

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS
ENERGÉTICAS E NUCLEARES (PROTEN)
CRCN-NE/CNEN

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA COSTA JÚNIOR

**CHUMBO-210 E FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS
ESFOLIATIVAS DA URINA DE FUMANTES E NÃO FUMANTES**

RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL

DEZEMBRO - 2015

**CHUMBO-210 E FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS
ESFOLIATIVAS DA URINA DE FUMANTES E NÃO FUMANTES**

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA COSTA JÚNIOR

**CHUMBO-210 E FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS
ESFOLIATIVAS DA URINA DE FUMANTES E NÃO FUMANTES**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Edvane Borges da Silva (CAV/DEN-UFPE)

RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL

DEZEMBRO – 2015

Catálogo na fonte

Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

C837c Costa Júnior, Carlos Eduardo de Oliveira.

Chumbo-210 e frequência de micronúcleos em células esfoliativas da urina de fumantes e não fumantes. / Carlos Eduardo de Oliveira Costa Júnior. - Recife: O Autor, 2015.

135 f. : il., tabs, gráfs.

Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2015.

Inclui referências bibliográficas, apêndices e anexos.

1. Urina. 2. Micronúcleos. 3. Fumantes. 4. Radionuclídeos naturais. 5. Biomonitoração. I. Silva, Edvane Borges da, orientadora. II. Título.

UFPE

CDD 612.01448 (21. ed.)

BDEN/2016-02

**CHUMBO-210 E FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS
ESFOLIATIVAS DA URINA DE FUMANTES E NÃO FUMANTES**

Carlos Eduardo de Oliveira Costa Júnior

APROVADO EM: 09.012.2015

ORIENTADORA: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dra. Edvane Borges da Silva - CAV/DEN/UFPE

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas - CAV/UFPE

Prof. Dra. Marcela Maria Pereira de Lemos Pinto – UNINASSAU

Prof. Dra. Simey de Souza Leão P. Magnata - CAV/UFPE

Dr. Wagner Eustaquio de Vasconcelos – UNICAP

Visto e permitida à impressão

**Coordenador do
PROTEN/DEN/UFPE**

Dedico este trabalho a toda minha família e aqueles que lutam para se livrar do tabagismo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** primeiramente, pela força e motivação em realizar este trabalho. Em nossas conversas nas madrugadas o conforto, palavras de incentivo e o apoio dado foram cruciais para que essa jornada chegasse ao fim satisfatoriamente. Por colocar pessoas honestas e generosas dispostos a contribuir com esta pesquisa.

Aos meus familiares que me acompanharam, apoiaram e sensibilizaram-se com a causa aqui defendida. Em especial meus Pais, **Carlos** e **Cilda**, e ao meu irmão **Marcus Vinícius**, pelo incentivo e a percepção de que a formação acadêmica é o melhor caminho para o sucesso profissional. Minha esposa amada **Maria Cláudia** por sempre acreditar no meu potencial e não deixar que os problemas encontrados fossem maiores do que a certeza do sucesso que estaria por vir. A minha sogra **Maria Helena** por ser uma grande mãe e por seus importantes conselhos.

A minha querida orientadora **Edvane Borges** por sua importante contribuição na minha formação científica e profissional. Por sua paciência, compreensão, conselhos e empatia, agindo em muitas situações como uma verdadeira mãe. Por acreditar nas possibilidades apresentadas para execução dessa pesquisa e mostrar que a Pós-Graduação pode ser mais humanizada.

Ao meu ex-IC e amigo **Leone Maltz**, por todo apoio dado e seu importante papel para que essa pesquisa fosse realizada. Com certeza terá um futuro brilhante como pesquisador.

Aos professores e pesquisadores **Thiago Fernandes**, **Simey de Souza**, **Cristiano Chagas**, **Wagner Eustáquio**, **Neyliane Santos** e **Mariana Brayner** por toda discussão científica, apoio e observações realizadas no I Seminário, Qualificação e II Seminário para o direcionamento na execução dessa pesquisa. Em especial à **Marcela Lemos**, pelo apoio dado as análises no LAMBDA e sua importante contribuição para a construção do texto.

Ao Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplacada - LAMBDA, na pessoa do Professor **Ademir Amaral** que muito gentilmente cedeu os equipamentos para a realização do teste do micronúcleo.

Aos meus ex-alunos, **Felipe Alves** e **Yuri Albuquerque** pelo importante apoio dado para realização da pesquisa e contribuição para a logística de coleta e análise das amostras.

A **Evelyne Solidônio** pela amizade e a disponibilidade em contribuir com a pesquisa.

Aos amigos **Alex Souza, André Santos e Cleomacio Miguel** pelo o apoio com as análises estatísticas.

Aos amigos que integram ou integraram o GERAR nesses últimos 6 anos de convivência. Prof. Dr. Ademir Amaral, Prof. Dr^a Edvane Borges, Gustavo Santos, Luanna Ribeiro, Fabrício Mendes, Sloana Giesta, Rafael Freitas, Mariana Brayner, Neyliane Santos, Marcela Maria, Mariel Cadena, Suellen Cristina, Thaísa Feliciano, Inês Barata, Heberton Ferreira, Thiago Salazar, Maria Helena, Leone Maltz, Mayara, Denise e Lídia.

Aos amigos e companheiros do Doutorado: **Paula Pereira, Patryk Melo, Jairo Dias, e Kennedy Francis** pelo apoio na vida de pós-graduando.

Aos professores **José Araújo, André Felipe, Everardo Sampaio e Rômulo Menezes.**

Ao prezados amigos do Departamento de Antibióticos da UFPE, **Robson (Robinho), Pérsio Alexandre, Erick, Raul, Camila Borba e Rafael**, pelo apoio com a coleta das amostras.

A professora **Kêzia Xisto** pelo imenso apoio dado na realização do estágio de docência.

Ao grande amigo **Edmilson**, pelo conhecimento e humildade compartilhados. Grato pela enorme ajuda com as amostras no Laboratório de Análise Ambiental.

Aos funcionários do DEN, Lia, Nilvânia, Karla, Kalydja, Carlos (Biblioteca do DEN) e David Ribeiro pela amizade e apoio.

A todos os doadores de urina, sem os quais não seria possível a realização da pesquisa.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria.”

(Salmo 111:10)

CHUMBO-210 E FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS ESFOLIATIVAS DA URINA DE FUMANTES EM FUMANTES E NÃO FUMANTES

RESUMO

A presença de diferentes substâncias genotóxicas, como os produtos do decaimento do ^{210}Pb , um elemento amplamente encontrado no cigarro, pode causar danos genéticos e contribuir para evolução de neoplasias malignas, o que evidencia a necessidade de monitoração constante dos fumantes. Bioindicadores, a exemplo de micronúcleos (MN's) são largamente empregados nos estudos das ações de agentes genotóxicos em seres humanos. Normalmente, em grupos formados por fumantes, são utilizadas amostras da mucosa bucal para avaliação da frequência de micronúcleos. No entanto, raros são os estudos que procuram utilizar como matriz amostras de urina para essas determinações. O presente trabalho avaliou a frequência de micronúcleo em células esfoliativas na urina, bem como os teores de Chumbo-210 em urina coletada durante 24 horas de indivíduos fumantes e não fumantes, com o objetivo de avaliar a utilização desta matriz como indicadora da suscetibilidade a danos genéticos em voluntários fumantes. Foram coletadas amostras de urina de 30 voluntários (15 não fumantes e 15 fumantes). Para as análises de micronúcleo em urina foram obtidas células esfoliativas através de uma série de centrifugações e lavagens com NaCl a 0,9%. A fixação e coloração empregadas foram metanol/ácido acético e Giemsa, respectivamente. Para determinar as concentrações de ^{210}Pb , utilizou-se a técnica da resina trocadora de íons. Nesse caso, o ^{210}Pb foi precipitado na forma de PbCrO_4 . O detector Canberra Tennelec S5E foi utilizado para determinar o ^{210}Pb . As concentrações de ^{210}Pb na urina dos fumantes variaram de 49,7 a 158,65 mBq.L^{-1} , enquanto os não fumantes apresentaram valores abaixo de 45 mBq (LD). Nesta pesquisa, os resultados relacionados ao ^{210}Pb sugerem que fatores como a idade, tempo de tabagismo e quantidade de cigarros não exerceram influência estatisticamente significativa sobre os valores de excreção do ^{210}Pb , entretanto o hábito tabagista contribui para o aumento das concentrações encontradas na urina. Foi encontrada uma frequência média para micronúcleo em não fumantes de $0,0036 \pm 0,001$ e, em fumantes foi de $0,0068 \pm 0,002$. Os resultados indicam um aumento expressivo da frequência de micronúcleos em células esfoliativas de indivíduos fumantes em relação aos não fumantes, sendo este aumento estatisticamente significativo. A análise estatística dos componentes principais (ACP) sugere que a quantidade de cigarros está relacionada com os micronúcleos, no entanto, não houve correlação estatisticamente significativa com as concentrações de Chumbo-210. Os resultados obtidos sugerem que a urina pode ser utilizada como matriz biológica para a avaliação da suscetibilidade a danos genéticos ocasionados pelos compostos presentes no cigarro, comportando-se como uma ferramenta eficiente para a monitoração humana.

Palavras-Chave: Urina, Micronúcleos, Fumantes, Radionuclídeos Naturais, Biomonitoração.

LEAD-210 AND MICRONUCLEUS FREQUENCY IN EXFOLIATIVE CELLS FROM URINE OF SMOKERS AND NON-SMOKERS

ABSTRACT

The presence of different genotoxic substances in cigarette smoke can cause genetic damage and contribute to development of malignancies, which highlights the need for constant monitoring of smokers. Biological indicators, such as the frequency of micronuclei (MN) are widely used to study the action of genotoxic agents in human beings. Usually in groups formed by smokers, the buccal mucosa samples are used to assess the frequency of micronuclei. However, few studies that seeks to use as a template urine samples for these determinations. The aim of this study was to evaluate the frequency of micronuclei in exfoliated cells as well as Lead-210 levels in 24-hour urine from smokers and nonsmokers, in order to evaluate the use of this matrix as an indicator of susceptibility to genetic damage in smokers volunteers. Because it is an array easy to obtain and allow an analysis of various elements were collected urine samples from 30 volunteers (15 smokers and 15 non-smokers). For the analysis of micronucleus, exfoliative cells from urine were obtained by a series of centrifugations and washings with NaCl 0.9%. Carnoy I fixation and Giemsa staining were employed, respectively. To determine the ^{210}Pb , we used the technique of ion exchange resin. In this case, the ^{210}Pb was precipitated in the form of PbCrO_4 . ^{210}Pb beta counts were conducted in a Canberra Tennelec S5E detector with a detection limit of 45 mBq. The results indicated that the urine is an excellent matrix for assessing the degree of exposure to lead-210, especially for smokers, the group of most interest to monitoring. The non-smokers present values above 45mBq and Smokers have shown higher values for ^{210}Pb in urine that ranged from 49.7 to 158.65 mBq.L⁻¹. In this research, the results related to this radionuclide suggest that factors such as age, smoking time and number of cigarettes have little influence on the ^{210}Pb excretion values, though the tobacco habit contributes to the concentrations found in the urine. The average rate for micronucleus found in nonsmokers was 0.0036 ± 0.001 and 0.0068 ± 0.002 in the smokers. The results showed a significant increase in micronuclei frequency in exfoliated cells of smokers compared to nonsmokers, which is statistically significant increase. Statistical analysis also suggest that the number of cigarettes are related to the micronuclei, however there is no statistical correlation with the concentrations of Lead-210. The results suggest that urine can be used with biological matrix for assessing genetic susceptibility to damage caused by the present compounds on the cigarette, behaving as an efficient tool for human monitoring.

Keywords: Urine, Micronucleus, Smokers, Natural Radionuclides Biomonitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Percentual das pessoas de 15 anos ou mais de idade usuárias de tabaco fumado ou não fumado, por sexo, segundo as Grandes Regiões – 2008.	20
Figura 2. Percentual de homens adultos (≥ 18 anos) fumantes segundo as capitais do Estado Brasileiro e Distrito Federal	22
Figura 3. Percentual de Mulheres adultas (≥ 18 anos) fumantes segundo as capitais do Estado Brasileiro e Distrito Federal	23
Figura 4. Taxas de óbitos por câncer entre homens nos EUA entre 1930-2005, segundo localização primária.	25
Figura 5. Representação das camadas da bexiga, contendo tumores no tecido epitelial.	28
Figura 6. Fontes de exposição ao ^{210}Pb considerando o Tabagismo e a bebida alcoólica	33
Figura 7. Fontes de exposição ao ^{210}Pb desconsiderando o Tabagismo e a bebida alcoólica .	33
Figura 8. Figura esquemática representativa do mecanismo de entrada do ^{210}Pb e ^{210}Po através da inalação da fumaça do cigarro	37
Figura 9. Modelo biocinético sistêmico dos elementos alcalinos terrosos e do chumbo.....	39
Figura 10. Representação do sistema urinário.....	45
Figura 11. Representação esquemática do Néfron	48
Figura 12. Células epiteliais esfoliativas uroteliais encontradas na urina.....	50
Figura 13. Células epiteliais esfoliativa escamosas encontradas na urina.	51
Figura 14. Representação esquemática da dinâmica histológica das células esfoliativas da parede da bexiga	53
Figura 15. Representação esquemática dos processos de formação do micronúcleo por agente clastogênico (A) e aneugênico (B).....	56
Figura 16. Representação esquemática da ação direta e indireta da radiação ionizante na molécula de DNA	57
Figura 17. Hipótese de contribuição da cadeia de decaimento do ^{210}Pb para o dano genético.	58

Figura 18. Representação esquemática do efeito citotóxico e genotóxicos após a ação da radiação ionizante.	59
Figura 19. Morfologia de uma célula epitelial escamosa derivada da urina contendo um micronúcleo.	62
Figura 20. Cadeia de decaimento do ^{210}Pb	69
Figura 21. Coluna de percolação contendo a resina trocadora de íons indicado pela seta vermelha.....	70
Figura 22. Tempo de crescimento do Bismuto-210 na amostra padrão.....	71
Figura 23. Representação esquemática da análise do ^{210}Pb em urina.....	75
Figura 24. Detector Tennelec S5E da CANBERRA	77
Figura 25. Representação esquemática da fixação e coloração das lâminas.....	83
Figura 26. Representação esquemática dos critérios de inclusão para contabilização do micronúcleo em células esfoliativas.	84
Figura 27. Representação esquemática dos critérios de exclusão para contabilização do micronúcleo em células esfoliativas.	85
Figura 28. Curva de calibração média do sistema de medidas utilizando o padrão de ^{210}Pb ...	87
Figura 29. Curvas de calibração do sistema de medidas utilizando o padrão de ^{210}Pb	89
Figura 30. Micronúcleos em células esfoliativas encontradas na urina	97
Figura 31. Gráfico obtido por ACP para as correlações entre idade, tempo de tabagismo, quantidade de cigarros consumidos, frequência de micronúcleos e concentração do ^{210}Pb na urina de fumantes.....	101
Figura 32. Gráfico obtido por ACP para o comportamento dos indivíduos fumantes em relação as frequência de micronúcleo, concentração de ^{210}Pb e fatores como idade, tempo de tabagismo e quantidade de cigarros consumidos.....	101
Figura 33. Distribuição dos micronúcleos em células esfoliativas presentes na urina dos voluntários não fumantes e fumantes.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual das pessoas de 15 anos ou mais de idade, segundo a condição de uso de tabaco fumado, por sexo - Brasil – 2008.....	21
Tabela 2. Contribuição das várias fontes para o corpo contendo ^{210}Pb	31
Tabela 3. Absorção sistemática do ^{210}Pb a partir da inalação do radônio , tabagismo e bebida alcoólica em relação ao total de ^{210}Pb absorvido na inalação e dieta, não incluindo fontes adicionais.	32
Tabela 4. Composição da urina coletada por 24 horas	46
Tabela 5. Ingestão e eliminação diária de água em situação normal e no exercício prolongado	49
Tabela 6. Distribuição geral da idade e hábitos de vida dos voluntários.	73
Tabela 7. Distribuição do perfil dos fumantes em relação ao tempo e quantitativo de cigarros consumidos.....	74
Tabela 8. Identificação, volume de urina, cinzas e concentração em atividade do ^{210}Pb	91
Tabela 9. Comparação dos Teores de ^{210}Pb em urina com os trabalhos existentes na literatura.	96
Tabela 10. Distribuição geral do número de células contabilizadas e a Frequência de Micronúcleos em células esfoliativas na urina de fumantes e não fumantes.	98

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Correção da atividade específica dos padrões	78
Equação 2. Cálculo do limite de detecção.....	79
Equação 3. Cálculo da concentração em atividade do ^{210}Pb	79
Equação 4. Cálculo da precisão	80
Equação 5. Cálculo da Exatidão	81
Equação 6. Equação da primeira curva de calibração.....	88
Equação 7. Equação da segunda curva de calibração	88
Equação 8. Equação da terceira curva de calibração	88
Equação 9. Cálculo do Desvio Padrão.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	American Cancer Society
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BH	Biomonitoração Humana
DPR	Desvio Padrão Relativo
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICRP	The International Commission on Radiological Protection
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRD	Instituto de Radioproteção e Dosimetria
LD	Limite de Detecção
MN	Micronúcleo
NCRP	National Council on Radiation Protection
UNSCEAR	United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation
USEPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Tabagismo no Brasil e no mundo	19
2.2 Doenças relacionadas ao tabagismo	23
2.2.1 Substâncias químicas do cigarro	28
2.2.1.1 Chumbo 210 (^{210}Pb)	29
2.2.1.2 Polônio 210 (^{210}Po).....	34
2.2.2 Cinética do ^{210}Pb e do ^{210}Po no corpo humano	36
2.3 Indicadores biológicos.....	42
2.3.1 Urina, formação e composição	44
2.3.1.1 Constituintes do sedimento da urina	50
2.3.2 Uretélio e a dinâmica das células esfoliativas	52
2.3.3 Micronúcleos.....	55
2.3.3.1 Técnicas de coleta do Micronúcleo em Urina.....	63
2.3.3.2 Técnicas de coloração.....	63
2.3.3.3 Critérios para identificação do Micronúcleo	65
2.4 Determinação do ^{210}Pb	67
2.4.1 Contador proporcional alfa beta.....	67
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
3.1 Características da pesquisa e Considerações éticas	72
3.1.1 Critérios de seleção de voluntários	72
3.1.2 Características dos voluntários selecionados.....	73
3.1.2.1 Voluntários fumantes.....	73
3.2 Preparação das amostras de urina para determinação do ^{210}Pb	74
3.3 Determinação de ^{210}Pb nas amostras de urina	74
3.4 Procedimento para as análises pelo detector proporcional alfa beta.....	77
3.4.1 Sistema de medidas	77
3.4.2 Curva de calibração do detector.....	78
3.4.3 Limite de detecção	78
3.4.4 Cálculo da concentração em atividade do ^{210}Pb	79
3.5 Avaliação do método de análise	79

3.6 Teste do micronúcleo em células esfoliativas na urina	81
3.6.1 Coleta de urina	81
3.6.2 Isolamento de células esfoliativas em urina	82
3.6.3 Fixação e coloração das lâminas	82
3.6.4 Análise das lâminas	83
3.7 Análises estatísticas.....	85
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1 Sistema de medidas	87
4.1.1 Curva de calibração para eficiência do detector	87
4.1.2 Limite de detecção	88
4.1.3 Avaliação do método de análise.....	90
4.2 Concentrações em atividade do ^{210}Pb nas amostras de urina	90
4.3 Micronúcleos em células esfoliativas de fumantes e não fumantes.....	96
4.3.1 Análises estatísticas relacionadas às variáveis estudadas e consideradas para a frequência de Micronúcleos	99
4.3.2 Frequência de Micronúcleo e Tabagismo	103
4.3.3 Perspectivas e aplicações da biomonitoração em hábitos tabagistas.	107
5 CONCLUSÕES	111
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
REFERÊNCIAS	113
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	128
APÊNDICE B – Questionário de hábitos alimentares e de higiene	130
APÊNDICE C – Cálculo do Desvio Padrão.....	131
ANEXO A1 – Parecer do Comitê de Ética	132
ANEXO A2 – Parecer do Comitê de Ética	133
ANEXO B – Folha de Contagem	134
ANEXO C1 – Resultado dos Testes Estatísticos.....	135
ANEXO C2 – Resultado dos Testes Estatísticos.....	136

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde considera o tabagismo como um problema de saúde pública, pois se acredita que o hábito de fumar tenha matado milhões de pessoas ao redor do mundo. O Brasil figura como um dos países onde o consumo de cigarro é elevado, se comparado a outros lugares do mundo, e a consequência disso são os índices de mortes por doenças tabaco-relacionadas reportados (WHO, 2003).

