

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**YASMIN CABRERA BATISTA**

**AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS DE CÁDMIO CAPAZES DE  
INDUZIR EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS SOBRE CULTURA DE  
LINFÓCITOS HUMANOS**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**URUGUAIANA  
2018**

**YASMIN CABRERA BATISTA**

**AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS DE CÁDMIO CAPAZES DE  
INDUZIR EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS SOBRE CULTURA DE  
LINFÓCITOS HUMANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Farmácia da Universidade Federal do  
Pampa, como requisito para a obtenção da  
graduação de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Flávio Souza de  
Oliveira

**URUGUAIANA  
2018**

**Yasmin Cabrera Batista**

**AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS DE CD CAPAZES  
DE INDUZIR EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS SOBRE  
CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS**

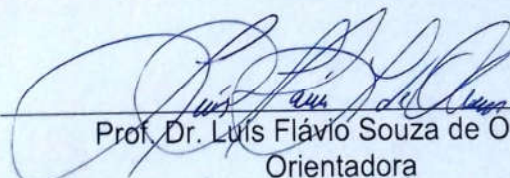
Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

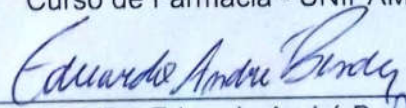
Orientador (a): Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira

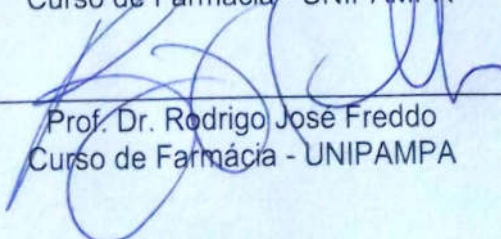
Área de concentração: Farmácia

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 04 / 07 / 2018

Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira  
Orientadora  
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eduardo André Bender  
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rodrigo José Freddo  
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

*Aos meus amados pais, Cristiane e Odilon,  
maiores incentivadores e fontes inesgotáveis de  
amor, carinho e compreensão.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por proporcionar grandes oportunidades em minha vida. Aos meus pais, Cristiane e Odilon, por todo apoio, carinho, compreensão e incentivo durante todos esses anos. Aos meus irmãos e cunhado, Sabrina, Bernardo e Neto, por sempre estarem ao meu lado e me darem forças para continuar. Ao meu namorado Lucas, por sempre estar disposto a me ajudar e por ter sido meu companheiro nesta caminhada. Amo vocês!

Um agradecimento especial ao meu orientador, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Luís Flávio Souza de Oliveira, pelos ensinamentos passados a mim ao longo do curso e durante a elaboração deste trabalho. Muito obrigada pela dedicação!

Aos professores Dr. Eduardo André Bender e Dr. Rodrigo José Freddo por aceitarem o convite para fazerem parte da minha banca. Aos colegas do grupo TOXCEL, que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização e concretização deste trabalho.

*“A persistência é o caminho do êxito”.*  
Charles Chaplin

## FOLHA DE APRESENTAÇÃO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado **AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS DE CÁDMIO CAPAZES DE INDUZIR EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS SOBRE CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS** está apresentado no formato de Trabalho Acadêmico, e seguirá as normas conforme “Manual para Elaboração e Normalização de Trabalhos Acadêmicos – conforme normas ABNT”.

---

(Luís Flávio Souza de Oliveira - Orientador)

---

(Yasmin Cabrera Batista - Aluna)

Uruguaiana, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_.

## RESUMO

O cádmio é um metal pesado não essencial, tóxico para humanos e é encontrado naturalmente em todos os componentes ambientais. Também está presente em dejetos e fumaça industriais, na fumaça do tabaco, em alimentos e água contaminados. Embora existam limites de segurança de cádmio para o ambiente, alimentos, água potável e solos utilizados na agricultura, ainda não se têm estabelecida a concentração mínima capaz de induzir danos celulares, especialmente em células humanas. Sendo assim, este trabalho investigou as concentrações mínimas desse metal capazes de induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos em linfócitos humanos, através de sua exposição a diferentes concentrações de cádmio (1, 2,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ). Foram avaliadas a viabilidade e a proliferação celulares e a frequência de micronúcleos. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via e complementados por teste de Tukey. O presente estudo demonstrou, através da análise dos dados obtidos que o cádmio induziu uma diminuição da viabilidade e proliferação celulares nas duas maiores concentrações e aumento da frequência de micronúcleo em todas as concentrações testadas. Esses dados corroboram para uma discussão mais ampla sobre os níveis de exposição humana ao metal.

Palavras-chave: Cádmio, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, linfócitos humanos.



## ABSTRACT

Cadmium is a non-essential heavy metal toxic for humans, and it is found naturally in all environmental components. It is also present in industrial waste and smoke, tobacco smoke, and contaminated food and water. Although there are established limits to insure the safety of cadmium in the environment, food, drinking water and soil used in agriculture, the minimum concentration capable of inducing cellular damage, especially in human cells, has yet to be established. Thus, this work investigated the minimum concentrations of this metal capable of inducing cytotoxic and genotoxic effects in human lymphocytes culture exposing them to different concentrations of cadmium (1, 2.5 and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cell proliferation, viability and micronucleus frequency were evaluated. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and complemented by Tukey's test. Data demonstrated that cadmium induced a decrease in cell viability and proliferation at the two highest concentrations and increased micronucleus frequency at all concentrations tested. These data urges for a broader discussion of levels of human exposure to metal.

Keywords: Cadmium, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, human lymphocytes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Recuperação de cádmio através de minérios de chumbo-zinco.....	12
<b>Figura 2:</b> Alguns mecanismos de carcinogenicidade do cádmio nos órgãos corporais.....	18
<b>Figura 3:</b> Células vivas (A e B) e célula não viável corada em azul (A - seta). ....	21
<b>Figura 4:</b> Método de contagem de linfócitos em câmara de Neubauer. ....	21
<b>Figura 5:</b> Células binucleadas (A) sem micronúcleo e (B) com micronúcleo (seta).....	22
<b>Figura 6:</b> Teste de viabilidade celular em linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações de cádmio. O gráfico demonstra as concentrações de cádmio, controle positivo e negativo versus porcentagem de células viáveis. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão, n=3; p<0,05. As letras indicam diferenças significativas em relação ao controle negativo; p<0,05. CN=controle negativo; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> =controle positivo.....	23
<b>Figura 7:</b> Ensaio de proliferação celular em linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações de cádmio. O gráfico demonstra as concentrações de cádmio, controle positivo e negativo versus número de linfócitos/mL. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão, n=3. As letras indicam diferenças significativas em relação ao controle negativo;**p<0,01;*** p<0,001. CN=controle negativo; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> =controle positivo. ....	25
<b>Figura 8:</b> Teste de frequência de micronúcleos em linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações de cádmio. O gráfico demonstra as concentrações de cádmio, controle positivo e negativo versus número de micronúcleos/500 linfócitos. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão, n=3. As letras indicam diferenças significativas em relação ao controle negativo; *p<0,05;** p<0,01. NC=controle negativo; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> =controle positivo. ....	27

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 HISTÓRICO .....	11
1.2 CÁDMIO .....	11
1.3 EXPOSIÇÃO .....	12
1.4 EPIDEMIOLOGIA .....	13
1.5 TOXICIDADE .....	14
<b>1.5.1 Citotoxicidade</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5.2 Genotoxicidade</b> .....	<b>16</b>
1.6 CARCINOGENICIDADE .....	17
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>19</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 OBTENÇÃO DA MATRIZ E CULTURA CELULAR .....	20
3.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS .....	20
<b>3.2.1 Viabilidade celular</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.2 Proliferação celular</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.3 Micronúcleo</b> .....	<b>22</b>
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	22
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
4.1 CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS DE CÁDMIO INDUZEM CITOTOXICIDADE EM LINFÓCITOS HUMANOS .....	23
4.2 CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS DE CÁDMIO INDUZEM GENOTOXICIDADE EM LINFÓCITOS HUMANOS .....	24
<b>4.2.1 Efeitos do cádmio sobre a proliferação celular</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2.2 Efeitos genotóxicos de mutagenicidade induzida por cádmio</b> .....	<b>26</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO

A descoberta do cádmio (Cd) ocorreu em 1817 pelo químico alemão Friedrich Stromeyer (1776-1835), ao testar a pureza do óxido de zinco. Stromeyer estranhou o fato de o composto descolorir a altas temperaturas, o que não era comum e desconfiou da presença de alguma impureza. A partir disso, criou um procedimento experimental que foi capaz de isolar um novo metal, o qual foi dado o nome de cádmio, derivado do latim “cadmia” e do grego “kadmeia”, ambos os nomes usados antigamente para a calamina. Após sua descoberta, mais de um século se passou até que ele fosse empregado para uso em extensão significativa, pois somente em 1940 a produção e o consumo aumentaram e o cádmio começou a ser utilizado na galvanoplastia, pigmentação de tintas, baterias de níquel-cádmio, estabilização de plásticos, e mais recentemente em painéis solares. Porém, seu uso vem sendo diminuído devido à sua toxicidade (HABASHI, 2017).

## 1.2 CÁDMIO

O cádmio (Cd, número atômico 48, massa atômica 112, ponto de fusão 321°C, ponto de ebulição 765°C e densidade de 8,64 g/cm<sup>3</sup>) é um metal pesado não essencial, de cor prata e tons azulados, com propriedades suaves, dúcteis, lustrosas, eletropositivas e não possui odor ou sabor. Possui oito isótopos estáveis, sendo os mais comuns o 112 Cd e 114 Cd. Forma uma variedade de aminas orgânicas, alguns complexos e quelatos. Os íons de cádmio formam sais solúveis de carbonatos, arsenatos, fosfatos e compostos de ferrocianeto (ADRIANO, 2001).

