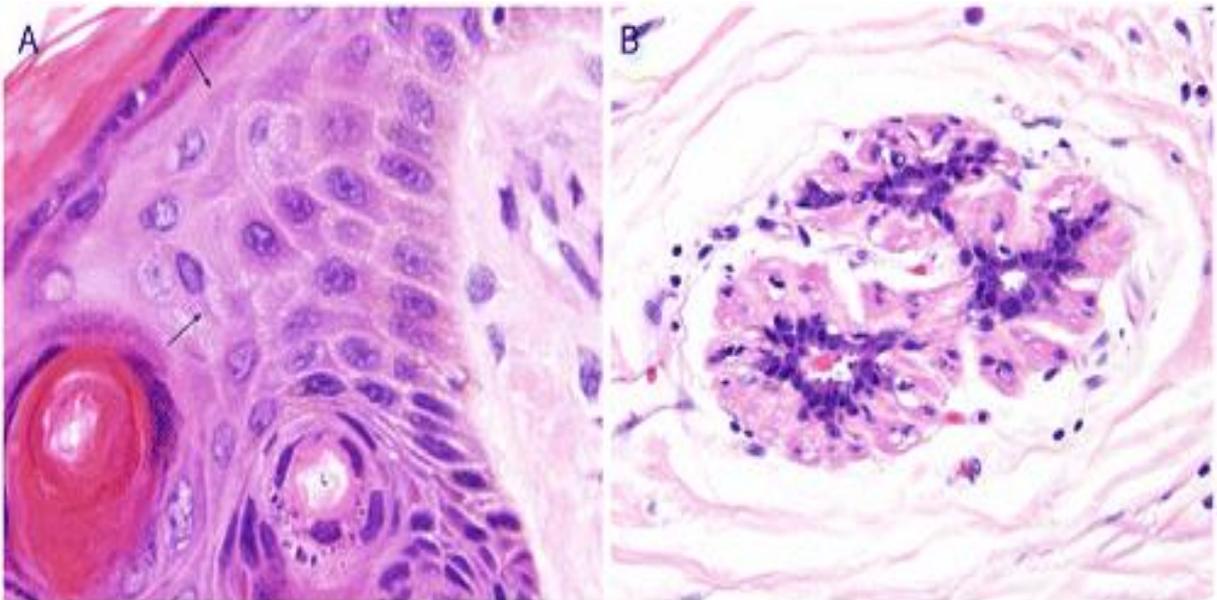
Apesar dos avanços notáveis na medicina molecular, capazes de fornecer informações requintadas sobre os tumores, como clonalidade, perfil de expressão gênica, alterações genéticas, modelo prognóstico e marcador preditivo para resposta à terapia alvo, o microscópio continua sendo a ferramenta mais importante do patologista cirúrgico em prática cotidiana. Isso ocorre porque a maioria das amostras na prática de patologia cirúrgica, como biópsias

gastrointestinais e curetagens uterinas, são diagnosticadas apenas por exame histológico e não requerem análise molecular (QU et al., 2014; GIACOMELLI et al., 2016; PIÓRKOWSKI; GERTYCH, 2018;).

Mesmo para neoplasias malignas, um diagnóstico histológico preciso ou pelo menos presuntivo é o ponto de partida para a seleção das investigações moleculares relevantes. Além disso, o exame de seções histológicas de rotina (além do exame macroscópico), juntamente com a imuno-histoquímica (LUO et al., 2017)

É extraordinário que a coloração de hematoxilina-eosina, introduzida há mais de um século, tenha resistido ao teste do tempo como a coloração padrão para exame histológico de tecidos humanos. Essa combinação simples e barata de corantes é capaz de revelar detalhes celulares notáveis, na medida em que as características ultraestruturais podem ser deduzidas. A interação de cores também pode fornecer pistas consideráveis sobre o estado funcional das células (**Figura 11**) (CHAN, 2014; QU et al., 2014; LUO et al., 2017).

Figura 11: Cores e detalhes celulares em corte histológico corado com hematoxilina-eosina (H&E).



Fonte: CHAN (2014)

As colorações de hematoxilina e eosina (H&E) são utilizadas há pelo menos um século e ainda são essenciais para o reconhecimento de vários tipos de tecido e das alterações morfológicas que formam a base do diagnóstico contemporâneo do câncer. A coloração permaneceu inalterada por muitos anos porque funciona bem com uma variedade de fixadores

e exibe uma ampla gama de características citoplasmáticas, nucleares e de matriz extracelular (CHAN, 2014).

A hematoxilina tem uma cor azul-púrpura profunda e cora os ácidos nucléicos por uma reação complexa e não completamente compreendida. A eosina é rosa e cora as proteínas de forma inespecífica. Em um tecido típico, os núcleos são corados de azul, enquanto o citoplasma e a matriz extracelular apresentam vários graus de coloração rosa. As células bem fixadas apresentam detalhes intranucleares consideráveis (CASTRO, 1995; TOSTA et al., 2019).

Os núcleos mostram vários padrões de condensação de heterocromatina (coloração com hematoxilina) específicos para tipos de células e tipos de câncer que são diagnósticos muito importantes. Coloração dos nucléolos com eosina. Se houver polirribossomos abundantes, o citoplasma terá um tom azulado distinto (BANCROFT; LAYTON, 2012; CHAN, 2014; LUO et al., 2017).

A zona de Golgi pode ser provisoriamente identificada pela ausência de coloração em uma região próxima ao núcleo. Assim, a mancha revela informações estruturais abundantes, com implicações funcionais específicas (ANDRÉS-MANZANO; ANDRÉS; DORADO, 2015).

Uma limitação da coloração pela hematoxilina é que ela é incompatível com a imunofluorescência. É útil, no entanto, corar uma seção de parafina em série de um tecido no qual a imunofluorescência será realizada. Hematoxilina, geralmente sem eosina, é útil como contracoloração para muitos procedimentos imuno-histoquímicos ou de hibridização que usam substratos colorimétricos (como fosfatase alcalina ou peroxidase) (BANCROFT; LAYTON, 2012; CHAN, 2014; ANDRÉS-MANZANO; ANDRÉS; DORADO, 2015; TOSTA et al., 2019).

1.11 Estudos comportamentais: Campo aberto e *rota rod*

O uso de modelos animais, apesar dos desafios, é fundamental para compreender melhor as várias condições e melhorar os resultados do tratamento em populações clínicas. O comportamento exploratório se define através das reações de investigação, reconhecimento e orientação do animal em relação ao espaço. O comportamento exploratório é vital a sobrevivência da maior parte dos animais e vem sendo estudados em muitas espécies, de insetos e primatas (RAMOS et al., 2008).

Os estudos comportamentais exploratórios realizados em roedores, permitem analisar, entre outros fatores, a resposta a novidade, os mecanismos neurais subjacentes a determinados comportamentos, as vias envolvidas, bem como o efeito comportamental de diferentes tratamentos. O comportamento animal é influenciado por fatores concorrentes e interativos que muitas vezes são mantidos constantes no laboratório para produzir um experimento bem controlado focado em uma variável (SNYDER; BROWN; BUFFALARI, 2020).

Paradigmas comportamentais como o teste de campo aberto, é usado para avaliar as propriedades ansiolíticas, ou redutoras da ansiedade, de medicamentos ou a poluentes ambientais. Alguns testes usam comportamentos de ansiedade que parecem bastante semelhantes, como o tempo gasto em uma zona mais "exposta" de um labirinto ou arena, o que é frequentemente relatado no teste de campo aberto (POHORECKY; SWEENEY; BUCKENDAHL, 2011). Nesse teste, o número de campos deslocados tem relação com o perfil psicoemocional da espécie, cuja maior emocionalidade se manifesta em ambientes amplos, já que os roedores, por instinto, se locomovem perto das paredes onde se sentem mais protegidos (DANIELS et al., 2004).

O teste de rota rod é realizado para avaliar a coordenação motora e equilíbrio do animal. O aparelho Rota Rod é especialmente sensível na detecção do efeito relaxante muscular de várias drogas, bem como disfunção cerebelar, verificando a força muscular / pega e a habilidade de coordenação motora de roedores (ARYAL; KAHAN, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o risco de instabilidade genômica e carcinogenicidade da exposição atmosférica crônica ao pó de cromo trivalente em *Rattus norvegicus*

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar alterações comportamentais e locomotoras sugestivas de toxicidade a partir da exposição atmosférica crônica ao pó de cromo trivalente em *Rattus norvegicus*;
- Caracterizar o perfil bioquímico e hematológico, bem como o peso de órgãos de *Rattus norvegicus* após exposição atmosférica crônica ao pó de cromo trivalente;
- Analisar alterações macroscópicas e histopatológicas em pulmão, fígado e rim de *Rattus norvegicus* após exposição atmosférica crônica ao pó de cromo trivalente;
- Determinar a atividade da catalase, superóxido dismutase e glutatona em sangue periférico de *Rattus norvegicus* a partir da exposição atmosférica crônica ao pó de cromo trivalente;
- Quantificar os níveis de peroxidação lipídica e nitritos em sangue periférico de *Rattus norvegicus* a partir da exposição atmosférica crônica ao pó de cromo trivalente;
- Mensurar os níveis e frequências de danos ao material genético em células da medula óssea de *Rattus norvegicus* após exposição atmosférica crônica ao pó de cromo trivalente;
- Examinar as frequências de apoptose, necrose e níveis de biomarcador de instabilidade genética (micronúcleos) em células da medula óssea de *Rattus norvegicus* após exposição atmosférica crônica ao pó de cromo trivalente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

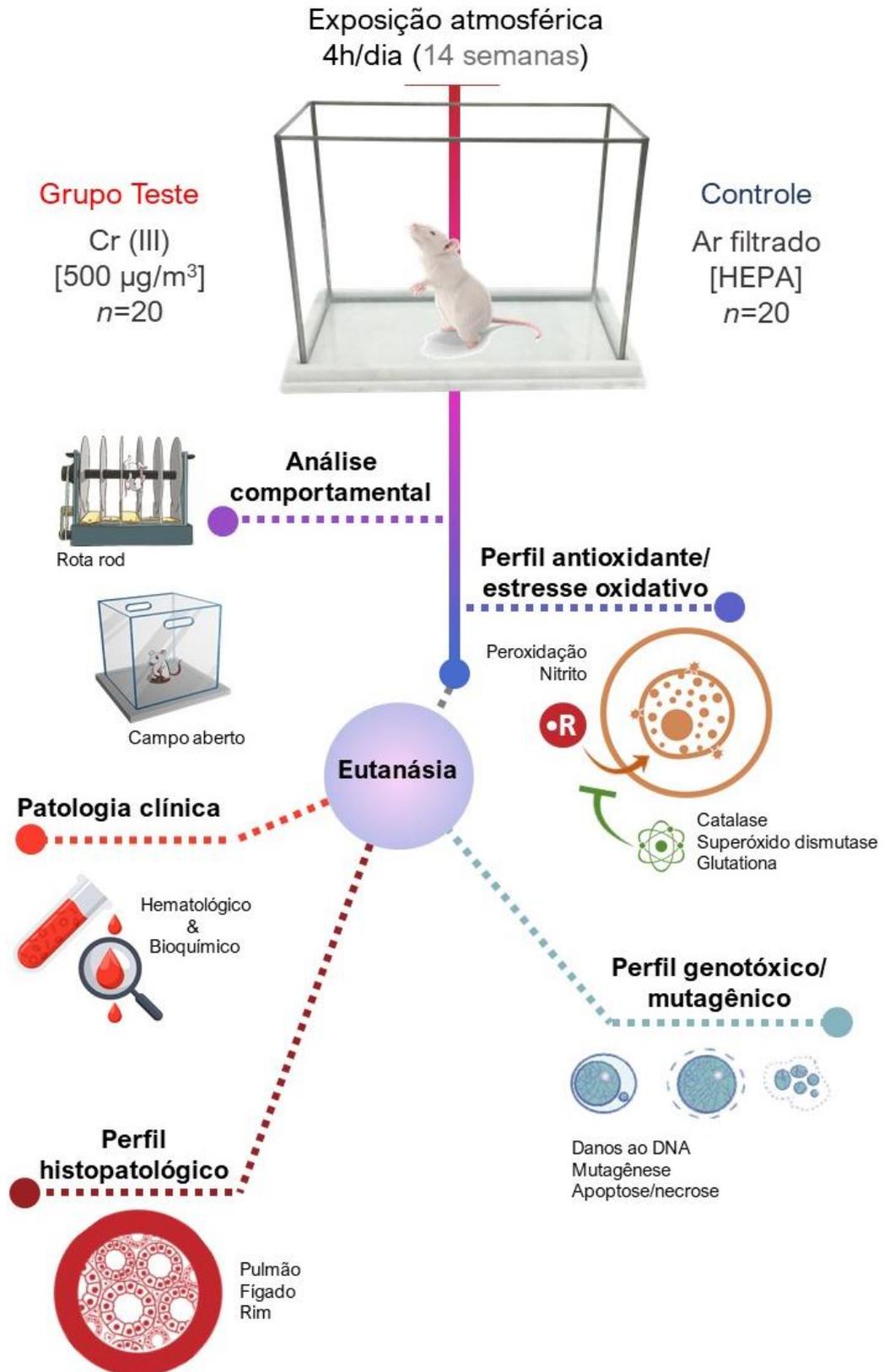
3.1 Animais experimentais

Foram utilizados neste estudo 40 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*), albinos, machos, adultos (8 semanas de idade), com peso aproximado de $200 \text{ g} \pm 40 \text{ g}$, obtidos do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual do Piauí. Os animais foram mantidos em caixas (máximo de 5 animais/caixa/gênero) de polipropileno com maravalha e em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (40-60%), ciclo claro/escuro de 12 h. Todos os animais receberam acesso *ad libitum* a *pellets* de Purina® e água. A quantidade de animais seguiu a regulamentação do Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará. Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais como modelo experimental foram conduzidos segundo as normas preconizadas no “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (*Institute of Laboratory Animals Resource, National Academy of Science, Washington, D.C., 1996*), pelos Princípios Éticos estabelecidos pela Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (2008) e pela Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008. O protocolo experimental foi apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará previamente aos experimentos.

3.2 Delineamento da exposição crônica ao pó de cromo (III)

Para avaliação dos efeitos carcinogênicos da exposição atmosférica crônica ao pó de cromo (III) na concentração de $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 20 animais foram mantidos em câmaras de inalação (5 animais/câmara) por 4 h diárias, por um período total de 14 semanas. O grupo controle foi constituído de 20 animais em exposição ao ar filtrado (HEPA). Por fim, concluído o período total de exposição, os animais foram sacrificados para condução de necropsia. Todos os animais foram verificados quanto aos sinais específicos de relevância toxicológica (discutidos nos tópicos a seguir), levando em consideração o período de pico dos efeitos antecipados após o período de inalação. Além disso, atenção especial foi dada ao desenvolvimento de tumores, bem como o tempo de início do tumor, localização, dimensões, aparência e progressão de cada tumor visível ou palpável, com auxílio de paquímetro digital, sendo sumariamente registrados. O delineamento experimental ilustrativo desta tese está demonstrado na **Figura 12**, a seguir.

Figura 12. Esquema estrutural do delineamento experimental.



3.3 Ambiente de exposição atmosférica ao pó de cromo (III)

A fim de simular um ambiente de exposição atmosférica ao pó de cromo (III), câmaras de inalação (70×40×40 cm) foram utilizadas neste estudo. Essas câmaras continham um gerador de pulverização de leito fluidizado (Modelo 3400, TSI Inc., St. Paul, MN), que produziu as partículas de aerossol de cromo (III) a uma taxa de fluxo de 9 L/min e concentração atmosférica de 500 µg/m³. A concentração do pó de cromo (III) teve como base as recomendações da *Agency for Toxic Substances & Disease Registry* (ATSDR, 2008). Apenas 5 animais foram inseridos nas câmaras a cada período de exposição.

3.4 Acompanhamento dos animais e avaliação toxicológica

3.4.1 Teste de campo aberto

O aparato do teste de campo aberto consistiu em uma caixa em acrílico (paredes transparentes e piso preto (diâmetro de 100 x 30 cm de altura), dividido em nove quadrados de iguais dimensões, com um disco central de 33 cm de diâmetro (ARCHER, 1973). Os ratos foram divididos, aleatoriamente, para avaliação de toxicidade. Imediatamente após o período de exposição diária, cada animal foi colocado individualmente no aparato e o número de cruzamentos com as quatro patas pelas divisões do aparato (atividade locomotora espontânea), frequência do comportamento de autolimpeza e número de levantamentos das patas dianteiras, sem apoiar-se nas paredes do aparato, foram computados. Após cada avaliação individual, o equipamento foi lavado com água e sabão, seguido de assepsia com álcool 70%. O campo aberto foi repetido a cada sete dias durante os tratamentos.

3.4.2 Teste de *rota rod*

Geralmente este teste é utilizado para a avaliação da coordenação motora e relaxamento muscular produzido por químicos em animais. Resumidamente, após um intervalo de 5 minutos, os animais testados no campo aberto foram submetidos ao *Rota rod*. Os ratos foram colocados com as quatro patas numa barra cilíndrica de aço inoxidável, com 25 mm de diâmetro, a uma velocidade de rotação de 17 rpm/min durante um período de 3 min. O tempo de permanência na barra em segundos e o número de quedas foram mensurados três vezes

(MACHADO et al., 2015). O *Rota rod* também foi repetido a cada sete dias durante os tratamentos.

3.5 Eutanásia e coleta dos órgãos

Os animais foram sacrificados ao final de 14 semanas de tratamento por sobredose de solução anestésica (pentobarbital sódico + xilazina [1:1], i.p.). O pulmão, fígado e rim foram, imediatamente, separados numa caixa de gelo. Os órgãos foram lavados com solução tampão fosfato-salino (PBS, pH 7.4), pesados e conservados em solução de formalina a 10%, até o início da análise histopatológica.