O hábito de fumar é considerado uma dependência química e expõe os seus usuários a diversas substâncias tóxicas, incluindo substâncias radioativas como os descendentes do urânio. Dentre tais descendentes o ^{210}Pb e ^{210}Po são elementos de considerada importância radiológica, pois a sequência de decaimento $^{210}\text{Pb} - ^{210}\text{Bi} - ^{210}\text{Po}$ contribui para o aumento da dose interna no homem (SPENCER et al., 1977; YAMAMOTO et al., 1994).

Estes elementos podem entrar no corpo humano através dos alimentos, da água e inalação da fumaça de cigarro. Neste caso, a alta temperatura na queima dos componentes do tabaco, principalmente o ^{210}Pb e ^{210}Po , sublimam para os pulmões dos fumantes, tornando-se disponíveis para a corrente sanguínea (PARFENOV, 1974; SKAWARZEC et al., 2001a). Ainda que o conhecimento dos efeitos da radiação em longo prazo, nos sistemas biológicos, seja bastante difundido, é de grande importância estudar o grau de assimilação do ^{210}Pb em situações onde o consumo de cigarro é elevado.

Um dos possíveis efeitos na saúde humana, oriunda da assimilação desses radionuclídeos, é o aumento do risco relacionado ao desenvolvimento de câncer. Levantamentos realizados pelo Instituto Nacional do Câncer (2014) mostram que a maior parte dos óbitos dos brasileiros, relacionados com cânceres, tem o tabagismo como fator de risco.

O uso de indicadores biológicos é a forma mais adequada para monitorar os fumantes. Dentre esses indicadores, a urina demonstra potencial para indicar a exposição à fumaça de cigarro, além de estabelecer os riscos a que estão sujeitos os indivíduos que possuem contato com ^{210}Pb , oriundo do hábito de fumar.

Por outro lado, ferramentas como a análise citogenética também se mostram adequadas para avaliar os efeitos causados pela exposição às radiações emitidas por estes radionuclídeos, uma vez que estas podem induzir à mutação gênica, aberrações cromossômicas e morte celular. Dentre as técnicas utilizadas para avaliar os possíveis danos biológicos, que surgem após exposições dos organismos a certas doses de radiação ionizante,

o teste do micronúcleo tem sido largamente aplicado (FERNANDES, 2005; PINTO et al., 2010).

A literatura específica define micronúcleos como produtos da não inclusão de cromossomos inteiros ou fragmentos de DNA, do núcleo principal celular, durante o processo de divisão. A frequência de micronúcleo nas células é utilizada como indicativo para a avaliação do dano em nível celular, que um agente (físico, químico ou biológico) pode estar causando (SILVA, 2010). Linfócitos do sangue periférico e células esfoliativas, como as da mucosa bucal e do uretério, são amplamente utilizadas para este propósito (FENECH et al., 1999a).

A urina é uma matriz utilizada para indicar contaminação crônica ao ^{210}Pb e o micronúcleo é um achado indicativo para o dano genético. A avaliação conjunta desses dois bioindicadores é rara e necessitam de maior aprofundamento. Além disso, o fato de haver indagações a cerca da relação entre a causa e o efeito envolvendo o micronúcleo justificam estudos mais específicos envolvendo este elemento, no intuito de esclarecer seus efeitos tóxicos e radiológicos. Trabalhos como este poderão auxiliar na investigação e sinalização dos riscos associados ao tabagismo no desenvolvimento de patologias malignas.

Como o tabagismo é um sério problema de saúde pública e levando-se em consideração a importância da monitoração humana, no intuito de estabelecer o grau de risco a que os indivíduos fumantes estão sujeitos, o objetivo geral deste trabalho foi investigar o potencial dano genético causado pelo tabagismo através da frequência de micronúcleos em células esfoliativas presentes na urina, bem como avaliar a associação entre o hábito tabagista e a concentração de Chumbo-210 nessa matriz biológica. Como objetivos específicos:

- 1) Aplicar o método da separação radioquímica das resinas trocadoras íons para isolar o Chumbo-210 presente na urina, de acordo com os critérios estabelecidos pela ANVISA.
- 2) Construir curvas de calibração para a resposta do detector proporcional alfa beta, no intuito de estabelecer o Limite de Detecção e Eficiência no Platô Beta.
- 3) Determinar a concentração em atividade do Chumbo-210 excretado na urina de fumantes coletada durante 24 horas, e em seguida, comparar as concentrações deste radionuclídeo em relação às amostras dos não fumantes (NF).

- 4) Implantar o teste do micronúcleo no Departamento de Energia Nuclear da UFPE, utilizando células esfoliativas presentes na urina.
- 5) Correlacionar a frequência de micronúcleos com os fatores idade, tempo de tabagismo, quantidade de cigarros consumidos e concentração de Chumbo-210.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tabagismo no Brasil e no mundo

O tabagismo é um tema de extrema relevância devido ao número de mortes relacionadas ao hábito de fumar. Acredita-se que este hábito foi responsável por aproximadamente 100 milhões de óbitos no século passado, o que leva o tabagismo a ser considerado um grave problema de saúde pública (SANTOS et al., 2013).

A forma mais difundida de consumo do tabaco ao redor do mundo é sob a forma de cigarro. Porém a queima deste elemento pode ainda ser realizada sob a forma de cachimbo, charuto e narguilé. Quando não há produção de fumaça pode ser mascado, preparado para ser absorvido pela mucosa oral e/ou absorvido por aspiração nasal (VIEGAS, 2008).

Diversos estudos por parte da comunidade científica, bem como massivas campanhas antitabagismo são resultados da preocupação gerada pelo elevado número de mortes registradas em decorrências de doenças tabaco relacionadas. Este quadro fica ainda mais preocupante quando são levados em consideração estudos como o publicado por Esson e Leeder (2004) que estimam um aumento considerável no consumo de cigarro em países com níveis médios e baixos de desenvolvimento humano em 25 anos.

Pesquisas conduzidas por Iglesias e col. (2007) e Santos e col. (2011) chamam a atenção para o número de mortes anuais que pode ser alcançado caso os atuais índices de consumo de cigarro mantenham-se, principalmente em países em desenvolvimento. Santos e col. (2013) alertam para o número de 1 bilhão de mortes até o final do século.

Conforme estudos epidemiológicos, só no século XX, foram registrados em todo o mundo, cerca de 100 milhões de mortes relacionadas ao hábito de fumar (IGLESIAS et al., 2007). Ezzati e Lopez (2003) estimaram que só no ano de 2000, cerca de 5 milhões de pessoas morreram devido ao consumo de cigarro.

Na América Latina e Caribe, o tabagismo é ainda mais preocupante do que doenças como a AIDS e a tuberculose, pois foram estimadas aproximadamente 300.000 mortes em decorrência do hábito de fumar no ano 2000 (EZZATI; LOPEZ, 2003).

Segundo o estudo publicado por Iglesias e col. (2007), os homens são as principais vítimas de doenças tabaco relacionadas. Mundialmente, uma em cada cinco pessoas é fumante, dentro de um universo de 1,1 bilhões de fumantes do sexo masculino. Em contraste,

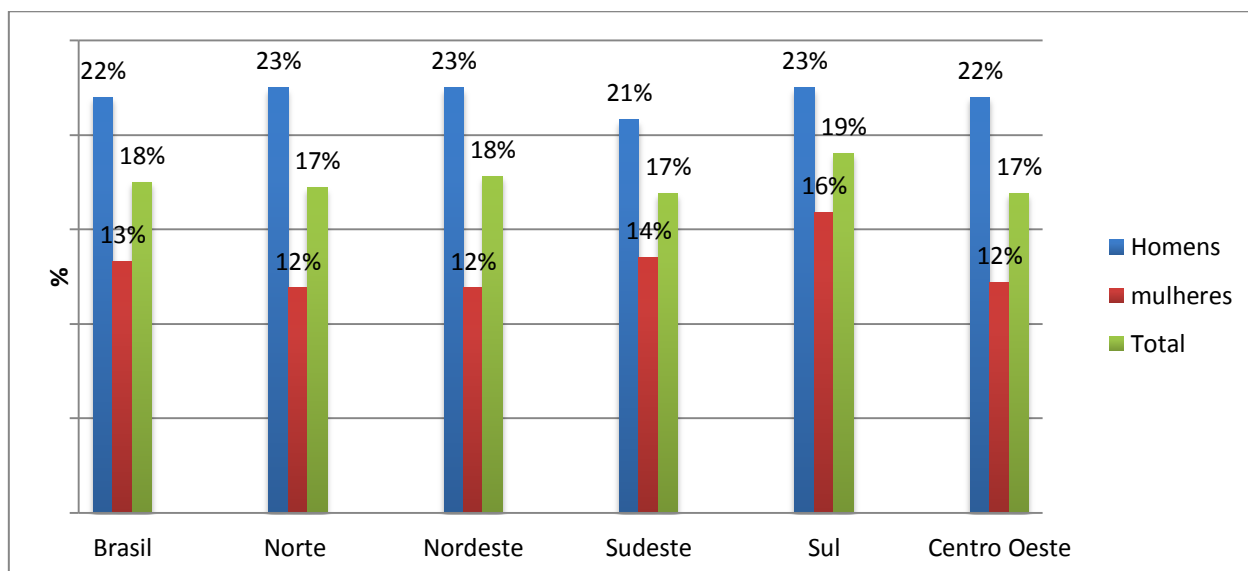
aproximadamente 230 milhões de mulheres dividem a dependência do fumo (SANTOS et al., 2013).

No Brasil, o cenário encontrado assemelha-se ao do restante do mundo, como confirmam os dados do relatório apresentado pelo Instituto Brasileiro de Geografia Estatística – IBGE, sobre o tabagismo no Brasil (IBGE, 2008).

Segundo a pesquisa realizada em 2008, os fumantes ativos e passivos no Brasil correspondiam a 17,2 % da população, aproximadamente 25 milhões de pessoas com idades a partir dos 15 anos. O levantamento apontou que a Região Sul apresentou os maiores percentuais de usuários, cerca de 19%, enquanto que as Regiões Sudeste e Centro-Oeste apresentaram os menores percentuais, com 16,9%. No entanto, em termos de contingente de fumantes, o Sudeste foi o maior, apresentando cerca de 10,5 milhões de fumantes.

Os dados revelam que o Brasil segue a tendência mundial também com relação ao sexo do fumante. Segundo informado, os usuários do sexo masculino sobressaíram-se sobre as usuárias do sexo feminino e em determinadas regiões, como o Norte e o Nordeste, esta parcela foi quase o dobro (Figura 1) (IBGE, 2008).

Figura 1. Percentual das pessoas de 15 anos ou mais de idade usuárias de tabaco fumado ou não fumado, por sexo, segundo as Grandes Regiões – 2008.



Fonte: IBGE, 2008

Neste mesmo ano, foram divulgados os percentuais de 32% e 16% em Portugal; Na Itália de 33% e 19%; Espanha 36% e 27%; e na Argentina 32% e 22%, para o sexo masculino e feminino respectivamente (WHO, 2013).

A pesquisa do IBGE também mostrou percentuais elevados de tabagismo, como é apresentado na Tabela 1, a qual representa um quadro do consumo e exposição ao tabaco, classificando as pessoas de 15 anos ou mais de idade, de acordo com a condição do consumo fumado (IBGE, 2008).

Tabela 1. Percentual das pessoas de 15 anos ou mais de idade, segundo a condição de uso de tabaco fumado, por sexo - Brasil – 2008.

Condições de uso de tabaco fumado	Percentual das pessoas de 15 anos ou mais de idade (%)		
	Total	Sexo	
		Homens	Mulheres
Fumantes	17,2	21,6	13,1
Fumante Diário	15,1	18,9	11,5
Fumante Ocasional	2,1	2,7	1,6
Não Fumantes	82,8	78,4	86,9
Ex fumante diário	14,1	17,2	11,2
Nunca fumante Diário	68,7	61,2	75,7

Fonte: Modificado de IBGE, 2008

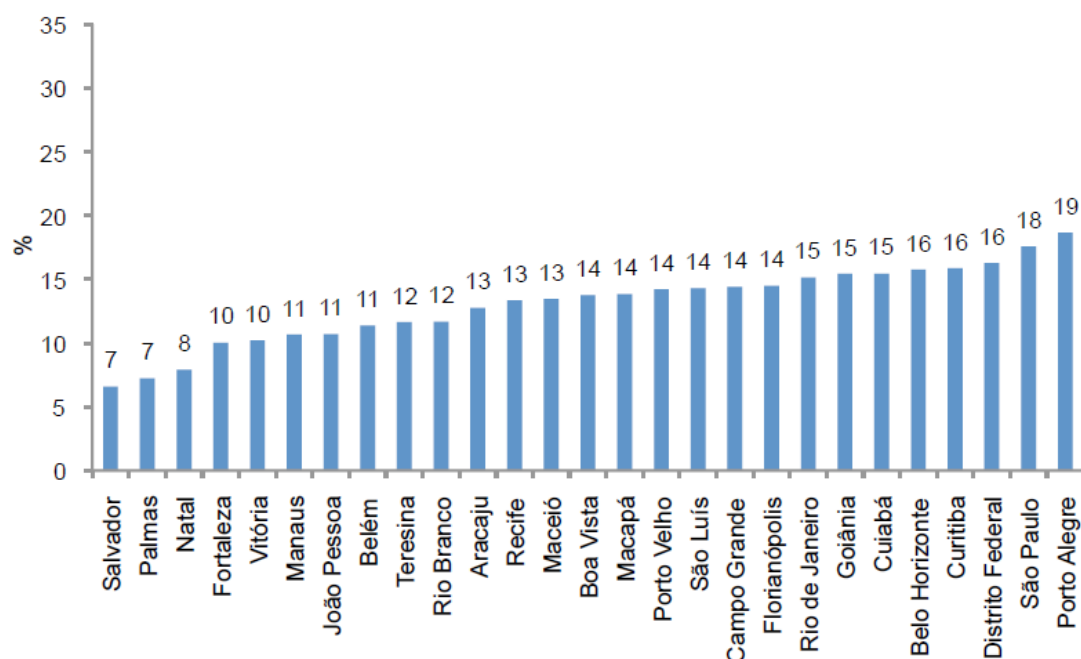
Em 2008, o Brasil apresentava um contingente de 24,6 milhões (17,2 %) de fumantes. De acordo com a Tabela 1 o grupo com os menores índices foi o fumante ocasional, com 2,1%. O IBGE (2008) ressalta ainda neste levantamento que, tanto para o grupo relacionado aos fumantes diários quanto para os fumantes ocasionais, o sexo masculino alcançou maiores proporções, 21% do total de 17% de fumantes. Em relação aos não fumantes, os indivíduos do sexo feminino se apresentaram como a maioria, correspondendo a aproximadamente 87% do total.

Dados divulgados pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico – VIGITEL - mostram que está havendo redução na frequência de fumantes adultos. Enquanto em 2008, o Brasil apresentava 17,2% de fumantes

(IBGE, 2008), em 2012 este percentual caiu para 14,8% (BRASIL, 2012). A pesquisa realizada pela VIGITEL confirmou ainda que no Brasil, o sexo masculino consome mais cigarro do que o sexo feminino. Nesta mesma pesquisa, a Região Sul continuou a abrigar os maiores percentuais de fumantes e a região Norte e Nordeste os menores.

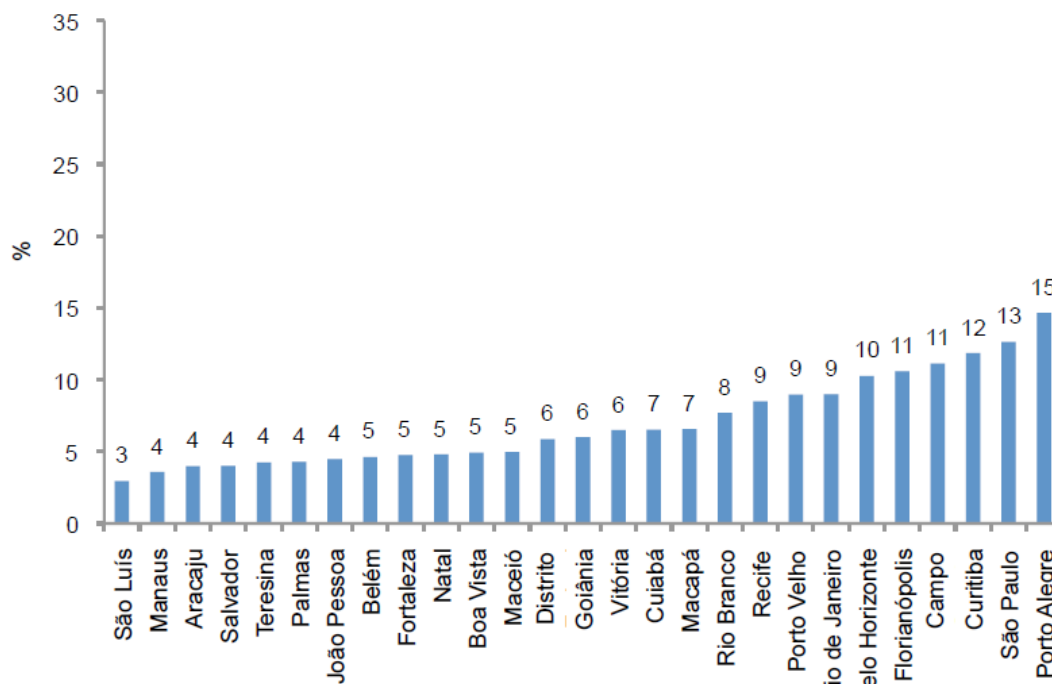
O último levantamento realizado mostrou que o percentual de fumantes adultos no Brasil continua em declínio, chegando a 11,3%. O sexo masculino apresentou os maiores percentuais de tabagismo (14,4%) em relação ao feminino (8,6%). Os dados obtidos no senso indicam que o tabagismo tendeu a ser menor em usuários com menos de 25 anos ou após os 65 anos em ambos os sexos (BRASIL, 2014). As figuras 2 e 3 mostram a visão geral de fumantes no Brasil em 2013.

Figura 2. Percentual de homens adultos (≥ 18 anos) fumantes segundo as capitais do Estado Brasileiro e Distrito Federal



Fonte: BRASIL, 2014

Figura 3. Percentual de Mulheres adultas (≥ 18 anos) fumantes segundo as capitais do Estado Brasileiro e Distrito Federal



Fonte: BRASIL, 2014

Quando os índices de fumantes (BRASIL, 2014) são confrontados com o número de casos de câncer no Brasil (INCA, 2014) surge a preocupação em relação à saúde dos seus usuários, pois o tabagismo é um considerado um fator de risco para diversos tipos de doenças, principalmente o câncer.

2.2 Doenças relacionadas ao tabagismo

O cigarro está intimamente ligado a aproximadamente 50 tipos de doenças, entre elas, doenças do coração, do sistema respiratório e câncer de diversos tipos (SANTOS et al., 2011).