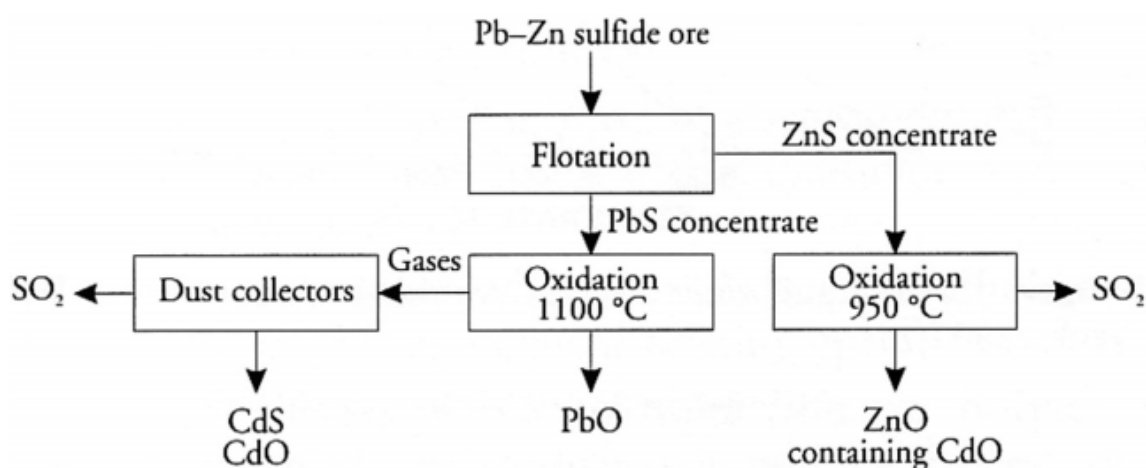
É encontrado naturalmente em todos os componentes ambientais (ar, solo, alimentos e água) e considerado um dos mais tóxicos aos humanos. Entretanto, é frequentemente utilizado na indústria, tendo como principais usos a fabricação de baterias de níquel-cádmio, pigmentos e estabilizadores de plástico, entre outras menos significativas, e pode exercer efeitos nocivos para a saúde humana (RAFATI-RAHIMZADEH *et al.*, 2017). Na produção de zinco, pode ser produzido em diferentes formas comerciais (ADRIANO, 2001; COBB, 2008).

O cádmio é consideravelmente raro e ocorre naturalmente na crosta terrestre, apresentando-se em quantidade de aproximadamente 0,1 a 0,5 parte por milhão de material cristal e também pode ser encontrado nas águas oceânicas com médias entre 5 e 110 ng/L. (WHO, 1992). Geralmente é encontrado como uma impureza em depósitos de Zinco (Zn) ou

Chumbo (Pb) e é fabricado, portanto, principalmente como subproduto da fundição destes (BERNHOF, 2013), como pode ser observado na Figura 1.

Pode espalhar-se pelo ar através de processos naturais como a erosão, ou através da combustão de minérios contendo cádmio em emissões vulcânicas. Partículas transportadas pelo ar depositam-se no solo e em cursos de água como poeira. Embora as águas superficiais possam conter alguma quantidade de cádmio dissolvido, que podem migrar para corpos hídricos, as concentrações tendem a ser baixas, uma vez que este metal é facilmente absorvido por animais marinhos, especialmente mariscos (WHO, 1992).

Os seres humanos desempenham um papel significativo na criação de fontes de cádmio e na sua liberação para o meio ambiente por meio de atividades como mineração e fundição e refino de minérios metálicos. O cádmio é também emitido para a atmosfera a partir de queima de combustíveis fósseis, incineração de resíduos e produção de aço. Ao todo, cerca de 4.000 a 13.000 toneladas de cádmio são liberadas para o meio ambiente anualmente como resultado das atividades humanas (SINGH, 2005).



**Figura 1:** Recuperação de cádmio através de minérios de chumbo-zinco.

Fonte: Habashi (2017).

### 1.3 EXPOSIÇÃO

A produção de cimento é uma das principais fontes industriais de material particulado e metais, sendo o cádmio um destes metais, que são gerados a partir da combustão de fósseis e transformação das matérias-primas (GUPTA *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2010). Alguns estudos sobre metais de fábricas de cimento mostraram os níveis ambientais destes no ar (ROVIRA *et*

*al.*, 2011; BALDANTONI; NICOLA; ALFANI, 2014), no solo (BERMUDEZ *et al.*, 2010; NASKRĘT; JAWORSKA; DIUGOSZ, 2014; OGUNKUNLE; FATOBA, 2014; PEDRON, 2012), através de biomonitoramento utilizando plantas (ABRIL *et al.*, 2014), exposições em humanos perto de uma fábrica de cimento (IşđKLđ *et al.*, 2006) e em trabalhadores de uma fábrica de cimento. Este último estudo detectou níveis elevados de cádmio nos trabalhadores e nos residentes da localidade em comparação com o grupo controle, o qual era composto por moradores aparentemente saudáveis de uma cidade distante da localidade onde encontrava-se a fábrica. Os resultados concluíram que a inalação de poeira de cimento pode estar associada a alterações nos níveis dos elementos séricos e funções do pulmão e do fígado, enquanto a exposição a longo prazo diminui o pico da taxa de fluxo expiratório (RICHARD *et al.*, 2016).

Em humanos, a fumaça do cigarro é a principal fonte de exposição ao cádmio por via inalatória (GODT *et al.*, 2006). Em média, um cigarro contém aproximadamente de 1 a 2 µg de cádmio (JARUP; AKESSON, 2009). Sendo assim, o consumo de tabaco é uma importante fonte ambiental de exposição ao cádmio na população em geral (RICHTER; FAROON; PAPPAS, 2017), o que contribui para sua detecção no sangue, na urina e tecidos de fumantes em comparação com não fumantes (SATARUG; MOORE, 2004; SATARUG; VESEY; GOBE, 2017).

A exposição ao cádmio também ocorre pela ingestão de alimentos contaminados por meio de bioacumulação ou através do consumo de água de beber. Para adotar medidas de proteção à saúde da população, foram estabelecidos limites de segurança de cádmio no ambiente (FAO; WHO, 1993) e nos alimentos (CAC, 2015). Um limite de 3 µg/L é aplicado à água potável (FAO; WHO, 1993), enquanto 3 mg/kg é aplicado a solos que são usados para a produção de culturas alimentares para consumo humano como, por exemplo, a produção de batata e de arroz. Os limites de segurança, conhecidos como concentrações máximas admissíveis (CMA) também foram estabelecidos para alguns tipos de mariscos que são conhecidos como hiperacumuladores de cádmio, em 2 mg/kg (CAC, 2015).

#### 1.4 EPIDEMIOLOGIA

O primeiro registro de incidente de exposição ocupacional ao cádmio ocorreu na Bélgica, em 1858. A intoxicação ocorreu em três trabalhadores de uma fábrica que poliam prata com carbonato de cádmio e, conseqüentemente, inalavam pó de cádmio. Essa exposição pode causar graves danos à saúde, desde náuseas e problemas respiratórios até a morte (FOULKES, 2012).

No Japão, a população de uma região do país apresentou muitos casos de toxicidade óssea e renal através da contaminação crônica por cádmio na água usada para beber, cozinhar e também cultivar lavouras de soja e arroz, que foram contaminadas. A forma mais grave de intoxicação leva o nome de Doença de Itai-itai (AOSHIMA, 2017). Está é caracterizada por danos renais severos, osteoporose generalizada, osteomalácia e múltiplas fraturas ósseas, afetando principalmente mulheres (AOSHIMA, 1987; HORIGUCHI *et al.*, 2010; BABA *et al.*, 2014). O número de pacientes acometidos pela doença no Japão foi estimado em torno de 400, desde 1910 até 2007 (KAJI, 2012).

Pensando na saúde da população, diretrizes de consumo dietético seguro de cádmio e limites de cádmio na urina foram estabelecidos pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Comitê Misto de Peritos em Aditivos Alimentares e Contaminantes (JECFA) (FAO, WHO, 1993, 2010). Atualmente, o nível de ingestão de cádmio tolerado por estas instituições é de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal por mês, enquanto o nível do limiar de cádmio urinário é de 5,24  $\mu\text{g}/\text{g}$  de creatinina (CALLAN; HINWOOD; DEVINE, 2014).

Grãos como arroz e trigo são fontes consideráveis de exposição a este metal. O arroz, particularmente, é apontado como uma cultura importante na exposição ao cádmio, isto devido às suas características físico-químicas; monocotiledônea, com sistema radicular fibroso que aumenta a área de superfície para a absorção de minerais e favorece a chance de absorção de cádmio. A média de consumo mundial de cádmio é de 30  $\mu\text{g}/\text{dia}$  (SEBASTIAN; PRASAD, 2014). Além disso, outra grande fonte de exposição ao cádmio é a fumaça do cigarro, isto ocorre porque a planta do tabaco acumula naturalmente altas concentrações de cádmio em suas folhas (ATSDR, 2012). A média de concentração de cádmio no sangue é de 0,5-1,0  $\mu\text{g}/\text{L}$  em não fumantes, e o dobro em fumantes, devido a absorção do metal presente no fumo (CDC, 2015). Em um estudo realizado, o cádmio foi medido em amostras de sangue de fumantes e demonstrou que estes possuíam 4 a 5 vezes mais cádmio no sangue do que os não-fumantes (RICHTER; FAROON; PAPPAS, 2017).