3.6 Análises bioquímica, hematológica e histopatológica

Para a análise bioquímica, o sangue do coração foi colhido logo após eutanásia dos animais e centrifugado a 4000 x g durante 5 min (a 4°C). O plasma foi submetido a uma análise bioquímica automática utilizando aparelho Labmax 240, com kits comerciais Labtest® para os seguintes parâmetros: ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Na avaliação hematológica, o número de eritrócitos, teor de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média foram determinados como séries vermelhas. Enquanto, o número de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos em séries brancas e plaquetas. A análise foi realizada em aparelho hematológico automático (Advia 120/Hematology Siemens). Para a análise histopatológica, os fragmentos de tecidos (pulmão, fígado e rim) foram fixados em formaldeído a 3,5% em tampão fosfato (pH 7.6), adicionado solução de sacarose a 1% e armazenados durante 12 h a 4°C até à sua utilização. A fixação foi processada durante 20 h, seguida por desidratação das peças em diluições crescentes de etanol/água (50, 70, 90 e 95% v/v). O material seco foi imergido em xileno PA e lavado duas vezes em parafina, antes de finalmente ser emblocado (BEHMER; TOLOSA; NETO, 1976). Os blocos obtidos foram seccionados (5 a 6 µM) em micrótomo e as secções distendidas em lâminas, de modo a serem submetidas à bateria de coloração. As secções distendidas foram desparafinizadas em três banhos sucessivos de xileno PA e desidratadas em diluições decrescentes de etanol, conforme supracitado. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (ELGENGAIHI et al., 2016) e finalmente, após lavagem e secagem, as lâminas foram cobertas por lamínulas com auxílio de bálsamo do Canadá. Os scores utilizados

para avaliar os fragmentos de pulmão quanto às alterações observadas foram – 0 = negativo; 1 = muito leve; 2 = leve; 3 = moderado; 4 = grave. Para o tecido hepático e renal, os scores utilizados na avaliação das alterações observadas foram – 0 = ausente; 1 = aumento discreto; 2 = aumento moderado; 3 = aumento marcadamente presente; 4 = aumento fortemente presente. O sistema de pontuação para classificar lesões pulmonares, hepáticas e renais foram baseados nos critérios estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Patologia e pela Sociedade Brasileira de Hepatologia (1999).

3.7 Determinação da atividade da catalase

Os homogenatos dos eritrócitos a 10% (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4) foram centrifugados (800 g, 20 min), e os sobrenadantes utilizados para ensaio de atividades da catalase (CAT). Foi preparado o meio reacional com H₂O₂ (18 mL) e tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM pH 8,0 (1,0 mL) e H₂O (0,8 mL). Em seguida, colocado na cubeta de quartzo 980 µL do meio reacional mais 20 µL do homogenato dos eritrócitos a 10% preparado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4. Por fim, realizou-se à leitura em espectrofotômetro durante 6 minutos em 230 nm. O branco consistiu na leitura na absorvância relativa a 230 nm com apenas 1 mL do meio reacional (CHANCE; MAEHLY, 1955). A concentração de proteínas foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951). Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína.

3.8 Determinação da atividade da superóxido dismutase

Os homogenatos dos eritrócitos a 10% (tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4) foram centrifugados (800 g, 20 min), e os sobrenadantes utilizados para ensaio de atividades da superóxido dismutase (SOD). Atividade da SOD foi testada por meio da taxa de redução do citocromo C pelos radicais superóxidos, utilizando o sistema xantina-xantina oxidase como fonte geradora de ânion superóxido (O₂⁻) (ARTHUR; BOYNE, 1985). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da atividade da SOD corresponde à inibição de 50% da reação do O₂⁻ com o citocromo C. Para a determinação da concentração de proteínas foi utilizado o método de Lowry e colaboradores (1951).

3.9 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada pelo ensaio acoplado de Paglia e Valentine (1967) utilizando hidroperóxido de t-butilo como substrato. A diminuição da NADPH foi registrada a 340 nm. Os resultados foram expressos em U/g de hemoglobina.

3.10 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida

A determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi baseada na reação de Ellman (5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) conforme algumas modificações da técnica descrita por Sedlak e Lindsay (1988). Em um tubo foi adicionado 400 µL do homogenato dos eritrócitos a 10% (tampão EDTA pH 5,4) e adicionado 320 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foi recolhido 400 µL do sobrenadante e acrescido de 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 µL de DTNB 0,01 M e, após 1 minuto de reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em 412 nm. A concentração foi expressa em mg/g de hemoglobina.

3.11 Determinação de peroxidação lipídica

O sangue com anticoagulante EDTA, colhido ao final de cada semana de exposição, foi centrifugado a 3000 rpm/4°C por 5 minutos, em seguida foi retirado o plasma e acrescentado solução gelada de NaCl (0,9%) para lavagem dos eritrócitos, seguida de nova centrifugação para retirada do sobrenadante. O procedimento anterior foi realizado por mais duas vezes para a obtenção dos eritrócitos e posterior diluição a 10% em tampão fosfato de sódio (50 mM pH 7,4). O homogenato a 10% (w/w) foi armazenado a -20°C. O grau de peroxidação lipídica foi mensurado por meio da determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), método previamente descrito por Draper e Hadley (1990). Dessa forma, 250 µL do homogenato a 10%, 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,67% foram adicionadas em um mesmo tubo e em seguida, a mistura foi agitada. Posteriormente, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente por 15 min, em seguida, resfriada em água corrente. Após o resfriamento, foi adicionada 2 mL de n-butanol, e em seguida agitada por 1 minuto. Após a agitação, a mistura foi centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos. A fase butanólica foi analisada em espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de

proteínas foi determinada (LOWRY et al., 1951). Os resultados foram expressos em nM/mg de proteína.

3.12 Determinação do conteúdo de nitrito

A dosagem do conteúdo de nitrito foi baseada na reação de Griess (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981) no qual, em um tubo branco foi adicionado 500 μ L do reagente de Griess, mais 500 μ L de água destilada (Branco). Em outro tubo teste foi adicionado 500 μ L do reagente de Griess mais 500 μ L do homogenato dos eritrócitos a 10% (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4) (Teste). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos em μ M/mg de proteína. O sangue utilizado neste experimento foi colhido ao final de cada semana de exposição.

3.13 Ensaio cometa

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por Speit e Hartmann (2005). O material celular (20 μ L) obtido da medula óssea de ambos os fêmures de cada animal foi misturado com uma fina camada de agarose *low melting point* 0,75% (180 μ L) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%. As lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso) por até 72 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH > 13) por 20 minutos e, logo em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0.90 V/cm) por 15 minutos em cuba de eletroforese. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7.5 e coradas com solução de prata. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD) ao material genético. O ID foi calculado por meio da fórmula: $ID = \Sigma$ (número de células em determinada classe de dano \times classe de dano). E FD pela seguinte fórmula: $FD = 100 - n^\circ$ de células em classe 0.

3.14 Teste de micronúcleos

O teste foi realizado de acordo com Moraes e colaboradores (2016). Resumidamente, amostras (100 μ L) de medula óssea de ambos os fêmures de cada animal foram colhidas e misturadas com 0,3 mL de soro bovino fetal e espalhados em lâminas. Os esfregaços

permaneceram em secagem durante 30 minutos à temperatura ambiente, sendo fixados em seguida com metanol durante 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0,2 M (pH 5,8). A quantificação de micronúcleos, células em apoptose e necrose foi realizada por meio de fotomicrografia com aumento de 1000× em microscópio óptico.

3.15 Análise estatística

A fim de determinar as diferenças entre os tratamentos, dados expressos como a média \pm desvio padrão foram comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey (considerando valores de $p < 0,05$ significantes), por meio do programa Graphpad (software intuitivo para a Ciência, San Diego, CA). Todos os estudos foram realizados em duplicata, a partir de avaliações biológicas independentes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação locomotora e comportamental

Durantes as 14 semanas de tratamento, nos grupos controle e exposto ao cromo (III), não foram evidenciadas alterações comportamentais sugestivas de toxicidade como modificação do frêmito vocal, ataxia, contorção e alteração de força ao agarrar. Também, não foram evidenciados sinais de irritabilidade ou redução do reflexo corneal, tremores, convulsões, hipnose, lacrimação, ptose palpebral, piloereção, cianose, hiperemia ou morte. Os dados do monitoramento comportamental (número de cruzamentos no campo aberto, movimento de autolimpeza e levantamento) e atividade locomotora (tempo de permanência na barra giratória e número de quedas da barra giratória), durante as semanas de exposição estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil comportamental e atividade locomotora dos animais.

Semanas de exposição/Grupos		Parâmetros comportamentais e atividade locomotora				
		Campo aberto			<i>Rota rod</i>	
		Cruzamento	Autolimpeza	Levantamento	TP(s)	NQ
S2	Cr (III)	83,2 ± 17,8	6,86 ± 2,13	16,0 ± 3,14	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Controle	81,4 ± 16,0	9,40 ± 1,20	17,0 ± 4,00	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
S4	Cr (III)	83,6 ± 13,4	11,4 ± 4,12	24,0 ± 6,50	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Controle	72,6 ± 14,3	10,2 ± 3,50	20,4 ± 5,07	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
S6	Cr (III)	76,6 ± 10,2	8,60 ± 3,32	22,0 ± 3,09	175,0 ± 3,16	0,00 ± 0,00
	Controle	73,4 ± 12,4	12,8 ± 2,16	16,4 ± 4,25	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
S8	Cr (III)	85,4 ± 11,0	14,2 ± 3,12	24,2 ± 4,80	178,2 ± 1,22	0,00 ± 0,00
	Controle	77,2 ± 8,29	14,0 ± 5,01	12,9 ± 6,24	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
S10	Cr (III)	80,0 ± 10,2	15,4 ± 6,08	17,4 ± 8,25	176,4 ± 2,14	0,00 ± 0,00
	Controle	72,5 ± 9,25	12,2 ± 5,40	20,8 ± 4,18	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
S12	Cr (III)	79,3 ± 8,26	14,0 ± 4,26	18,2 ± 3,87	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Controle	80,1 ± 9,37	15,2 ± 2,28	14,3 ± 2,89	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
S14	Cr (III)	76,1 ± 16,2	16,0 ± 5,48	23,0 ± 8,22	176,8 ± 1,83	0,00 ± 0,00
	Controle	74,7 ± 12,2	10,5 ± 3,12	16,3 ± 4,92	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Os valores representam a média ± E.P.M., n=40. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, $p > 0,01$, comparado com o grupo controle. Cr (III): cromo trivalente [$500 \mu\text{g}/\text{m}^3$]. Controle: ar filtrado [HEPA]. S: semana de exposição. TP: tempo de permanência na barra giratória. NQ: número de queda.

Os resultados supracitados sugerem que a exposição atmosférica ao cromo (III) $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ não é suficiente para induzir alterações comportamentais em ratos. Staniek (2019) em seu estudo destaca que a suplementação de cromo (III) $500 \text{mg}/\text{kg}$ em ratos Wistar também não produziu alterações comportamentais. Curiosamente, o metal atuou contra os efeitos negativos da deficiência de outros minerais como o ferro e cobre.

Já no estudo de Hegazy et al. (2021), realizou a instilação intranasal de dicromato de potássio por dois meses diminui significativamente a atividade motora de ratos com 3 níveis de dose usados ($0,125$; $0,25$ e $0,5 \text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$), conforme revelado pelos resultados do teste de atividade em gaiola. Por outro lado, essa deterioração da atividade motora dos ratos observada após um mês apenas nos grupos tratados com inPDC ($0,25$ ou $0,5 \text{mg} / \text{kg} / \text{dia}$).

A avaliação de parâmetros toxicológicos comportamentais pode fornecer conhecimentos de importância para a caracterização de alterações fisiológicas, hematológicas, bioquímicas e histopatológicas compatíveis com os efeitos tóxicos de potenciais contaminantes ambientais, substâncias químicas naturais ou sintéticas sob investigação em diferentes modelos, inclusive em estudos que envolvam mecanismos de instabilidade genômica e carcinogênese (ANVISA, 2013).

Hegazy et al. (2021) também observou que, no seu estudo, o dicromato de potássio intranasal não apresentou diferença significativa no tempo de equilíbrio gasto pelos ratos no teste do rotarod em comparação com suas leituras basais e também em comparação com o grupo controle normal. No entanto, após dois meses, em todas as doses, a coordenação motora dos ratos se deterioraram, e essa deterioração da atividade motora foi observada após um mês apenas nos grupos tratados (0,25 ou 0,5 mg/kg/dia).

4.2 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Após 14 semanas de exposição atmosférica ao cromo (III), não foram observadas alterações hematológicas induzidas pelo metal nos animais experimentais (Tabela 2). Por outro lado, os marcadores bioquímicos de função renal e hepática nos animais expostos ao cromo (III), apresentaram elevação ($p < 0,05$) dos níveis séricos de ureia ($59,4 \pm 7,26$), creatinina ($4,48 \pm 0,52$), alanina aminotransferase ($82,6 \pm 8,24$) e aspartato aminotransferase ($119,2 \pm 12,6$), comparados ao grupo controle ($32,2 \pm 6,30$; $0,40 \pm 0,05$; $60,8 \pm 2,22$; $78,2 \pm 4,25$, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil bioquímico e hematológico dos animais.

Parâmetros bioquímicos	Grupos	
	Controle	Cromo (III) 500 µg/m ³
Ureia (mg/dL)	32,2 ± 6,30	59,4 ± 7,26 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,40 ± 0,05	4,48 ± 0,52 ^a
ALT (IU/L)	60,8 ± 2,22	82,6 ± 8,24 ^a
AST (IU/L)	78,2 ± 4,25	119,2 ± 12,6 ^a
Parâmetros hematológicos		
<i>Série vermelha</i>		
HEM (10 ¹² /L)	9,80 ± 1,00	8,23 ± 0,77
HGB (g/dL)	14,7 ± 1,16	15,5 ± 1,34
HTC (%)	54,2 ± 3,27	54,2 ± 1,63
VCM (fL)	55,6 ± 4,41	66,3 ± 7,36
HCM (pg)	15,0 ± 1,09	19,0 ± 3,11
CHCM (g/dL)	27,1 ± 0,84	28,5 ± 1,66
<i>Série branca</i>		
Leucócitos (p/mm ³)	3252 ± 984,1	3090 ± 828,4
Neutrófilos (10 ⁹ /L)	9,78 ± 2,20	8,46 ± 2,80
Linfócitos (10 ⁹ /L)	74,2 ± 5,42	86,0 ± 5,02
Eosinófilos (10 ⁹ /L)	0,2 ± 0,05	0,1 ± 0,04
Monócitos (10 ⁹ /L)	0,50 ± 0,05	1,20 ± 0,05
<i>Outros</i>		
Plaquetas (10 ⁹ /L)	745,2 ± 40,6	812,4 ± 62,5

Os valores representam a média ± E.P.M., n=40. HEM: hemácias; HGB: hemoglobina, HTC: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, ^ap<0,01, comparado com o grupo controle.

Compostos de cromo quando ingeridos, especialmente na forma hexavalente, são eficientemente reduzidos para a forma trivalente (III) pelo suco gástrico (DE FLORA, et al., 1989), tendo como mediador desse processo, o ascorbato (ATSDR, 2000). Além disso, a forma hexavalente inalada pode ser reduzida para a forma trivalente no fluido epitelial do revestimento dos pulmões por ascorbato e glutathione (SUZUKI; FUKUDA, 1990). Standeven e Wetterhahn (1989) destacam que o cromo (VI) entra rapidamente nas células por difusão através de um

canal aniônico inespecífico, sendo reduzido para a forma trivalente no citoplasma celular; enquanto que para o cromo (III), as células são relativamente impermeáveis, o que pode justificar a ausência de alterações hematológicas observadas no presente estudo.

Além disso, levantamentos epidemiológicos apontam que o cromo total (56,9%) e o cromo hexavalente (78%) apresentam valores significativamente mais elevados no sangue de indivíduos ocupacionalmente expostos, comparados a indivíduos não expostos. No entanto, nenhuma alteração foi observada em diferentes parâmetros hematológicos ao comparar indivíduos expostos com não expostos, corroborando os resultados deste estudo (RAY, 2016). Apenas uma pequena variação pode ser observada e associada a uma pluralidade de fatores, além de possíveis efeitos da toxicidade do cromo (AHSAN; SHAKOORI; SHAKOORI, 2006).

Por outro lado, foi observado no presente estudo que o cromo (III) induziu alterações bioquímicas para marcadores de função hepática e renal nos animais expostos. Dados similares foram observados após a instilação intratraqueal de cloreto de cromo (CrCl_3) em coelhos. A exposição ao cromo resultou em sua absorção parcial no sangue e confinamento do material absorvido no plasma dos animais, com pequenas quantidades também depositadas no fígado e nos rins, demonstrando alterações dos marcadores de funções destes tecidos (WIEGAND; OTTENWÄLDER; BOLT, 1987).

No trabalho de Ogbomida et al. (2018) foi observado que ratos expostos ao cromo apresentaram um aumento significativo nas plaquetas, granulócitos e monócitos, enquanto os linfócitos e a largura de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) eram baixos. Os marcadores bioquímicos e redox dos perfis hepático e renal mostraram diminuição da alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) no fígado. A creatinina e a ureia nos rins também diminuem, enquanto as proteínas totais aumentam significativamente.

Além disso, estudos bioquímicos apontaram que alterações na concentração e atividade de algumas enzimas são expressivas em ambientes com elevada presença de cromo. Bozcaarmutlu e Arinc (2007) relataram que o cromo é um forte inibidor da atividade da Citocromo-P450-redutase em peixes, independentemente de seus estados de oxidação. Outro estudo, utilizando carpa indiana, destacou que o cromo não induz aumento nos marcadores alanina aminotransferase (ALT) ou aspartato aminotransferase (AST) em *Labeo rohita* (VUTUKURU et al., 2007). Por outro lado, níveis elevados de ALT e AST foram relatados para exposição ao cromo na CL_{50} de 61 mg/L por 24h e 96h de exposição. Assim, é evidente que o ambiente contaminado com cromo induz várias alterações bioquímicas, citológicas e fisiológicas, mesmo após uma exposição aguda (BAKSHIA; PANIGRAHI, 2018).