Desde os anos 50, como informam Doll (1998), Sasco e col. (2004), Rodgman (2004) e Kuper e col. (2002), o potencial carcinogênico do tabagismo tem sido reportado em diversos trabalhos principalmente em estudos realizados em pulmões de roedores. Um exemplo é o trabalho publicado por Duarte e col. (2006), o qual relatou que a incorporação passiva da

fumaça do cigarro induziu mudanças morfológicas na prega vocal em roedores, o que poderia progredir possivelmente para neoplasias malignas.

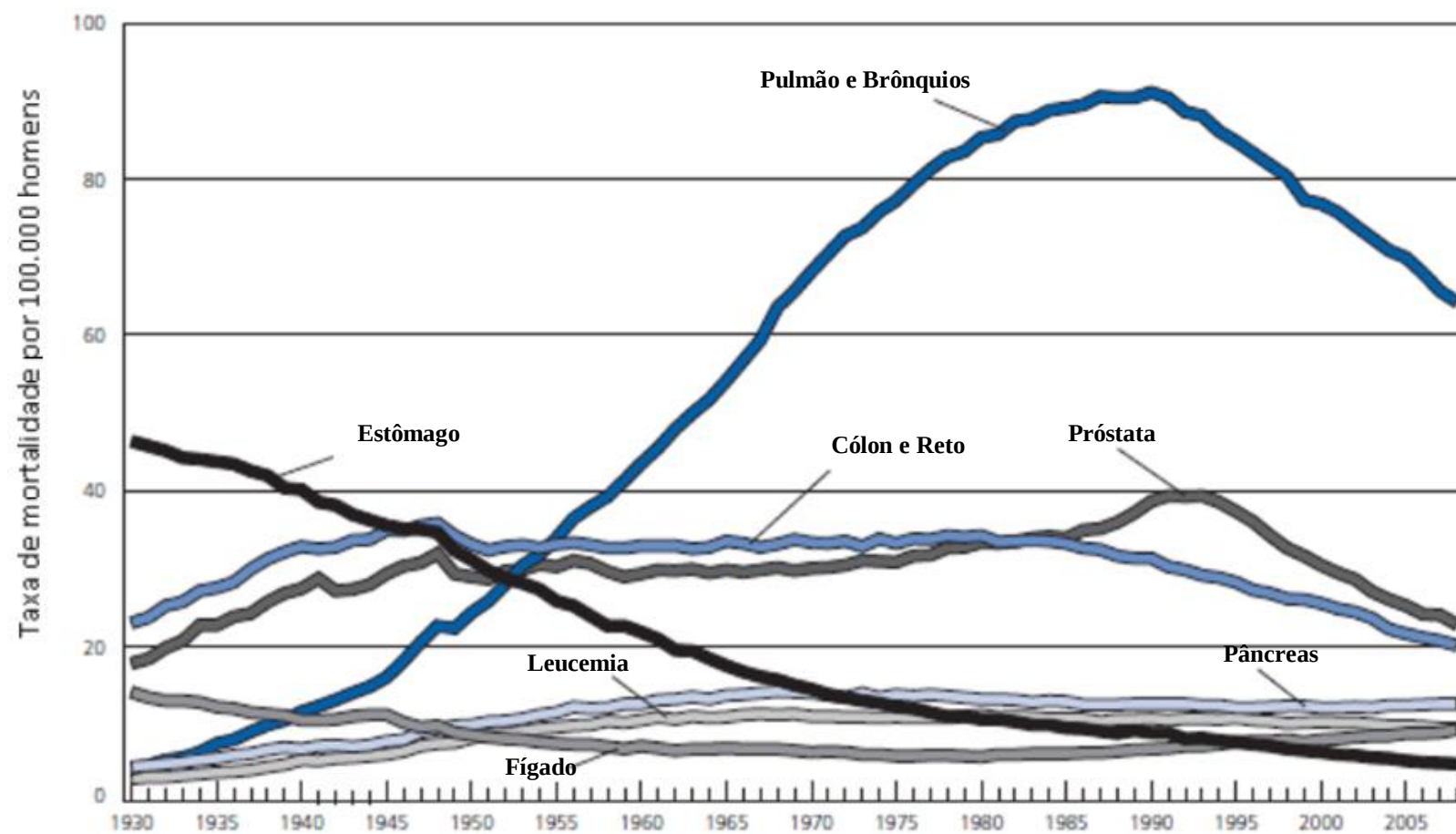
Em 1985, um grupo de especialistas internacionais correlacionou o tabagismo a cânceres do sistema respiratório, digestivo e urinário. Essa correlação se deu basicamente através da associação entre dados epidemiológicos em todo mundo (IARC, 1986). Já Ezzati e Lopez (2003) utilizaram a mortalidade por câncer de pulmão como indicativo indireto dos riscos atribuídos ao tabagismo.

Segundo informações da Organização Mundial da Saúde, o tabagismo seria o responsável por 90 a 95% do total de mortes em decorrência do câncer de pulmão em países desenvolvidos (WHO, 1999).

Levantamentos realizados por Boyle e col. em 2003 na Europa, Japão e América do Norte apontam que 91% dos cânceres de pulmão em homens e 61% em mulheres são tabaco relacionadas (apud SASCO et al., 2004).

Dados da Sociedade Americana de Câncer (ACS), que acompanhou por 75 anos, desde 1930, a taxa de óbitos de câncer por localização primária, mostram que entre a população masculina, o câncer do sistema respiratório foi o mais prevalente. A Figura 4 mostra a ocorrência de óbitos por câncer de pulmão e brônquios, comparada a outras modalidades da doença nos Estados Unidos, entre 1930 e 2005 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012b).

Figura 4. Taxas de óbitos por câncer entre homens nos EUA entre 1930-2005, segundo localização primária.



Fonte: Modificado de AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012b.

Observa-se a partir da Figura 4 um aumento do índice de câncer de pulmão e brônquios a partir dos anos 30, quando os primeiros estudos de epidemiológicos foram reportados. Burns e col. (2015) esclarecem que o hábito de fumar, como um estilo de vida, e as duas Grandes Guerras Mundiais contribuíram para o aumento do consumo de cigarro. Neste período, os cigarros foram distribuídos gratuitamente e tornaram-se parte integrante da ração diária das tropas.

Em meados dos anos 80 os índices de câncer de pulmão e brônquios mostraram o ápice da prevalência, com consequente aumento na taxa de mortalidade entre os homens. Já na metade dos anos 90, a prevalência de câncer de pulmão e brônquios começa a declinar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012b).

As estatísticas relacionadas ao número de óbitos por câncer de pulmão enfatizam que este tipo patologia apresenta considerada importância quando comparada a outras modalidades de câncer. Em 2012, a ACS estimou que aproximadamente 226.160 novos casos de câncer de pulmão foram diagnosticados; destes, 116.470 foram em homens e 109.690 em mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012a).

No Brasil, em 2014, o Instituto Nacional do Câncer – INCA, divulgou estimativas da elevação dos números de novos casos de câncer de pulmão entre 2014 e 2015. De acordo com o INCA, mais uma vez os homens apresentaram maior número. Segundo a WHO (2012), 11% de todas as mortes devido ao câncer foram atribuíveis ao tabaco e que 72% dos óbitos dos brasileiros acometidos por câncer de pulmão, traqueia e brônquios tem alguma relação com o tabagismo. Este percentual de óbitos não está distante dos que foram relatados pela ACS (2012a), a qual divulgou que 80 % a 90 % das mortes por câncer de pulmão nos Estados Unidos foram resultantes do ato de fumar.

Além do câncer de pulmão, a literatura mostra relação entre o hábito de fumar e o câncer de boca, faringe e esôfago, pois esses órgãos recebem a ação direta de carcinógenos presente na fumaça e a excreção dos agentes mutagênicos do tabaco na urina torna a bexiga um alvo para o desenvolvimento de doenças relacionadas ao fumo (BURGAZ et al., 1995).

O câncer de bexiga está associado à exposição aos agentes químicos presentes no meio ambiente ou procedimentos ocupacionais, e em particular, o consumo de tabaco representa um fator de risco correlacionado ao aumento estatístico (FORTIN et al., 2010). A probabilidade dos fumantes desenvolverem câncer nesta região é quatro vezes maior se comparados aos não fumantes, e o tempo de 20 anos é estimado para que o risco de

desenvolver neoplasias malignas, após a eliminação do hábito de fumar, reduza aos níveis dos não fumantes (POMPEO et al., 2008).

No Reino Unido, 10.400 pessoas foram diagnosticadas com esta doença em 2011. O câncer de bexiga é o 7º tipo mais comum entre os britânicos, representando o 4º mais comum entre os homens, em que 7.500 novos casos foram diagnosticados neste mesmo ano. Na Europa como um todo, mais de 150.000 novos casos foram estimados em 2012. Neste mesmo ano, ao redor do mundo, uma estimativa aproximada de 430.000 novos casos de câncer de bexiga foram diagnosticados, embora a taxa de incidência varie por região (CANCER RESEARCH UK, 2015).

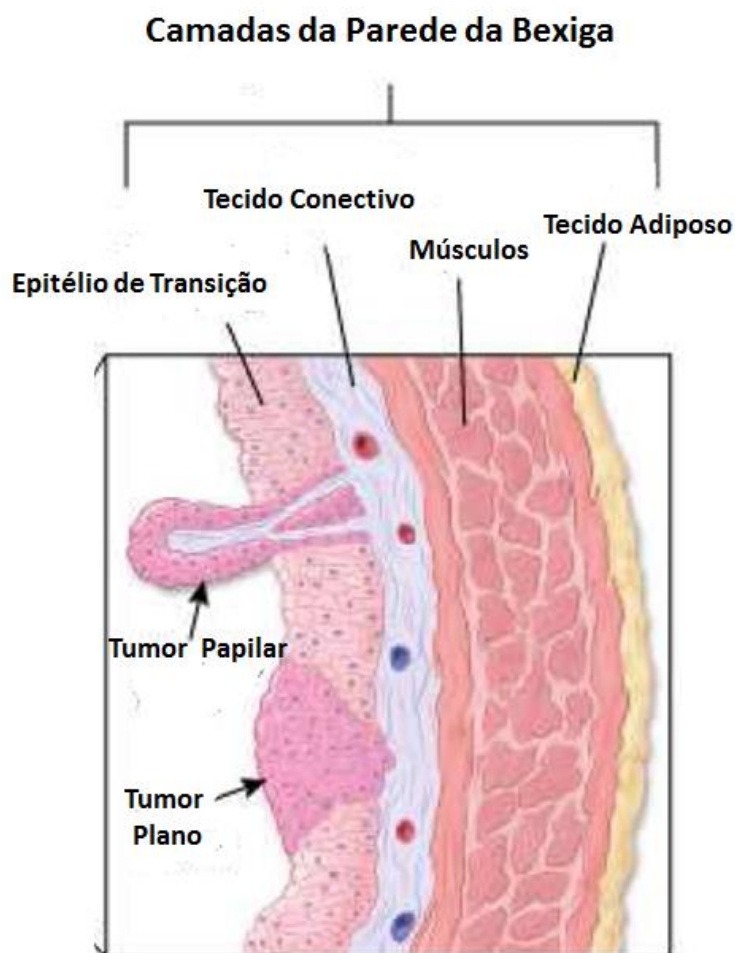
Nos Estados Unidos, o câncer de bexiga ocupa a posição de número quatro entre os cânceres mais incidentes em homens, considerado uma importante causa de mortalidade entre este gênero, e o nono entre as mulheres (POMPEO et al., 2008). Segundo a Associação Americana de Câncer, 74.000 novos casos de câncer de bexiga são diagnosticados (56.320 em homens e 17.680 em mulheres) e 16.000 mortes são estimadas (11.510 em homens e 4.490 em mulheres) devido a este tipo de câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

No Brasil, os levantamentos mais recentes estimam 6.750 casos novos de câncer de bexiga em homens e 2.190 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 6,89 casos novos a cada 100 mil homens e 2,15 a cada 100 mil mulheres. Em Pernambuco foram estimados 290 casos (INCA, 2014).

O tabagismo é o fator de risco mais importante para esse tipo de câncer, sendo responsável por aproximadamente 66% dos casos novos em homens e 30% em mulheres nas populações mais industrializadas (INCA, 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015; CANCER RESEARCH UK, 2015).

Estudos indicam que o carcinoma urotelial é a forma mais comum do câncer de bexiga, representando por volta de 90% dos tumores (POMPEO et al., 2008; NERSESYAN et al., 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Aproximadamente 90% dos cânceres humanos tem origem em células epiteliais (Figura 5). Portanto, este tipo de células representa um alvo para o início de processos genotóxicos resultantes da ação de agentes carcinogênicos, e que entram no corpo por inalação ou ingestão (THOMAS et al., 2009; ROSIN, 1992).

Figura 5. Representação das camadas da bexiga, contendo tumores no tecido epitelial.



Fonte: Modificado de AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015

2.2.1 Substâncias químicas do cigarro

Inicialmente é importante ressaltar que o tabaco é um produto natural, contudo na produção do cigarro é adicionada uma série de substâncias químicas que conferem as características finais do produto, seja para manter a umidade, para evitar que micro-organismos atuem sobre o tabaco, ou simplesmente para dar o sabor característico de cada produto (RODGMAN, 2002; 2004; PURKIS et al., 2011).

Dempsey e col.(2011), em sua revisão sobre a toxicologia dos ingredientes na indústria tabagista, enfatizam a necessidade de um maior rigor na avaliação de novos ingredientes utilizados, uma vez que existe mais preocupação em relação aos alimentos do

que com o cigarro. Esses autores ressaltam também que a indústria farmacêutica já realiza testes para avaliar os efeitos genotóxicos da adição de novos ingredientes.

Estudos como os publicados pelo INCA (2001), Kuper e col. (2002), Oliveira (2012) e ACS (2012a), discutem sobre os diversos compostos existentes no cigarro. Segundo estas publicações e o que vem informado nos próprios maços, o cigarro apresenta cerca de 4.720 substâncias químicas.

As principais substâncias cancerígenas se encontram na fumaça a qual apresenta duas fases: uma de vapor, onde se encontra elementos como monóxido e dióxido de carbono, e outra particulada, uma vez que, durante a combustão, a fumaça irá liberar produtos particulados originados de elementos e substâncias químicas como arsênio, níquel, benzopireno, cádmio, resíduos de agrotóxicos, acetona, naftalina e até fósforo, substâncias usadas para veneno de rato, além de elementos radioativos, como o Radônio, Carbono 14, Chumbo 210, Polônio 210. Estas são substâncias altamente tóxicas, que podem provocar algum tipo de câncer (SMITH et al., 1997).

Entre os radionuclídeos liberados durante a combustão do cigarro, o ^{210}Pb e o produto do seu decaimento, o ^{210}Po , despertam interesse devido a importância de suas características radiológicas e contribuição para a dose recebida (SANTOS et al., 1994; SKWARZEC et al., 2001a).

Estudos relacionados à inalação de ^{210}Po e ^{210}Pb , consideraram o consumo do cigarro uma das mais significantes causas do câncer de pulmão (MARMORSTEIN, 1986; MARTELL, 1987; GAIROLA et al., 1993).

2.2.1.1 Chumbo 210 (^{210}Pb)

O chumbo é encontrado em minerais como galena (sulfeto de chumbo, PbS), anglesita (Sulfato de Chumbo, PbSO_4), cerussita (carbonato de chumbo, PbCO_3) e outros minerais. A abundância na crosta terrestre é de 1000 ppb e na água do mar é de 0,03 ppb. Seu ponto de fusão é $327,46^\circ\text{C}$. Quando associado com a matéria orgânica pode sublimar em temperaturas superiores a 500°C . É um metal pesado do grupo 14 da tabela periódica (LAURIA et al., 2003)

O ^{210}Pb , descendente do Urânio, tem uma meia-vida de 22 anos e emite radiação beta com energia média de 17 keV, tornando a determinação deste nuclídeo bastante laboriosa (SILL; WILLIS, 1965).

Estudos mostram que em águas superficiais, tais como, rios e lagos, o ^{210}Pb está presente em decorrência tanto da própria deposição atmosférica deste radionuclídeo devido ao decaimento do ^{222}Rn , bem como da lixiviação de rochas e sedimentos que contêm urânio. Em águas de poços rasos, o ^{210}Pb é oriundo da lixiviação do urânio de rochas circunvizinhas e do arraste provocado pela água da chuva. Em poços profundos, o ^{210}Pb origina-se apenas da lixiviação de rochas circunvizinhas e do decaimento do ^{222}Rn disperso na água (SILVA, 2000). Jaworowski (1967, apud, EISENBUD; GESELL, 1997) reportou concentrações variadas em água da chuva.

O ^{210}Pb é um dos radionuclídeos naturais que mais contamina os vegetais, principalmente, se eles forem folhosos. Devido ao “fallout” natural do ^{222}Rn , o ^{210}Pb incorpora-se facilmente nos vegetais, entrando assim, na cadeia alimentar (SILVA, 2000).

A dieta padrão dos norte americanos não apresenta diferenças significativas entre os diversos Estados do país em relação à concentração média de ^{210}Pb , a qual está por volta de $0,03 \text{ Bq.kg}^{-1}$. Estudos em oito cidades americanas revelaram valores de $0,026$ a $0,037 \text{ Bq.kg}^{-1}$ de ^{210}Pb em alimentos consumidos pelos habitantes (MAGNO et al., 1970).

Nos Estados Unidos, a partir da avaliação em alimentos realizada pela UNSCEAR (1982), observou-se que a ingestão diária média estimada de ^{210}Pb é cerca de $0,11 \text{ Bq}$ em circunstâncias normais. Já a NCRP (1987) reportou a média diária de ingestão de ^{210}Pb em cerca de $0,05 \text{ Bq}$.

Além dos alimentos, a fumaça de cigarro contribui para exposição a este elemento (UNSCEAR, 1982). Estudo realizado na Polônia demonstrou que o consumo de cigarro e a absorção da fumaça pelo sistema respiratório são as principais fontes e as principais vias de absorção de ^{210}Pb e, conseqüentemente, de ^{210}Po em fumantes (SKWARZEC et al., 2001a).

Nos Estados Unidos, estima-se que o ^{210}Pb e os produtos do seu decaimento contribuem anualmente com a dose de $0,7 \text{ mSv}$ na superfície do osso, $0,14 \text{ mSv}$ em tecido mole e medula óssea, aproximadamente (NCRP, 1988). A Tabela 2 demonstra a contribuição das várias fontes para o corpo contendo ^{210}Pb .

Na Tabela 2 a NCRP (1988) demonstra que o indivíduo não fumante pode chegar a inalar cerca de 15 mBq.d^{-1} de ^{210}Pb e a quantidade que chega no sangue está por volta $2,6 \text{ mBq.d}^{-1}$. Já um fumante pode chegar a inalar até 47 mBq.d^{-1} , mais que o triplo de um não fumante, e conseqüentemente a quantidade que chega no sangue também apresenta aumento significativo, com $6,1 \text{ mBq.d}^{-1}$.

Tabela 2. Contribuição das várias fontes para o corpo contendo ^{210}Pb .

Via de incorporação	Absorção (mBq.d^{-1})		Absorção Fracional para o sangue	Quantidade chegando no sangue (mBq.d^{-1})	
	Não fumantes	Fumantes		Não fumantes	Fumantes
Intestino (alimento e água)	50	50	0,18	9	9
^{222}Rn no corpo	0,07	0,07	1,0	0,07	0,07
^{222}Ra no corpo	0,03	0,3	1,0	0,3	0,3
^{210}Pb inalado	15	47	0,16	2,6	6,1
Produtos do decaimento do ^{222}Rn inalado	0,3	0,3	0,16	0,05	0,05
Total	66	98		12	16

Fonte: NCRP, 1988

Salmon e col. (1998) apresentaram uma revisão sistemática a cerca da absorção do ^{210}Pb a partir de várias fontes. O consumo de cigarro e a inalação da fumaça mostraram os valores mais relevantes, principalmente se for considerado que um único cigarro contribui para a inalação de 1,7 mBq de ^{210}Pb (WATSON,1989), como pode ser visto na Tabela 3. Esta tabela permite uma avaliação da significância do hábito de fumar em relação a outras formas de captação do ^{210}Pb .