## 1.5 TOXICIDADE

A contaminação por metais em humanos pode gerar diversos distúrbios na saúde, pois muitos deles atuam de maneira individual ou em sinergia, podendo causar efeitos genotóxicos, carcinogênicos, clastogênicos, hematotóxicos, imunotóxicos, nefrotóxicos,

miotóxicos, neurotóxicos, desbalanço na homeostasia do sistema endócrino, entre outros (ATSDR, 2000).

A exposição ao cádmio, seja ela ocupacional ou ambiental, pode causar diversos danos ao organismo, afetando vários sistemas. Porém, têm sido relatado que os danos renais e hepáticos se destacam pelo fato deste metal ter a capacidade de acumular-se nestes tecidos (AKERSTROM *et al.*, 2013), o que está relacionado à sua meia-vida muito longa, de aproximadamente 10 a 35 anos em humanos. Essa circunstância é um dos motivos que levaram a Agência de Proteção Ambiental dos EUA a classificá-lo como um dos 126 poluentes prioritários (JIN; LU; NORDBERG, 1998).

Esse efeito bioacumulativo pode acarretar em disfunções renais irreversíveis, aumentando a excreção de proteínas com baixo peso molecular, como as metalotioneínas, proteína na qual o cádmio se liga para poder transportar-se através do plasma. O cádmio livre, não ligado às metalotioneínas, induz uma retroalimentação positiva sobre a síntese protéica dessa família. Os efeitos tóxicos do cádmio surgem quando este não está ligado à proteína. Apesar de o cádmio se acumular principalmente no pulmão, fígado e rim, a pele também é facilmente exposta a este metal (GERHARDSSON *et al.*, 2002; JARUP, 2003).

A análise da urina também pode ser feita para auxiliar na comprovação da exposição ao cádmio, através de sinais precoces de dano renal, proteinúria, perda de cálcio e lesão tubular (PATRICK, 2003). Satarug, Vesey e Gobe (2017) relataram em sua revisão que concentrações de cádmio na urina e no sangue de participantes de um estudo estavam relacionadas com o risco de desenvolver doença renal crônica e albuminúria. Além disso, um aumento adicional deste risco foi demonstrado em pacientes que apresentavam baixos níveis séricos de zinco, comparado com aqueles que apresentavam maiores níveis de zinco. Baixa ingestão de cálcio, zinco ou ferro aumentam a absorção de cádmio. Em indivíduos com deficiência de ferro, a absorção gastrointestinal desse elemento pode ultrapassar 10% (ATSDR, 2012).

Alguns estudos já existentes na literatura sugerem que a exposição ao cádmio pode provocar apoptose e alterar o arranjo das células dos receptores da orelha interna, levando a uma diminuição auditiva (KIM *et al.*, 2008). Entre os anos de 1999-2006, a NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) realizou um estudo de Coorte com 3698 indivíduos de 20-69 anos e observou uma associação entre cádmio no sangue e urina e perda auditiva ( $p < 0.05$ ) (SATARUG; VESEY; GOBE, 2017).

Embora o mecanismo de toxicidade induzida pelo cádmio seja pouco compreendido, sabe-se que pode causar danos às células através da geração de espécies reativas de oxigênio



(ERO) (STOHS, 1995), incluindo ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, através de alterações nos mecanismos de defesa antioxidante (OH; LIM, 2006; PATHAK; KHANDELWAL, 2006; VALKO *et al.*, 2006).

### 1.5.1 Citotoxicidade

Muitos estudos relatam que, através da perturbação na homeostase do cálcio, este metal é capaz de induzir citotoxicidade em diferentes linhagens de células (SON *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2008; YEH *et al.*, 2009; BIAGIOLI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008). Os íons de cálcio são sinalizadores intracelulares onipresentes responsáveis por controlar numerosos processos celulares incluindo proliferação, diferenciação, desenvolvimento e morte celular (BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; MATTSON; CHAN, 2003), exercendo assim, papéis fundamentais em várias funções biológicas do organismo e muito provavelmente a citotoxicidade mediada pelo cádmio está em parte relacionada às concentrações de cálcio intracelular (LEMARIÉ *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2008). Essa alteração das concentrações intracelulares de íons cálcio pode causar apoptose (BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998). Ademais, altos níveis de íons de cálcio intracelular podem levar ao rompimento do equilíbrio de cálcio mitocondrial, o que possibilita a perda de potencial de membrana mitocondrial e, conseqüentemente, induz a formação de ERO. Essas contemplações sugerem que o íon cálcio exerce funções importantes na toxicidade induzida pelo cádmio através da geração de ERO, embora o mecanismo celular pelo qual o cádmio utiliza os íons de cálcio em sua ação tóxica não seja claro (LEMARIÉ *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2008).

Son *et al.* (2009) demonstraram em seu estudo que a exposição de células da pele de camundongos ao cádmio por 12 h desencadeou um aumento no cálcio livre citoplasmático de uma forma dependente da concentração, em comparação com o grupo controle negativo. Wang *et al.* (2008) também relatou um aumento de cálcio citoplasmático, que induziu morte celular através de apoptose e autofagia.

### 1.5.2 Genotoxicidade

O cádmio afeta a proliferação, diferenciação e apoptose celulares. Essas atividades interagem com o mecanismo de reparo do DNA, a geração de ERO e a indução de apoptose (RANI *et al.*, 2013). Liga-se às mitocôndrias e pode inibir a respiração celular e a fosforilação

oxidativa em baixa concentração (PATRICK, 2003). Os compostos à base cádmio também podem induzir aberrações cromossômicas – incluindo deleções, troca de cromátides irmãs, quebra de cadeias de DNA e ligações cruzadas de DNA-proteína em algumas linhagens celulares (JOSEPH, 2009). Como exemplo disso, na cultura de células de mamíferos, onde além de induzir mutações genéticas (CHOE *et al.*, 2003) induziu também a elevada e precoce frequência de micronúcleos nas mesmas (KORKALAINEN *et al.*, 2012).

Privezentsev; Sirota; Gaziev (1996) relataram dois potenciais mecanismos de genotoxicidade induzida por cádmio: (1) interação direta de Cd/DNA, que leva à quebra da fita simples no DNA; e (2) a inibição da nuclease de incisão durante o processo de reparo no DNA, além da possível interferência deste metal na condensação da cromatina.

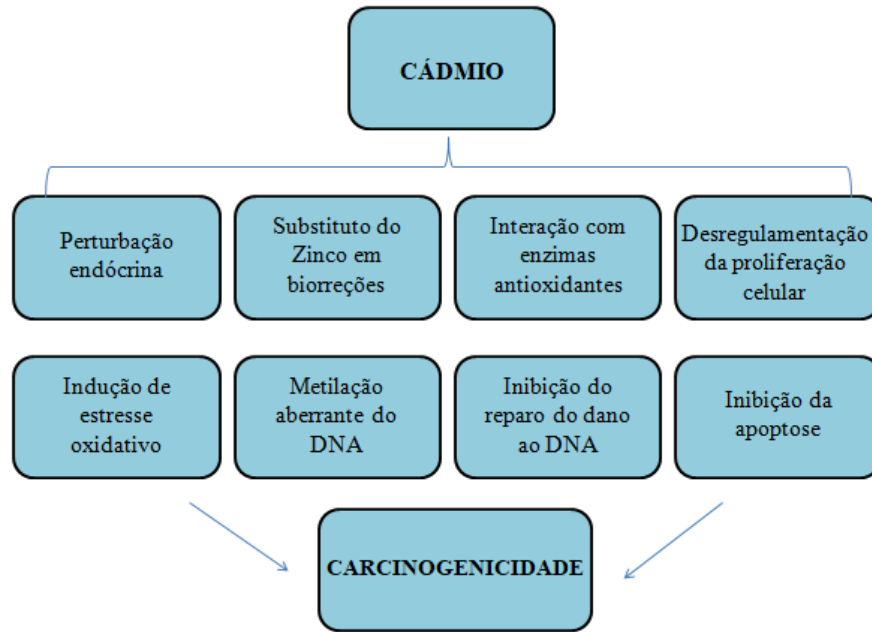
Em estudos anteriores, o cádmio demonstrou induzir processos de apoptose *in vivo* (HARSTAD; KLAASSEN, 2002; TZIROGIANNIS *et al.*, 2003) e *in vitro* (HOSSAIN *et al.*, 2009; KRUMSCHNABEL *et al.*, 2010).

## 1.6 CARCINOGENICIDADE

A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) alerta sobre a contaminação ambiental causada por este metal e classificou, em 1993, compostos à base de cádmio como carcinogênicos para algumas espécies animais e carcinogênicos para humanos, pertencente ao grupo I (IARC, 1993). São considerados carcinogênicos pulmonares, indutores de câncer de próstata e renal, pois afetam a produção de testosterona e induzem hiperplasia de células intersticiais testiculares (GOYER; LIU; WAALKES, 2004).

O cádmio pode ser um potencial fator de risco para câncer de mama, câncer de pâncreas, induzindo o aumento de risco de neoplasias. Adicionalmente, alguns estudos sugerem que o cádmio pode estar envolvido em doenças do fígado, sistema hematopoiético, bexiga e estômago (WAALKES, 2003).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na carcinogenicidade do cádmio, que podem ser observados na Figura 2, incluem também a ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, ruptura da adesão celular e a inibição do reparo do DNA (ILYASOVA; SCHWARTZ, 2005). De acordo com estudos da literatura, sugere-se que a exposição ao cádmio pode afetar a proliferação, diferenciação, apoptose, sinalização celular e outras atividades celulares, as quais poderiam induzir a carcinogênese direta ou indiretamente (WAALKES, 2003).