4.3 Peso de órgãos e análise histopatológica

O exame macro e microscópico de órgãos para avaliar os efeitos tóxicos de contaminantes tornou-se uma ferramenta vital na detecção precoce de alterações na morfologia tecidual. Esta ferramenta também tem sido utilizada como biomarcador para avaliar a toxicidade de vários poluentes (GURCAN et al., 2009).

No presente estudo, após 14 semanas de exposição atmosférica ao cromo (III), não foram observadas alterações do peso absoluto de órgãos (pulmão, fígado e rins) dos animais, comparados ao grupo exposto ao ar filtrado HEPA. Os valores dos pesos estão apresentados na Tabela 3. Também, nenhuma alteração macroscópica evidente foi observada nos tecidos supracitados. Doses elevadas (equivalentes a 100 mg Cr/kg/dia, durante 4 semanas) de cromo (III) também não afetaram a massa corporal, a razão de eficiência alimentar ou a massa de órgãos de ratos Wistar em exposição ao metal, conforme estudo de Wang et al., 2017.

Tabela 3. Perfil do peso absoluto de órgãos dos animais.

Órgãos	Controle	Cromo (III) 500 µg/m ³
Pulmão (g)	1,14 ± 0,08	1,24 ± 0,06
Fígado (g)	4,38 ± 0,80	4,69 ± 0,78
Rins (g)	1,25 ± 0,03	1,22 ± 0,08

Os valores representam a média ± E.P.M., n=40. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste. *p>0,05 comparado ao grupo controle.

Por outro lado, a análise histopatológica dos tecidos relevou alterações no tecido renal, hepático e pulmonar dos animais expostos ao cromo (III), comparado ao grupo controle. No tecido hepático dos animais expostos ao cromo (III), foi observado um grau leve (aumento discreto) de lesões nos hepatócitos, acompanhado de pequenas dilatações nos sinusoides (Figura 2B, asterisco), ao redor da veia central (Figura 2B, seta). Além disso, não foram observadas características histopatológicas de carcinoma ou hiperplasia, com ausência de áreas de necrose. Em sistemas biológicos, evidências apontam que metais podem afetar organelas e componentes celulares, como membrana celular, mitocondrial, lisossoma, retículo endoplasmático, núcleos e algumas enzimas envolvidas no metabolismo, desintoxicação e reparação de danos do DNA (WANG; SHI, 2011).

Os íons metálicos, em especial, podem interagir com componentes celulares, como DNA e proteínas nucleares, causando danos ao DNA e mudanças conformacionais que podem

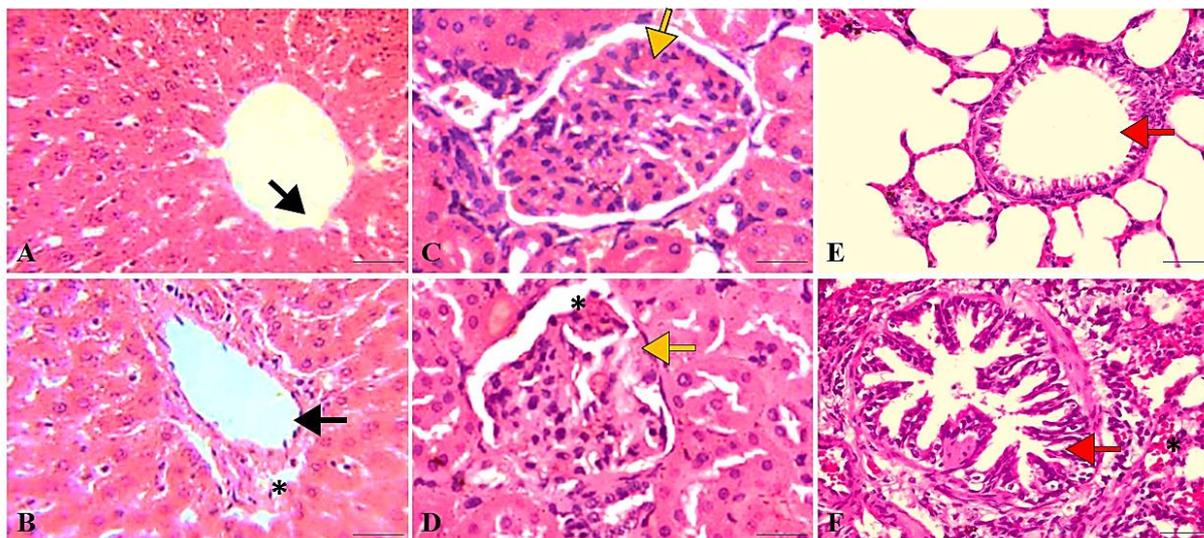
levar à modulação do ciclo celular, carcinogênese ou apoptose (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008). Nesse estudo, não foram evidenciadas alterações expressivas da histoarquitetura hepática dos animais expostos ao cromo (III).

Por outro lado, no tecido renal foi evidenciado obliteração da capsula de Bowman (Figura 2C, seta), com presença de hemorragia (Figura 2C, asterisco). Além disso, a análise histopatológica do pulmão revelou hiperplasia do epitélio bronquiolar (Figura 2F, seta), com infiltração de células leucocíticas peribronquiolares (Figura 2F, asterisco), indicando aumento leve-moderado de lesão do tecido pulmonar decorrentes da exposição ao cromo (III).

No estudo de Salama et al. (2016) foram evidenciadas lesões histopatológicas mais graves em tecidos pulmonares de ratos tratados com dicromato de potássio (2 mg/kg) intranasal, sob a forma de lesão aguda, reação inflamatória e alterações apoptóticas, acompanhadas de elevação de estresse oxidativo. As lesões pulmonares que foram demonstradas nos grupos tratados com o cromo, indicaram a penetração efetiva deste metal através da mucosa nasal e indução de toxicidade tecidual. Esses achados corroboram com os dados desta pesquisa e com os eventos observados nos estudos de Toya et al. (1999), que demonstraram inflamação alveolar e intersticial e formação de granulomas em ratos após a instilação intratraqueal de compostos de cromato. Em conjunto, estes dados ressaltam que o metal efetivamente induz irritabilidade ao trato respiratório e tecido mucoso (SCHNEIDER et al., 2012).

Diferentes estudos avaliaram os efeitos teciduais do cromo e seu potencial como agente carcinógeno, em especial, na forma de oxidação hexavalente. Por outro lado, o padrão de deposição de cromo (III) no trato respiratório, seu perfil toxicocinético e penetração celular, bem como seu provável efeito carcinogênico, ainda permanecem não esclarecidos e controversos (**Figura 13**) (URBANO; FERREIRA; ALPOIM, 2008; URBANO; FERREIRA; ALPOIM, 2012).

Figura 13. Alterações histopatológicas em fígado, rins e pulmão dos animais.



A: Secção hepática do grupo controle, mostrando arquitetura dos sinusoides preservadas, ao lado da veia central (seta). B: Secção hepática do grupo exposto ao cromo, mostrando leve dilatações nos sinusoides (asterisco) ao redor da veia central (seta). C: Secção renal do grupo controle, mostrando histoarquitetura glomerular normal (seta). D: Secção renal do grupo exposto ao cromo, mostrando obliteração da capsula de Bowman (seta) e presença de hemorragia (asterisco). E: Secção pulmonar do grupo controle, mostrando parênquima pulmonar normal com epitélio bronquiolar (seta) normal e alvéolos normais. F: Secção pulmonar do grupo exposto ao cromo, mostrando hiperplasia do epitélio bronquiolar (seta) com infiltração de células leucocíticas peribronquiolares (asterisco). $\times 40$.

É importante considerar que a exposição crônica tem papel fundamental nos processos de carcinogênese. No presente estudo, o período de exposição ao cromo (III) foi de 14 semanas, por via inalatória. É possível que um período maior de exposição ao metal possa apresentar resultados mais consolidados quantos aos danos teciduais e celulares, bem como outros mecanismos que colaboram para o desenvolvimento de carcinogênese, considerando que as formas mais biodisponíveis de cromo (III), podem contribuir para o desequilíbrio redox celular, induzindo a formação de radicais livres no citoplasma celular, e estes, por sua vez, possam interagir com o material genético, ocasionando instabilidade genômica e consequentemente, câncer (KE; COSTA, 2007; LEVINA; LAY, 2008).

4.4 Avaliação do perfil antioxidante

Os animais expostos ao pó de cromo (III) apresentaram elevação ($p < 0,05$) da atividade da enzima catalase em comparação ao grupo controle (Tabela 4). Na avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase foi observado também um aumento durante as semanas de exposição ao metal, comparado ao grupo controle, não exposto (Tabela 4).

Por outro lado, as concentrações de glutathiona reduzida nos eritrócitos dos ratos expostos ao cromo (III) apresentaram diminuição ($p < 0,05$) durante as semanas de tratamento, comparado ao grupo controle. Comportamento similar foi também observado para os níveis de glutathiona peroxidase (GPx) (Tabela 4) em eritrócitos de ratos expostos ao cromo (III). Cabe ressaltar que houve uma redução proeminente ($p < 0,05$) nos níveis de GPx ao final da 12^a e 14^a semanas de exposição ao cromo (III), comparado às demais semanas de exposição.

Tabela 4. Níveis de catalase, superóxido dismutase e glutaciona nos animais em exposição ao cromo (III) e ar filtrado (HEPA).

Semana de exposição/grupo		CAT	SOD	GPx	GSH
S2	Cr (III)	18,6 ± 4,02 ^a	2,78 ± 0,11 ^a	86,2 ± 12,4 ^a	22,8 ± 1,26 ^a
	Controle	11,2 ± 2,20	1,62 ± 0,08	185,6 ± 32,2	38,1 ± 7,24
S4	Cr (III)	21,7 ± 3,27 ^a	2,81 ± 0,14 ^a	91,2 ± 14,1 ^a	24,3 ± 2,40 ^a
	Controle	11,8 ± 1,98	1,65 ± 0,02	179,3 ± 29,5	36,1 ± 6,48
S6	Cr (III)	20,2 ± 6,89 ^a	2,69 ± 0,14 ^a	83,2 ± 13,9 ^a	21,0 ± 1,39 ^a
	Controle	12,4 ± 2,36	1,69 ± 0,06	174,2 ± 30,2	38,9 ± 9,21
S8	Cr (III)	24,1 ± 5,28 ^a	2,86 ± 0,10 ^a	90,5 ± 9,2 ^a	18,4 ± 3,74 ^a
	Controle	13,6 ± 3,50	1,70 ± 0,06	182,1 ± 26,8	40,2 ± 6,82
S10	Cr (III)	22,4 ± 3,87 ^a	2,74 ± 0,16 ^a	82,2 ± 12,8 ^a	19,3 ± 3,02 ^a
	Controle	14,1 ± 4,08	1,68 ± 0,10	181,0 ± 23,1	32,7 ± 10,0
S12	Cr (III)	26,3 ± 3,24 ^a	2,77 ± 0,10 ^a	75,4 ± 10,8 ^b	17,8 ± 4,80 ^a
	Controle	16,9 ± 3,17	1,65 ± 0,04	179,6 ± 28,9	37,3 ± 8,12
S14	Cr (III)	25,3 ± 2,66 ^a	2,85 ± 0,13 ^a	65,4 ± 13,6 ^b	14,7 ± 3,12 ^a
	Controle	13,0 ± 4,23	1,71 ± 0,08	174,2 ± 30,2	39,0 ± 9,18

Os valores representam a média ± E.P.M., n=40. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, ^ap<0,01, comparado com o grupo controle. ^bp<0,01 comparado a todas as semanas de exposição ao cromo (III). CAT: catalase (µM/mg de proteína). SOD: Superóxido dismutase (µM/mg de proteína). GPx: glutaciona peroxidase (U/g de hemoglobina). GSH: glutaciona redutase (U/g de hemoglobina) S: semana de exposição. Cr (III): cromo trivalente [500 µg/m³]. Controle: ar filtrado [HEPA].

As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem causar danos oxidativos aos organismos e, assim, desempenhar um papel importante em muitas doenças, como envelhecimento, artrite, aterosclerose, enfisema e câncer (MITRA et al., 2019). A maneira mais eficaz de eliminar as EROs são por meio dos antioxidantes. Os organismos vivos desenvolveram sistemas antioxidantes complexos para combater as EROs e para reduzir seus efeitos adversos. A soma de antioxidantes representa a atividade antioxidante total de um sistema. Esses sistemas antioxidantes incluem enzimas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e GPx; e macromoléculas, como albumina, ceruloplasmina, ferritina e outras substâncias, a exemplo do ácido ascórbico, glutaciona reduzida, α-tocoferol e β-caroteno (LI; JIA; TRUSH, 2016).

A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação de radicais superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, atuando como importante agente antioxidante (YOUNUS, 2018). O peróxido de hidrogênio, espécie reativa não radicalar, é posteriormente convertido em oxigênio molecular e água pela CAT (MARTINS; ENGLISH, 2014). Por sua vez, a GPx catalisa a redução de hidroxiperóxidos, incluindo peróxido de hidrogênio e produtos de peroxidação lipídica, por meio da glutatona reduzida (GSH), finalmente protegendo as células contra os danos oxidativos. A SOD em conjugação com CAT e GPx eliminam os radicais intracelulares e extracelulares, bem como inibem a peroxidação lipídica induzida por radicais hidroxila (RODRÍGUEZ-SUREDA, 2015).

Alguns estudos se concentraram na citotoxicidade induzida por metais via mecanismos oxidativos (SALAMA; HEGAZY; HASSAN, 2016; VALKO et al., 2016). A formação de EROs mediada por metais pode causar várias modificações nas bases do DNA, maior peroxidação lipídica e alterações na homeostase celular (RAY; HUAN; TSUJI, 2012). Alguns desses elementos são ferro, cromo, níquel e molibdênio. Um estudo relatou que o cromo (III) induziu estresse oxidativo no cérebro, fígado e rim de peixes (VELMA; TCHOUNWOU, 2010). As EROs podem reagir com o DNA (formando adutos cromo-DNA e ligações cruzadas DNA-DNA), bem como com várias organelas celulares, a exemplo de microfilamentos, mitocôndrias e lisossomos (O'BRIEN; CERYAK; PATIERNO, 2003).

O estudo desenvolvido por Terpilowska e Siwicki (2019), em culturas celulares de hepatocarcinoma HepG2 e fibroblastos de embriões de camundongo A31, apontaram que a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx estavam baixas, sendo insuficientes para neutralizar os radicais hidroxila gerados pelo cromo (III) e ferro (III). Os radicais hidroxila podem interagir com lipídios e induzir a formação de peróxido lipídico (ROOH) e produtos derivados da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA).

Ressalta-se que a SOD e CAT não podem neutralizar os produtos da peroxidação lipídica. No presente estudo, as enzimas antioxidantes (CAT e SOD) se elevaram, provavelmente, em resposta à grande quantidade de radicais hidroxila formados pelo cromo (III). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Długosz et al. (2012) e Chen et al. (2007). Além disso, foi possível observar que a atividade de GPx estava baixa, sendo incapaz de neutralizar esses produtos. Terpilowska e Siwicki (2019) aponta que, provavelmente, com o aumento da concentração de MDA, ocorre uma diminuição também da atividade de GPx.

A produção de EROs é considerada um possível mecanismo de toxicidade, que pode levar a danos no DNA (AshaRani et al., 2009). Foi evidenciado que o Cr (III) também pode

gerar EROs intracelulares quando examinados pelo corante permeável à célula DCFDA, indicando assim que o estresse oxidativo pode ser o mecanismo primário para sua toxicidade (SANAPATI et al., 2015).

O Cr (III) é um metal de transição capaz de ativar a reação de Fenton (CHAGAS et al., 2019). Os resultados Staniek et al (2010). confirmam que o Cr(III) é capaz de gerar EROs, o que levaria ao potencial genotóxico, podendo induzir inúmeras lesões no DNA, que levam à deleção, mutação e dano oxidativo ao DNA.

4.5 Avaliação do perfil de peroxidação lipídica e níveis de nitrito

Os resultados da análise de marcadores de estresse oxidativo evidenciaram um aumento ($p < 0,01$) nos níveis basais de malonaldeído e nitrito nos eritrócitos de ratos expostos ao cromo (III), comparados aos ratos do grupo controle. Ressalta-se que os marcadores apresentaram aumento a cada semana de avaliação, conforme os dados apresentados na Tabela 5. No entanto, também foi possível observar que houve um aumento proeminente dos níveis de MDA na última semana de exposição ao cromo (III), comparado às demais semanas de exposição, bem como ao grupo controle.

Tabela 5. Níveis dos marcadores de peroxidação lipídica e nitrito.

Semanas/grupo		MDA (nM/mg de proteína)	NO ₂ ⁻ (µM/mg de proteína)
S2	Cr (III)	1,40 ± 0,20 ^a	1,23 ± 0,05 ^a
	Controle	0,42 ± 0,05	0,15 ± 0,22
S4	Cr (III)	4,76 ± 0,68 ^a	1,81 ± 0,02 ^a
	Controle	0,50 ± 0,02	0,12 ± 0,10
S6	Cr (III)	3,26 ± 0,86 ^a	1,45 ± 0,15 ^a
	Controle	0,36 ± 0,04	0,14 ± 0,16
S8	Cr (III)	4,62 ± 0,42 ^a	1,39 ± 0,18 ^a
	Controle	0,47 ± 0,10	0,17 ± 0,10
S10	Cr (III)	6,22 ± 0,58 ^a	1,46 ± 0,14 ^a
	Controle	0,51 ± 0,12	0,12 ± 0,14
S12	Cr (III)	6,84 ± 0,58 ^a	2,16 ± 0,14 ^a
	Controle	0,60 ± 0,21	0,20 ± 0,05
S14	Cr (III)	11,98 ± 0,65 ^b	2,79 ± 0,07 ^a
	Controle	0,54 ± 0,08	0,15 ± 0,12

Os valores representam a média ± E.P.M., n=40. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, ^ap<0,01, comparado com o grupo controle. ^bp<0,01 comparado a todas as semanas de exposição ao cromo (III). MDA: malondialdeído. NO₂⁻: Nitrito. S: semana de exposição. Cr (III): cromo trivalente [500 µg/m³]. Controle: ar filtrado [HEPA].