Tabela 3. Absorção sistemática do ^{210}Pb a partir da inalação do radônio , tabagismo e bebida alcoólica em relação ao total de ^{210}Pb absorvido na inalação e dieta, não incluindo fontes adicionais.

Local	Contribuição para Absorção adicional de ^{210}Pb pelo consumo de 20 cigarros por dia em relação ao total de ^{210}Pb captado. (%)	Média Nacional da concentração interna do Radônio (Bq.m^{-3}) (UNCEAR, 1989)	Absorção adicional de ^{210}Pb oriundo da média nacional do Radônio em relação a captação total do ^{210}Pb¹. (%)	Contribuição para Absorção adicional de ^{210}Pb pelo consumo de bebida alcoólica em relação ao total de ^{210}Pb captado². (%)
Illinois, E.U.A	83	46	3,9	49
Estados Unidos	64	46	3,0	38
Japão	17	29	0,5	10
Reino Unido	89	20	1,8	53
Alemanha	40	57	2,3	24
Polônia	58	9	0,5	34
Rússia	30	-	-	18
Portugal	16	81	1,3	9
Média Internacional	50 ± 28	41 ± 21	$1,9 \pm 1,3$	29 ± 17

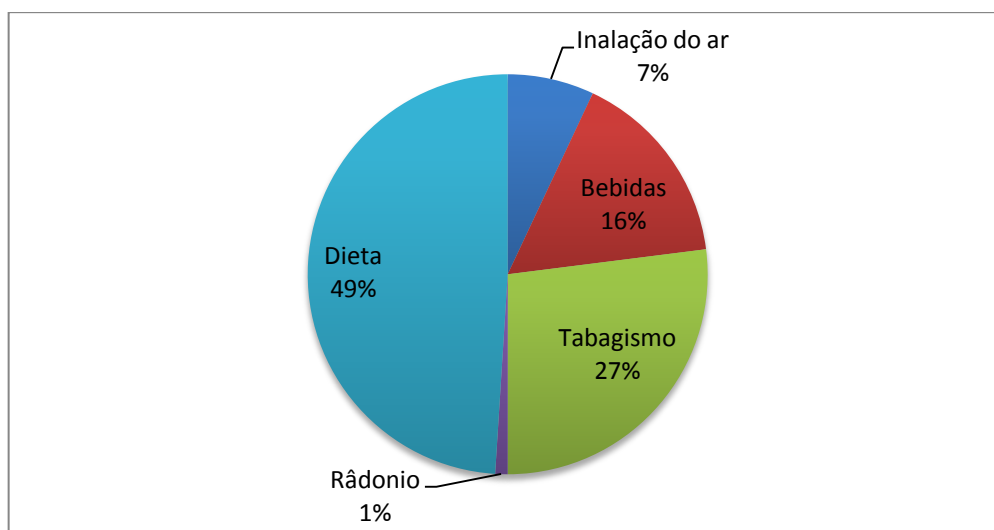
Fonte: SALMON et al., 1998

¹ Considerando a média do tempo de concentração no ar sendo 2 horas e a ocupação na residência sendo de 60%.

² Considerando a concentração média de ^{210}Pb em bebidas (vinho e cerveja) sendo $0,13\text{Bq.L}^{-1}$ e a ingestão média do adulto é $0,35 \text{ L.d}^{-1}$ (KAMTANI et al., 1981)

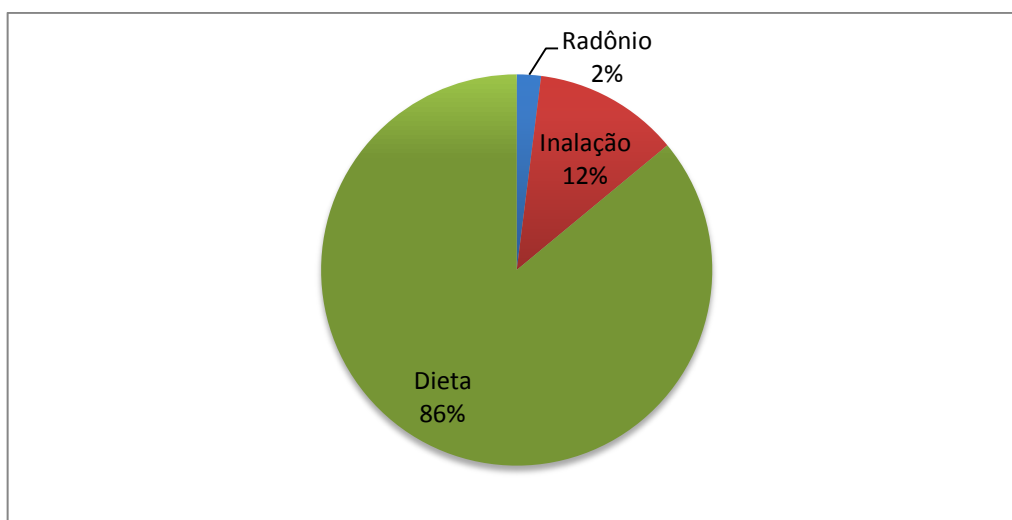
Dessa forma, Salmon e col. (1998) através das Figuras 6 e 7 mostram as relativas porcentagens das possibilidades de exposição ao ^{210}Pb , em relação a inalação do ar, dieta e fontes domésticas adicionais como Radônio, tabagismo, bebidas em 8 Países. Como pode ser observado na Figura 6, o tabagismo contribuem de maneira significativa para um aumento da exposição do ^{210}Pb .

Figura 6. Fontes de exposição ao ^{210}Pb considerando o Tabagismo e a bebida alcoólica



Fonte: SALMON et al., 1998

Figura 7. Fontes de exposição ao ^{210}Pb desconsiderando o Tabagismo e a bebida alcoólica



Fonte: SALMON et al., 1998

2.2.1.2 Polônio 210 (^{210}Po)

O Polônio, elemento de número atômico 84, foi descoberto por Marie Sklodowska Curie e Pierre Curie em 1898 purificando-o a partir da pechblenda. O Polônio é o primeiro elemento da tabela periódica, para o qual, todos os isótopos (um total de 28 com massas variando de 192 a 218; apud STANNARD, 1988) são radioativos. Este elemento é raro, mas pode ser encontrado em minérios de urânio, em quantidade aproximada de 100 µg por tonelada de minério (0,1 ppb) (GUILMETTE, 2007).

Guilmette (2007) ressalta que existem sete isótopos que surgem da série de decaimento da ocorrência natural do Tório (^{211}Po , ^{216}Po), Actínio (^{211}Po , ^{215}Po) e Urânio (^{210}Po , ^{214}Po e ^{218}Po). Devido a meia vida curta destes isótopos, estes não se acumulam no ambiente natural em qualquer extensão significativa. O Polônio-210 se apresenta como o isótopo de grande importância devido ao maior tempo de meia vida, 138 dias.

Esse elemento pertence ao grupo 6A da tabela periódica e apresenta a cor prata em tons de cinza. O Polônio metálico pode reagir lentamente com o oxigênio atmosférico a temperatura ambiente e rapidamente a uma temperatura de 250 °C. É facilmente solubilizados em ácidos diluídos, mas é apenas fracamente solubilizado em meio alcalino (LAURIA et al., 2003; GUILMETTE, 2007). Forma sais solúveis com cloretos, brometos, acetatos, nitratos e ânions inorgânicos. Uma das suas mais importantes propriedades químicas do ponto de vista biológico é sua tendência para hidrolisar e formar coloides quando há massa suficiente disponível (GUILMETTE, 2007).

Este elemento é bioacumulado em um nível considerado elevado em tecidos de organismos marinhos, até mais do que o ^{210}Pb , e tem uma elevada afinidade pela matéria orgânica (LAURIA et al., 2003).

Os primeiros estudos envolvendo Polônio e cigarro surgiram na década de 60. Vilma H. Runt e colaboradores trabalhavam em uma técnica para medir níveis muito baixos de Rádio e Polônio. Ao testar por curiosidade sua nova técnica, em cinzas de cigarro, não observou traços de Polônio, mesmo sabendo que quantidades muito pequenas existem no ambiente e contribuem para background natural. Vilma Runt deduziu que o Polônio tinha sido inalado pelo fumante. Para comprovar sua teoria, um aparato experimental foi montado consistindo de uma armadilha para capturar a fumaça principal e secundária do cigarro. Os cigarros foram soprados a cada 2 e 3 segundos durante 50 segundos em média, baseado na observação de Runt e Radford em relação aos colegas fumantes. Após a captura, a fumaça foi

tratada com cloreto de hidrogênio e depositada em placas de prata. As contagens da partícula alfa foram realizadas em detector proporcional de gás de fluxo contínuo. Runt e Radford chegaram a conclusão que um indivíduo que consome mais de 2 maços de cigarro por dia, durante 25 anos, recebe uma dose de 0,36 Sv ou 7 vezes a exposição ao background normal (REGO, 2009).

O Polônio-210 ganhou destaque mundial em 2006, aumentando o interesse médico por este radionuclídeo, devido ao atentado envolvendo o ex-agente da KGB Alexander Litvinenko, o qual foi envenenando com Polônio oriundo de um Reator Nuclear da Rússia, vindo a óbito em 3 semanas após ter ingerido uma grande quantidade de ^{210}Po (JEFFERSON et al., 2009).

A fonte geral do ^{210}Po , assim como no ^{210}Pb , na atmosfera é o decaimento do ^{222}Rn dentro das massas continentais (JAWOROWSKI, 1969; JAWOROWSKI; KOWNACKA, 1976). Os radionuclídeos precipitam, juntamente com a chuva e a neve, com consequente deposição na superfície da terra, nos vegetais e no oceano. Nas pesquisas, realizadas por Rangarajan e col. (1976), Skwarzec e Stepnowski (1998), os resultados indicaram que a deposição atmosférica do ^{210}Po e do ^{210}Pb pode variar de 0,05 a 0,5 $\text{kBq.m}^{-2}.\text{ano}^{-1}$. Nas plantas, o Polônio pode ser incorporado através do sistema radicular e diretamente a partir do “fallout” sobre os vegetais (POPOVA; TOSKAEV, 1980). No caso do tabaco, a deposição direta do ^{210}Po na superfície da folha é a via mais importante para acumulação na planta (LOPES DOS SANTOS et al., 1970; MUSSALO-RAUHAMAA; JAAKKOLA, 1985; SKWARZEC et al., 2001b). Além disso, o uso de fertilizantes fosfatados também pode contribuir para a contaminação do tabaco com ^{210}Po e ^{210}Pb (HUSSEIN, 1994; ALAM et al., 1997).

A concentração de ^{210}Po determinado em cigarros de tabaco está no intervalo de 2,8 a 37 Bq.kg^{-1} e variam com a marca de cigarro, provavelmente devido as diferentes variedades de tabaco usado e diferentes processos de fabricação (SKWARZEC et al., 2001b). Estudo realizado no Brasil por Peres e Hiromoto (2002) encontrou concentrações de ^{210}Pb variando de 11,9 a 30,2 mBq.g^{-1} e 10,9 a 27,4 mBq.g^{-1} para o ^{210}Po em tabaco seco. Little e col. (1965, apud EISENBUD;GESELL, 1997) em estudo envolvendo cadáveres de fumantes, avaliaram o ^{210}Po que estava presente no parênquima pulmonar desses indivíduos.

Portanto, sabe-se que fumantes e indivíduos que residem em áreas de elevado background radioativo estão sujeitos a receberem as maiores doses devido ao ^{210}Po (EISENBUD;GESELL, 1997; JEFFERSON et al., 2009).

Embora os cigarros tenham filtros para reduzir a inalação de substâncias cancerígenas, elementos como o ^{210}Pb e ^{210}Po são barrados ineficientemente. Na pesquisa realizada por Khater (2004) para determinar os teores desses elementos em cigarros consumidos no Egito, o filtro mostrou uma eficiência de 4,6% em média para impedir que os radionuclídeos fossem inalados, indicando assim que o Chumbo e Polônio contribuem para a dose recebida pelos fumantes.

2.2.2 Cinética do ^{210}Pb e do ^{210}Po no corpo humano

O ^{210}Pb é transferido para o corpo humano por inalação ou ingestão (LADINSKAYA et al., 1973). A ingestão de alimentos e água contribui para o aumento do nível de ^{210}Pb no sangue (EISENBUD; GESELL, 1997). Os frutos do mar consumidos na dieta humana possuem as maiores concentrações de ^{210}Pb , por isso são considerados como a principal fonte de contaminação interna (BEASLEY et al., 1969).

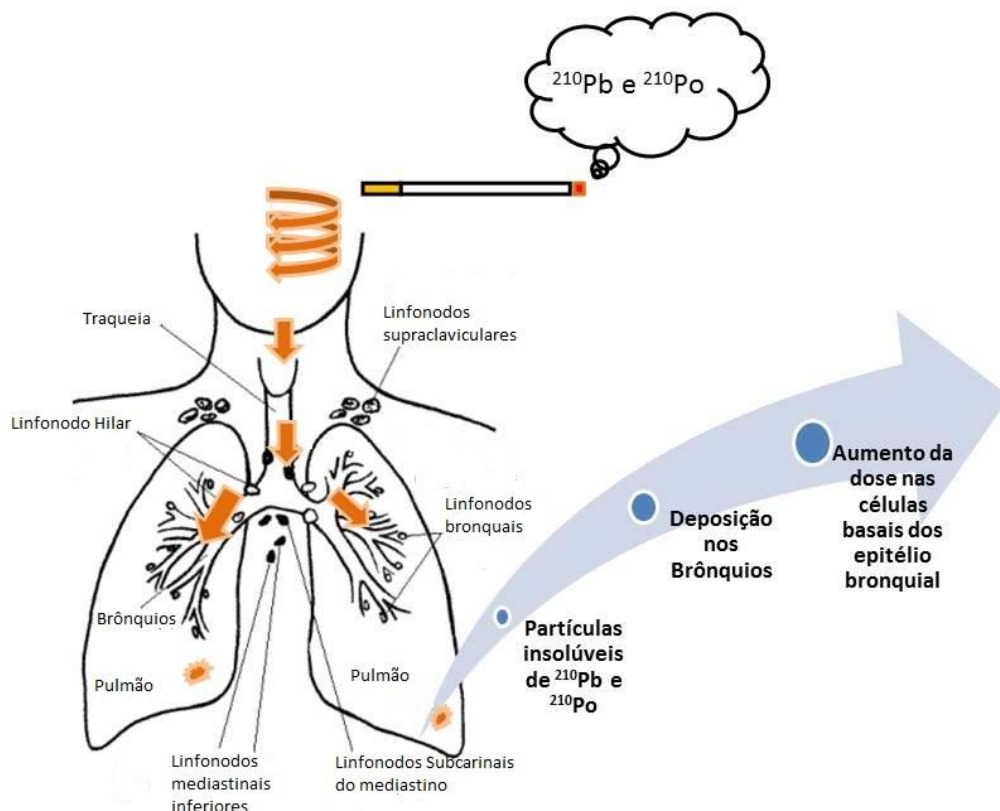
Ladinskaya e col. (1973) estudaram as diversas fontes ambientais e a biocinética do ^{210}Pb em habitantes de Rostov-on-Don na Rússia. Esses autores encontraram valores ínfimos de ^{210}Pb no ar, em média $0,63 \pm 0,17 \text{ mBq.m}^{-3}$. Enquanto que os valores obtidos na inalação e ingestão diária ^{210}Pb foram estimados entre 13 e 250 mBq, respectivamente. Contudo, estes valores não representam com exatidão os reais valores de absorção no sangue, pois não foi calculado nenhum fator de ponderação para as duas rotas, e nesse caso a inalação tem maior peso como rota de entrada para o ^{210}Pb no sangue (SALMON et al., 1998).

Quando se fala em contaminação por Chumbo-210 e Polônio-210, em relação aos fumantes, é preciso compreender que esses dois elementos estão em equilíbrio no tabaco do cigarro (YAPRAK; UYSAL, 1998). Isso devido ao prazo na produção do tabaco, no armazenamento e venda do cigarro, as vezes mais de 2 anos, faz com que o ^{210}Po e ^{210}Pb contido no tabaco fumado estejam em equilíbrio secular radioativo e as atividades dos radionuclídeos analisados são iguais quando o cigarro é consumido pelo usuário (GODOY, 1992; YAPRAK; UYSAL, 1998). Embora as atividades sejam semelhantes a partícula alfa emitida pelo Polônio tem uma energia mais elevada, o que representa um potencial mutagênico maior (SKAWARZEC et al., 2001a).

Além disso, a temperatura de queima de um cigarro pode chegar até cerca de 700°C e ambos os radionuclídeos são sujeitos a volatilizar a temperaturas superiores a 500°C

(PARFENOV, 1974). Desse modo, a maior parte do ^{210}Po e ^{210}Pb sublima do cigarro para os pulmões do fumante, como demonstra a Figura 8 (SKAWARZEC et al., 2001a).

Figura 8. Figura esquemática representativa do mecanismo de entrada do ^{210}Pb e ^{210}Po através da inalação da fumaça do cigarro



2

Fonte: Modificado de AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012a.

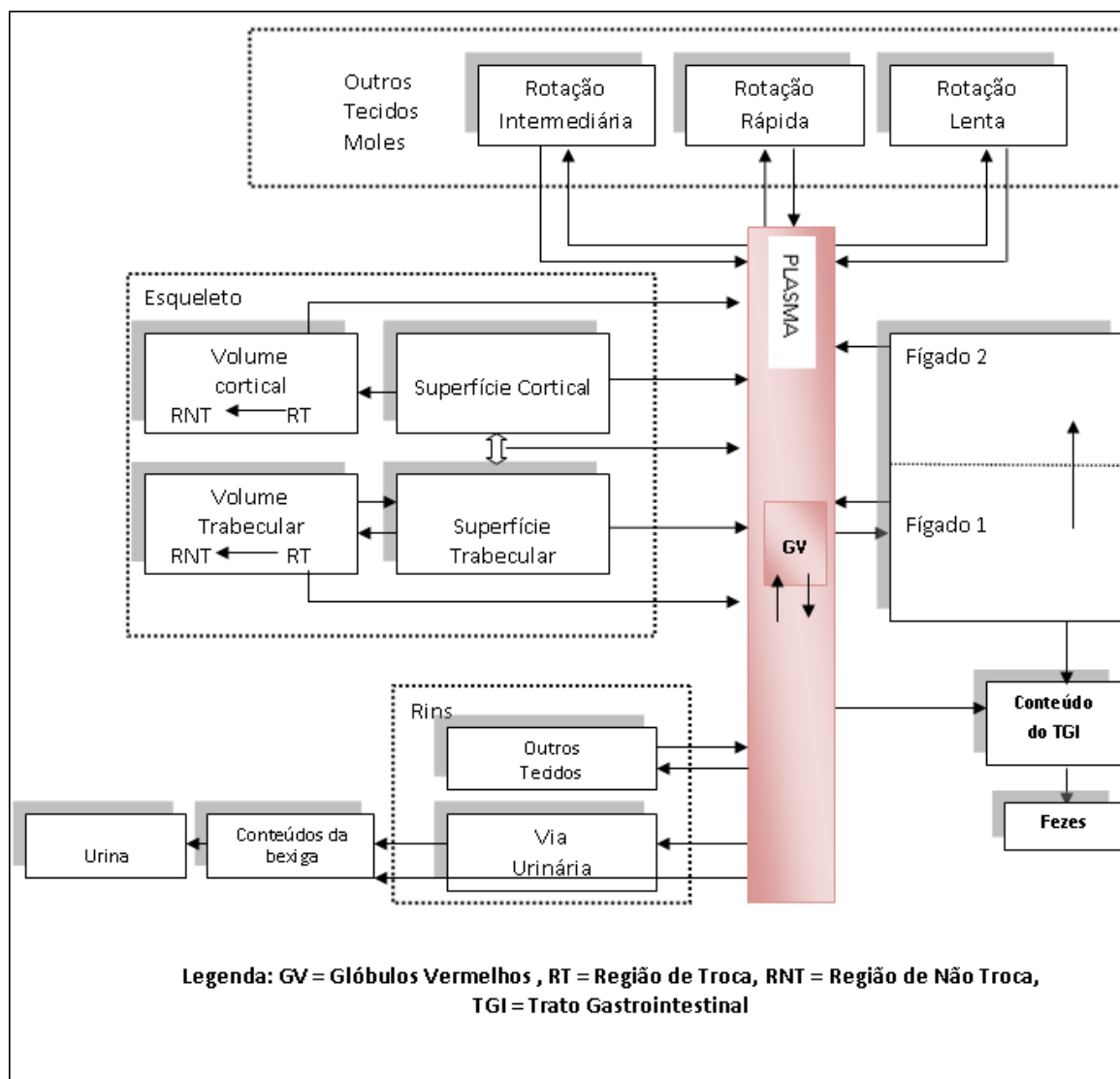
O ^{210}Po , quando inalado, tende a se depositar em tecidos moles (GUILMETTE, 2007). No caso, a secagem do tabaco e a combustão de tricoma na queima do cigarro produz partículas insolúveis de ^{210}Po e ^{210}Pb de alta atividade que são inaladas e depositadas nos brônquios dos fumantes (MARTELL, 1974 apud SKAWARZEC et al., 2001a), contribuindo assim para o aumento da dose em células basais do epitélio bronquial. Cohen e col. (1980) reportaram maior dose em células bronquiais de fumantes em relação aos não fumantes.