**Figura 2:** Alguns mecanismos de carcinogenicidade do cádmio nos órgãos corporais.

Fonte: Adaptado de Bishak *et al.* (2015).

Embora existam alguns apontamentos sobre a toxicologia do cádmio, ainda existem lacunas a serem preenchidas, como a concentração mínima capaz de induzir danos celulares, especialmente em células humanas. Sendo assim, este trabalho visa investigar as concentrações mínimas desse metal capazes de induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos em células humanas, através da exposição a diferentes concentrações, utilizando como modelo experimental cultura de linfócitos humanos.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as concentrações mínimas de cádmio capazes de induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos sobre cultura de linfócitos humanos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o cádmio é capaz, nas concentrações propostas, de induzir danos à membrana celular de linfócitos humanos *in vitro*.
- Avaliar os efeitos das concentrações de cádmio propostas sobre a proliferação de linfócitos humanos *in vitro*.
- Avaliar a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos *in vitro* expostos às concentrações de cádmio propostas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DA MATRIZ E CULTURA CELULAR

A obtenção da matriz biológica utilizada neste estudo, linfócitos humanos, foi através de punção venosa de voluntário autodenominado saudável, maior de 18 anos de idade, não fumante, sem uso de medicação continuada pelo menos há seis meses antes da coleta de amostra sanguínea e de qualquer outro tipo de medicação pelo menos trinta dias antes da coleta. Uma vez obtida a matriz, foi procedido com o protocolo para preparação de cultura celular e realização dos protocolos experimentais, que foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIPAMPA sob o número 27045614.0.0000.5323.

Inicialmente foi preparada uma pré-cultura em garrafa para fins de proliferação celular. Após 24h de incubação, uma suspensão de 100  $\mu$ L com aproximadamente 88.500 células linfocitárias foi adicionada em cada frasco de cultura contendo meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina, como descrito previamente por Güz *et al.* (2017), com modificações. Os frascos de cultura foram cultivados 48h, a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. O controle negativo utilizado foi o próprio meio de cultura e o controle positivo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 4  $\mu$ M para os testes de viabilidade e proliferação, e demecolcine 10  $\mu$ g/mL para o teste de micronúcleo. As concentrações de cádmio testadas foram 1, 2,5 e 5  $\mu$ g/mL, baseadas em trabalho prévio desenvolvido pelo grupo (dados não publicados). Todos os grupos foram ensaiados em triplicata.

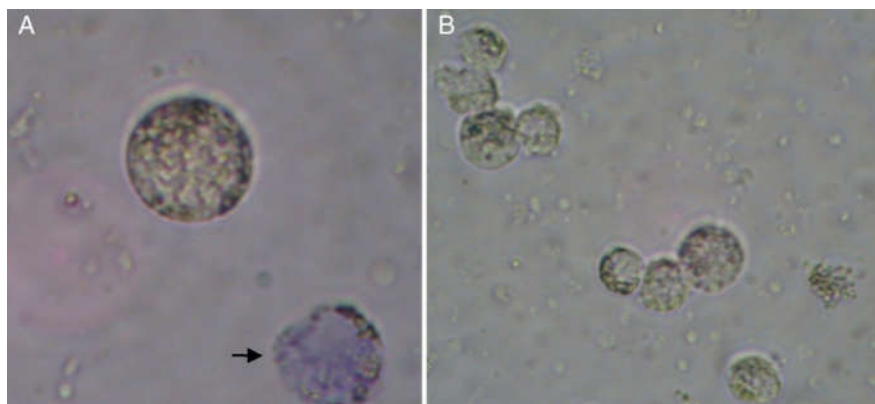
#### 3.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS

A técnica escolhida para avaliar a citotoxicidade foi a viabilidade celular, enquanto que os parâmetros genotóxicos foram avaliados através das seguintes técnicas: proliferação celular e teste micronúcleo.

##### 3.2.1 Viabilidade celular

A viabilidade foi avaliada através da perda da integridade da membrana leucocitária utilizando 10  $\mu$ L de Azul de Tripán e 10  $\mu$ L da amostra (BUROW *et al.*, 1998) e após três

minutos, uma alíquota foi colocada em uma Câmara de Neubauer e visualizada em microscópio em um aumento de 400X. A diferenciação entre células vivas e mortas se dá pela obtenção de coloração azul no citoplasma das células inviáveis (Figura 3).



**Figura 3:** Células vivas (A e B) e célula não viável corada em azul (A - seta).

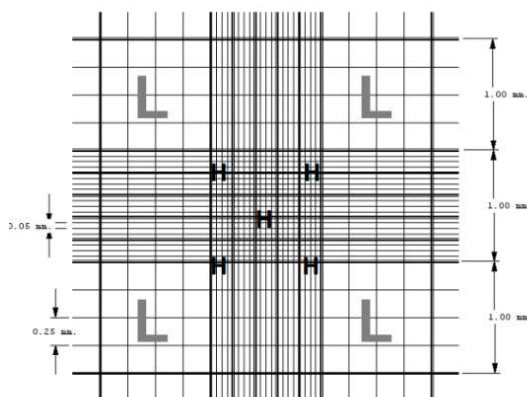
Fonte: Vireque *et al.* (2013).

### 3.2.2 Proliferação celular

Nesta técnica, homogeneizou-se 10  $\mu\text{L}$  da amostra e posteriormente preencheu-se a Câmara de Neubauer com esta suspensão. A contagem dos linfócitos foi realizada nos campos assinalados com a letra “L” (Figura 4).

A fórmula utilizada foi:

Número total de linfócitos/mL = número de células contadas x  $10^4$  x diluição / 4 (número de quadrados).



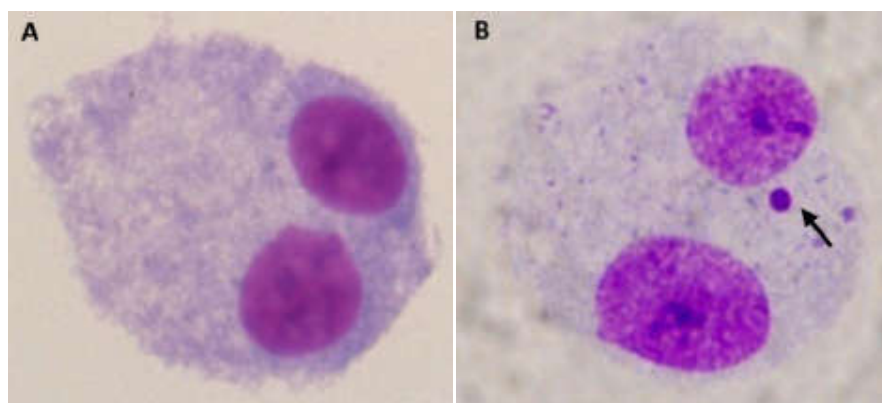
**Figura 4:** Método de contagem de linfócitos em Câmara de Neubauer.

Disponível em: <http://edusanjalmicro.blogspot.com/2010/07/techniques-of-isolation-and-enumeration.html>.

Acesso em 05/05/2018.

### 3.2.3 Micronúcleo

O teste de micronúcleos foi realizado como descrito por Schmid (1975), onde foram preparados esfregaços da cultura de linfócitos a partir de 50  $\mu$ L da amostra e, após secagem, foram corados pelo kit de coloração Panótica da Labtest<sup>®</sup>. A análise foi realizada em microscópio óptico com objetiva para ampliação de 1.000 X. Para cada lâmina, 500 células foram contabilizadas e classificadas quanto à quantidade de células mononucleadas com presença de micronúcleos e células binucleadas com micronúcleos, células em processo necrótico e células em processo apoptótico (Figura 5).



**Figura 5:** Células binucleadas (A) sem micronúcleo e (B) com micronúcleo (seta).

Fonte: Reis *et al.* (2015).

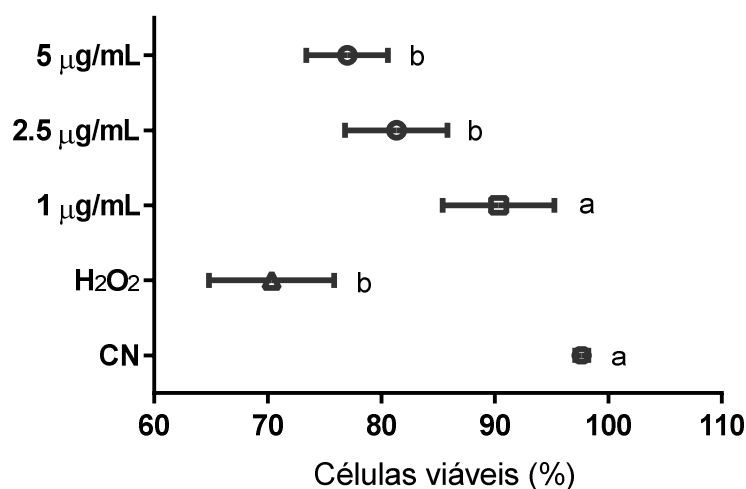
### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados provenientes dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via. Ambos os tratamentos estatísticos foram complementados com o teste de Tukey para múltiplas comparações. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS DE CÁDMIO INDUZEM CITOTOXICIDADE EM LINFÓCITOS HUMANOS

A Figura 6 demonstra que o cádmio induziu uma diminuição do percentual de células viáveis de 17% (2,5  $\mu\text{g/mL}$ ) a 21% (5  $\mu\text{g/mL}$ ) nas duas maiores concentrações testadas em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). A concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  não alterou significativamente a viabilidade celular ao ser comparada com o controle negativo.