O aumento simultâneo do estresse oxidativo e diminuição dos sistemas antioxidantes indica riscos para o desenvolvimento de neoplasias (PANDE et al., 2011). Muitos estudos descrevem que as espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) e espécies reativas derivadas de nitrogênio (ERNs) estão envolvidas na etiologia e progressão de vários tipos de cânceres (RALPH et al., 2010; ROCKENBACH et al., 2011; VALLEJO et al., 2013). Estas ERNs têm sido associadas ao desenvolvimento da carcinogênese por mecanismos que envolvem danos ao DNA, contribuindo para o surgimento de mutações e aberrações cromossômicas em diferentes tecidos (GUPTA et al., 2012). É importante destacar que a redução de cromo (VI) para cromo (III) resulta na formação de intermediários reativos, levando a lesões celulares e danos oxidativos em diversos tecidos (PATLOLLA et al., 2009).

O malondialdeído (MDA) é o produto resultante da peroxidação induzida por radicais livres em ácidos graxos poliinsaturados das membranas, sendo este um importante indicador de

estresse oxidativo (BADJATIA et al., 2010). O aumento das concentrações plasmáticas de MDA no soro, bem como no câncer de pulmão de pacientes já foi relatado por vários autores (GÖNENÇ et al., 2001 OTSMANE et al., 2018; ZABŁOCKA-SŁOWIŃSKA et al., 2019). Os resultados deste estudo demonstram uma elevação de MDA nos animais expostos ao cromo (III) em comparação ao grupo controle, corroborando os estudos anteriores que sugerem um aumento da peroxidação lipídica em situações de estresse oxidativo e câncer de pulmão.

Cabe ressaltar que este estudo avaliou o estresse oxidativo em nível celular, evidenciado a sua importância quando associado aos marcadores do metabolismo lipídico, de forma similar aos resultados obtidos no estudo de Terpilowska e Siwicki (2019), que observaram a indução de estresse oxidativo pelo cromo (III) em fibroblastos de embriões de camundongos e células de carcinoma hepático. Além disso, o estudo de Fatima et al. (2017) demonstrou aumentos na concentração de MDA acompanhados de níveis reduzidos de SOD e GSH em rins e cérebro de ratos Wistar, expostos a nanopartículas de óxido de cromo em relação ao grupo controle, destacando que o padrão de toxicidade é claramente dependente da dose e duração da exposição ao cromo.

Níveis elevados de ERNs, alteração no balanço redox e sinalização redox desregulada são características comuns da progressão do câncer e da quimiorresistência (KAMM et al., 2019). Há evidências demonstrando que o óxido nítrico, nitrito e nitrotirosina estão aumentados em pacientes com câncer de pulmão. Os efeitos destas moléculas na biologia tumoral são amplos, abrangendo seu envolvimento na transformação celular, formação de lesões neoplásicas e iniciação e regulação da cascata metastática (SZILI et al., 2018). Também, participam de eventos genotóxicos (ROJAS-WALKER et al., 1995), podendo mediar lesões ao DNA, pela modificação direta do DNA ou pela inibição dos mecanismos de reparo do DNA (FOLKES; O'NEILL, 2013).

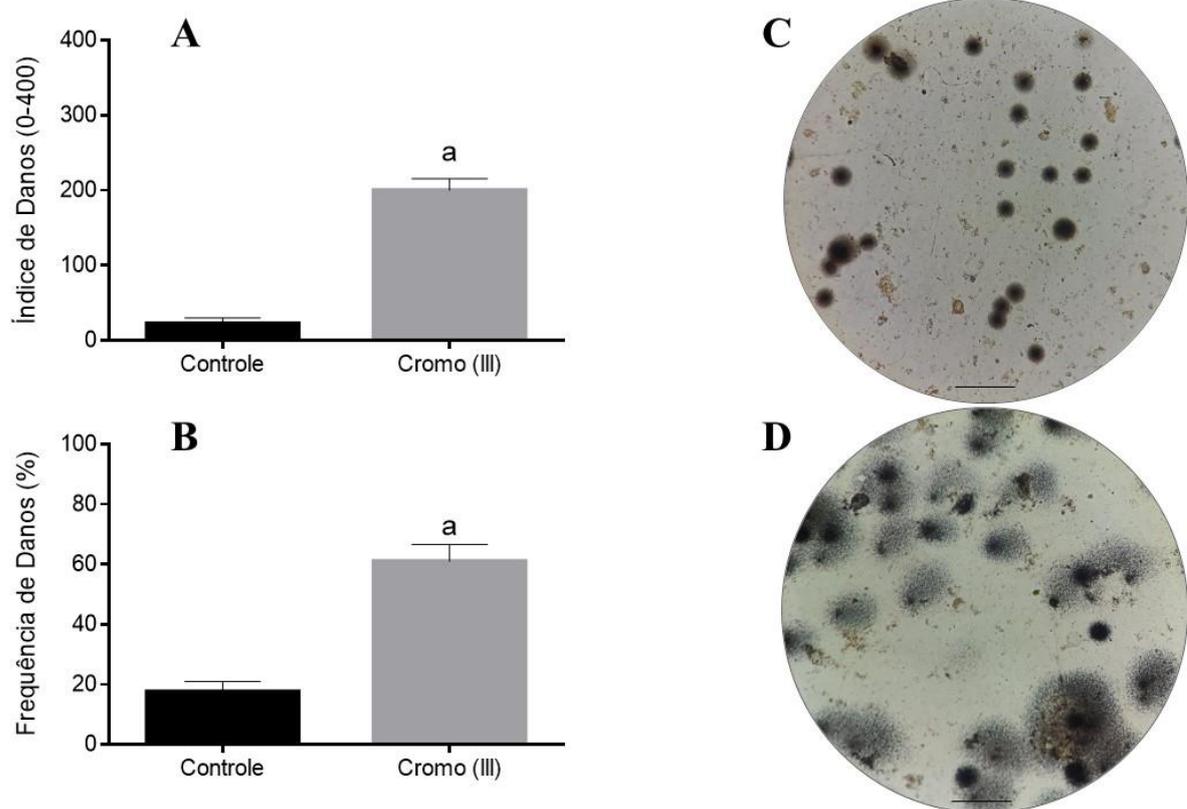
Os ERNs podem induzir quebras da fita de DNA, bem como produzir diferentes tipos de mutações no DNA. No presente estudo foi verificado um aumento semelhante nos níveis de NO_2^- determinado pelo método de Griess. Além disso, níveis elevados de nitrito foram relacionados ao estresse oxidativo e danos ao DNA (CHENG et al., 2019).

4.6 Investigação dos danos ao DNA

Após 14 semanas de exposição ao cromo (III), foi evidenciado aumento ($p < 0,05$) do nível e frequência de danos ao DNA de células nucleadas da medula óssea dos ratos, comparado ao grupo controle (Figura 14A e B). Além disso, o perfil fotomicrográfico das células dos

animais expostos ao cromo apresentou nucleoides com extensa fragmentação do material genético (Figura 14D).

Figura 14. Perfil do nível e frequência de danos ao DNA de células da medula óssea de ratos expostos ao cromo (III) $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e ao ar filtrado (HEPA).



A: índice de danos ao DNA. B: frequência de danos ao DNA. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA, Tukey). C: perfil fotomicrográfico das células de medula óssea dos animais do grupo controle (expostos ao ar filtrado, HEPA). D: perfil fotomicrográfico das células de medula óssea dos animais expostos ao cromo (III). $\times 40$.

Curiosamente, os estudos que consideram o efeito do cromo (III) *in vivo* são amplamente negativos em relação aos resultados genotóxicos (EASTMOND; MACGREGOR; SLESINSKI, 2008). No entanto, alguns relatos apontaram a ocorrência de ligações cruzadas de DNA-proteína detectadas em hepatócitos de ratos F344, expostos ao cromato de potássio durante 3 semanas (COOGAN et al., 1991). Além disso, dados de estudos que relacionam risco ocupacional e exposição crônica ao cromo, indicam genotoxicidade (por meio de quebras das fitas de DNA) e eventos mutagênicos, pela indução de instabilidade genômica (SBRANA et al., 1990; MEDEIROS et al., 2003; MEIBIANA et al., 2008; AMARAL et al., 2015). Outros

relatos sugerem que a exposição ao cromo (III) a longo prazo aumenta o risco de cânceres (MANCUSO, 1997).

Wang et al. (2017) também observou genotoxicidade a partir da suplementação dietética com um complexo de propionato de cromo (III) em ratos Wistar fêmeas, utilizando o ensaio cometa em linfócitos de sangue periférico dos animais expostos. O cromo trivalente combina-se com várias macromoléculas, incluindo material genético dentro do citosol, expondo seu perfil citotóxico e por vezes mutagênico (BAKSHIA; PANIGRAHI, 2018). Além disso, resultados *in vivo* sugerem que o cromo (III) induz danos ao DNA e mutagenicidade em leveduras e células Jurkat, ressaltando seu potencial genotóxico. Estes dados fornecem evidências inequívocas dos efeitos genotóxicos induzidos por compostos de cromo (III) (FANG et al., 2014).

O Cr (III) apresenta genotoxicidade devido à sua distinta solubilidade em água, cobrindo uma ampla gama de testes de efeitos genéticos e relacionados. Compostos de Cr (VI), dicromatos e cromatos de potássio, sódio e amônio, trióxido de cromo e cromatos de cálcio induzem danos ao DNA, mutação genética, troca de cromátides irmãs, aberração cromossômica e células transformação. Mutações letais dominantes foram observadas em uma variedade de sistemas de teste em células humanas e animais em cultura e em animais experimentais que são expostos *in vivo* a diferentes compostos de cromo (ARUNACHALAM; ANNAMALAI; KURUVA, 2013; AHMED et al., 2013).

O mecanismo de genotoxicidade do Cr (III) é devido ao mesmo ser utilizado como produto de redução intracelular após sua penetração na célula. Cr (VI) é rapidamente absorvido pelas células através do sistema de transporte de sulfato, e é prontamente reduzido à forma trivalente por redutores celulares, como ácido ascórbico, glutathione e flavoenzimas, incluindo citocromo P-450, glutathione redutase e riboflavina, e induz efeitos genotóxicos. Na presença de glutathione, foi demonstrado que o Cr (III) produz adutos de DNA genotóxico que inibem a replicação do DNA e são altamente mutagênicos por natureza. (SELLAPPA et al., 2010; LOU et al., 2013).

O complexo de cromo com niacina presente no grânulo de fibra estável não induziu genotoxicidade em um teste de micronúcleo realizado com camundongos. Uma avaliação de toxicidade oral de 28 dias dependente da dose de SFG para ratos não revelou efeitos significativos na mortalidade, peso corporal, pesos de órgãos selecionados e comportamento. Avaliações de hematologia, bioquímica clínica e histopatologia não mostraram efeitos adversos em ratos tratados com 5000mg/kg por dia (WU et al., 2018).

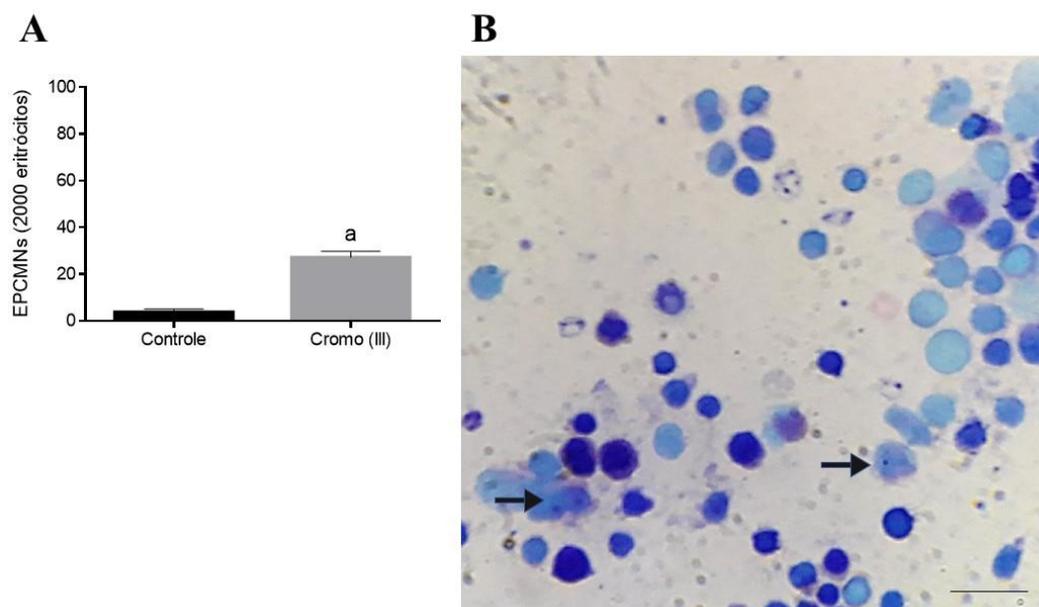
O dano ao DNA pode induzir a morte celular ou a carcinogênese, conseqüentemente perturbando as funções celulares normais. No estudo de Saud Alarifi; Alkahtani (2016) os autores encontraram efeitos prejudiciais ao DNA causados pelo Cr (III) em células L929 usando o teste do cometa, que identifica quebras de fita dupla e simples em danos mínimos ao DNA.

Tais resultados corroboram também com Singh et al (2016) o ensaio do cometa foi avaliado por sua capacidade de detectar DNA danificado por oxidação in vitro induzido pelo Cr(III) e o estudo mostrou que o método pode detectar aumento dependente da dose no dano em ambas linhagens celulares.

4.7 Perfil de mutagenicidade e morte celular

Os resultados a partir da avaliação mutagênica (evidenciada pela frequência de micronúcleos em células da medula óssea) apontam que os ratos em exposição atmosférica ao pó de cromo (III) $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ apresentaram elevada ($p < 0,05$) frequência de micronúcleos (Figura 15) em eritrócitos policromáticos, comparado ao grupo controle.

Figura 15. Perfil mutagênico em células da medula óssea de ratos expostos ao cromo (III) 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e ao ar filtrado (HEPA).



A: nível de micronúcleos em 2000 eritrócitos policromáticos de medula óssea. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA, Tukey). B: perfil fotomicrográfico da medula óssea de animais expostos ao cromo (III), apresentando micronúcleos (seta). $\times 100$.

Os danos genotóxicos com intensidade superior desencadeiam instabilidade genômica não reparada juntamente com genotoxicidade extensa e, a nível cromossômico/molecular, podem causar mutações no DNA (ZHANG et al., 2014). Estes eventos decorrem de rearranjo cromossômico ou perda, bem como não disjunção, resultando na formação de micronúcleos (BHATIA; KUMAR 2013).

Os micronúcleos podem ser formados ao longo da eritropoiese em roedores adultos (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Na medula, eritroblastos que excluem o núcleo após 6 h da mitose final, originam eritrócitos policromáticos (EPC), células basófilas que contém RNA no citoplasma. Os EPC sofrem um processo de maturação, originando os eritrócitos normocromáticos (ENC), com coloração mais opaca (MAVOURNIN et al., 1990). Assim, os agentes clastogênicos e/ou aneugênicos são capazes de originar fragmentação cromossômica ou perdas cromossômicas, durante a divisão destas células, que não estarão integradas no núcleo da célula filha, resultando em micronúcleo. A elevada frequência de EPC micronucleados sugere dano cromossômico (FENECH; MORLEY, 2001).

Além disso, a interação com a ligação fosfodiéster do DNA (adutos de cromo-DNA) é uma das mais abundantes lesões genéticas induzidas por cromo em células de mamífero e uma

das principais hipóteses de mecanismos de mutagenicidade deste composto (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008). Além disso, Fang e colaboradores (2014) demonstraram que o cromo (III) interfere com os pares de bases do DNA, levando à clivagem e degradação do material genético. Estas evidências harmonizam com os resultados do presente estudo.

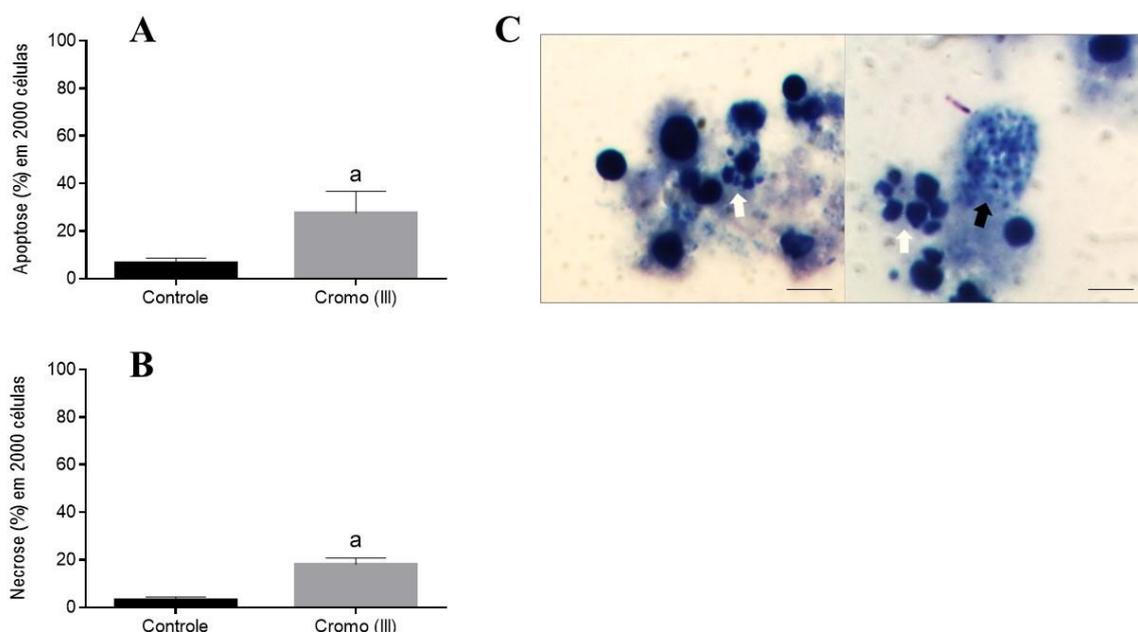
A partir da exposição a agentes genotóxicos e mutagênicos, como o cromo (III), a célula sofrerá parada do ciclo celular, como ponto de verificação e correção de danos ao DNA. Como consequência dos danos genéticos irreparáveis, a célula será eliminada por meio da ativação de mecanismos de morte, como apoptose (MOBAHAT et al., 2014).