O Chumbo inorgânico inalado ou ingerido tende a formar complexos com macromoléculas sem necessariamente ser metabolizado e dessa forma poderá ser absorvido, distribuído e excretado (SCHIFER et al., 2005).

Para melhor compreensão a respeito da transferência de qualquer radionuclídeo para os diversos sistemas do corpo humano, a Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP) elaborou modelos biocinéticos que caracterizam matematicamente o movimento, a translocação, a deposição e a excreção de qualquer substância radioativa incorporada. Tais modelos predizem as vias de movimentação de radionuclídeos no corpo e estimam o tempo de residência em cada compartimento, permitindo assim, o cálculo da dose e do risco interno aos tecidos e órgãos específicos.

A ICRP-67 (1993) apresentou extensos estudos na literatura sobre a distribuição e a retenção de Rádio em seres humanos. Como resultado desses estudos, tem-se o modelo biocinético sistêmico do Rádio no corpo humano, apresentado na Figura 9. Este modelo serve também para estudar o metabolismo de qualquer metal alcalino terroso, como também o Chumbo e o Polônio. O modelo incorpora um compartimento central, o plasma sanguíneo, conectado aos compartimentos de entrada do ^{210}Pb e do ^{210}Po no corpo humano: esqueleto, rins, fígado, pulmão e outros tecidos moles e também aos compartimentos de saída: fezes e urina. Neste modelo, o plasma é tratado como um reservatório uniformemente misturado. Os tecidos moles (excluindo o fígado e os rins, quando estes órgãos são tratados explicitamente) são divididos em compartimentos que correspondem a rápido, intermediário e lento. Esta classificação é baseada no nível de retorno da atividade metabólica ao plasma.

Figura 9. Modelo biocinético sistêmico dos elementos alcalinos terrosos e do chumbo.



Fonte: ICRP-67, 1993

Após sua absorção, o chumbo será distribuído pelo sangue para todo o organismo associado principalmente aos eritrócitos em proporção aproximada de 90% (SCHIFER et al., 2005). No plasma sanguíneo apresenta-se ligado à albumina, α_2 globulina ou como íons livres (SADAO, 2002). Estudos realizados por Bruenger e col. (1973) mostram desordens hematológicas provocadas pelo ^{210}Pb . Neste trabalho, os resultados indicaram que o ^{210}Pb estava aderido à membrana dos eritrócitos, estando ligado primariamente a hemoglobina. Esta pesquisa mostrou também que no interior da célula, o ^{210}Pb teve a capacidade de formar complexos com as proteínas. Aproximadamente 10% da quantidade de ^{210}Pb encontra-se associada com o estroma e 90% com o citosol das células sanguíneas. A distribuição deste

elemento através do sangue ocorrerá principalmente no epitélio tubular dos rins e fígado, onde sofrerá excreção, uma parte será armazenada e uma fração será reintroduzida na circulação sob a forma de fosfato de chumbo (SADAO, 2002).

No organismo humano, o ^{210}Pb possui grande afinidade por tecidos densos principalmente o fígado e os ossos, podendo induzir diversos tipos de danos à saúde. Vários estudos têm confirmado que o ^{210}Pb tem preferência em se depositar nos ossos trabecular e cortical. 70% do ^{210}Pb presente no corpo humano encontra-se depositado nos ossos, sendo o restante distribuído nos tecidos moles. A acumulação do ^{210}Pb no osso ocorre através de troca iônica entre o Pb^{+2} e o Ca^{+2} , daí a similaridade metabólica do Chumbo com o Cálcio no corpo, apesar dos mecanismos de metabolização não serem necessariamente idênticos (MITTELSTAEDT, 1983).

No entanto, em situações onde a ingestão de Cálcio é pobre na dieta há maior favorecimento de absorção do Chumbo e nesse caso é possível estabelecer uma correlação entre os baixos níveis de cálcio com altos teores de Chumbo no sangue e nos ossos, principalmente em mulheres grávidas e no pós-parto (PIRES, et al., 2001).

No esqueleto, o ^{210}Pb decai nos radionuclídeos ^{210}Bi e ^{210}Po . A energia média da partícula beta emitida no decaimento do ^{210}Pb , é de 17 keV. Nesse caso, apenas 1% da energia emitida, é depositada na medula óssea vermelha. A energia média da radiação beta emitida pelo ^{210}Bi , é de 1,2 MeV. Somente 17% dessa energia é absorvida pela medula óssea vermelha. Por outro lado, o decaimento alfa do ^{210}Po , com energia de 5,3 MeV, contribui com 90 a 95% da energia depositada na medula óssea vermelha (SALMON, 1999). Estima-se que 50% da quantidade de ^{210}Po produzido pelo decaimento do ^{210}Pb no corpo humano é transferido para os ossos, dessa forma esse tecido representa um reservatório para esses radionuclídeos (HURSH, 1960).

Os primeiros estudos realizados mostraram a importância da incorporação de emissores alfa em ossos humanos (TURNER et al., 1958; MAYNEORD; HILL, 1959). Nesses trabalhos foram comprovados que as partículas alfa emitidas no decaimento do ^{210}Po oriundo do decaimento do ^{210}Pb presente no corpo (OSBORNE, 1963; HOLTZMAN, 1963) danificaram estruturas ósseas. Pesquisas realizadas em cadáveres de pessoas não expostas ocupacionalmente comprovaram o desenvolvimento de doenças malignas nos ossos, relacionado com as radiações emitidas pelo decaimento do ^{210}Pb (HILL; JAWOROWSKI, 1961). Esses autores verificaram que a radiação alfa emitida no decaimento do ^{210}Po foi o principal responsável pelas doenças observadas. Além disso, a partícula alfa do ^{210}Po , possui

baixo deslocamento no tecido, aproximadamente 40µm e a dose de radiação é localmente confinada (SAMUELSSON, 1988). A partícula alfa emitida pelo ^{210}Po apresenta-se como um poderoso mutagênico e altamente eficiente em relação a outras fontes de radiação ou aos poluentes químicos (SKAWARZEC et al., 2001a). Estudo conduzido por Martell (1982) verificou que a dose acumulada nos brônquios de fumantes que morreram de câncer de pulmão foi de aproximadamente 16 Sv.

No caso de envenenamento com ^{210}Pb , este elemento químico encontra-se associado com a membrana da célula vermelha e com o citosol (BRUENGER et al., 1973).

O Chumbo e o Polônio são excretados por várias rotas, porém só a excreção renal e a gastrointestinal têm importância prática. Uma vez ingerido, cerca de 90% do Chumbo que não foi absorvido é excretado pelas fezes, em função da dinâmica do trato gastrointestinal sob a forma de sulfetos insolúveis. A urina representa a maior via de excreção do Chumbo absorvido, pois a excreção renal ocorre em sua maioria através da filtração glomerular, o que representa 80% da eliminação do elemento que foi absorvido, 15% é eliminado pelas fezes, por meio da biliar e secreção do trato gastrointestinal e um percentual inferior a 8% é eliminado pelo suor, descamação cutânea, cabelos e unhas (MAVROPOULOS, 1999; MOREIRA; MOREIRA, 2004; SADAQ, 2002).

A quantidade excretada é afetada pela idade, características da exposição e dependente da espécie (WHO, 1995). A excreção na urina é sempre de origem sistêmica. O teor de radionuclídeos das fezes é devido à excreção de um componente sistêmico, em grande parte, originários da dieta que possivelmente não foi absorvido pelo trato gastrointestinal (NAUMANN, 1998). O efeitos biológico do ^{210}Pb é mesmo, independentemente das rota de entrada, uma vez que ele interfere no funcionamento normal da célula e em inúmeros processos fisiológicos. Contudo o risco associado ao Chumbo-210 é mais radiológico, principalmente em exposições crônicas.

A utilização de diversas matrizes ambientais tem possibilitado estimar a exposição humana a diversas substâncias químicas, incluindo o ^{210}Pb e o ^{210}Po . A avaliação do ar, água e solo é denominada de monitoração ambiental e associada à avaliação das substâncias químicas presentes nos indivíduos expostos, quer seja no ambiente de trabalho, ou situações que os levem a se expor de alguma forma, pode indicar relação entre exposição e efeito na saúde dos indivíduos (KUNO et al., 2010).

Kuno e col. (2010) ressaltam a importância da utilização de “indicadores biológicos”, principalmente os de exposição e de efeito, para verificar o grau de exposição aos agentes

químicos ou físicos, que refletem as alterações em níveis celulares e moleculares que ocorrem em um sistema ou na amostra biológica.

2.3 Indicadores biológicos

Os bioindicadores são uma ferramenta importante de análise dos sistemas biológicos quando estes estão sob algum estresse (HYNE; MAHER, 2000). Livingstone (1993) definiu os indicadores biológicos a partir dos efeitos resultantes da ação de contaminantes ambientais ao nível individual que podem ser mensurados no próprio organismo ou na matriz biológica que indique qualquer alteração dos padrões normais, diante da impossibilidade de ser detectado no organismo intacto.

Sendo assim, os bioindicadores podem ser obtidos a partir de qualquer alteração em fluidos corporais, células e tecidos encontradas a partir de medidas obtidas sobre o organismo completo, que possam sugerir, do ponto de vista bioquímico, celular, fisiológico, compartimentais ou energéticos, a ação de qualquer contaminante ou a magnitude da resposta do organismo alvo (LIVINGSTONE, 1993).

Mais especificamente, Kuno e col. (2010) exemplificam alguns indicadores biológicos de exposição. São exemplos de bioindicadores a concentração de compostos correlatos ou de seus metabólitos em fluidos biológicos como sangue, soro, urina, adutos de DNA (formados pela ligação de contaminantes ambientais ao DNA), hemoglobina ou albumina. Cabelos e dentina também são utilizados e podem indicar indiretamente a concentração em tecidos específicos pela afinidade que determinadas substâncias apresentam (KUNO et al., 2010).

O conhecimento das vias de interação dos elementos que causam os efeitos tóxicos deve ditar a escolha do melhor bioindicador. Um pré-requisito importante na escolha do bioindicador para ser analisado é que ele seja de fácil obtenção, como por exemplo, amostras de urina, sangue (contagem de células sanguíneas), cabelo ou saliva. Estes indicadores biológicos já são utilizados na biomonitoração humana como indicadores de exposição às radiações ionizantes (KUNO et al., 2010).

Substâncias na urina podem indicar o consumo de cigarro, como a cotinina e o 4-(methilnitrosamino)-1-(3-piridyl)-1-butanol (NNAL), porém existem limitações no uso dessas substâncias para avaliar o grau de exposição ao cigarro. Uma delas é o tempo de meia vida da cotinina no plasma sanguíneo, por volta de 16 horas, neste caso, essa substância derivada da nicotina indica a exposição ao cigarro nos últimos dias, mas pouco usado para exposições

crônicas. Além disso, as limitações com este método de avaliação da exposição incluem a não bioacumulação dessas substâncias no organismo, o ambiente em que a pesquisa é administrada e a precisão das respostas fornecidas quando correlacionadas com o quantitativo de cigarros consumidos (SCHAYER et al., 2010). Estes autores sugerem o ^{210}Pb e o ^{210}Po como marcadores complementares para avaliar o grau de exposição a fumaça de cigarro.

A avaliação das amostras biológicas, como a urina de 24 horas, é uma ferramenta para investigar a exposição a agentes radiológicos (JEFFERSON et al., 2009). Dos métodos indiretos para determinação de radionuclídeos, a análise de urina é o mais simples, constituindo-se a amostra ideal, pois é fácil de obter, contém somente radionuclídeos metabolizados e pode ser convencionalmente colhida por períodos de tempo bem definidos sem dificuldade (PASSARELLI, 1977). Além disso, a determinação dos teores de Chumbo urinário é utilizada como indicativo de exposições a este elemento (SADAO, 2002).

Passarelli (1977) pontua três propósitos da análise de urina:

- Monitorar a incorporação de material radioativo pelos indivíduos para se assegurar que a concentração esteja abaixo dos limites máximos permissíveis.
- Verificar a possibilidade de incorporação após algum evento que demande maiores cuidados, em acidentes, por exemplo.
- Seguir incorporações conhecidas para definir os níveis de carga corporal e os valores de meia-vida efetiva e determinar, assim, a dose de radiação recebida.

O trabalho realizado por Schayer e col. (2010) demonstrou, com base no tempo de meia-vida e regressão dos resultados, que o ^{210}Pb contido na urina pode ser usado para avaliar a probabilidade da inalação da fumaça do cigarro. Nesta pesquisa foi demonstrado que há uma correlação entre a atividade do ^{210}Pb na urina e o número de cigarros consumidos por dia.

Outros estudos utilizaram a urina como bioindicador da presença de ^{210}Pb e ^{210}Po no corpo do indivíduo. Entre eles destaca-se o de Knezevic e col. (1998), que descreveram a influência de ácido etilenodiamino-tetracético cálcico dissódico (CaNa_2EDTA), um agente quelante, na excreção e mobilidade biológica do ^{210}Pb , ^{210}Po e Chumbo estável na urina de trabalhadores, sujeitos a intoxicação crônica por esses elementos, que atuam no processo de reciclagem de baterias em Belgrado. A terapia de quelação tem papel importante, pois os quelantes são agentes caracterizados por se ligarem aos íons de metais pesados formando complexos químicos estáveis não tóxicos, que aceleram a excreção de metais (KNEZEVIC et al., 1998; CAPITANI, 2009).

Naumann e col. (1998), em estudo realizado em Berlin com amostras de urina, obtiveram baixas concentrações de ^{210}Pb em indivíduos expostos a radioatividade natural.

No Brasil, pesquisa realizada por Santos e col. (1995), em Joinville no Estado de Santa Catarina, a análise de urina revelou concentrações semelhantes entre fazendeiros que utilizam fertilizantes fosfatados e indivíduos do grupo controle.

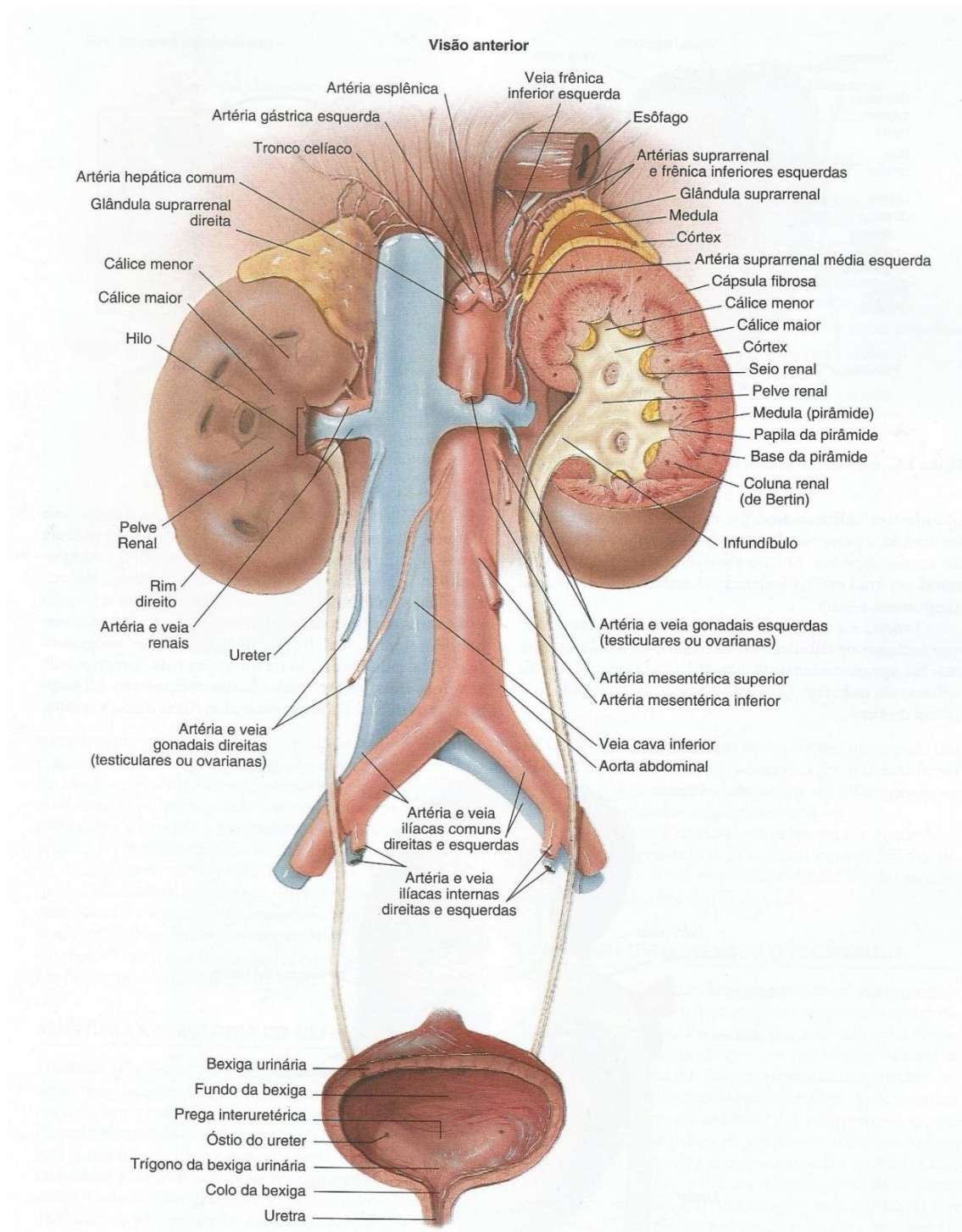
Pesquisada realizada por Santos e col. (1994) na cidade de Poços de Caldas, apresentaram altos valores de excreção de ^{210}Po e ^{210}Pb em urina dos fumantes em relação aos não fumantes dos mesmo grupo.

2.3.1 Urina, formação e composição

O sistema urinário (Figura 10) é o responsável pela produção da urina, um líquido transparente, amarelado, formado pela filtração do sangue nos rins (LENTNER, 1981) e que transporta os produtos do metabolismo até ao exterior do corpo. Ela é constituída por 95% de água, na qual a ureia, toxinas e sais minerais, como o cloro, magnésio, potássio, sódio, cálcio, fósforo e nitrogênio que formam os outros 5% estão dissolvidos (SCHOUW et al., 2002).