**Figura 6:** Teste de viabilidade celular em linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações de cádmio. O gráfico demonstra as concentrações de cádmio, controle positivo e negativo *versus* porcentagem de células viáveis. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ ;  $p < 0,05$ . As letras indicam diferenças significativas em relação ao controle negativo;  $p < 0,05$ . CN=controle negativo; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=controle positivo.

A literatura apresenta alguns trabalhos sobre a citotoxicidade do cádmio, tanto com linhagens de animais quanto de humanas. Em células PC12 de ratos, após exposição ao metal, em concentrações que variaram de 0,46  $\mu\text{g/mL}$  a 1,83  $\mu\text{g/mL}$ , o cádmio diminuiu o número de células viáveis em ~25% a 75% nas duas maiores concentrações testadas (HOSSAIN *et al.*, 2018). Em outro estudo, utilizando células auditivas HEI-OC1 de ratos, o cádmio diminuiu a viabilidade celular em ~35% a 55% nas concentrações ~0,4 e 3,5  $\mu\text{g/mL}$  (KIM *et al.*, 2008). Em linfócitos de ratos, Pathak e Khandelwal (2006) estudaram a exposição dessas células ao cádmio e verificaram uma diminuição da viabilidade celular de ~50% a 80% nas concentrações de 4,5 e 18,3  $\mu\text{g/mL}$ .

Em relação a células humanas, o cádmio demonstrou ser capaz de diminuir a viabilidade em ~70% da linhagem HEK293, de rim embrionário humano, na concentração de



~18 µg/mL (CHOMCHAN *et al.*, 2018). Em células epiteliais humanas CRL 11241, Song e Koh (2012) demonstraram a diminuição do número de células viáveis em ~6% a 49% nas concentrações entre ~3,7 e 18 µg/mL de cádmio.

Ainda dentro deste contexto, Okoko e Ere (2012) relataram que o cádmio diminuiu a viabilidade de células U937 de linfoma humano em aproximadamente 86% na concentração de ~0,02 µg/mL. Já Oh e Lim (2006) submeteram células HepG2 de hepatoma humano a diferentes concentrações de cádmio (0,46 a 7,3 µg/mL, 24 horas de incubação) e obtiveram uma diminuição da viabilidade celular de ~25% a 50% nas duas maiores concentrações testadas (3,6 e 7,3 µg/mL).

Nosso estudo, entretanto, demonstrou que o cádmio, quando em contato com PBMC (células mononucleares do sangue periférico) humanas foi capaz de induzir citotoxicidade nas concentrações de 2,5 e 5 µg/mL. Como é possível observar, há uma variabilidade no efeito citotóxico e da concentração capaz de induzi-lo entre os tipos celulares que foram reportados pela literatura. Entretanto, é interessante observar que os tipos celulares humanos que apresentaram diminuição da viabilidade em concentrações menores que as que observamos são células alteradas (de linhagens cancerígenas), que não respondem como as células normais, tais como as que foram testadas no presente estudo.

Em relação ao mecanismo de indução de citotoxicidade, Lemarié *et al.* (2004) reportaram que a toxicidade induzida por cádmio pode estar relacionada à necrose e/ou apoptose, independente de caspases, como fora observado em células Hep3B de hepatocarcinoma humano. Esses achados, segundo os autores, parecem estar associados à translocação nuclear da endonuclease G e ao fator indutor de apoptose, duas proteínas apoptogênicas mitocondriais. A liberação dessas proteínas está provavelmente relacionada ao aumento rápido e sustentado do cálcio citoplasmático, que coincide com o aumento do potencial de membrana mitocondrial e produção de ERO.

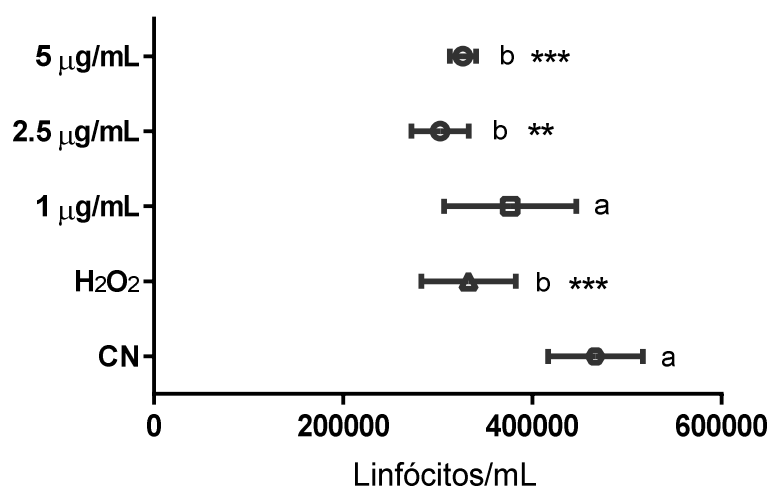
## 4.2 CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS DE CÁDMIO INDUZEM GENOTOXICIDADE EM LINFÓCITOS HUMANOS

### 4.2.1 Efeitos do cádmio sobre a proliferação celular

A identificação de compostos genotóxicos é de grande relevância na ciência para que seja possível avaliar a segurança de medicamentos, alimentos e contaminantes ambientais que possam causar riscos à saúde humana (POWERS; LAWTON; MODLIN, 1995). Já existe um

considerável número de testes para a detecção da genotoxicidade de compostos, bem como para mensurar a exposição a estes compostos (HOVHANNISYAN, 2010). De acordo com Eastmond e Tucker (1989), um único teste não é suficiente para detectar todas as substâncias genotóxicas, pois uma série de acontecimentos genéticos pode ocorrer após o contato com o agente tóxico. Desta forma, os riscos genotóxicos são medidos por meio de uma combinação de testes que investigam os principais danos ao material genético.

Neste trabalho, para investigar a genotoxicidade do cádmio foram realizados os seguintes testes: proliferação celular e teste de micronúcleo. Os resultados obtidos a partir do ensaio de proliferação celular em linfócitos humanos (Figura 7) expostos a diferentes concentrações de cádmio demonstraram que apenas as duas maiores concentrações testadas (2,5  $\mu\text{g/mL}$  e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) reduziram significativamente a proliferação celular em aproximadamente 34,1%, quando comparadas ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7:** Ensaio de proliferação celular em linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações de cádmio. O gráfico demonstra as concentrações de cádmio, controle positivo e negativo *versus* número de linfócitos/mL. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ . As letras indicam diferenças significativas em relação ao controle negativo; \* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . CN=controle negativo; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=controle positivo.

A proliferação celular é um critério de avaliação genotóxica que demonstra a capacidade de determinada célula ou de um grupo de células proliferarem-se frente a situações que podem ser adversas. Neste trabalho, as diferentes concentrações testadas de cádmio demonstraram poder interferir no processo de proliferação, que dispõe de vários alvos moleculares passíveis de sofrer interferência, como os que envolvem a manutenção da estrutura da molécula de DNA.

Há alguns anos vem sendo investigado os mecanismos pelos quais o cádmio causa a redução da proliferação celular. Pesquisadores têm relatado que o cádmio interfere na homeostase do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular. Hechtenberg e Beyersmann (1994) submeteram núcleos de células de fígado bovino a concentrações nanomolares de cádmio e observaram uma diminuição de até 60% dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Eles supõem que, como o íon cádmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) tem um raio iônico semelhante ao  $\text{Ca}^{2+}$ , ele seria capaz de substituir o  $\text{Ca}^{2+}$  em seus locais de ligação e transporte intracelular. Portanto, a ação inibidora do cádmio no transporte nuclear de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser um resultado do bloqueio do local de ligação de transporte da bomba nuclear de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, eles demonstraram que o íon  $\text{Cd}^{2+}$  livre no meio de cultivo é capaz de entrar no núcleo celular. Como consequência, o íon  $\text{Cd}^{2+}$  ocuparia sítios de ligação de depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intranucleares, de modo que a capacidade do núcleo de sequestrar  $\text{Ca}^{2+}$  seria reduzida.

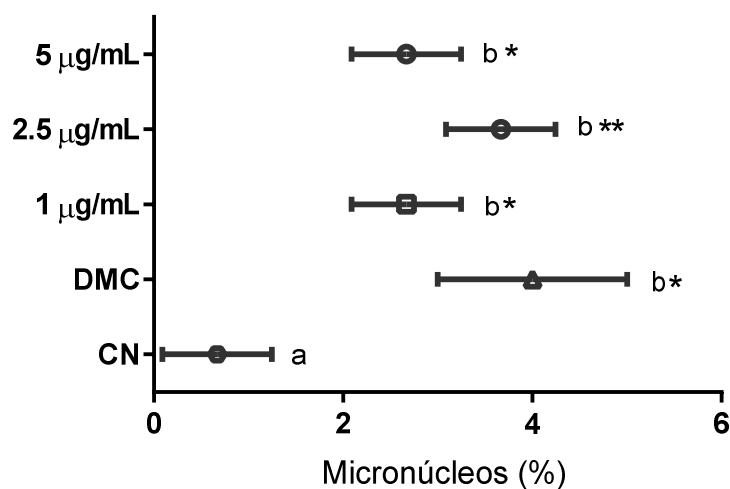
As alterações na homeostase nuclear do  $\text{Ca}^{2+}$  causadas por  $\text{Cd}^{2+}$  são fatores que podem perturbar a regulação dependente da  $\text{Ca}^{2+}$  na replicação do DNA e na transcrição gênica. Sabe-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  controla a expressão de genes relacionados ao crescimento e à transformação celular (MISRA *et al.*, 2002). Portanto, o comprometimento da regulação nuclear de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo  $\text{Cd}^{2+}$  pode interferir na regulação da proliferação celular. Diante das situações citadas, outros estudos complementares que tenham por objetivo elucidar as interferências nas fases do ciclo celular são necessários, principalmente em células humanas.