Vários relatos demonstram o papel crítico da apoptose em desordens induzidas por metais, tais como neurotoxicidade, distúrbios auto-imunes, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e carcinogênese (RANA, 2008; TCHOUNWOU et al., 2012; JAISHANKAR et al., 2014). Por outro lado, a ineficiência do sistema de reparação poderá desenvolver resistência à morte celular, levando a uma sobrevivência celular a longo prazo, processo comum na carcinogênese (GOLDAR et al., 2015).

A apoptose é um mecanismo de suicídio celular geneticamente regulado que desempenha um papel essencial no desenvolvimento e na defesa de organismos multicelulares. As células apoptóticas são geralmente caracterizadas por uma série de características morfológicas, moleculares e bioquímicas (HAYASHI et al., 2004). No estudo de Senapati (2015) utilizando o Cr(III), mudanças morfológicas foram evidentes em células apoptóticas como condensação nuclear e fragmentação foi observada por microscópio de fluorescência, enquanto as células de controle eram redondas e saudáveis. A alteração no potencial da membrana mitocondrial também é conhecida por ser um evento precoce na apoptose.

Neste estudo, o cromo (III) $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ induziu aumento de apoptose e necrose em células da medula óssea de ratos, comparado ao grupo controle (Figura 16). Resultados similares foram identificados por Balamurugan et al. (2002) em células do sangue. A apoptose induzida por cromo (III) em linfócitos foi mediada através da produção de EROs, que por sua vez ativaram tirosina-quinases da família Src, associadas aos mecanismos de apoptose. Além disso, células A549 de carcinoma pulmonar humano e células HaCaT de queratinócitos humanos expostas a nanopartículas de óxido de cromo (III), apresentaram aumento no nível de EROs e ativação de sistemas de defesa antioxidante. A exposição destas células desencadeou na ativação de caspase-3, mediador de morte celular, resultando em uma diminuição da viabilidade celular e aumento de apoptose (HORIE et al., 2013).

Figura 16. Percentual de apoptose e necrose em células de medula óssea de ratos expostos ao cromo (III) $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e ao ar filtrado (HEPA). A: percentual de apoptose em 2000 células de medula óssea. B: percentual de necrose em 2000 células de medula óssea. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA, Tukey). C: perfil fotomicrográfico da medula óssea de animais expostos ao cromo (III), apresentando apoptose (seta branca) e necrose (seta preta). $\times 100$.



No estudo de Catelas et al. (2005) onde foram colocados macrófagos expostos a cromo III a apoptose foi predominante após 24 h nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 ppm. No entanto, altas concentrações (300, 400 e 500 ppm) induziram principalmente necrose após 48 h nos macrófagos expostos ao cromo.

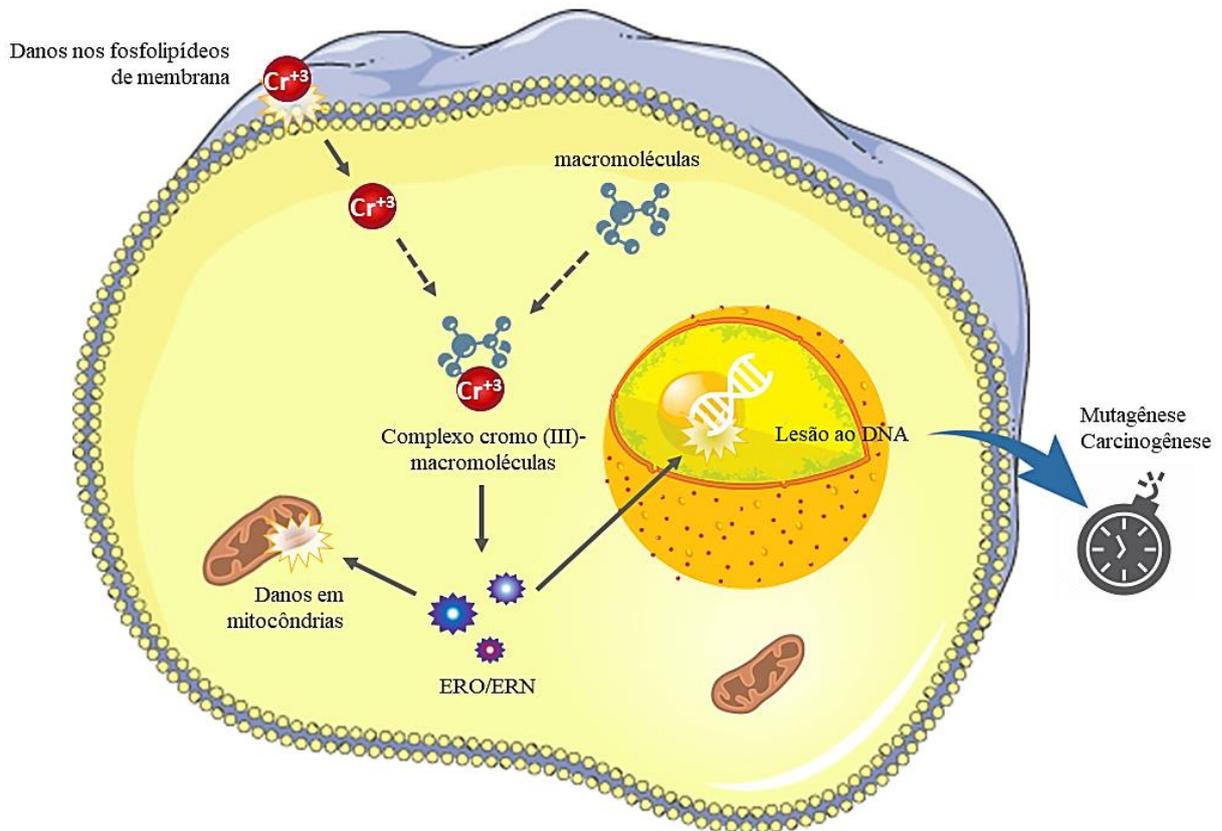
Também, análises de vários marcadores de danos celulares; isto é, atividade mitocondrial, integridade nuclear e estresse oxidativo demonstraram que o hidróxido de acetato de cromo, forma química de cromo (III) originário de processos industriais, testado em células Hep-2, interage diretamente com organelas subcelulares induzindo apoptose e necrose (RUDOLF; CERVINKA, 2003).

Catelas et al. (2005) observou que macrófagos de camundongos expostos *in vitro* ao cromo (III) 500 ppm por 48 h apresentaram elevada porcentagem de células em necrose, comparado à apoptose. Este estudo demonstrou que a citotoxicidade nos macrófagos induzida por cromo (III) depende da duração de sua exposição, o que aponta para o potencial desse metal em induzir danos aos tecidos por necrose, se presentes em grandes concentrações *in vivo*.

As evidências apresentadas nos tópicos anteriores destacam que o cromo (III) na concentração atmosférica de $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ tem potencial para induzir danos oxidativos, que por

sua vez resultam em danos ao material genético, contribuindo para instabilidade genômica, o que pode favorecer o desenvolvimento de neoplasias. Os possíveis mecanismos envolvidos no processo de instabilidade genômica e carcinogênese estão sumarizados na Figura 17.

Figura 17. Possíveis mecanismos de instabilidade genômica e carcinogenicidade induzida pelo cromo (III) em microambiente tecidual.



O Cr (VI) sofre redução para Cr (III) por agentes redutores; as espécies reativas de Cr (III) produzidas durante o ataque a macromoléculas causam citotoxicidade e danos genéticos (COSTA E KLEIN, 2006). Múltiplas vias celulares podem reparar o DNA danificado por Cr: reparo de quebra de fita dupla de DNA (DSB), reparo de incompatibilidade, reparo de excisão de nucleotídeo acoplado à transcrição, entre outros (WISE et al., 2008). Um mecanismo de dano ao DNA induzido por cromo é através da formação de adutos de Cr-DNA iniciados por Cr (III) que ocorrem preferencialmente em di-nucleotídeos GG e inibem a replicação de DNA e a transcrição de RNA, podendo levar ao processo mutagênico e carcinogênico (LOU et al., 2021).

5 CONCLUSÃO

A exposição crônica ao pó de cromo (III) $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ induziu alterações da função hepática, evidenciadas pelo aumento de ALS e AST, bem como alterações na função renal, por meio da elevação de ureia e creatinina. A análise histopatológica relevou leve alterações nos sinusoides hepáticos, no entanto, em rins foi evidenciado processo inflamatório e obliteração da cápsula de Bowman. No pulmão, o cromo (III) induziu inflamação e hiperplasia do epitélio bronquiolar. O metal também produziu aumento das enzimas catalase e superóxido dismutase, mas reduziu os níveis de glutathione peroxidase e redutase. Além disso, o cromo (III) elevou os níveis de malondialdeído e nitritos nos eritrócitos dos animais. Danos genotóxicos foram também caracterizados pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA de células da medula óssea, acompanhados pelo aumento de micronúcleos. Por fim, evidenciou-se elevação da frequência de apoptoses e necroses em células de medula óssea. Estes dados em conjunto apontam que a exposição ao cromo (III) tem potencial para ocasionar instabilidade genômica, por mecanismos envolvidos com o estresse oxidativo. Estes efeitos, por sua vez, estão diretamente relacionados com o processo de carcinogênese.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, T.K. et al. Activation of gene expression by metal-responsive signal transduction pathways. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 5, p. 813-817, 2002.
- AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical Chemistry**, v. 238, p. 1-7, 2018.
- AHILA ANGELIN, J.; STEVEN JONES, R. D.; SAM MANOHAR DAS, S. Pre and post treatment toxicity of chrome plating industry effluent to *Poecilia reticulata* Peter 1859. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 2, n. 4, p. 153-156, 2015.
- AHMAD, P. et al. Exogenous application of nitric oxide modulates osmolyte metabolism, antioxidants, enzymes of ascorbate-glutathione cycle and promotes growth under cadmium stress in tomato. **Protoplasma**, v. 255, n. 1, p. 79-93, 2018.
- AHMED, M. K. et al. Chromium (VI) induced acute toxicity and genotoxicity in freshwater stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p. 64-70, 2013.
- AHSAN, M.M.; SHAKOORI, F.R.; SHAKOORI, A.R. Biochemical and Haematological Abnormalities in Factory Workers Exposed to Hexavalent Chromium in Tanneries of Kasur District. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 38, n. 3, p. 239-253, 2006.
- AL-BULUSHI, S.; SHAWAF, T.; AL-HASANI, A. Some hematological and biochemical parameters of different goat breeds in Sultanate of Oman "A preliminary study". **Veterinary world**, v. 10, n. 4, p. 461, 2017.
- AL-SALEH, I.; ABDULJABBAR, M. Heavy metals (lead, cadmium, methylmercury, arsenic) in commonly imported rice grains (*Oryza sativa*) sold in Saudi Arabia and their potential health risk. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220, n. 7, p. 1168-78, 2017.
- ALI, S. S. et al. Understanding oxidants and antioxidants: classical team with new players. **Journal of food biochemistry**, v. 44, n. 3, p. e13145, 2020.
- ALKADI, H. A review on free radicals and antioxidants. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 20, n. 1, p. 16-26, 2020.
- AMARAL, F.P. et al. Cytogenetic evaluation of tannery workers in the city of Teresina, northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18799-807, 2015.
- ANDELKOVIĆ, M. et al. Hematological and biochemical parameters in elite soccer players during a competitive half season. **Journal of medical biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 460-466, 2015.
- ANDRÉS-MANZANO, M. J.; ANDRÉS, V.; DORADO, B. Oil red O and hematoxylin and eosin staining for quantification of atherosclerosis burden in mouse aorta and aortic root. In: **Methods in Mouse Atherosclerosis**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 85-99.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos.** Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia, Brasília, DF, p. 1–48, 2013.

APPLE, D J. et al. Complications of intraocular lenses. A historical and histopathological review. **Survey of ophthalmology**, v. 29, n. 1, p. 1-54, 1984.

ARCARO, S. et al. MWCNTs produced by electrolysis of molten carbonate: Characteristics of the cathodic products grown on galvanized steel and nickel chrome electrodes. **Applied Surface Science**, v. 466, p. 367-374, 2019.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ARITA, A; COSTA, M. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. **Metallomics**, v. 1, n. 3, p. 222-228, 2009.

ARTHUR, J.R.; BOYNE, R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. **Life Sciences**, v. 36, n. 16, p. 1569-1575, 1985.

ARUNACHALAM, K. D.; ANNAMALAI, S. K.; KURUVA, J. K. Avaliação in vivo de danos ao DNA induzidos por cromo hexavalente por ensaio de cometa alcalino e estresse oxidativo em *Catla catla*. **American Journal of Environmental Sciences**, v. 9, n. 6, p. 470, 2013.

ARYAL, D.; KHAN, N. Anxiolytic and Motor Coordination activity of ethanolic and aqueous extracts of *Dendrophthoe falcata* leaves in mice. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10 p. 1753–1760, 2014.

ASHARANI, P. V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS nano**, v. 3, n. 2, p. 279-290, 2009.

ATIENZAR, F. A.; NICOLAS, J. Prediction of human liver toxicity using in vitro assays: limitations and opportunities. In: **Drug-induced liver toxicity**. Humana, New York, NY, 2018. p. 125-150.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Chromium**. U.S. Department of Health and Human Services; Washington, DC: 2012.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Chromium**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2008.

AUNG, T. et al. Uterine lipoleiomyoma: a histopathological review of 17 cases. **Pathology international**, v. 54, n. 10, p. 751-758, 2004.

AZQUETA, A. et al. Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 783, p. 108288, 2020.

AZQUETA, A. et al. DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 781, p. 71-87, 2019.

BAKSHI, A.; PANIGRAHI, A. K. A comprehensive review on chromium induced alterations in fresh water fishes. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 440-447, 2018.

BALAMURUGAN, K. et al. Chromium(III)-induced apoptosis of lymphocytes: death decision by ROS and Src-family tyrosine kinases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 12, p. 1622-1640, 2002.

BANCROFT, J. D.; LAYTON, C. The hematoxylin and eosin. **Bancroft's theory and practice of histological techniques**, p. 173-186, 2012.

BÁNFALVI, G. **Heavy metals, trace elements and their cellular effects**. In: BÁNFALVI, G.; editor. Cellular Effects of Heavy Metals. New York: Springer; 2011. p. 3–28.

BARCELOUX, D.G.; BARCELOUX, D. Chromium. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v 37, n. 2, 1999.

BASU, A.K. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, pii: E970, 2018.

BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; NETO, A.G.F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Livraria Editora Ltda; 1976.

BENVINDO-SOUZA, M et al. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. **Chemosphere**, v. 240, p. 124910, 2020.

BEYERSMANN, D. Effects of carcinogenic metals on gene expression. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1-3, p. 63-8, 2002.

BEYERSMANN, D. Interactions in metal carcinogenicity. **Toxicology Letters**, v. 72, n. 1-3, p. 333-338, 1994.

BLASIAK, J.; KOWALIK, J. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. **Mutation Research**, v. 469, n. 1, p. 135-45, 2000.

BOZCAARMUTLU, A.; ARINC, E. Effect of mercury, cadmium, nickel, chromium and zinc of kinetic properties of NADPH-cytochrome P450 reductase purified from leaping mullet (*Lizasaliens*) **Toxicology In Vitro**, v. 21, n. 3, p. 408-416, 2007.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, **Hoboken**, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018

BROWNING, C. L.; SPEER, R. M.; WISE, J. P. Molecular mechanisms of chromium-induced carcinogenesis. In: **Essential and Non-essential Metals**. Humana Press, Cham, 2017. p. 143-180.

CARDOSO, A.P.F.; BANERJEE, M.; NAIL, A.N.; LYKOIDI, A.; STATES, C. miRNA dysregulation is an emerging modulator of genomic instability. **Seminars in Cancer Biology**, *In Press*, 2021.

CASSANO, A. et al. Integrated membrane process for the recovery of chromium salts from tannery effluents. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 21, p. 6825-6830, 2007.

CASTRO, M. D. A hematoxylin-eosin phloxine stain for tissues embedded in glycol methacrylate. **Journal of Histotechnology**, v. 8, n. 1, p. 23-24, 1985.

CATELAS, I.; PETIT, A.; VALI, H.; FRAGISKATOS, C.; MEILLEUR, R.; ZUKOR, D. J.; HUK, O. L. Quantitative analysis of macrophage apoptosis vs. necrosis induced by cobalt and chromium ions in vitro. **Biomaterials**, v. 26, p. 2441–2453, 2005.

ÇAYIR, S. et al. Segmentation of the main structures in hematoxylin and eosin images. In: **2018 26th Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU)**. IEEE, 2018. p. 1-4.