Ingestão alimentar, atividade física, metabolismo corporal, funções endócrinas e, até mesmo, a posição corporal são variáveis que exercem influência na excreção de solutos que correspondem aos 5% restantes. Como resultado do metabolismo do fígado e parte da degradação das proteínas e aminoácidos, a ureia é um produto responsável por boa parte do total de sólidos dissolvidos na urina (STRASINGER; DI LORENZO, 2009).

Figura 10. Representação do sistema urinário



Fonte: MUNDT; SHANAHAN, 2012

Na urina substâncias como hormônios, vitaminas e medicamentos e principalmente sólidos inorgânicos como cloreto, sódio e potássio também podem ser encontrados. Elementos como células, cilindros, cristais, muco e bactérias podem ser encontrados, mesmo não sendo integrantes do plasma filtrado (STRASINGER; DI LORENZO, 2009). Além desses elementos citados, radionuclídeos naturais como ^{210}Pb e ^{210}Po podem ser encontrados em caso de contaminação (COSTA-JÚNIOR et al., 2013b; HÖLGYE, 2013; MUIKKU et al., 2011; SCHAYER et al., 2010; KNEZEVIC et al., 1998; NAUMANN et al. 1998; SANTOS et al., 1995;). No caso do ex-agente da KGB, Alexander Litvinenko, a urina foi a principal matriz de bioindicação da contaminação com ^{210}Po (JEFFERSON et al., 2009).

A tabela 4 mostra simplificadaamente os elementos presentes na urina coletada em 24 horas.

Tabela 4. Composição da urina coletada por 24 horas

Componentes Orgânicos	Quantidade	Observações
Ureia	25 -35 g	Produto do metabolismo de aminoácido em amônia.
Creatinina	1,5 g	Elemento derivado da Creatina, substância nitrogenada presente no tecido muscular.
Ácido úrico	0,4 – 1 g	Produto do catabolismo de ácido nucleico em alimentos e destruição celular.
Ácido Hipúrico	0,7 g	O corpo elimina este elemento sob a forma de ácido benzoico
Outras substâncias	2,9 g	Carboidratos, Pigmentos, ácidos graxos, enzimas e hormônios.
Inorgânicos		
Cloreto de Sódio (NaCl)	15 g	Principal sal, sua concentração na urina depende da quantidade ingerida na dieta.
Potássio (K^+)	3,3 g	Presente como sal cloreto, sulfato e fosfato.
Sulfato (SO_4^{2-})	2,5 g	Oriundo de aminoácidos.
Fosfato (PO_4^{3-})	2,5 g	Está presente no sangue, exercendo o papel de tampão, ocorre principalmente na forma de compostos de sódio.
Amônio (NH_4^+)	0,7 g	Produto do metabolismo proteico e da glutamina

		nos rins; a quantidade varia de acordo com a acidez do sangue e dos fluidos teciduais.
Magnésio (Mg^{2+})	0,1 g	Presentes como sal cloreto, sulfato e fosfato.
Cálcio (Ca^{2+})	0,3 g	
Chumbo-210 (^{210}Pb)	-	Presente na urina em pequenas quantidades em indivíduos não ocupacionalmente expostos e indivíduos não fumantes. Como não existe um valor limite de referência, em casos que envolvam contaminação acima de 3.700 Bq, a urina deve ser analisada ³ .

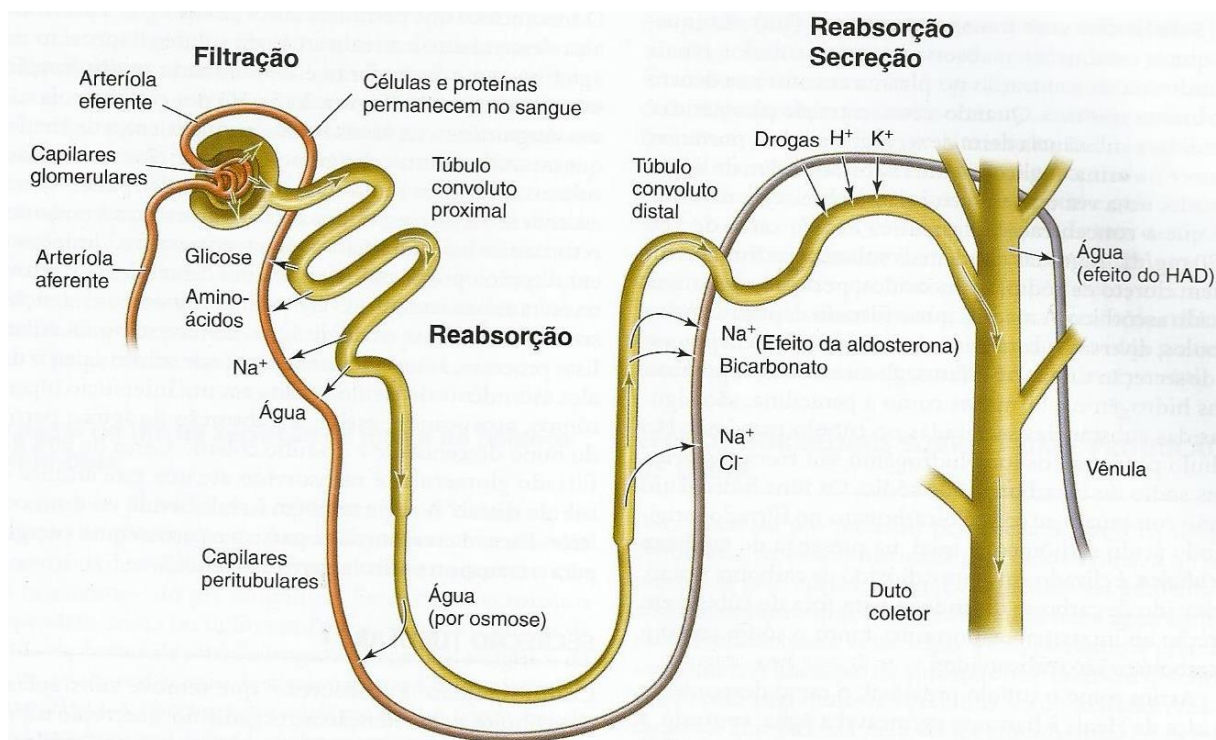
Fonte: Modificado de STRASINGER; DI LORENZO, 2009.

De maneira geral, a urina é formada nos rins (Figura 10), um órgão constituído aproximadamente por 1 milhão de néfrons, quando estes filtram o plasma perfazendo uma relação entre a reabsorção de água e substâncias importantes para o organismo de aproximadamente 170.000 mL de plasma filtrado para 1.200 mL de urina final, em média (STRASINGER; DI LORENZO, 2009). Basicamente o néfron possui dois importantes componentes: um glomérulo, responsável por filtrar boa parte dos líquidos do sangue e um túbulo alongado no qual o líquido filtrado é convertido em urina no seu trajeto em direção a pelve renal (GUYTON; HALL, 1998).

Basicamente 120 mL/min, ou a razão de um quinto do fluxo plasmático renal é filtrada através dos glomérulos, dando origem a um composto conhecido como “ultrafiltrado”, o qual passará por processos fisiológicos, à medida que se desloca através do néfron (Figura 11). O ultrafiltrado em sua natureza possui a mesma composição do plasma sanguíneo, exceto pela ausência do excesso de proteínas, normalmente. Dentre os produtos filtrados estão água, glicose, eletrólitos, aminoácidos, ureia, ácido úrico, creatinina e amônia (MUNDT; SHANAHAN, 2012).

³ ENVIROMENTAL HEALTH & SAFETY, 2015.

Figura 11. Representação esquemática do Néfron



Fonte: MUNDT; SHANAHAN, 2012

Ao passo que o ultrafiltrado atravessa os túbulos proximais, componentes como água em grande quantidade, cloreto de sódio, bicarbonato, potássio, cálcio, aminoácidos, fosfato, proteína, glicose e outras substâncias importantes ao organismo são reabsorvidos e retornam a corrente sanguínea. É importante ressaltar que mais de 80% do filtrado é reabsorvido no túbulo proximal (STRASINGER; DI LORENZO, 2009; MUNDT; SHANAHAN, 2012). Nesse momento o ^{210}Pb , por similaridade química com Ca^{+2} , também poderá ser reabsorvido, estando disponível para causar dano nessa região (SADAO, 2002).

Na etapa seguinte, assim como no túbulo proximal, no ramo descendente da alça de Henle, há grande permeabilidade da água, porém sem ocorrência de reabsorção de solutos neste local. Na região do ramo ascendente, diante da reduzida permeabilidade da água, há absorção de cloreto, sódio e magnésio. Devido à ausência de cloreto de sódio, o fluido deixa a alça de Henle com osmolalidade menor que o plasma (MUNDT; SHANAHAN, 2012).

O segmento com maior espessura do ramo ascendente da alça de Henle deságua no túbulo distal. Nesse túbulo há reabsorção intensa de íons, incluindo sódio, potássio e cloreto, contudo ainda é impermeável à água e ureia, dessa forma, esta região é conhecida como segmento diluidor, pois também dilui o líquido tubular (GUYTON; HALL, 1998).

Na etapa do processo final de formação da urina, que concerne o final do túbulo distal ao longo dos túbulos coletores, há reabsorção de 10% de água e do sódio filtrados. Nesta região, do túbulo coletor cortical, há reabsorção de água e sódio no lúmen do tubo e secreção de potássio. No ducto coletor medial é permeável a ureia, a qual é reabsorvida pelo interstício medular, auxiliando a elevar a osmolalidade nesta região dos rins, contribuindo assim para formar uma urina mais concentrada (GUYTON; HALL, 1998).

A urina que será eliminada da bexiga possui a mesma composição do líquido que flui pelos ductos coletores. Não havendo maiores alterações nos constituintes do líquido urinário à medida que percorre a via: cálices renais, ureteres e bexiga (MUNDT; SHANAHAN, 2012).

Os hábitos alimentares exercem influência sob a composição química bem como a quantidade de água consumida, atividade física, tamanho do corpo e fatores ambientais (SULLIVAN; GRANTHAM, 1982). Cada indivíduo produz em média de 1 a 1,5 litros de urina por dia, conforme a Tabela 5.

Tomando-se a excreção humana como ferramenta da biomonitoração é importante levar em consideração a quantidade de água ingerida e eliminada pelo corpo humano. Normalmente, apenas pequena quantidade de água (100 ml/dia) é perdida nas fezes e a maior parte de líquido é eliminada através da urina excretada pelos rins, como mostrado na Tabela 5. (GUYTON; HALL, 1998).

Tabela 5. Ingestão e eliminação diária de água em situação normal e no exercício prolongado

	Normal (ml/dia)	Exercício Intenso Prolongado
Ingestão		
Líquidos ingeridos	2.100	-
Provenientes do metabolismo	200	200
Ingestão Total	2.300	-
Eliminação		
Insensível - Pele	350	350
Insensível – Pulmões	350	650
Suor	100	5.000
Fezes	100	100
Urina	1.400	500
Eliminação total	2.300	6.600

Fonte: GUYTON; HALL, 1998

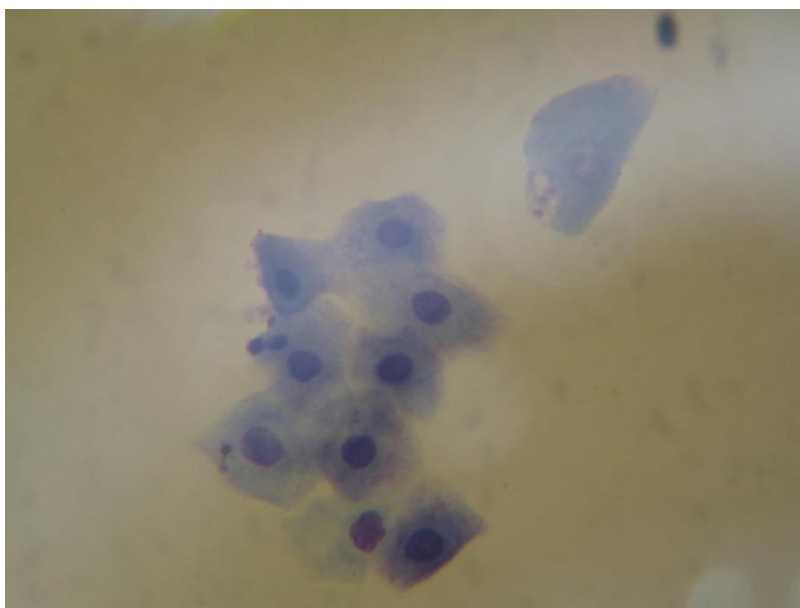
2.3.1.1 Constituintes do sedimento da urina

O sedimento urinário representa um meio rico em elementos formados, que vão de glóbulos vermelhos e glóbulos brancos até cilindros. De modo geral é possível encontrar nada mais do que células epiteliais ou filamentos de muco na urina (STRASINGER; DI LORENZO, 2009).

As células epiteliais são achados comuns. Podem ter sua origem de qualquer sítio do trato geniturinário, do túbulo proximal até a uretra. Este tipo de célula, encontrada no líquido urinário é proveniente da descamação normal de células epiteliais antigas (SHANAHAN; MUNDT, 2012).

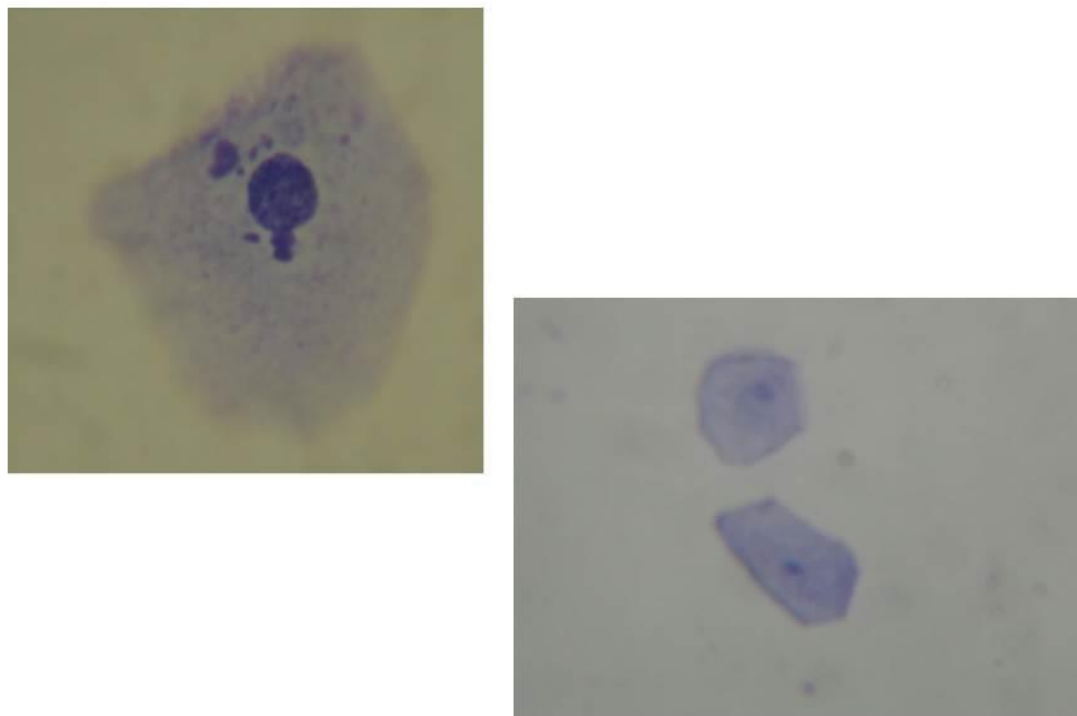
Basicamente, 3 tipos de células epiteliais podem ser observadas na urina: células uroteliais (Figura 12) escamosas (Figura 13) e tubulares renais (FORTIN et al., 2010; STRASINGER; DI LORENZO, 2009). No sexo masculino, as células escamosas apresentam menor frequência, originadas basicamente da uretra. No sexo feminino, estas células são encontradas em abundância. Este tipo de célula é identificável por apresentar morfologia irregular, por ser grande e achatada, contendo pequenos núcleos centrais e citoplasma abundante, porém apresenta pouca utilidade diagnóstica por sua presença na urina resultar da contaminação a partir da vagina (SHANAHAN; MUNDT, 2012).

Figura 12. Células epiteliais esfoliativas uroteliais encontradas na urina.



Legenda. Células esfoliativas coradas com Giemsa. O núcleo mais fortemente corado com roxo escuro e o citoplasma bem delimitado. Fonte: O autor

Figura 13. Células epiteliais esfoliativa escamosas encontradas na urina.



Legenda. Células esfoliativas escamosas coradas com Giemsa. Com um aumento de 1000 x é possível observar o núcleo bem delimitado. É possível observar alguns achados no citoplasma
Fonte: O autor

As células tubulares renais são ligeiramente maiores que leucócitos e são caracterizados por conterem grandes núcleos esféricos. Apresentam as formas achatada, cuboide ou colunar. Uma elevada frequência deste tipo de célula sugere dano tubular (FORTIN et al., 2010; SHANAHAN; MUNDT, 2012).

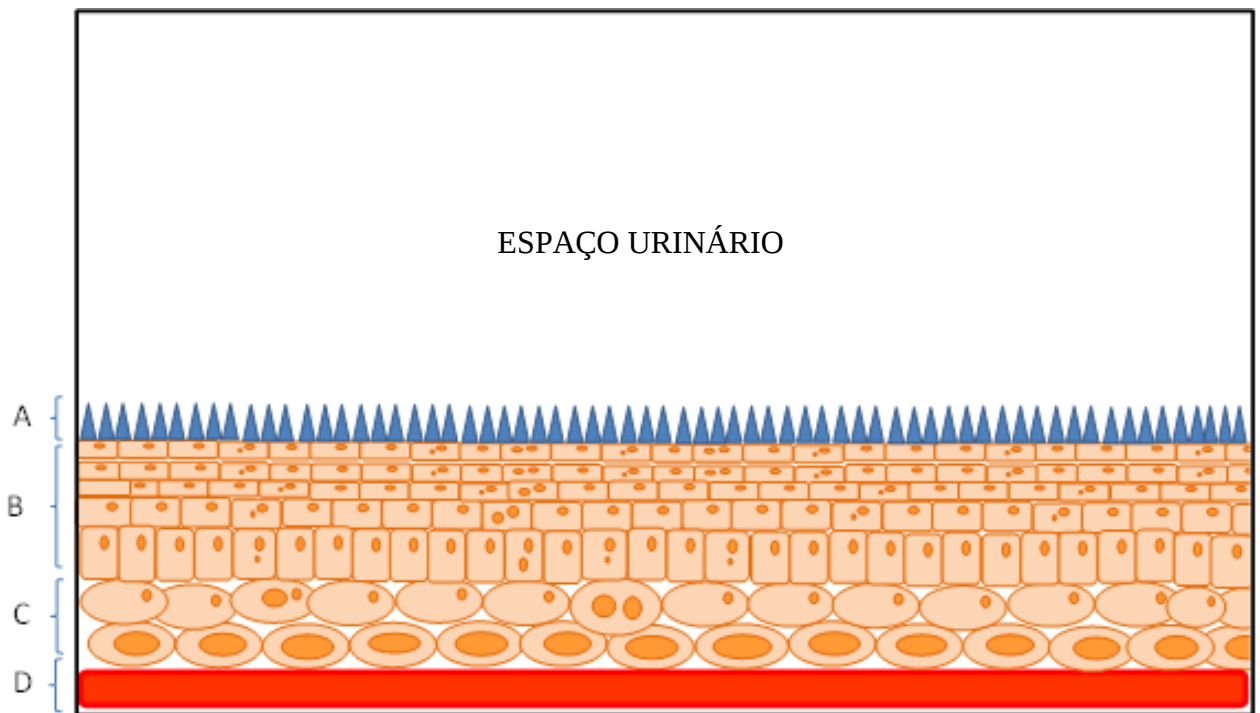
Um tipo de célula de grande importância diagnóstica são as células epiteliais de transição, também são conhecidas como células uroteliais que revestem o trato urinário desde a pelve renal até a porção superior da uretra. Apresentam de 2 a 4 vezes o tamanho dos leucócitos e caracterizam-se por apresentarem formato esférico, piriforme com projeções caudais e possível presença de dois núcleos em situações ocasionais (SHANAHAN; MUNDT, 2012).