#### **4.2.2 Efeitos genotóxicos de mutagenicidade induzida por cádmio**

O teste do micronúcleo é um dos testes mais utilizados para avaliação mutagênica de compostos. Ele identifica mutações cromossômicas visíveis, que são expressas pelos cromossomos durante o ciclo de divisão mitótica ou meiótica através de atrasos cromossômicos decorrentes de problemas no fuso mitótico, e que levam a perdas cromossômicas, originando os micronúcleos (GRANT, 1978).

Define-se mutação como uma mudança na sequência de DNA, o que leva a uma alteração herdável da função gênica. Os compostos que têm a capacidade de mudar a sequência do DNA são considerados tóxicos para os genes e são, então, chamados de genotóxicos (RIBEIRO, 2003), que podem ser transitórios. Entretanto, os efeitos genotóxicos relacionados a processos mutagênicos são persistentes, pois levam a uma alteração definitiva no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD *et al.*, 2002).

Aqui, demonstramos um aumento da frequência de micronúcleos em linfócitos humanos após exposição às diferentes concentrações de cádmio testadas, em aproximadamente 2 a 4%, quando comparadas ao controle negativo ( $p < 0,05$ ) (Figura 8).



**Figura 8:** Teste de frequência de micronúcleos em linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações de cádmio. O gráfico demonstra as concentrações de cádmio, controle positivo e negativo *versus* número de micronúcleos/500 linfócitos. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ . As letras indicam diferenças significativas em relação ao controle negativo; \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . CN=controle negativo; DMC=controle positivo.

A literatura dispõe de alguns estudos que avaliaram a frequência de micronúcleos induzida por cádmio em células animais, vegetais e humanas. Estudos *in vivo* envolvendo ratos, encontraram um aumento da frequência de micronúcleos nos grupos tratados com cádmio em aproximadamente 5%, independentemente do regime de doses (0,5 a 15 mg/Kg/dia) e períodos (de 60 a 120 dias), em relação aos respectivos controles negativos, que apresentaram, em média, uma frequência de 1% (FAHMY e ALY, 2000; ÇELIK, ÇÖMELEKOĞLU e YALIN, 2005; ÇELIK *et al.*, 2009; TAPISSO *et al.*, 2009).

Em estudo *in vitro*, com fibroblastos embrionários de ratos, foi avaliada a concentração de cádmio de 0,2 µg/mL e observou-se uma elevação da frequência de micronúcleos de aproximadamente 5%, enquanto o controle negativo apresentou uma frequência de 1% (KORKALAINEN *et al.*, 2012).

Por outro lado, estudos conduzidos a partir de exposições ocupacionais humanas ao cádmio reiteram a capacidade do cádmio em induzir efeito mutagênico, em diferentes concentrações determinadas no sangue desses indivíduos, como as testadas por Palus *et al.*

(2006), que variam de 0,0054 a 0,0308  $\mu\text{g/mL}$ , com uma frequência média de micronúcleos de 13% para os grupos tratados e de aproximadamente 6% para o controle negativo.

Por outro lado, Bércecs *et al.* (1993) avaliaram a presença de micronúcleos em linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações de cádmio, que variaram de 0,2 a 184  $\mu\text{g/mL}$ , com uma frequência de micronúcleos de 20 a 60%.

Esses achados dos estudos com células animais e humanas demonstram, claramente, que há uma variabilidade de efeito genotóxico e mutagênico induzido por cádmio em relação aos tipos celulares e, assim como encontrado no nosso estudo, depende das concentrações utilizadas. Sendo assim, podemos observar que o cádmio tem sido mostrado como um potencial agente genotóxico independente da linhagem celular, mas dependente de concentração.

De qualquer forma, nossos dados, embora não apontem o mecanismo pelo qual induzem lesão celular e ao seu material genético, trazem novos dados sobre a toxicologia do cádmio, ao mesmo tempo que apontam para a necessidade para discutir melhor sobre o risco ao metal a partir de diferentes fontes de exposição, no que toca às concentrações mínimas capazes de induzir danos a células humanas.

## 5 CONCLUSÃO

Considerando a exposição de linfócitos humanos ao cádmio em uma faixa de concentração de 1, 2,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ , e período de incubação de 48 horas, foi possível concluir que:

As duas maiores concentrações testadas de cádmio (2,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) demonstraram ser capazes de diminuir significativamente a viabilidade celular, agindo sobre a membrana celular dos linfócitos, quando comparadas ao controle negativo, evidenciando os efeitos citotóxicos deste composto mesmo em baixas concentrações.

Em relação aos efeitos genotóxicos, as duas maiores concentrações testadas de cádmio (2,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) demonstraram ser capazes de interferir negativamente no processo de proliferação celular, diminuindo significativamente o número de células proliferadas, quando comparadas ao controle negativo. No teste de micronúcleo, todas as concentrações testadas de cádmio (1, 2,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) demonstraram ser capazes de aumentar a frequência de número de células contendo micronúcleos, em comparação com o controle negativo, evidenciando possíveis efeitos mutagênicos deste composto.

Através dos resultados encontrados surge a necessidade de estudos complementares relacionados ao cádmio, para quem sabe elucidar os possíveis mecanismos pelos quais este metal, mesmo em baixas concentrações, é capaz de induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos em linfócitos humanos, como observado neste estudo.

## REFERÊNCIAS

ABRIL, Gabriela A. *et al.* **Biomonitoring of airborne particulate matter emitted from a cement plant and comparison with dispersion modelling results.** Atmospheric Environment, [s.l.], v. 82, p.154-163, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.10.020>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

ADRIANO, D.C. **Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals.** 2nded. Newyork: Springer-Verlag ; p: 264, 2001. Acesso em: 12 abr 2018.

AOSHIMA, Keiko. **Itai-itai disease: Lessons from the investigations of environmental epidemiology conducted in the 1970's, with special reference to the studies of the Toyama Institute of Health.** Nippon Eiseigaku Zasshi (Japanese Journal Of Hygiene), [s.l.], v. 72, n. 3, p.149-158, 2017. Japanese Society for Hygiene. <http://dx.doi.org/10.1265/jjh.72.149>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 14 abr. 2018.

\_\_\_\_\_. **Epidemiology of renal tubular dysfunction in the inhabitants of a cadmium-polluted area in the Jinzu River basin in Toyama prefecture.**The Tohoku Journal Of Experimental Medicine, [s.l.], v. 152, n. 2, p.151-172, 1987. Tohoku University Medical Press. <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.152.151>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 15 abr. 2018.

ATSDR, AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Medical management guidelines for acute chemical exposure.** Atlanta, GA: Department of Health and Human Services; 2000. p. 22. Disponível em: <<https://wonder.cdc.gov/wonder/prevguid/p0000016/p0000016.asp>>. Acesso em: 29 mar 2018.

ATSDR, AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for cadmium.** 2012. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>>. Acesso em: 10 mai 2018.

BABA, Hayato *et al.* **Histopathological analysis for osteomalacia and tubulopathy in Itai-Itai disease.** The Journal Of Toxicological Sciences, [s.l.], v. 39, n. 1, p.91-96, 2014. Japanese Society of Toxicology. <http://dx.doi.org/10.2131/jts.39.91>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

BALDANTONI, Daniela; NICOLA, Flavia de; ALFANI, Anna. **Air biomonitoring of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons near a cement plant.** Atmospheric Pollution Research, [s.l.], v. 5, n. 2, p.262-269, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.5094/apr.2014.032>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

BÉRCES, J *et al.* **Using the micronucleus assay to detect genotoxic effects of metal ions.** Environmental Health Perspectives 101.Suppl 3, p. 11–13, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

BERMUDEZ, Gonzalo M.a. *et al.* **Heavy metal pollution in topsoils near a cement plant: The role of organic matter and distance to the source to predict total and HCl-extracted heavy metal concentrations.** Chemosphere, [s.l.], v. 78, n. 4, p.375-381, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.012>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

BERNHOF, Robin A. **Cadmium toxicity and treatment.** The Scientific World Journal, [s.l.], v. 2013, p.1-7, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/394652>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 13 abr. 2018.

BERRIDGE, Michael J.; BOOTMAN, Martin D.; LIPP, Peter. **Calcium - a life and death signal.** Nature, [s.l.], v. 395, n. 6703, p.645-648, out. 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/27094>. Disponível em: <<https://www.nature.com/nature/>>. Acesso em: 24 mai 2018.

BERRIDGE, Michael J.; LIPP, Peter; BOOTMAN, Martin D. **The versatility and universality of calcium signalling.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, [s.l.], v. 1, n. 1, p.11-21, out. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/35036035>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 19 mai 2018.

BIAGIOLI, Marta *et al.* **Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis.** Cell Calcium, [s.l.], v. 43, n. 2, p.184-195, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2007.05.003>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 13 abr. 2018.

BISHAK, Yaser Khaje *et al.* **Mechanisms of cadmium carcinogenicity in the gastrointestinal tract.** Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention, [s.l.], v. 16, n. 1, p.9-21, 4 fev. 2015. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention. <http://dx.doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.1.9>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 02 jun. 2018.