CENINI, G.; LLORET, A.; CASCELLA, R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from a mitochondrial point of view. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

CHAGAS, P. M. B. et al. Use of an environmental pollutant from Hexavalent chromium Removal as a Green catalyst in the fenton process. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

CHAHAL, A. et al. Natural antioxidants as defense system against cancer. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 11, n. 5, p. 38-44, 2018.

CHAN, J. K.C. The wonderful colors of the hematoxylin–eosin stain in diagnostic surgical pathology. **International journal of surgical pathology**, v. 22, n. 1, p. 12-32, 2014.

CHANCE, B., MAEHLY, A.C. Assay catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-768, 1955.

CHAPPELL, G. A.; WIKOFF, D. S.; THOMPSON, C. M. Assessment of mechanistic data for hexavalent chromium-induced rodent intestinal cancer using the key characteristics of carcinogens. **Toxicological Sciences**, v. 180, n. 1, p. 38-50, 2021.

CHARAMES, G.S.; BAPAT, B. Genomic instability and cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 3, n. 7, p. 589-96, 2003.

CHEN, F; SHI, X. Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 1, p. 105-121, 2002.

CHEN, L. et al. Interaction of chromium(III) or chromium(VI) with catalase and its effect on the structure and function of catalase: An in vitro study. **Food Chemistry**, v. 244, p. 378-385, 2018.

CHEN, Q.Y.; DESMARAIS, T.; COSTA, M. Metals and mechanisms of carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 59, 537–554, 2019.

CHENG, C.H. et al. Effect of nitrite exposure on oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mud crab (*Scylla paramamosain*). **Chemosphere**, v. 239, p. 124668, 2019.

CHERVONA, Y.; ARITA, A.; COSTA, M. Carcinogenic metals and the epigenome: understanding the effect of nickel, arsenic, and chromium. **Metallomics**, v. 4, n. 7, p. 619-27, 2012.

CHOI, H. D. et al. Dual role of reactive oxygen species in autophagy and apoptosis induced by compound PN in prostate cancer cells. **Molecular & Cellular Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 41-50, 2021.

COSTA, M.; KLEIN, C.B. Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, n. 2, p. 155-63, 2006.

COSTA, M.; KLEIN, C.B. Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, p. 155-163, 2006.

CULLEN, J.M.; WARD, J.M.; THOMPSON, C.M. Reevaluation and classification of duodenal lesions in B6C3F1 mice and F344 rats from 4 studies of hexavalent chromium in drinking water. **Toxicologic Pathology**, v. 44, n. 2, p. 279-89, 2016.

CUNHA, L.R. Estresse oxidativo: avaliação in vitro da capacidade moduladora do Resveratrol em células da linhagem Neuro 2-A. 2018.

DANIELS, W.M.U.; PIETERSEN, C.Y.; CARSTENS, M.E.; STEIN, D.J. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. **Metabolic Brain Disease**, v. 19, p. 3–14, 2004.

DAS, A.P; MISHRA, S. Hexavalent chromium (VI): environment pollutant and health hazard. **Journal of Environmental Research and Development**, v. 2, n. 3, p. 386-392, 2008.

DAS, PRATYUSH KUMAR; DAS, BIDYUT PRAVA; DASH, PATITAPABAN. Hexavalent chromium induced toxicity and its remediation using macrophytes. **Pollution Research**, v. 36, p. 92-98, 2017.

DE FLORA, S; WETTERHAHN, K.E. Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. **Life Chemistry Reports**, v. 7, p. 169-244, 1989.

DE FLORA, S. et al. Lack of genotoxic effects in hematopoietic and gastrointestinal cells of mice receiving chromium(VI) with the drinking water. **Mutation Research**, v. 659, n. 1-2, p. 60-67, 2008.

DE HOLANDA MARQUES, J. P. et al. Atypical glandular cells and cervical cancer: systematic review. **Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)**, v. 57, n. 2, p. 229-233, 2011.

DESMARIAS, T. L.; COSTA, M. Mechanisms of chromium-induced toxicity. **Current Opinion in Toxicology**, v. 14, p. 1-7, 2019.

DHARMARAJA, A. T. Role of reactive oxygen species (ROS) in therapeutics and drug resistance in cancer and bacteria. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 8, p. 3221-3240, 2017.

DŁUGOSZ, A. et al. Influence of chromium on the natural antioxidant barrier. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, n. 2, p. 331-335, 2012.

DOMAZETOVIC, V. et al. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 209, 2017.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

EASTMOND, D.A; MACGREGOR, J.T; SLESINSKI, R.S. Trivalent Chromium: Assessing the Genotoxic Risk of an Essential Trace Element and Widely Used Human and Animal Nutritional Supplement. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, p. 173-190, 2008.

ELGENGAIHI, S. et al. Hepatoprotective Efficacy of Cichorium intybus L. Extract Against Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage in Rats. **Journal of Dietary Supplements**, v. 13, n. 5, p. 570-84, 2016.

ERENPREISA, J.; CRAGG, M.S. Cancer: a matter of life cycle? **Cell Biology International**, v. 31, n. 12, p. 1507-1510, 2007.

FANG, Z. et al. Genotoxicity of tri- and hexavalent chromium compounds in vivo and their modes of action on DNA damage in vitro. **PLoS One**, v. 9, e103194, 2014.

FATIMA, R. et al. Chromium oxide nanoparticle–induced biochemical and histopathological alterations in the kidneys and brain of Wistar rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 33, n. 12, p. 1-11, 2017.

FELDMAN, A. T.; WOLFE, D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. In: **Histopathology**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 31-43.

FENECH, M; FERGUSON, L. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. **Mutation Research**, v. 475, p. 1-6, 2001.

FINCH, L.E.; HILLYER, M.M.; LEOPOLD, M.C. Quantitative analysis of heavy metals in children's toys and jewelry: a multi-instrument multitechnique exercise in analytical chemistry and public health. **Journal of Chemical Education**, v. 92, p. 849-54, 2015.

FISHER, C. et al. VIVD: virtual in vitro distribution model for the mechanistic prediction of intracellular concentrations of chemicals in in vitro toxicity assays. **Toxicology in Vitro**, v. 58, p. 42-50, 2019.

FLOOR, S.L.; DUMONT, J.E.; MAENHAUT, C.; RASPE, E. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, pp. 509-515, 2012.

FOLKES, L.K.; O'NEILL, P. Modification of DNA damage mechanisms by nitric oxide during ionizing radiation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 58, p. 14-25, 2013.

GHANI, A. Effect of chromium toxicity on growth, chlorophyll and some mineral nutrients of *Brassica juncea* L. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 9-15, 2011.

GIACOMELLI, M. G. et al. Virtual hematoxylin and eosin transillumination microscopy using epi-fluorescence imaging. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0159337, 2016.

GOLEMIS, E.A.; SCHEET, P.; BECK, T.N.; SCOLNICK, E.M.; HUNTER, D.J.; HAWK, E.; HOPKINS, N. Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States. **Genes & Development**, v. 32, n. 13-14, p. 868-902, 2018.

GÖNENÇ, A. et al. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 26, n. 2, p. 141-144, 2001.

GRAHAM, T.A.; SOTTORIVA, A. Measuring cancer evolution from the genome. **Journal of Pathology**, v. 241, p. 183-191, 2017.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

GRIMSRUD, T.K.; ANDERSEN, A. Unrecognized risks of nickel-related respiratory cancer among Canadian electrolysis workers. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v. 38, n. 6, p. 503-15, 2012.

GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, L; SLASKA, B. Mitochondrial DNA and carcinogenesis (review). **Molecular Medicine Reports**, v. 6, n. 5, p. 923-930, 2012.

GUO, Q. et al. Oxidative stress, nutritional antioxidants and beyond. **Science China Life Sciences**, v. 63, n. 6, p. 866-874, 2020.

GUPTA, D. K. et al. (Ed.). **Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants**. Berlin: Springer International Publishing, 2018.

GURCAN, M. N. et al. Histopathological image analysis: A review. **IEEE reviews in biomedical engineering**, v. 2, p. 147-171, 2009.

GURCAN, M.N. et al. Histopathological Image Analysis: A Review. **IEEE Reviews in Biomedical Engineering**, v. 2, p. 147-171, 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARIKRISHNAN, R.; RANI, M. N.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 41-50, 2003.

HARRIS, G.K; SHI, X. Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. **Mutation Research**, v. 533, n. 1-2, p. 183-200, 2003.

HAYASHI, Y.; KONDO, T.; ZHAO, Q.-L.; OGAWA, R.; CUI, Z.-G.; FERIL, L. B.; KASUYA, M. Signal transduction of p53-independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 197, p. 96–106, 2004.

HAYES, R.B. The carcinogenicity of metals in humans. **Cancer Causes Control**, v. 8, n. 3, p. 371-85, 1997.

HEGAZY, R.; MANSOUR, D.; SALAMA, A.; HASSAN, A.; SALEH, D. Exposure to intranasal chromium triggers dose and time-dependent behavioral and neurotoxicological defects in rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 216, p. 1-10, 2021.

HOLMES, A.L; WISE, J.P. Sr Mechanisms of Metal-Induced Centrosome Amplification. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, p. 1687-1690, 2010.

HOLMES, A.L; WISE, S.S; WISE, J.P. Sr Carcinogenicity of hexavalent chromium. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, p. 353-372, 2008.

HOMA, D; HAILE, E; WASHE, A.P. Determination of Spatial Chromium Contamination of the Environment around Industrial Zones. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2016, p. 7214932, 2016.

HORIE, M. et al. Chromium(III) oxide nanoparticles induced remarkable oxidative stress and apoptosis on culture cells. **Environmental toxicology**, v. 28, n. 2, p. 61-75, 2013.

HU, G. et al. Circulating lead modifies hexavalent chromium-induced genetic damage in a chromate-exposed population: An epidemiological study. **Science of The Total Environment**, v. 752, p. 141824, 2021.

HUMPHRIES, B.; WANG, Z.; YANG, C. The role of microRNAs in metal carcinogen-induced cell malignant transformation and tumorigenesis. **Food Chemistry Toxicology**, v. 98, p. 58–65, 2016.

IGL, B.W. et al. The rat bone marrow micronucleus test: statistical considerations on historical negative control data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 102, p. 13-22, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2020.

ISLAM, F.; QIAO, B.; SMITH, R.A.; GOPALAN, V.; LAM, A.K. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 98, pp. 184-191, 2015.

ISMAIL, G. A. et al. In vitro potential activity of some seaweeds as antioxidants and inhibitors of diabetic enzymes. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 681-691, 2019.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-1078, 2009.

JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M.; WILLIAMS, P. L. Em Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications; Williams, P. L.; James, R. C.; Roberts, S. M., eds.; 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 2000, cap. 1.

JIANG, Y. et al. Effect of Fluorescent Proteins on Fusion Partners Using Polyglutamine Toxicity Assays in Yeast. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 141, 2018.

JOMOVA, K; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2-3, p. 65-87, 2011.

KAMM, A. et al. Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield. **Nitric Oxide**, v. 93, p. 102-114, 2019.

KAYA, A. et al. Removal of Cr (VI) through calixarene based polymer inclusion membrane from chrome plating bath water. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 141-149, 2016.

KE, Q; COSTA, M. **Overview of chromium (III) toxicology**. In: Vincent JB, editor. The Nutritional Biochemistry of Chromium (III) Elsevier; Amsterdam: 2007. p. 257-263.

KIM, J; BAE, J.S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 6058147, 2016.

KIM, J.; SEO, S.; KIM, Y.; KIM, D.H. Review of carcinogenicity of hexavalent chrome and proposal of revising approval standards for an occupational cancers in Korea. **Annals of Occupational and Environmental Medicine**, v. 30, p. 1-5, 2018.

KIM, Y.S; KIM, Y.J; SEO, Y.R. An Overview of Carcinogenic Heavy Metal: Molecular Toxicity Mechanism and Prevention. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 4, p. 232-240, 2015.

KIRTONIA, A.; SETHI, G.; GARG, M. The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-25, 2020.

KOEDRITH, P. et al. Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 5, p. 587-598, 2013.

KÖNEN-ADIGÜZEL, S.; ERGENE, S. In vitro evaluation of the genotoxicity of CeO₂ nanoparticles in human peripheral blood lymphocytes using cytokinesis-block micronucleus test, comet assay, and gamma H2AX. **Toxicology and industrial health**, v. 34, n. 5, p. 293-300, 2018.

KOPPEN, G. et al. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 32, n. 3, p. 397-408, 2017.

- KOPPEN, G.; AZQUETTA, A.; POURRUT, B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A.R.; LANGIE, S.A.S. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 32, n. 3, p. 397-408, 2017.
- LAI, T. T.; YANG, C.M.; YANG, C.H. Astaxanthin protects retinal photoreceptor cells against high glucose-induced oxidative stress by induction of antioxidant enzymes via the PI3K/Akt/Nrf2 pathway. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 729, 2020.
- LAL, R; SINGH, R. C. Investigations of tribodynamic characteristics of chrome steel pin against plain and textured surface cast iron discs in lubricated conditions. **World Journal of Engineering**, 2019.
- LAM, P.-L. et al. The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: An updated mini review. **Chemico-Biological Interactions**, v. 320, p. 109023, 2020.
- LANGÅRD, S. One hundred years of chromium and cancer: a review of epidemiological evidence and selected case reports. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 17, n. 2, p. 189-215, 1990.
- LEBEDEV, S.; GAVRISH, I. A.; GUBAYDULLINA, I. Z. Different chrome sources influence on morphobiochemical indicators and activity of digestive enzymes in wistar rats. **Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]**, v. 54, n. 2, p. 304-315, 2019.
- LEE, J.D.; CAI, Q.; SHU, X.O.; NECHUTA, S.J. The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. **Journal of Women's Health**, v. 26, p. 467-482, 2017.
- LEONARD, S.S; BOWER, J.J; SHI, X. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 255, n. 1-2, p. 3-10, 2004.
- LI, R.; JIA, Z.; TRUSH, M.A. Defining ROS in Biology and Medicine. **Reactive Oxygen Species (Apex)**, v. 1, n. 1, p. 9-21, 2016.
- LIANG, Y. et al. Heavy Metal Contamination and Health Risk Assessment in the Vicinity of a Tailing Pond in Guangdong, China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 12, pii: E1557, 2017.
- LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical interventions in aging**, v. 13, p. 757, 2018.
- LIU, K.; ZHENG, J.; CHEN, F. Effects of washing, soaking and domestic cooking on cadmium, arsenic and lead bioaccessibilities in rice. *J Sci Food Agric*. 2018 Aug;98(10):3829-3835. doi: 10.1002/jsfa.8897. Epub 2018 Mar 12.
- LÓPEZ-LÁZARO, M. The stem cell division theory of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 123, n. 1, p. 95-113, 2018.

- LORENZO, J. M. et al. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. **Trends in food science & technology**, v. 79, p. 136-147, 2018.
- LORIA, D.; BARRIOS, E.; ZANETTI, R. Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 25, p. 530-539, 2009.
- LOU, J. et al. DNA damage and oxidative stress in human B lymphoblastoid cells after combined exposure to hexavalent chromium and nickel compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 533-540, 2013.
- LOU, J.; YU, S.; FENG, L.; GUO, X.; WANG, M.; BRANCO, A.T.; LI, T.; LEMOS, B. Environmentally induced ribosomal DNA (rDNA) instability in human cells and populations exposed to hexavalent chromium [Cr (VI)]. **Environment International**, v. 153, p. 1-11, 2021.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with follin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUO, T. et al. Enhanced visualization of hematoxylin and eosin stained pathological characteristics by phasor approach. **Analytical chemistry**, v. 89, n. 17, p. 9224-9231, 2017.
- LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. 131, 2013.
- LUZZATI, T.; PARENTI, A.; RUGHI, T. Economic Growth and Cancer Incidence. **Ecological Economics**, v. 146, p. 381-396, 2018.
- MACHADO, K.C. et al. Anticonvulsant and behavioral effects observed in mice following treatment with an ester derivative of ferulic acid: Isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 273-9, 2015.
- MARTINS, D.; ENGLISH, A.M. Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. **Redox Biology**, v. 2, p. 308-313, 2014.
- MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.
- MATZENBACHER, C. A. et al. DNA damage induced by coal dust, fly and bottom ash from coal combustion evaluated using the micronucleus test and comet assay in vitro. **Journal of hazardous materials**, v. 324, p. 781-788, 2017.
- MEDEIROS, M.G. et al. Elevated levels of DNA-protein crosslinks and micronuclei in peripheral lymphocytes of tannery workers exposed to trivalent chromium. **Mutagenesis**, v. 18, p. 19-24, 2003.
- MEIBIANA, Z. et al. Investigating DNA damage in tannery workers occupationally exposed to trivalent chromium using comet assay. **Mutation Research**, v. 654, p. 45-51, 2008.