Em caso de danos no DNA envolvendo estes tipos de células a presença do micronúcleo é um achado representativo da exposição a agentes mutagênicos e pode ser utilizado na monitoração dos efeitos biológicos nos tecidos alvo de transformações neoplásicas (FORTIN et al., 2010). Sua capacidade de se comportar como um marcador dos estágios iniciais do câncer em tecidos específicos fez com que o micronúcleo, em células esfoliativas, obtivesse grande aceitação em estudos epidemiológicos na indicação do dano genotóxicos sofrido por tecidos expostos (BURGAZ et al., 1995).

2.3.2 Uretélio e a dinâmica das células esfoliativas

Para melhor compreender o micronúcleo presentes em células esfoliativas, é necessário estudar a dinâmica dessas células. Thomas e col. (2009) publicaram um protocolo para o estudo de micronúcleos em células esfoliativas da mucosa bucal, cujos conceitos e metodologias são aplicáveis a qualquer tipo de células esfoliativas. Como base nesse modelo e nas representações da parede da bexiga no trabalho de Birder e Anderson (2013), a Figura 14 mostra a representação esquemática da formação das células esfoliativas e os achados mais comuns.

Figura 14. Representação esquemática da dinâmica histológica das células esfoliativas da parede da bexiga



Legenda. (A) Camada de Glicosaminaglicano; (B) Células uroteliais; (C) Células basais; (D) Membrana basal

Legenda:



Célula basal Indiferenciada



Célula urotelial binucleada



Célula basal Indiferenciada com micrônúcleo



Célula urotelial com micrônúcleo



Célula urotelial normal



Célula esfoliativa urotelial com micrônúcleo

A estrutura indicada pela letra A na Figura 14 representa a camada de glicosaminoglicano (GAG) que recobre as células mais superficiais do epitélio, chamadas guarda-chuvas. A principal função desta camada é de fornecer proteção para as células mais inferiores do tecido. É uma barreira natural com a função de impedir que micro-organismos e substâncias tóxicas ou carcinogênicas presentes na urina adentrem nas camadas mais internas do uretério (BIRDER; ANDERSON, 2013). O mecanismo exato da função barreira do conjunto das células-guarda-chuva e a camada de GAG é muito complexo e precisa de estudos mais aprofundados, contudo Birder e Anderson (2013) enfatizam que mudanças na dieta ou utilização de remédios podem influenciar no tráfego de substâncias tóxicas para interior do uretério.

Na camada B, as células intermediárias estão representadas pelas células de transição e o conjunto de células mais superficial (células guarda-chuvas), que possuem de 25 a 250µm de diâmetro. Estas células são mais largas geralmente binucleadas ou multinucleadas e recobrem a camada de células menores, chamadas de cuboidais (BIRDER; ANDERSON, 2013, FORTIN et al., 2010).

As estruturas C e D representam o conjunto de células basais indiferenciadas e a membrana basal, respectivamente. As células basais são responsáveis pela manutenção do epitélio urotelial, através dos processos de proliferação e diferenciação. A membrana basal é responsável pela sustentação e conexão com os tecidos mais inferiores (BIRDER; ANDERSON, 2013).

Como mostrado na Figura 14, os micronúcleos que são observados em células esfoliativas do epitélio urotelial não são induzidos quando as células estão na superfície do epitélio, e sim quando estão na linha basal. Em geral são necessários de 7 a 16 dias para que elas descolorem-se até a superfície e comecem a esfoliar, ou seja, o dano genético sofrido recentemente nas células basais pode ser refletido sob a forma de micronúcleo nas células esfoliativas mais superficiais. Porém, a frequência de micronúcleos será reduzida, uma vez que apenas uma das células-filhas herdará o micronúcleo (FONTANA et al., 2001; FENECH et al., 1999a). Uma vez esfoliadas essas células são encontradas na urina e estão disponíveis para análise do micronúcleo.

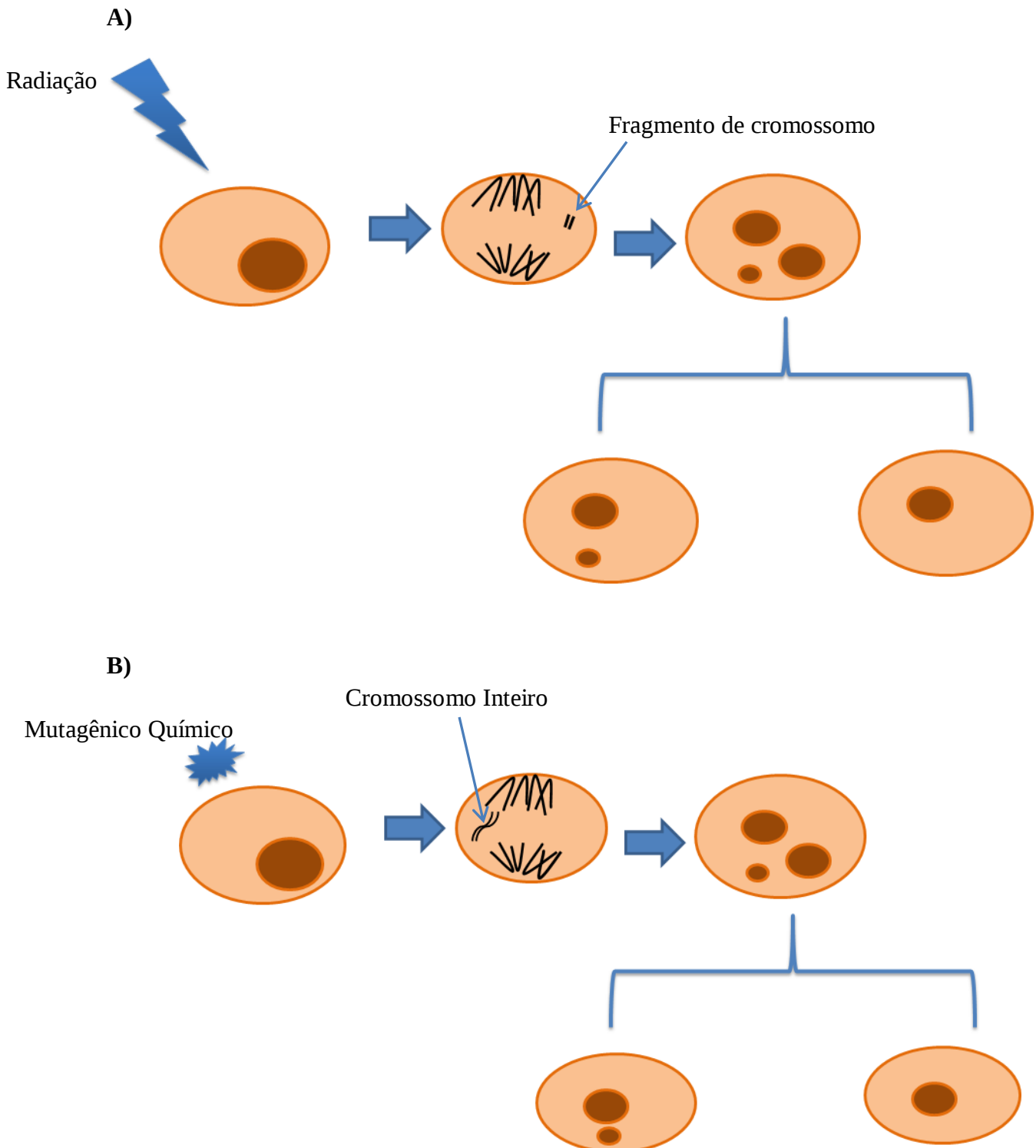
2.3.3 Micronúcleos

O micronúcleo (MN) é uma estrutura separada do núcleo principal de uma célula, resultante da não inclusão do cromossomo ou parte dele no núcleo principal da célula durante no processo de divisão celular, ou seja, essa estrutura é um subproduto das aberrações cromossômicas instáveis, que por sua vez são caracterizadas pela quebra ou perda de cromossomos inteiros. Sua formação completa-se quando o envoltório nuclear é restituído ao redor dos cromossomos das células-filhas (FENECH, et al., 2000; FERNANDES, 2005).

Em geral a ocorrência de micronúcleos tem relação com o dano cromossômico causado pela exposição a agentes mutagênicos, defeito no mecanismo mitótico ou falha no reparo do DNA (PINTO et al., 2010; HOLLAND et al., 2008; BONASSI et al., 2003; FENECH et al., 1999a).

Se o dano genético envolvendo a quebra da fita da molécula de DNA origina fragmentos, o agente causador do evento é dito clastogênico. As radiações ionizantes são conhecidas por atuarem na quebra cromossômica, formando tais fragmentos acêntricos, sendo, portanto desprovidos de região centromérica, induzindo assim os micronúcleos. Já quando um agente (químico) atua causando a perda de cromossomos inteiros é considerado aneugênico. Este mecanismo produz micronúcleos contendo o cromossomo com região centromérica distinta (PINTO et al., 2010; THIERENS; VRAL, 2009). A Figura 15 mostra um dos modelos de processo de formação do micronúcleo.

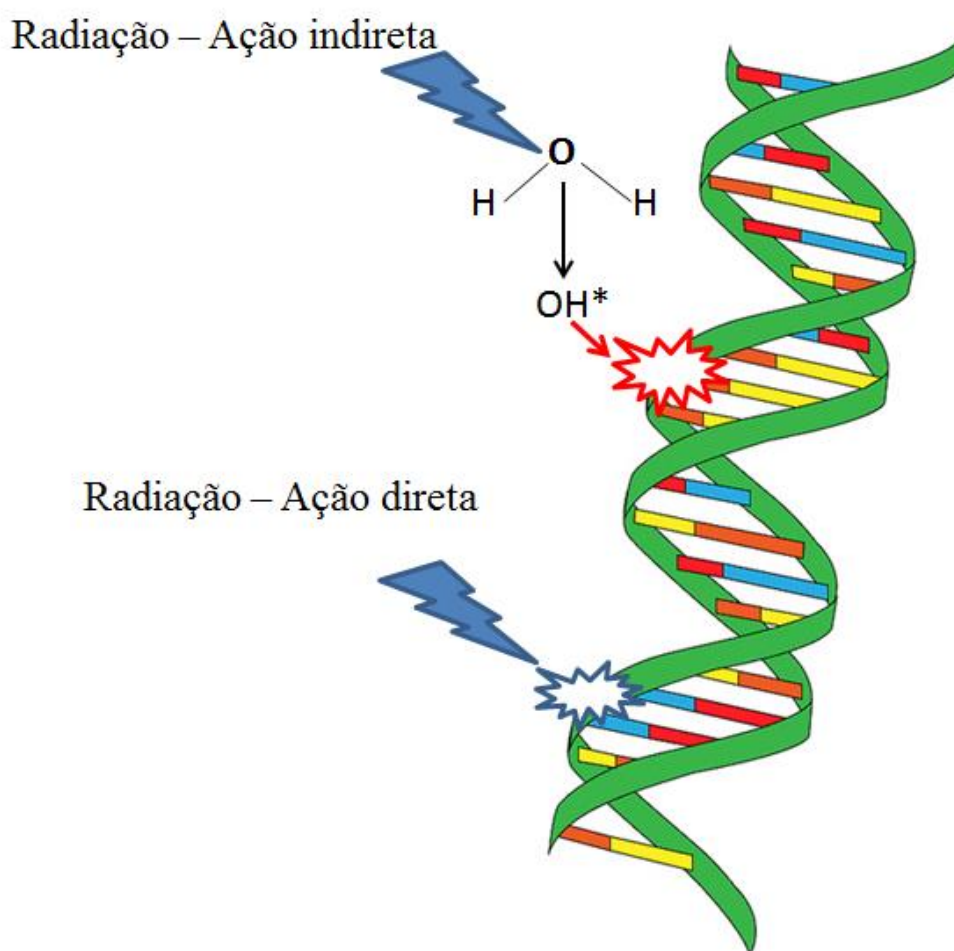
Figura 15. Representação esquemática dos processos de formação do micronúcleo por agente clastogênico (A) e aneugênico (B).



Legenda. (A) Ação da radiação ionizante na célula basal indiferenciada, gerando um fragmento de cromossomo. (B) Ação de um agente genotóxico na célula basal indiferenciada, gerando uma perda de um cromossomo inteiro.

Tratando-se de radiação, esse agente físico pode atuar de duas formas: (a) diretamente, pela deposição da energia no DNA, ocasionando dano nessa molécula; (b) indiretamente, através da atuação na molécula de água, a qual sofrerá o processo de radiólise, resultando em produtos genotóxicos ($\text{HO}^\bullet$ e $\text{H}^\bullet$) que também causam dano ao DNA (YOKOYA et al., 2008; FERNANDES, 2005; DUNN; CURTIS, 1985). A Figura 16 ilustra as formas de atuação da radiação por esses dois processos processo.

Figura 16. Representação esquemática da ação direta e indireta da radiação ionizante na molécula de DNA

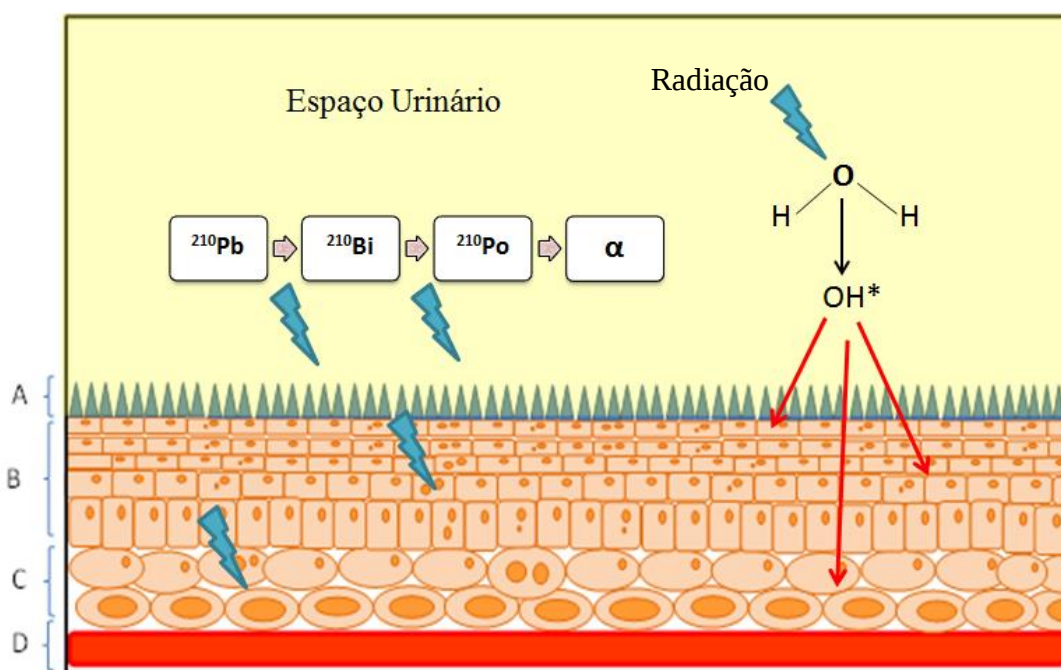


Fonte: Modificado de Microsoft Office 2010 copyright®

Legenda. Produto da radiólise da água danificando o DNA através da ação indireta da radiação. Ação direta da radiação ionizante diretamente na molécula gerando a quebra da fita de DNA.

A consequência desse processo direta e indiretamente é o surgimento de mutações que podem levar à formação das aberrações cromossômicas instáveis como fragmentos de cromossomos acêntricos, cromossomos em anel ou dicêntricos (FERNANDES, 2005). A Figura 17 representa uma hipótese da contribuição da cadeia de decaimento do ^{210}Pb para o dano genético em células do uretério.

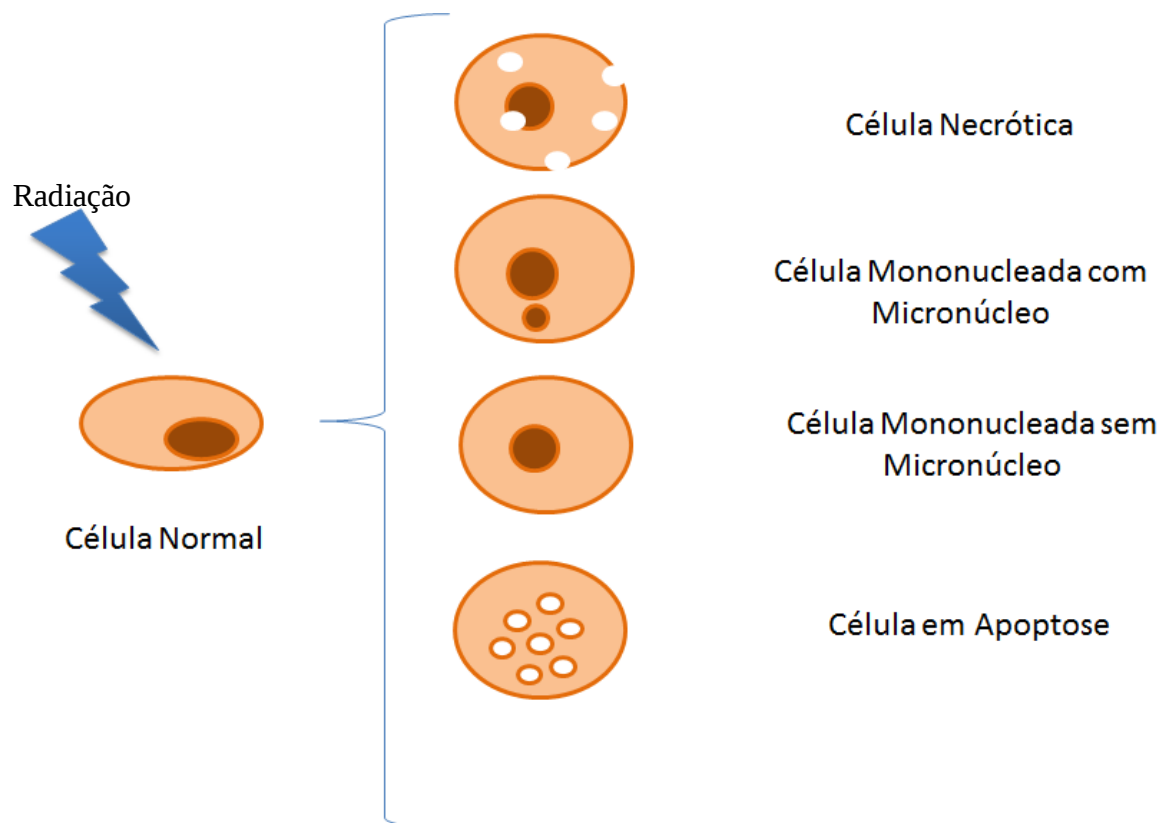
Figura 17. Hipótese de contribuição da cadeia de decaimento do ^{210}Pb para o dano genético.



Legenda. (A) Camada de Glicosaminaglicano; (B) Células uroteliais; (C) Células basais; (D) Membrana basal.

Fenech e col. (1999b) enfatizam que uma célula que sofreu dano no DNA pode ativar o mecanismo do reparo ou expressar o dano sofrido não reparado através da apresentação do micronúcleo e uma terceira situação é o início de dois processos distintos, apoptose (morte programada da célula) ou necrose celular, conforme a Figura 18. Nesse caso, a combinação do efeito genotóxicos (presença de micronúcleo) pode ser complementada pela avaliação do efeito citotóxico (apoptose e necrose).

Figura 18. Representação esquemática do efeito citotóxico e genotóxicos após a ação da radiação ionizante.