BUROW, M.E., *et al.* **Differences in susceptibility to tumour necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants.** Cancer Research, [s.l.], v. 58, n. 21, p. 4940-4946, nov. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

CALLAN, Anna; HINWOOD, Andrea; DEVINE, Amanda. **Metals in commonly eaten groceries in western Australia: a market basket survey and dietary assessment.** Food Additives & Contaminants: Part A, [s.l.], v. 31, n. 12, p.1968-1981, 17 nov. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2014.973457>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

CAC, CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **In general standard for contaminants and toxins in food and feed.** Codex Stan 193–1995. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Roma, Itália, 2015. Disponível em: <[www.fao.org/input/download/standards/17/CXS\\_193e\\_2015.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/17/CXS_193e_2015.pdf)>. Acesso em: 31 mar 2018.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Fourth national report on human exposure to environmental chemicals.** 2015 Disponível em: <[https://www.cdc.gov/biomonitoring/pdf/FourthReport\\_UpdatedTables\\_Feb2015.pdf](https://www.cdc.gov/biomonitoring/pdf/FourthReport_UpdatedTables_Feb2015.pdf)>. Acesso em: 13 mai 2018.



ÇELİK, Ayla *et al.* **Assessment of cadmium genotoxicity in peripheral blood and bone marrow tissues of male wistar rats.** *Toxicology Mechanisms And Methods*, [s.l.], v. 19, n. 2, p.135-140, fev. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15376510802354979>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

ÇELİK, Ayla; ÇÖMELEKOĞLU, Ülkü; YALIN, Serap. **A study on the investigation of cadmium chloride genotoxicity in rat bone marrow using micronucleus test and chromosome aberration analysis.** *Toxicology And Industrial Health*, [s.l.], v. 21, n. 9, p.243-248, out. 2005. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1191/0748233705th237oa>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

CHEN, C. *et al.* **Environmental impact of cement production: detail of the different processes and cement plant variability evaluation.** *Journal Of Cleaner Production*, [s.l.], v. 18, n. 5, p.478-485, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2009.12.014>. Disponível em: <<file:///C:/Users/win10/Downloads/JCLP2100.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

CHOE, Suck-young *et al.* **Evaluation of estrogenicity of major heavy metals.** *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 312, n. 1-3, p.15-21, ago. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697\(03\)00190-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697(03)00190-6). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

CHOMCHAN, Rattanamanee *et al.* **Protective effect of selenium-enriched ricegrass juice against cadmium-induced toxicity and DNA damage in HEK293 kidney cells.** *Foods*, [s.l.], v. 7, n. 6, p.81-95, 28 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods7060081>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

COBB, A.B. **The elements cadmium.** 1st ed. New York: Marshall Cavendish Corporation 2008; p:8-10.

DEARFIELD, Kerry L *et al.* **Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy.** *Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, [s.l.], v. 521, n. 1-2, p.121-135, nov. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00236-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00236-x). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

DEPAULT, François *et al.* **Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy in situ end-labeling (EM-ISEL) assay.** *Toxicology In Vitro*, [s.l.], v. 20, n. 4, p.513-518, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2005.09.003>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

EASTMOND, David A.; TUCKER, James D. **Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody.** *Environmental and Molecular Mutagenesis*, [s.l.], v. 13, n. 1, p.34-43, 1989. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/em.2850130104>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

FAHMY, M.A., ALY, F.A. **In vivo and in vitro studies on the genotoxicity of cadmium chloride in mice.** *J. Appl. Toxicol.*, 20, p. 231-238, 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(200005/06\)20:3<231::AID-JAT653>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(200005/06)20:3<231::AID-JAT653>3.0.CO;2-T). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of certain food additives and contaminants: Forty-First report of the joint FAO/WHO expert Committee on Food Additives.** WHO Technical Report Series No. 837; WHO: Geneva, Switzerland, 1993. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44515/WHO\\_TRS\\_960\\_eng.pdf;jsessionid=7E1D314FE795DA6098F905705484906C?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44515/WHO_TRS_960_eng.pdf;jsessionid=7E1D314FE795DA6098F905705484906C?sequence=1)>. Acesso em: 12 abr. 2018.

\_\_\_\_\_. **Summary and conclusions. in proceedings of the joint FAO/WHO expert committee on food additives seventy-third meeting.** Geneva, Switzerland, 8–17 June 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/summary73.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

FOULKES, Ernest C. **Cadmium.** Springer Berlin Heidelberg. Handbook Of Experimental Pharmacology, v. 80, p.144, 2012. Disponível em: <<https://books.google.com.br/>>. Acesso em: 16 mai 2018.

GERHARDSSON, Lars *et al.* **Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers.** Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology, [s.l.], v. 16, n. 4, p.261-266, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0946-672x\(02\)80055-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0946-672x(02)80055-4). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 27 mai 2018.

GODT, Johannes *et al.* **The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health.** Journal Of Occupational Medicine And Toxicology, [s.l.], v. 1, n. 1, p.22-26, 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6673-1-22>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 29 mar. 2018.

GOYER, Robert A.; LIU, Jie; WAALKES, Michael P. **Cadmium and cancer of prostate and testis.** Biometals, [s.l.], v. 17, n. 5, p.555-558, out. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/b:biom.0000045738.59708.20>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 16 abr. 2018.

GRANT, W.F. **Chromosome aberrations in plants as a monitoring system.** Environmental Health Perspectives, v. 27, p.37-43, 1978. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

GÜEZ, Camila Martins *et al.* **Evaluation of basil extract (*Ocimum basilicum L.*) on oxidative, anti-genotoxic and anti-inflammatory effects in human leukocytes cell cultures exposed to challenging agents.** Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences, [s.l.], v. 53, n. 1, e15098, 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902017000115098>. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-82502017000100606](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502017000100606)>. Acesso em: 21 abr. 2018.

GUPTA, R.k. *et al.* **Particulate matter and Elemental emissions from a cement kiln.** Fuel Processing Technology, [s.l.], v. 104, p.343-351, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.06.007>. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/257210587\\_Part particulate\\_matter\\_and\\_elemental\\_emissions\\_from\\_a\\_cement\\_kiln](https://www.researchgate.net/publication/257210587_Part particulate_matter_and_elemental_emissions_from_a_cement_kiln)>. Acesso em: 20 mar. 2018.

HABASHI, Fathi. **Two hundred years Cadmium**. Metall, v. 71, n. 12, p.504-505, 2017. Disponível em: <[http://works.bepress.com/fathi\\_habashi/257/](http://works.bepress.com/fathi_habashi/257/)>. Acesso em: 22 mai. 2018.

HARSTAD, Eric B.; KLAASSEN, Curtis D. **Tumor necrosis factor- $\alpha$ -null mice are not resistant to cadmium chloride-induced hepatotoxicity**. Toxicology And Applied Pharmacology, [s.l.], v. 179, n. 3, p.155-162, mar. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/taap.2001.9362>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 03 abr. 2018.

HECHTENBERG, S.; BEYERSMANN, D. **Interference of cadmium with ATP-stimulated nuclear calcium uptake**. Environmental Health Perspectives, 102 (Suppl 3), p.265-267, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 02 abr. 2018

HORIGUCHI, Hyogo *et al.* **Latest status of cadmium accumulation and its effects on kidneys, bone, and erythropoiesis in inhabitants of the formerly cadmium-polluted Jinzu River Basin in Toyama, Japan, after restoration of rice paddies**. International Archives Of Occupational And Environmental Health, [s.l.], v. 83, n. 8, p.953-970, 4 fev. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00420-010-0510-x>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 16 abr. 2018.

HOSSAIN, Kaniz Fatima Binte *et al.* **Inhibitory effects of selenium on cadmium-induced cytotoxicity in PC12 cells via regulating oxidative stress and apoptosis**. Food and Chemical Toxicology, [s.l.], v. 114, p.180-189, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.034>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 07 jun. 2018.

HOSSAIN, Shireen *et al.* **Cadmium exposure induces mitochondria-dependent apoptosis in oligodendrocytes**. Neurotoxicology, [s.l.], v. 30, n. 4, p.544-554, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2009.06.001>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 07 abr. 2018.

HOVHANNISYAN, Galina G. **Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology**. Molecular Cytogenetics, [s.l.], v. 3, n. 1, p.17-28, 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1755-8166-3-17>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs-Cadmium**; International Agency for Research on Cancer (IARC): 1993, Lyon, France. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-8.pdf>>. Acesso em: 18 mar 2018.

ILYASOVA, D; SCHWARTZ, G. **Cadmium and renal cancer**. Toxicology And Applied Pharmacology, [s.l.], v. 207, n. 2, p.179-186, 1 set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2004.12.005>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

IşđKLđ, Burhanettin *et al.* **Cadmium exposure from the cement dust emissions: A field study in a rural residence**. Chemosphere, [s.l.], v. 63, n. 9, p.1546-1552, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.09.059>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 25 mar. 2018

JARUP, L. **Hazards of heavy metal contamination.** British Medical Bulletin, [s.l.], v. 68, n. 1, p.167-182, 1 dez. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldg032>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 28 mai 2018.

JARUP, Lars; AKESSON, Agneta. **Current status of cadmium as an environmental health problem.** Toxicology And Applied Pharmacology, [s.l.], v. 238, n. 3, p.201-208, 1 ago. 2009. Elsevier BV. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 28 mai 2018.

JIN, Taiyi; LU, Jian; NORDBERG, M. **Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein.** Neurotoxicology, v. 19, n. 4-5, p. 529-535, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 27 mar. 2018.

JOSEPH, Pius. **Mechanisms of cadmium carcinogenesis.** Toxicology and applied pharmacology, [s.l.], v. 238, n. 3, p.272-279, 1 ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.011>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 20 abr. 2018.

KAJI, M. **Role of experts and public participation in pollution control: the case of Itai-itai disease in Japan.** Ethics In Science And Environmental Politics, [s.l.], v. 12, n. 2, p.99-111, 6 jul. 2012. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/eseq00126>. Disponível em: <https://www.int-res.com/abstracts/eseq/v12/n2/p99-111/>. Acesso em: 17 abr. 2018.