- MEKKI, A.; SAYADI, S. Study of heavy metal accumulation and residual toxicity in soil saturated with phosphate processing wastewater. **Water Air Soil Pollut**, v. 228, n. 6, p. 215, 2017.
- MESSINA, M. J. et al. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. **Nutrition and cancer**, v. 21, n. 2, p. 113-131, 1994.
- MIGLIORATI, C. et al. Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. **Supportive Care in Cancer**, v. 21, n. 1, p. 333-341, 2013.
- MIHAILOVIĆ, M. et al. The Influence of Plant Extracts and Phytoconstituents on Antioxidant Enzymes Activity and Gene Expression in the Prevention and Treatment of Impaired Glucose Homeostasis and Diabetes Complications. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 480, 2021.
- MIKOCZY, Z; HAGMAR, L. Cancer incidence in the Swedish leather tanning industry: Updated findings 1958-99. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 62, p. 461-4, 2005.
- MISHRA, M. et al. Tracing the tracks of genotoxicity by trivalent and hexavalent chromium in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 722, n. 1, p. 44-51, 2011.
- MITRA, S. et al. Impact of ROS Generated by Chemical, Physical, and Plasma Techniques on Cancer Attenuation. **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 7, p. 1030, 2019.
- MOHANTY, M.; KUMAR, PATRA, H. Effect of ionic and chelate assisted hexavalent chromium on mung bean seedlings (*Vigna Radiata* l. Wilczek. Var k-851) during seedling growth. **JSPB**, v. 9, n. 2, p. 232-241, 2013.
- MØLLER, P. et al. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature Protocols**, v. 15, n. 12, p. 3817-3826, 2020.
- MØLLER, P. The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2018.
- MORAES, G. P. et al. Cytogenotoxic and Oxidative Status Evaluation of *Morinda citrifolia*. **International Archives of Medicine**, v. 9, p. 1-13, 2016.
- MORIS, D. et al. The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. **Annals of Translational Medicine**, v. 5, n. 16, 2017.
- MOURA, L. K. et al. Integrative review on oral cancer. **Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online**, v. 6, n. 5, p. 164-175, 2014.
- MWINYIHIJA, M. **Ecotoxicological Diagnosis in the Tanning Industry**. Berlin, Germany: Springer, 2010.

MWINYIHIJA, M. et al. An ecotoxicological approach to assessing the impact of tanning industry effluent on river health. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 3, p. 316-324, 2006.

MWINYIHIJA, M. et al. Biosensor based toxicity dissection of tannery and associated environmental samples. **Journal of the American Leather Chemists Association**, v. 100, n. 12, p. 481-490, 2005.

National Toxicology Program (NTP). NTP toxicology and carcinogenesis studies of chromium picolinate monohydrate (CAS No. 27882-76-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). **National Toxicology Program Technical Report Series**, v. 556, p. 1-194, 2010.

NAUMOVA, M. G.; MOROZOVA, I. G.; BORISOV, P. V. Investigating the features of color laser marking process of galvanic chrome plating in order to create a controlled color image formation at given marking. **Materials Today: Proceedings**, v. 19, p. 2405-2408, 2019.

NICKENS, K.P; PATIERNO, S.R; CERYAK, S. Chromium genotoxicity: A double-edged sword. **Chemical Biological Interact**, v. 188, n. 2, p. 276-288, 2010.

NIKITAKI, Z. et al. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. 35, 2015.

O'BRIEN, T.J.; CERYAK, S.; PATIERNO, S.R. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. **Mutation Research**, v. 533, p. 3-36, 2003.

OGBOMIDA, E.T.; OMOFONMWAN, K.; AGANMWONY, I.; FASIPE, I.P.; ENUNEKU, A.; EZEMONYE, I.N. Bioactive profiling and therapeutic potential of mushroom (*Pleurotus tuberregium*) extract on Wistar albino rats (*Ratus norvegicus*) exposed to arsenic and chromium toxicity. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 1-10, 2018.

OHSHIMA, H; TATEMACHI, M.; SAWA, T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 3-11, 2003.

OTSMANE, A. et al. Clinico-epidemiological profile and redox imbalance of lung cancer patients in Algeria. **Journal of Medicine and Life**, v. 11, n. 3, p. 210-217, 2018.

PAGE, M. A. et al. Composite toxicity assays for enhanced assessment of decentralized potable reuse systems. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 6, n. 12, p. 3306-3315, 2020.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, p. 158-69, 1967.

PATLOLLA, A.K. et al. Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. **Environmental Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 66-73, 2009.

PIÓRKOWSKI, A.; GERTYCH, A. Color normalization approach to adjust nuclei segmentation in images of hematoxylin and eosin stained tissue. In: **International Conference on Information Technologies in Biomedicine**. Springer, Cham, 2018. p. 393-406.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

POHORECKY, L.A., SWEENEY, A.; BUCKENDAHL, P. Differential sensitivity to amphetamine's effect on open field behavior of psychosocially stressed male rats. **Psychopharmacology**, v. 218, p. 281-292, 2011.

POURAHMAD, J. et al. Carcinogenic metal induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes. **Toxicology In Vitro**, v. 17, n. 5-6, p. 803-810, 2003.

PRAKASH, S.; DHINGRA, K.; PRIYA, S. Similar hematological and biochemical parameters among periodontitis and control group subjects. **European journal of dentistry**, v. 6, n. 3, p. 287, 2012.

PROCTOR, D.M. et al. Assessment of the mode of action for hexavalent chromium-induced lung cancer following inhalation exposures. **Toxicology**, v. 325, p. 160-79, 2014.

QI, W. et al. Chromium (III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. **Environ Health Perspect**, v. 108, n. 5, p. 399-402, 2000.

QIANG, T, et al. A chrome-free and chrome-less tanning system based on the hyperbranched polymer. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 3, p. 701-707, 2016.

QU, A. et al. Two-step segmentation of Hematoxylin-Eosin stained histopathological images for prognosis of breast cancer. In: **2014 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM)**. IEEE, 2014. p. 218-223.

QUAIL, D.F; JOYCE, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 2013.

QUIEVRYN, G. et al. Genotoxicity and mutagenicity of chromium(VI)/ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. **Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1062-1070, 2003.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 1-14, 2014.

RAMADASS, K; PALANISAMI, T; SMITH, E; MAYILSWAMI, S; MEGHARAJ, M; NAIDU, R. Earthworm Comet Assay for Assessing the Risk of Weathered Petroleum

Hydrocarbon Contaminated Soils: Need to Look Further than Target Contaminants. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, n. 4, p. 561-571, 2016.

RAMESH, S.A.; SHIN, R.; EIDE, D.J.; SCHACHTMAN, D.P. Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. **Plant Physiology**, v. 133, n. 1, p. 126-134, 2003.

RAMOS, A.; PEREIRA, E.; MARTINS, G.C.; WEHRMEISTER, T.D.; IZIDIO, G.S. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. **Behavioural Brain Research**, v. 193, p. 277-288, 2008.

RAY, P.D.; HUANG, B.W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signaling**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012.

RAY, R.R. Adverse hematological effects of hexavalent chromium: an overview **Interdisciplinary Toxicology**, v. 9, n. 2, p. 55-65, 2016.

REAL, M.I.H.; AZAM, H.M.; MAJED, N. Consumption of heavy metal contaminated foods and associated risks in Bangladesh. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 12, p. 651, 2017.

REDA, A.H. Study on the pollution levels of trace metals from modjo tannery effluent in the surrounding river water and soil. **Science Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 5, p. 56-60, 2015.

REEMTSMA, T; JEKEL, M. Dissolved organics in tannery wastewaters and their alteration by a combined anaerobic and aerobic treatment. **Water Research**, v. v. 31, n. 5, p. 1035-1046, 1997.

REHMAN, K. et al. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 157-184, 2018.

REID, S. A. et al. Study of hematological and biochemical parameters in runners completing a standard marathon. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 14, n. 6, p. 344-353, 2004.

REYHANI POUL, S.; JAFARPOUR, S. A.; SAFARI, R. Evaluation of oil fatty acid profile, functional properties and antioxidants activity of hydrolyzate produced from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera by application of protamex and neutrase enzymes. **Iranian Journal Food Science and Technology Research**, v. 14, n. 1, p. 162-176, 2018.

REYNOLDS, M.; PETERSON, E.; QUIEVRYN, G.; ZHITKOVICH, A. Human nucleotide excision repair efficiently removes chromium-DNA phosphate adducts and protects cells against chromate toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30419-24, 2004.

REYNOLDS, M.; STODDARD, L.; BESPALOV, I.; ZHITKOVICH, A. Ascorbate acts as a highly potent inducer of chromate mutagenesis and clastogenesis: linkage to DNA breaks in G2 phase by mismatch repair. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. 2, p. 465-76, 2007.

REYNOLDS, M.F. et al. Rapid DNA double-strand breaks resulting from processing of Cr-DNA cross-links by both MutS dimers. **Cancer Research**, v. 69, n. 3, p. 1071-1079, 2009.

RIM, K.T; KIM, S.J. A Review on Mutagenicity Testing for Hazard Classification of Chemicals at Work: Focusing on *in vivo* Micronucleus Test for Allyl Chloride. **Safety and Health at Work**, v. 6, n. 3, p. 184-191, 2015.

ROBIN, M.A.; LE ROT, M.; DESCATOIRE, V.; PESSAYRE, D. Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. **Journal of Hepatology**, v. 26, n. 1, p. 23-30, 1997.

RODRÍGUEZ-SUREDA, V. et al. Intracellular Oxidant Activity, Antioxidant Enzyme Defense System, and Cell Senescence in Fibroblasts with Trisomy 21. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 509241, 2015.

ROHR, P; DA SILVA, J; DA SILVA, F.R; SARMENTO, M; PORTO, C; DEBASTIANI, R. Evaluation of genetic damage in open-cast coal mine workers using the buccal micronucleus cytome assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 54, n. 1, p. 65-71, 2013.

ROJAS-WALKER, T. et al. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 473-477, 1995.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Em Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones; Morales, G. C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, 2004, cap. 1.

ROSATI, R. et al. Faster R-CNN approach for detection and quantification of DNA damage in comet assay images. **Computers in Biology and Medicine**, v. 123, p. 103912, 2020.

ROSSNER, P; BINKOVA, B; MILCOVA, A; SOLANSKY, I; ZIDZIK, J; LYUBOMIROVA, K.D. Air pollution by carcinogenic PAHs and plasma levels of p53 and p21(WAF1) proteins. **Mutation Research**, v. 620, n. 1-2, p. 34-40, 2007.

ROUSSEAU, M.C. IARC Carcinogen Update. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 9, p. A580–A581, 2005.

RUDOLF, E.; CERVINKA, M. Chromium (III) produces distinct type of cell death in cultured cells. **Acta Medica**, v. 46, n. 4, p. 139-146, 2003.

RUITER, N; MAILÄNDER, V; KAPPUS, H. Effect of heavy metals on cellular growth, metabolism and integrity of cultured Chinese hamster kidney cells. **Xenobiotica**, v. 15, n. 8-9, p. 665-671, 1985.

RUIZ-RUIZ, B. et al. Cytokinesis-block micronucleus assay using human lymphocytes as a sensitive tool for cytotoxicity/genotoxicity evaluation of AgNPs. **ACS omega**, v. 5, n. 21, p. 12005-12015, 2020.

SABHARWAL, R; VERMA, P; SYED, M.A; SHARMA, T; SUBUDHI, S.K; MOHANTY, S. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, v. 36, n. 4, p. 212-218, 2015.

SALAMA, A.; HEGAZY, R.; HASSAN, A. Intranasal Chromium Induces Acute Brain and Lung Injuries in Rats: Assessment of Different Potential Hazardous Effects of Environmental and Occupational Exposure to Chromium and Introduction of a Novel Pharmacological and Toxicological Animal Model. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0168688, 2016.

SALEHI, B. et al. Antioxidants: positive or negative actors?. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, p. 124, 2018.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, p. 201–205, 2016

SALIM, S. Oxidative stress in anxiety: implications for pharmacotherapy. **The American Journal of Medicine**, v. 1, p. 11-21, 2011.

SALNIKOW, K; COSENTINO, S; KLEIN, C; COSTA, M. Loss of thrombospondin transcriptional activity in nickel-transformed cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 851-858, 1994.

SALNIKOW, K; ZHITKOVICH, A; COSTA, M. Analysis of the binding sites of chromium to DNA and protein *in vitro* and in intact cells. **Carcinogenesis**, v. 13, p. 2341-2346, 1992.

SALNIKOW, K; ZHITKOVICH, A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 28-44, 2008.

SAMANTA, S; DEY, P. Micronucleus and its applications. **Diagnostic Cytopathology**, v. 40, n. 1, p. 84-90, 2012.

SANDOVAL-HERRERA, N. et al. Micronucleus Test Reveals Genotoxic Effects in Bats Associated with Agricultural Activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 202-207, 2021.

SANTOS, C.L; POURRUT, B; FERREIRA DE OLIVEIRA, J.M. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 216, 2015.

SAUD ALARIFI, D.A.; ALKAHTANI, S. Mechanistic investigation of toxicity of chromium oxide nanoparticles in murine fibrosarcoma cells. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 1253, 2016.

SBRANA, I; CARETTO, S; LASCIALFARI, D; ROSSI, G; MARCHI, M; LOPRIENO, N. Chromosomal monitoring of chromium-exposed workers. **Mutation Research**, v. 242, p. 305–312, 1990.

SCHNEIDER, B.C.; CONSTANT, S.L.; PATIERNO, S.R.; JURJUS, R.A.; CERYAK, S.M. Exposure to particulate hexavalent chromium exacerbates allergic asthma pathology. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 259, n. 1, p. 38-44, 2012.

SCHOOTS, M. H.; GORDIJIN, S.J.; SCHERJON, S.A.; GOOR, H.; HILLEBRANDS, J. Oxidative stress in placental pathology. **Placenta**, v. 69, p. 153-161, 2018.

SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, 25, 192-205, 1988.

SEDMAN, R.M; BEAUMONT, J; MCDONALD, T.A; REYNOLDS, S; KROWECH, G; HOWD, R. Review of the evidence regarding the carcinogenicity of hexavalent chromium in drinking water. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 24, n. 1, p. 155-182, 2006.

SEITZ, N; BÖTTCHER, M; KEITER, S; KOSMEHL, T; MANZ, W; HOLLERT, H. A novel statistical approach for the evaluation of comet assay data. **Mutation Research**, v. 652, n. 1, p. 38-45, 2007.

SELLAPPA, S. et al. Evaluation of DNA damage induction and repair inhibition in welders exposed to hexavalent chromium. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 11, n. 1, p. 95-100, 2010.

SENA, J. S. et al. Occupational skin cancer: systematic review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 3, p. 280-286, 2016.

SENAPATI, Violet Aileen et al. Chromium oxide nanoparticle-induced genotoxicity and p53-dependent apoptosis in human lung alveolar cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 10, p. 1179-1188, 2015.

SENONER, T.; DICHTL, W. Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target?. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2090, 2019.

SEVER, R; BRUGGE, J.S. Signal transduction in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 4, pii: a006098, 2015.

SHACTER, E.; WEITZMAN, S.A. Chronic inflammation and cancer. **Oncology**, v. 16, n. 2, p. 217-26, 2002.

SHARIFI-RAD, M. et al. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 694, 2020.

SHARMA R.K; AGRAWAL, M. Biological effects of heavy metals: an overview. **Journal of Environmental Biology**, v. 26, n. 2 Suppl, p. 301-313, 2005.

SHARMA, B; SINGH S; SIDDIQI, N.J. Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. **BioMed Research International**, v. 640754, 2014.

SHELNUTT, S.R; GOAD, P; BELSITO, D.V. Dermatological toxicity of hexavalent chromium. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37, n. 5, p. 375-387, 2007.

SHEN, Z. Genomic instability and cancer: an introduction. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2011.

- SHI, X.; CHIU, A.; CHEN, C.T.; HALLIWEL, B.; CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V. Reduction of chromium(VI) and its relationship to carcinogenesis. **Journal of Toxicology and Environmental Health, B**, v. 2, p. 87-104, 1999.
- SI, M.; LANG, J. The roles of metallothioneins in carcinogenesis. **Journal of Hematology Oncology**, v. 11, p. 1-20, 2018.
- SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, p. 7-30, 2017.
- SIMMONS, S.O; FAN, C.Y; YEOMAN, K; WAKEFIELD, J; RAMABHADRAN, R. NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. **Current Chemical Genomics and Translational Medicine**, v. 5, p. 1-12, 2011.
- SIMPSON, P.J; PAPWORTH, D.G; SAVAGE, J.R.K. X-ray-induced simple, pseudosimple and complex exchanges involving two distinctly painted chromosomes. **International Journal of Radiation Biology**, v. 75, p. 11-18, 1999.
- SIMUNKOVA, M.; ALWASEL, S.H.; ALHAZZA, I.M.; JOMOVA, K.; KOLLAR, V.; RUSKO, M.; VALKO, M. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. **Archives of toxicology**, v. 93, n. 9, p. 2491-2513, 2019.
- SINGH, A.; KUKRETI, R.; SASO, L.; KUKRETI, S. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1583, 2019.
- SINGH, B.N; SINGH, B.R; SINGH, R.L; PRAKASH, D; DHAKAREY, R; UPADHYAY, G; et al. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1109-1116, 2009.
- SINGH, J; PRITCHARD, D.E; CARLISLE, D.L; MCLEAN, J.A; MONTASER, A; ORENSTEIN, J.M; et al. Internalization of carcinogenic lead chromate particles by cultured normal human lung epithelial cells: formation of intracellular lead-inclusion bodies and induction of apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 161, n. 3, p. 240-248, 1999.
- SINGH, N.P; MCCOY, M.T; TICE, R.R; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- SINGH, S; RAJU, N.J; NAZNEEN, S. Environmental risk of heavy metal pollution and contamination sources using multivariate analysis in the soils of Varanasi environs, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 6, p. 345, 2015.
- SKONECZNA, A; KANIAK, A; SKONECZNY, M. Genetic instability in budding and fission yeast-sources and mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p. 917-967, 2015.

SMITH, J.A.; PARK, S.; KRAUSE, J.S.; BANIK, N.L. Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 764-775, 2013.

SNOW, E; XU, L. chromium(III) bound to DNA templates promotes increased polymerase processivity and decreased fidelity during replication *in vitro*. **Biochemistry**, v. 30, p. 11238-11245, 1991.

SNOW, E.T. A possible role for chromium(III) in genotoxicity. **Environ Health Perspect**, v. 92, p. 75-81, 1991.

SNOW, E.T. Effects of chromium on DNA replication *in vitro*. **Environ. Health Perspect**, v. 102, p. 41-44, 1994.

SNYDER, C. N.; BROWN, A.R.; BUFFALARI, D. Similar tests of anxiety-like behavior yield different results: comparison of the open field and free exploratory rodent procedures. **Physiology & Behavior**, v. 230, p. 1-14, 2020.

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

SOUZA, T. S; FONTANETTI, C. S. **Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo**. 4º PDPETRO, Campinas, 2007.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. **The Comet Assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage**. In: HENDERSON, D. S. DNA Repair Protocols: Mammalian Systems (Methods in Molecular Biology), 2 ed., Totowa, NJ: Humana Press, 2005, p. 85-95.

SRAM, R.J; BESKID, O; BINKOVA, B; CHVATALOVA, I; LNENICKOVA, Z; MILCOVA, A; et a. Chromosomal aberrations in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair genes polymorphisms. **Mutation Research**, v. 620, n. 1-2, p. 22-33, 2007.

STANG, A; WITTE, I. Performance of the comet assay in a high-throughput version. **Mutation Research**, v. 675, n. 1-2, p. 5-10, 2009.

STANIEK, H. The Combined Effects of Cr(III) Supplementation and Iron Deficiency on the Copper and Zinc Status in Wistar Rats. **Biological Trace Elements Research**, v. 190, n. 2, p. 414-424, 2019.

STANKOV, S; STANKOV, K. Descriptive epidemiology of breast cancer in Vojvodina. **The Breast**. v. 20, n. 2, p. 192-195, 2011.

STEARNS, D.M; SILVEIRA, S.M; WOLF, K.K; LUKE, A.M. Chromium (III) tris (picolinate) is mutagenic at the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, v. 513, p. 135-142, 2002.

STEARNS, D.M; WISE, J.P; Sr, PATIERNO, S.R; WETTERHAHN, K.E. Chromium(III) picolinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. **Faseb J**, v. 9, p. 1643-1648, 1995.

STICKNEY, J.A; SAGER, S.L; CLARKSON, J.R; SMITH, L.A; LOCEY, B.J; BOCK, M.J. An updated evaluation of the carcinogenic potential of 1,4-dioxane. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 183-195, 2003.

STOUT, M.D; NYSKA, A; COLLINS, B.J; WITT, K.L; KISSLING, G.E; MALARKEY, D.E; et al. Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies of Chromium Picolinate Monohydrate Administered in Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice for 2 Years. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 729-733, 2009.

SUN, H; BROCATO, J; COSTA, M. Oral Chromium Exposure and Toxicity. **Current Environmental Health Reports**, v. 2, n. 3, p. 295-303, 2015.

SUNDAR, V.J; RAO, J.R; MURALIDHARAN, C. Cleaner chrome tanning-emerging options. **Journal of Cleaner Production**, v. 10, n. 1, p. 69-74, 2002.

SURJADINATA, B. B.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Physiological role of reactive oxygen species, ethylene, and jasmonic acid on UV light induced phenolic biosynthesis in wounded carrot tissue. **Postharvest Biology and Technology**, v. 172, p. 111388, 2021.

SUZUKI, Y.; FUKUDA, K. Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid and glutathione with special reference to the rat lung. **Archives of Toxicology**, v. 64, n. 3, p. 169-176, 1990.

SZETO, Y.T; LEE, A.K; BENZIE, I.F; OBIED, H.K. Optimized noninvasive procedures to measure DNA damage in comet assay. **Human and Experimental Toxicology**, v. 31, n. 11, p. 1144-1150, 2012.

SZILI, E.J. Et al. Tracking the Penetration of Plasma Reactive Species in Tissue Models. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 594-602, 2018.

SZYMANSKA-CHABOWSKA, A; ANTONOWICZ-JUCHNIEWICZ, J; ANDRZEJAK, R. Some aspects of arsenic toxicity and carcinogenicity in living organism with special regard to its influence on cardiovascular system, blood and bone marrow. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 15, p. 101-116, 2002.

TABISH, T. A.; ZHANG, S.; WINYARD, P. G. Developing the next generation of graphene-based platforms for cancer therapeutics: The potential role of reactive oxygen species. **Redox biology**, v. 15, p. 34-40, 2018.

TAKAHASHI, Y.; KONDO, K.; HIROSE, T.; NAKAGAWA, H.; TSUYUGUCHI, M.; HASHIMOTO, M. Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. **Molecular Carcinogenesis**, v. 42, p. 150–158, 2005.

TAN, B. L. et al. Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1162, 2018.

TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E.; LIEW, W.P.P. Nutrients and oxidative stress: friend or foe?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

TANAKA, T. Introduction for inflammation and cancer. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, p. 121-122, 2013.

TANAKA, T.; ISHIGAMORI, R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. **Journal of Oncology**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

TANAKA, T.; SHIMIZU, M.; KOCHI, T.; MORIWAKI, H. Chemical-induced Carcinogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 203-209, 2013.

TCHOUNWOU, P.B; CENTENO, J.A; PATLOLLA, A.K. Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis--a health risk assessment and management approach. **Mol Cell Biochem Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 255, n. 1-2, p. 47-55, 2004.

TCHOUNWOU, P.B; ISHAQUE, A.B; SCHNEIDER, J. Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to cadmium chloride. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 222, n. 1-2, p. 21-28, 2001.

TERPILOWSKA, S.; SIWICKI, A.K. Pro- and antioxidant activity of chromium(III), iron(III), molybdenum(III) or nickel(II) and their mixtures. **Chemico-Biological Interactions**, v. 298, p. 43-51, 2019.

THOMAS, P; WU, J; DHILLON, V; FENECH, M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 69-76, 2011.

THOMPSON, C.M; PROCTOR, D.M; SUH, M; HAWS, L.C; KIRMAN, C.R; HARRIS, M.A. Assessment of the mode of action underlying development of rodent small intestinal tumors following oral exposure to hexavalent chromium and relevance to humans. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 244-274, 2013.

THORNE, D. et al. Genotoxicity evaluation of tobacco and nicotine delivery products: Part Two. in vitro micronucleus assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, p. 110546, 2019.

TICE, R.R; AGURELL, E; ANDERSON, D; BURLINSON, B; HARTMANN, A; KOBAYASHI, H. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TOKAR, E.J; BENBRAHIM-TALLAA, L; WAALKES, M.P. Metal ions in human cancer development. **Met Ions Life Sci**, v. 8, p. 375-401, 2011.

TOLBERT, P.E; SHY, C.M; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **American Journal of Epidemiology**, v. 134, n. 8, p. 840-850, 1991.

TOSTA, T. A. A. et al. Unsupervised method for normalization of hematoxylin-eosin stain in histological images. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, v. 77, p. 101646, 2019.

TOYA, T.; FUKUDA, K.; KOHYAMA, N.; KYONO, H.; ARITO, H. Hexavalent chromium responsible for lung lesions induced by intratracheal instillation of chromium fumes in rats. *Industrial health*, v. 37, n. 1, p. 36-46, 1999.

TSOU, T.C; CHEN, C.L; LIU, T.Y; YANG, J.L. Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by chromium(III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis*, v. 17, p. 103-108, 1996.

TSUJI, H.; FUJIMOTO, H.; MATSUURA, D.; NISHINO, T.; LEE, K.M. Comparison of Biological Responses in Rats Under Various Cigarette Smoke Exposure Conditions. *Journal of Toxicologic Pathology*, v. 26, n. 2, p. 159-174, 2013.

UDROIU, I; SGURA, A; VIGNOLI, L; BOLOGNA, M.A; D'AMEN, M; SALVI, D; et al. Micronucleus test on *Triturus carnifex* as a tool for environmental biomonitoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 56, n. 4, p. 412-417, 2015.

UEDA, M. Alkali comet assay in genotoxicity tests. In: *DNA Electrophoresis*. Humana, New York, NY, 2020. p. 73-78.

URBANO, A.M.; FERREIRA, L.M.; ALPOIM, M.C. Molecular and cellular mechanisms of hexavalent chromium-induced lung cancer: an updated perspective. *Current Drug Metabolism*, v. 13, n. 3, p. 284-305, 2012.

URBANO, A.M.; RODRIGUES, C.F.D.; ALPOIM, M.C. Hexavalent chromium exposure, genomic instability and lung cancer. *Gene Therapy and Molecular Biology*, v. 12, p. 219-238, 2008.

VALKO, M; JOMOVA, K; RHODES, C.J; KUČA, K; MUSÍLEK, K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*, v. 90, n. 1, p. 1-37, 2016.

VALKO, M; MORRIS, H; CRONIN, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 2005.

VALVERDE, M; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research*, v. 681, n. 1, p. 93-109, 2009.

VANOIRBEEK, J.A.; HOET, P.H.; NEMERY, B.; VERBEKEN, E.K.; HAUFROID, V.; LISON, D.; DINSDALE, D. Kinetics of an intratracheally administered chromium catalyst in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. v. 66, n. 4, p. 393-409, 2003.

VELMA, V.; TCHOUNWOU, P.B. Chromium induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of Goldfish, *Carassius auratus*. *Mutation Research*, v. 698, n. 1-2, p. 43-51, 2010.

VEYALKIN, L.V.; MILYUTIN, A.A. Proportionate cancer mortality among workers in the Belarussian tanning industry. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 44, p. 637-42, 2003.

VILLELA, I. V. **Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental**. In: *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. p.145-163, 2003.

VIMERCATI, L. et al. Environmental exposure to arsenic and chromium in an industrial area. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 12, p. 11528-35, 2017.

VINCENT, K; PICHLER, M; LEE, G.-W; LING, H. MicroRNAs, genomic instability and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 14475-14491, 2014.

VOITKUN, V; ZHITKOVICH, A; COSTA, M. Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. **Nucleic Acids Research**, v. 26, p. 2024-2030, 1998.

VUTUKURU, S.S. et al. Effect of arsenic and chromium on the serum amino-transferases activity in Indian major carp, *Labeo rohita*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 4, n. 3, p. 224-227, 2007.

WAALKES, M.P. Cadmium carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 533, p. 107-120, 2003.

WAGNER, A. D. et al. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 18, p. 2903-2909, 2006.

WAGNER, H.; CHENG, J. W.; KO, E. Y. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. **Arab journal of urology**, v. 16, n. 1, p. 35-43, 2018.

WAGNER, J.G.; VAN DYKEN, S.J.; WIERENGA, J.R.; HOTCHKISS, J.A.; HARKEMA, J.R. Ozone exposure enhances endotoxin-induced mucous cell metaplasia in rat pulmonary airways. **Toxicology Sciences**, v. 74, n. 2, p. 437-46, 2003.

WAKEEL, A.; XU, M.; GAN, Y. Chromium-induced reactive oxygen species accumulation by altering the enzymatic antioxidant system and associated cytotoxic, genotoxic, ultrastructural, and photosynthetic changes in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 728, 2020.

WALDRON, D. Genome stability: Chromothripsis and micronucleus formation. **Nature Review Genetic**, v. 16, n. 7, p. 376-387, 2015.

WANG, J.J.; LEI, K.F.; HAN, F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 3855-3964, 2018.

WANG, S; SHI, X. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 222, n. 1-2, p. 3-9, 2001.

WANG, S. et al. The role of antioxidant enzymes in the ovaries. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

WANG, Y. et al. Carcinogenicity of chromium and chemoprevention: a brief update. **OncoTargets and Therapy**, v. 10, p. 4065-4079, 2017.

WANG, Z.; WU, J.; HUMPHRIES, B.; KONDO, K.; JIANG, Y.; SHI, X. Upregulation of histone-lysine methyltransferases plays a causal role in hexavalent chromium-induced cancer stem cell-like property and cell transformation. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 342 p. 22–30, 2018.

WARREN, G; SHULTZ, D; BANCROFT, K; BENNETT, K; ABBOTT, E.H; ROGERS, S. Mutagenicity of a series of hexacoordinate chromium(III) compounds. **Mutation Research**, v. 90, p. 111-118, 1981

WEBER, L; CARVALHO, L; SÁ, N; SILVA, V; BERARDINI, N; SOUZA, V. Genotoxic effects of the water-soluble fraction of heavy oil in the brackish/freshwater amphipod *Quadrivisia aff. lutzi* (Gammaridea) as assessed using the comet assay. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 4, p. 642-655, 2013.

WELLING, R. et al. Chromium VI and stomach cancer: a meta-analysis of the current epidemiological evidence. **Occupational & Environmental Medicine**, v. 72, n. 2, p. 151-9, 2015.

WESSELING, C; PUKKALA, E; NEUVONEN, K; KAUPPINEN, T; BOFFETTA, P; PARTANEN, T. Cancer of the brain and nervous system and occupational exposures in Finnish women. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 44, p. 663-668, 2002.

WHANG, Z.; YANG, C. Metal carcinogen exposure induces cancer stem cell-like property through epigenetic reprogramming: A novel mechanism of metal carcinogenesis. **Seminars in**

WHO – World Health Organization. **Trace Elements in Human Nutrition and Health**. Switzerland: Geneva, 1996.

WIEGAND, H.J.; OTTENWÄLDER, H.; BOLT, H.M. Bioavailability and metabolism of hexavalent chromium compounds. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 263-275, 1987.

WILD, P; BOURGKARD, E; PARIS, C. Lung cancer and exposure to metals: the epidemiological evidence. **Methods in Molecular Biology**, v. 472, p. 139-167, 2009.

WISE, S. S. et al. Hexavalent Chromium–Induced Chromosome Instability Drives Permanent and Heritable Numerical and Structural Changes and a DNA Repair–Deficient Phenotype. **Cancer Research**, v. 78, n. 15, p. 4203-4214, 2018.

WISE, S.S; HOLMES, A.L; WISE, J.P. Sr Hexavalent Chromium-Induced DNA Damage and Repair Mechanisms. **Reviews on Environmental Health**, v. 23, p. 39-57, 2008.

WISE, S.S; WISE, J.P. Sr Aneuploidy as an Early Mechanistic Event in Metal Carcinogenesis. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, p. 1650-1654, 2010.

WISE, S.S.; HOLMES, A.L.; WISE, J.P. Hexavalent chromium-induced DNA damage and repair mechanisms. **Reviews on Environmental Health**, v. 23, p. 39-57, 2008.

WITKIEWICZ-KUCHARCZYK, A; BAL, W. Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. **Toxicology Letters**, v. 162, p. 29-42, 2006.

WOO, S. Ji et al. Toxicological effects of trichlorfon on hematological and biochemical parameters in *Cyprinus carpio* L. following thermal stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 209, p. 18-27, 2018.

WOOD, J.P; SMITH, A.J; BOWMAN, K.J; THOMAS, A.L; JONES, G.D. Comet assay measures of DNA damage as biomarkers of irinotecan response in colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Med**, v. 4, n. 9, p. 1309-1321, 2015.

WOOD, J.P. et al. Comet assay measures of DNA damage as biomarkers of irinotecan response in colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Med**, v. 4, n. 9, p. 1309-1321, 2015.

WU, C.T.; CHIU, C.Y.; HUANG, C.F.; PENG, F.C.; LIU, S.H. Genotoxicity and 28-day oral toxicity studies of a functional food mixture containing maltodextrin, white kidney bean extract, mulberry leaf extract, and niacin-bound chromium complex. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 92, p. 67-74, 2018.

XIE, H; MASON, M.M; WISE, J.P. Genotoxicity of metal nanoparticles. **Reviews on Environmental Health**, v. 26, n. 4, p. 251-268, 2011.

XIE, X.; HE, Z.; CHEN, N.; TANG, Z.; WANG, Q.; CAI, Y. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

YANG, L.; CHEN, P. Biosorption of hexavalent chromium onto raw and chemically modified *Sargassum* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, 297-307, 2008.

YANG, M. A current global view of environmental and occupational cancers. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v. 29, p. 223-249, 2011.

YAO, H; GUO, L; JIANG, B.H; LUO, J; SHI, X. Oxidative stress and chromium(VI) carcinogenesis. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v. 27, n. 2, p. 77-88, 2008.

YAO, Y; DAI, W. Genomic Instability and Cancer. **Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 5, p. 1000165, 2014.

YEDJOU, C.G; TCHOUNWOU, P.B. N-acetyl-l-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 4, n. 2, p. 132-137, 2007.

YILDIZ, M; CIĞERCI, I.H; KONUK, M; FIDAN, A.F; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 934-938, 2009.

YILMAZ, H. et al. Analysis of the hematological and biochemical parameters related to lead intoxication. **Journal of forensic and legal medicine**, v. 19, n. 8, p. 452-454, 2012.

YOUNUS, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. **International Journal of Health Science**, v. 12, n. 3, p. 88-93, 2018.

ZABŁOCKA-SŁOWIŃSKA, K. et al. Oxidative stress in lung cancer patients is associated with altered serum markers of lipid metabolism. **PLoS One**, 14, n. 4, e0215246, 2019.

ZAPATA, L.M; BOCK, B.C; OROZCO, L.Y; PALACIO, J.A. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 108-116, 2016.

ZHANG, Z et al. Pyrolysis characteristics, kinetics, and evolved gas determination of chrome-tanned sludge by thermogravimetry–Fourier-transform infrared spectroscopy and pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry. **Waste Management**, v. 93, p. 130-137, 2019.

ZHANG, Z.; COSTA, M. p62 functions as a signal hub in metal carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, in press, 2021.

ZHITKOVICH, A; VOITKUN, V; COSTA, M. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium in vitro: importance of trivalent chromium and the phosphate group. **Biochemistry**, v. 35, p. 7275-7282, 1996.

ZHITKOVICH, A; VOITKUN, V; COSTA, M. Glutathione and free amino acids form stable complexes with DNA following exposure of intact mammalian cells to chromate. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 907-913, 1995.

ZHITKOVICH, A. Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI). **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 3-11, 2005.

ZHU, Y.; COSTA, M. Metals and molecular carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 41, p. 1161–1172, 2020.

ZOIDIS, E. et al. Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. **Antioxidants**, v. 7, n. 5, p. 66, 2018.

ZWELLING, L.A; ANDERSON, T; KOHN, K.W. DNA-protein and DNA interstrand cross-linking by cis- and trans-platinum(II) diamminedichloride in L1210 mouse leukemia cells and relation to cytotoxicity. **Cancer Research**, v. 39, p. 365-369, 1979.