KIM, Su-jin *et al.* **The protective mechanism of antioxidants in cadmium-induced ototoxicity *in vitro* and *in vivo*.** Environmental Health Perspectives, [s.l.], v. 116, n. 7, p.854-862, 26 fev. 2008. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.10467>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 29 mai 2018.

KORKALAINEN, Merja *et al.* **Dioxin induces genomic instability in mouse embryonic fibroblasts.** Plos One, [s.l.], v. 7, n. 5, e37895, 29 maio 2012. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037895>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 02 abr. 2018.

KRUMSCHNABEL, Gerhard *et al.* **Apoptosis and necroptosis are induced in rainbow trout cell lines exposed to cadmium.** Aquatic Toxicology, [s.l.], v. 99, n. 1, p.73-85, 1 ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.005>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 06 abr. 2018.

LEMARIÉ, Anthony *et al.* **Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor.** Free Radical Biology And Medicine, [s.l.], v. 36, n. 12, p.1517-1531, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.020>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 29 mai 2018.

MATTSON, Mark P.; CHAN, Sic L. **Calcium orchestrates apoptosis.** Nature Cell Biology, [s.l.], v. 5, n. 12, p.1041-1043, dez. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1203-1041>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 22 mai 2018.

MISRA, Uma Kant *et al.* **Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: The role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms.** Cellular Signalling, [s.l.], v. 14, n. 4, p.327-340, abr. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0898-6568\(01\)00268-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0898-6568(01)00268-6). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

NASKRĘT, H. Dąbkowska-; JAWORSKA, H.; DŁUGOSZ, J. **Assessment of the total nickel content and its available forms in the soils around cement plant Lafarge Poland.** International Journal Of Environmental Research, [s.l.], v. 8, n. 1, p.231-236, jan. 2014. University of Tehran. <http://dx.doi.org/10.22059/ijer.2014.712>. Disponível em: <[https://ijer.ut.ac.ir/article\\_712\\_0.html](https://ijer.ut.ac.ir/article_712_0.html)>. Acesso em: 19 mar. 2018.

OGUNKUNLE, Clement Oluseye; FATOBA, Paul Ojo. **Contamination and spatial distribution of heavy metals in topsoil surrounding a mega cement factory.** Atmospheric Pollution Research, [s.l.], v. 5, n. 2, p.270-282, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.5094/apr.2014.033>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

OH, S; LIM, S. **A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation.** Toxicology And Applied Pharmacology, [s.l.], v. 212, n. 3, p.212-223, 1 maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2005.07.018>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 03 mar. 2018.

OKOKO, Tebekeme; ERE, Diepreye. **Hibiscus sabdariffa extractivities on cadmium—mediated alterations of human U937 cell viability and activation.** Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine, [s.l.], v. 5, n. 1, p.33-36, jan. 2012. Medknow. [http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645\(11\)60241-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645(11)60241-1). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

PALUS, J *et al.* **Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium.** Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis, [s.l.], v. 540, n. 1, p.19-28, set. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5718\(03\)00167-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5718(03)00167-0). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

PATHAK, Neelima; KHANDELWAL, Shashi. **Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium.** Toxicology, [s.l.], v. 220, n. 1, p.26-36, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2005.11.027>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 02 abr. 2018.

PATRICK, L. **Toxic metals and antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity.** AlternMedRev, [s.l.], v. 8, n.2, p.106-128, mai 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

PEDRON, F., *et al.* **Heavy metal trends in surface soils around a cement plant.** Agrochimica, v.56, p.268-280, 2012. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

POWERS, Robert e; LAWTON, Gary P; MODLIN, Irvin M. **Genotoxicity, carcinogenicity and acid-suppressing medications.** *Pharmacology & Therapeutics*, [s.l.], v. 65, n. 3, p.303-317, jan. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)98596-i](http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258(95)98596-i). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

PRIVEZENTSEV, K.V.; SIROTA, N.P; GAZIEV, A.J. **The genotoxic of cadmium studied *in vivo*.** *Tsitologia i Genetika*, [s.l.], v. 30 (3),p. 45-51, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 03 abr. 2018.

RAFATI-RAHIMZADEH, Mehrdad *et al.* **Cadmium toxicity and treatment: An update.** *Caspian Journal Of Internal Medicine*, [s.l.], v. 8, n. 3, p.135-145, jun. 2017. Babol University of Medical Sciences. <http://dx.doi.org/10.22088/cjim.8.3.135>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 16 mar. 2018.

RANI, Anju *et al.* **Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review.** *International Journal Of Environmental Health Research*, [s.l.], v. 24, n. 4, p.378-399, 11 out. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2013.835032>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 12 abr. 2018.

REIS, Érica de Melo *et al.* **Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources (amorphous and nanoparticles) using the *in vitro* micronucleus test and the *in vivo* wing somatic mutation and recombination test.** *Food And Chemical Toxicology*, [s.l.], v. 84, p.55-63, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.07.008>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 19 mai 2018.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental.** Rio Grande do Sul: Ulbra, 2003, 356p.

RICHARD, Egbe Edmund *et al.* **Cement dust exposure and perturbations in some elements and lung and liver functions of cement factory workers.** *Journal Of Toxicology*, [s.l.], v. 2016, p.1-7, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6104719>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

RICHTER, Patricia; FAROON, Obaid; PAPPAS, R. Steven. **Cadmium and cadmium/zinc ratios and tobacco-related morbidities.** *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, [s.l.], v. 14, n. 10, p.1154-1173, 29 set. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph14101154>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 29 mar. 2018.

ROVIRA, Joaquim *et al.* **Environmental levels of PCDD/Fs and metals around a cement plant in Catalonia, Spain, before and after alternative fuel implementation. Assessment of human health risks.** *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 485-486, p.121-129, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.061>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

\_\_\_\_\_. **Monitoring environmental pollutants in the vicinity of a cement plant: A temporal study.** *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, [s.l.], v. 60, n. 2, p.372-384, 8 dez. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-010-9628-9>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 21 mar. 2018.

SATARUG, Soisungwan; MOORE, Michael R. **Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in food stuffs and cigarette smoke.** Environmental Health Perspectives, [s.l.], v. 112, n. 10, p.1099-1103, 25 mar. 2004. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.6751>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 30 mar. 2018.

SATARUG, Soisungwan; VESEY, David A.; GOBE, Glenda C. **Current health risk assessment practice for dietary cadmium: Data from different countries.** Food And Chemical Toxicology, [s.l.], v. 106, p.430-445, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.013>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 30 mar. 2018.

SCHMID, W. **The micronucleus test.** Mutation Research/environmental Mutagenesis And Related Subjects, [s.l.], v. 31, n. 1, p.9-15, fev. 1975. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

SEBASTIAN, Abin; PRASAD, Majeti Narasimha Vara. **Cadmium minimization in rice. A review.** Agronomy For Sustainable Development, [s.l.], v. 34, n. 1, p.155-173, 21 jun. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-013-0152-y>. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000332417500009>. Acesso em: 27 mai 2018.

SINGH, Narendra P. *et al.* **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** Experimental Cell Research, [s.l.], v. 175, n. 1, p.184-191, mar. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

SINGH, V. P. **Metal toxicity and tolerance in plants and animals.** Sarup& Sons, v.1, p. 95, 2005. Disponível em: <<https://books.google.com.br/>>. Acesso em: 16 mai 2018.

SON, Young-ok *et al.* **Cadmium induces intracellular Ca<sup>2+</sup>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent apoptosis through jnk- and p53-mediated pathways in skin epidermal cell line.** Toxicological Sciences, [s.l.], v. 113, n. 1, p.127-137, 3 nov. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfp259>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

SONG N-H, KOH J-W. **Effects of cadmium chloride on the cultured human lens epithelial cells.** Molecular Vision. n. 18, p.983-988. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 14 jun 2018.

STOHS, S. **Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions.** Free Radical Biology And Medicine, [s.l.], v. 18, n. 2, p.321-336, fev. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-h](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-h). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 03 abr. 2018.

TAPISSO, Joaquim Torres *et al.* **Induction of micronuclei and sister chromatid exchange in bone-marrow cells and abnormalities in sperm of Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to cadmium, lead and zinc.** Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis, [s.l.], v. 678, n. 1, p.59-64, ago. 2009. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.07.001>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 13 jun. 2018.

TZIROGIANNIS, Konstantinos N. *et al.* **Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver: the role of apoptosis.** Archives Of Toxicology, [s.l.], v. 77, n. 12, p.694-701, 1 dez. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-003-0499-y>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 04 abr. 2018.

VALKO, M. *et al.* **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** Chemico-biological Interactions, [s.l.], v. 160, n. 1, p.1-40, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 02 abr. 2018.

WAALKES, M. **Cadmium carcinogenesis.** Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis, [s.l.], v. 533, n. 1-2, p.107-120, 10 dez. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.011>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 21 abr. 2018.

WANG, Lin *et al.* **Role of oxidative stress, apoptosis, and intracellular homeostasis in primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to cadmium.** Biological Trace Element Research, [s.l.], v. 127, n. 1, p.53-68, 19 set. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-008-8223-7>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 14 abr. 2018.

WANG, S. H. *et al.* **Cadmium-induced autophagy and apoptosis are mediated by a calcium signaling pathway.** Cellular And Molecular Life Sciences, [s.l.], v. 65, n. 22, p.3640-3652, 11 out. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8383-9>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 12 abr. 2018.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **IPCS Environmental health criteria 134: Cadmium.** Geneva, Switzerland, 1992. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>. Acesso em: 28 mar 2018.

YEH, Jeng-hsien *et al.* **Cadmium-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation and subsequent apoptosis in renal tubular cells.** Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, [s.l.], v. 104, n. 5, p.345-351, maio 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00391.x>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 11 abr. 2018.