Legenda. As situações acima refletem os possíveis caminhos de uma célula após a ação da radiação ionizante, os possíveis caminhos da célula irradiada.

O teste do MN é considerado método de avaliação para biomonitoração da exposição às radiações ionizantes e agentes químicos clastogênicos, principalmente em células binucleadas. Contudo a avaliação de células expostas a agentes aneugênicos na fase G_0 , momento em que a célula não está em processo de divisão, tem pouca utilidade. Nesse caso, para estudar a ação de agentes clastogênicos *in vivo* a avaliação de células mononucleadas é mais indicada. Isso se deve ao fato que agentes não clastogênicos, na fase G_0 do ciclo celular induzem adutos, mas não quebras no DNA (KIRSH-VOLDERS; FENECH 2001).

O micronúcleo foi estudado exhaustivamente em células esfoliativas mononucleadas (NERSESYAN et al., 2014; FORTIN et al., 2010; THOMAS et al., 2009; BURGAZ et al.,

1995; BAGWE; BHISEY, 1993; ROSIN, 1992; STICH et al., 1982). No entanto, em estudos *in vitro* usando linfócitos, os micronúcleos são contabilizados em células binucleadas para fins de correlação do efeito causado por agentes clastogênicos ou aneugênicos (BONASSI et al., 2003; FENECH, 2000; FENECH et al., 1999a). Kirsh-Volders e Fenech (2001) ressaltam que os micronúcleos em células mononucleadas devem indicar o dano cromossômico ocorrido *in vivo* e podem complementar os ensaios *in vitro*.

Por apresentar associações positivas com ação de agentes causadores de dano no DNA, este teste vem ganhando maior aceitação e empregabilidade na monitoração das exposições ambientais e ocupacionais (BONASSI et al., 2003; FENECH et al., 1999a; HOLLAND et al., 2008).

Fernandes (2005) e Barbosa (2003) apresentaram o teste do micronúcleo em sangue periférico como uma técnica viável e rápida para indicação do dano causado pelas exposições às radiações ionizantes. Este bioindicador pode também promover uma marcação do estágio inicial da carcinogênese (BONASSI et al., 2003).

Um aspecto relevante acerca da presença dos micronúcleos é a relação com os hábitos de vida dos indivíduos, tais como o consumo de cigarro, álcool e deficiência de vitamina na dieta, os quais também podem contribuir para os danos genéticos (FENECH et al., 1999a). A relação entre a frequência de micronúcleos e o hábito de fumar tem sido alvo de diversos estudos. Na literatura é possível encontrar uma variedade de resultados que relacionam o hábito de fumar e a frequência de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico de fumantes. Um exemplo disso são os resultados apresentados em um dos estudos do projeto HUMN (BONASSI et al., 2003) em que se percebe um aumento discreto na frequência de micronúcleos em linfócitos de fumantes em relação aos não fumantes. Entretanto, este trabalho reportou aumento significativo de micronúcleo quando associado com a exposição ocupacional a agentes genotóxicos em fumantes que consomem menos de 30 cigarros por dia. Bonassi e col. (2003) explicam que a exposição ocupacional a agentes genotóxicos podem mascarar os efeitos em consumidores de menos de 20 cigarros por dia.

Em seres humanos, os micronúcleos podem ser facilmente avaliados em diversos tipos de células, tais como, eritrócitos, linfócitos e células esfoliativas epiteliais (HOLLAND et., 2008).

O estudo da frequência de micronúcleos em linfócitos é uma prática corriqueira em bioanálise, mas pode gerar algum desconforto para o indivíduo durante a coleta do material biológico. Neste caso, uma alternativa é a utilização células epiteliais esfoliativas, que

representa uma técnica de menor incômodo para os indivíduos avaliados, pois a coleta é minimamente invasiva e demonstra ser adequada para monitoração tanto populacional quanto individual (FENECH et al., 2007; BONASSI et al., 2009; HOLLAND et al., 2008).

O uso do teste do micronúcleo, como indicador do dano genético, em células esfoliativas, foi inicialmente proposto por Stich e col. (1982) e tem sido utilizado desde então para monitoração humana.

A frequência de micronúcleos em células da mucosa bucal foi utilizada para monitorar a exposição de trabalhadores ao tabaco em uma fábrica de cigarro na Índia. Neste caso, os trabalhadores expostos apresentaram elevada frequência de micronúcleos no epitélio bucal (BAGWE; BHISEY, 1993). Em pesquisa conduzida por Suhas e col. (2004) foram observadas diferenças significativas na frequência de micronúcleos de fumantes e não fumantes quando comparadas diferentes regiões da mucosa oral. Os autores dessa pesquisa chamam a atenção para maior frequência de micronúcleos relacionada com hábito de fumar, principalmente para região da mucosa bucal e palato.

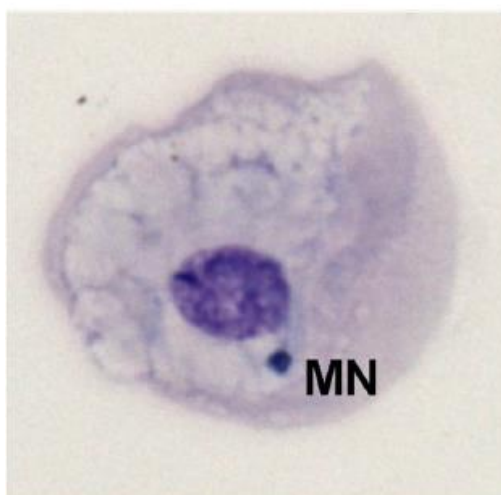
Estudo conduzido por Martins e Filho (2003) alertou para os riscos do tabagismo. Os autores demonstraram a importância da utilização do teste do micronúcleo na biomonitoração dos fumantes. No trabalho ficou evidente que as células da mucosa bucal de indivíduos fumantes apresentaram uma maior frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares em relação ao grupo controle. Essas considerações corroboram com a revisão realizada por Holland e col. (2008) onde foi enfatizado que o tabagismo crônico através do consumo de cigarro, tabaco mascado ou inalado na forma de rapé apresentam relação significativa com patologias orais.

Estas informações são relevantes, pois as células da mucosa bucal são a primeira barreira contra a ingestão e inalação de agentes carcinogênicos. Esta barreira natural pode metabolizar fração desses agentes, resultando em produtos reativos (HOLLAND et al., 2008). Aproximadamente 90% dos cânceres humanos têm origem em células epiteliais e os micronúcleos nessas células esfoliativas podem marcar o estágio carcinogênico inicial no tecido alvo (THOMAS et al., 2009; ROSIN, 1992).

O micronúcleo também pode ser encontrado em células uroteliais. Trabalhos realizados na Índia, Chile e Estados Unidos indicaram um aumento na frequência de micronúcleo em células esfoliativas presentes na urina da população exposta ao arsênico através do consumo de água contaminada (BASU et al., 2002; BIGGS et al., 1997; WARNER

et al., 1994). A Figura 19 mostra a presença de um micronúcleo em uma célula encontrada na urina.

Figura 19. Morfologia de uma célula epitelial escamosa derivada da urina contendo um micronúcleo.



Fonte: NERSESYAN et al., 2014

Em fumantes, trabalhos correlacionaram à frequência de micronúcleos em células esfoliativas uroteliais e o consumo de cigarro (BURGAZ et al., 1995; REALI et al., 1987). De fato, as células esfoliativas da bexiga são mais sensíveis ao fumo do tabaco se comparadas com as células esfoliativas da mucosa bucal (MAJER et al., 2001; BURGAZ et al., 1995). A sensibilidade a estes efeitos tóxicos ainda é perceptível em indivíduos que pararam de fumar a mais de 2 anos. Isso pode ser observado no trabalho de Lehucher-Michel e col. (1996) onde os resultados indicaram que o grupo de ex-fumantes e de fumantes ativos apresentaram os mesmos efeitos genotóxicos em células esfoliativas da bexiga, refletindo o dano ocorrido em células do tecido basal.

Cid e col. (1991) utilizaram o micronúcleo em células esfoliativas uroteliais como bioindicador eficiente na monitoração de trabalhadores da indústria de couro, na Argentina. Nesta pesquisa o grupo dos indivíduos fumantes e expostos a agentes químicos apresentaram maior frequência de micronúcleos em relação ao grupo controle.

Devido à facilidade de realização, o teste do micronúcleo tem sido amplamente utilizado em programas de biomonitoramento, e é considerada uma valiosa ferramenta para avaliar exposições de organismos a substâncias genotóxicas. O teste do micronúcleo é um

importante sinalizador precoce de danos com consequências irreversíveis (FREIRE, 2008; FENECH et al., 1999a; NORPPA; FALCK, 2003).

São vantagens do teste do micronúcleo (STICH et al., 1982):

- Demonstrar os danos em nível citogenético que ocorreram na população de células em constante divisão na camada basal;
- Monitorar indivíduos com risco em potencial para câncer como fumantes e alcoólatras;
- Constitui-se como método de fácil execução, permitindo a avaliação em níveis epidemiológicos.
- Os resultados obtidos podem ser comparados com outras técnicas consagradas na literatura científica, por exemplo, cultura *in vitro* de linfócitos.
- Baixo Custo.

2.3.3.1 Técnicas de coleta do Micronúcleo em Urina

Para o estudo com células esfoliativas em urina, o cuidado com a coleta e o volume de urina coletados devem ser observados. Fortin e col. (2010) chamam a atenção para assepsia prévia da região genital, bem como para o volume, uma vez que na urina de indivíduos do sexo feminino apresentam maior quantitativo de células, necessitando de um volume menor, por volta de 100 ml. Já os indivíduos do sexo masculino necessitam de um volume maior, pois há poucas células na amostra, e neste caso, a literatura científica reporta entre 200 e 500 ml de urina devem ser coletados (FORTIN et al., 2010; BASU et al., 2004; FONTANA, et al., 2001).

2.3.3.2 Técnicas de coloração

A maior variação na metodologia do teste do micronúcleo encontrado nos textos científicos está no tipo de corante utilizado para identificação do micronúcleo. A técnica de Feulgen é a mais comumente empregada (aproximadamente, 56%) nos laboratórios que realizam o teste do micronúcleo (TOLBERT et al., 1992; THOMAS et al., 2009; BONASSI et al., 2009).

A primeira etapa dessa técnica é a imersão das lâminas, contendo as células da mucosa bucal, em HCl a 1 M em temperatura ambiente por 1 minuto, em seguida, uma nova imersão

das lâminas é realizada em HCl a 1 M a 60 °C por 10 minutos e, novamente, em HCl a 1 M a temperatura ambiente por 1 minuto. As imersões realizadas na solução de HCl são responsáveis pela hidrólise das bases, sendo uma das fases essenciais para coloração na técnica de Feulgen. A hidrólise realizada tem o objetivo de separar as bases púricas do açúcar da desoxirribose, expondo os grupos aldeídos livres, deixando a cadeia do DNA intacta e apurínica (CHIECO; DERENZINE, 1999).

Na etapa seguinte à hidrólise, as lâminas são imersas no reagente de Schiff por 1 hora (TOLBERT et al., 1992). Nesta etapa, as regiões específicas das células com os grupamentos aldeídos livres na molécula do DNA apurínico associam-se a Pararosanilina, um corante não metilado na cor magenta dissolvido no reagente de Schiff (CHIECO; DERENZINE, 1999). A ligação entre a Pararosanilina e a molécula do DNA é considerada específica, impedindo dessa forma as ações dos interferentes inespecíficos no resultado.

Este tipo de coloração é a mais indicada quando o objetivo é quantificar o DNA devido à característica desse corante possuir alto grau de especificidade para marcação da molécula de DNA (CHIECO; DERENZINE, 1999). Além disso, na coloração por Feulgen Fast Green, o citoplasma apresenta uma coloração transparente e clara que permite uma identificação mais adequada do micronúcleo em microscópio óptico comum (HOLLAND et al., 2008; THOMAS et al., 2009).

Outra técnica de coloração bastante utilizada na identificação de micronúcleos é a coloração de May-Grünwald/Giemsa (MGG), como alternativa mais barata em relação à Técnica de Feulgen. Na técnica da coloração com May-Grünwald/Giemsa (MGG), as lâminas contendo o esfregaço com células da mucosa bucal são secas ao ar, em seguida coradas com May-Grünwald por 5 minutos. Após esta etapa as lâminas são coradas com Giemsa por 15 minutos e posteriormente lavadas em água corrente (PALASKARA; JINDAL, 2010). Esta técnica permite uma melhor visualização do núcleo da célula e é amplamente utilizada em células sanguíneas, contudo não apresenta marcação específica para o DNA (THOMAS et al., 2009; NERSESYAN et al., 2006). Segundo Nersesyan e col. (2006), a maior limitação da MGG é a falta de especificidade para marcação de DNA, o que possibilita maior ocorrência de resultados falso-positivos. Achados comuns em células podem ser interpretados equivocadamente como micronúcleos. Estes autores enfatizam ainda que a avaliação de micronúcleos utilizando lâminas coradas com a técnica de MGG deve ser realizada com cautela e critério, no intuito de evitar resultados falso-positivos.

Um dos trabalhos mais recentes (FORTIN et al., 2010) na padronização do teste do micronúcleo em células presentes na urina comparou o desempenho entre o Giemsa e a Técnica Papanicolau para distinguir células escamosas de células uroteliais. O sucesso dessas técnicas foi possível devido à correta higienização da região genital, separação, lavagem com NaCl a 0,9% e fixação das células esfoliativas.

Além de Fortin e col. (2010) outros trabalhos como os de Lehucher-Michel e col. (1996), Cid e col. (1991), Jen e col. (2002) e Gandhi e col. (2003) obtiveram sucesso utilizando o Giemsa para estudar micronúcleo em células esfoliativas presentes na urina.

No levantamento realizado por Nersesyan e col. (2014) sobre os principais protocolos utilizados para estudar células esfoliativas presentes na urina, o corante Giemsa foi o mais utilizado se comparado a coloração com Papanicolau.

A coloração com Papanicolau é uma alternativa em relação às técnicas citadas acima para identificação de micronúcleos. Apesar de ser uma técnica menos específica em relação aos corantes citados anteriormente, tem sido utilizada em alguns trabalhos. No trabalho de Palaskara e Jindal (2010) os resultados da comparação deste corante com o MGG indicou melhor visualização dos micronúcleos em células da mucosa bucal de fumantes e consumidores de tabaco sem fumaça. Os autores justificam esse resultado pela utilização de álcool na fixação das células, o que permitiu um fundo com maior clareza quando comparadas com lâminas secas ao ar e coradas com MGG. Esta justificativa está em comum acordo com as colocações de Dindgire e col. (2012) os quais enfatizam que o álcool etílico usado na fixação das células na técnica tem efeito bactericida e mantém a integridade da célula.

Marcadores fluorescentes também podem ser empregados para visualização do micronúcleo, contudo esta técnica tem menor frequência (aproximadamente, 13%) de utilização entre os laboratórios que fazem parte projeto HUMN (BONASSI et al., 2009). Esta técnica apresenta maior custo devido ao uso de anticorpos e de um microscópio de fluorescência.

2.3.3.3 Critérios para identificação do Micronúcleo

Um importante fator para o sucesso da técnica do micronúcleo, além do tipo de coloração utilizada, são os critérios de identificação. Os critérios desenvolvidos por Tolbert e col. (1992), para inclusão de células que serão contabilizadas na identificação de micronúcleos, tem sido amplamente utilizados (THOMAS, et al., 2009; HOLLAND et al.,

2008; PALASKARA;JINDAL, 2010; MACHADO-SANTELLI et al., 1994; MARTINO-ROTH, 2002).

Bonassi e col. (2009) realizaram um levantamento em diversos laboratórios no mundo, que publicaram artigos envolvendo micronúcleo em células esfoliativas, no intuito de verificar o atual quadro das principais metodologias empregadas. Neste levantamento 50% de um total de 46 laboratórios utilizam os critérios descritos por Tolbert e col. (1992).

No protocolo estabelecido por Tolbert e col. (1992) os parâmetros propostos a serem observados são: (a) citoplasma intacto e posição da célula relativamente plana na lâmina; (b) pouca ou nenhuma sobreposição com as células adjacentes; (c) poucos ou nenhuns detritos e (d) núcleo normal e intacto, perímetro nuclear distinto. Os critérios sugeridos para identificação dos micronúcleos são: (a) perímetro redondo e suave sugerindo presença de membrana; (b) menos de um terço do diâmetro do núcleo associado, mas suficientemente grande para que sejam diferenciadas forma e cor; (c) Feulgen positivo, ou seja, rosa no campo claro iluminado; (d) mesma intensidade de coloração em relação ao núcleo; (e) textura similar a do núcleo; (f) mesmo plano focal do núcleo e (g) ausência de sobreposição ou ponte internucleoplásmica com o núcleo.

Com este protocolo Tolbert e col. (1992) obtiveram sucesso em identificar excesso de micronúcleos em pacientes submetidos à radioterapia. Nesta pesquisa ficou evidenciada a distinção entre outras anomalias nucleares e o micronúcleo.

Para avaliação dos micronúcleos em urina Fortin e col. (2010) utilizaram critérios modificados estabelecidos por Fenech (2007) e Reali e col. (1987). Estes critérios incluem características como diâmetro do micronúcleo, cor e textura semelhantes ao núcleo, ausência de sobreposição de células e boa visualização celular.

Apesar dos protocolos para a aplicação do teste do micronúcleo estarem bem estabelecidos para a avaliação, em níveis epidemiológicos, da exposição a agentes causadores de dano do DNA, Carrard e col. (2007) ressaltam a importância do teste do micronúcleo associado a outros biomarcadores para corroborar com o indicativo de efeitos que podem progredir para carcinoma.

Neste caso, trabalhos focados em alinhar a frequência do micronúcleo em células esfoliativas e o ^{210}Pb presente na urina de fumantes são raros nos bancos de dados da literatura científica, havendo necessidade, portanto, de estudos mais aprofundados, uma vez que este radionuclídeo é encontrado em teores consideráveis e o consumo excessivo do

cigarro é uma preocupação em saúde pública devido aos elevados índices de câncer associados ao tabagismo.

2.4 Determinação do ^{210}Pb

Godoy e col.. (1994) apresentaram um método analítico sequencial que permite a determinação dos ^{238}U , ^{234}U , ^{232}Th , ^{228}Th , ^{228}Ra , ^{226}Ra e ^{210}Pb em amostras ambientais, sendo posteriormente adaptado para amostras biológicas como urina e fezes.

A metodologia apresenta por Godoy e col.. (1994) surge como uma alternativa frente aos métodos para determinação do ^{210}Pb . Dentre esses métodos destacam-se a espectrometria gama, a espectrometria alfa e o método de contagem α e β total. Uma das principais vantagens da espectrometria gama é a quantidade de informações obtidas em uma única análise. Além disso, é uma técnica de análise rápida, multielementar e não destrutiva. A principal característica do HPGe é baseada na sua alta resolução em determinar a energia da radiação gama, proporcionando assim, uma menor incerteza na medida, no entanto possui a limitação de que devido à baixa energia da emissão dos raios gama emitidos (46,5 keV), situada na região da alta influência do efeito Compton e a pequena probabilidade de emissão (4%), o que provoca a necessidade de grande volume da amostra, ocasionando dificuldades na medida devido a auto-absorção e baixa eficiência de contagem (SANTOS-JÚNIOR et al., 2009).

Trabalhos como os de Santos e col. (1994), Santos e col. (1995), Knezevic e col. (1998), e col. (2010), Naumann e col. (1998) determinaram ^{210}Pb e ^{210}Pb em urina por espectrometria alfa. Esta técnica é muito sensível, mas limitado pelo tempo necessário para o estabelecimento do equilíbrio, superior a 6 meses (LAURIA et al., 2003). A literatura científica especializada é muito carente sobre abordagens dos níveis de ^{210}Pb em amostras de urina humana.

2.4.1 Contador proporcional alfa beta

O contador proporcional é um tipo de detector gasoso que foi introduzido em 1948 por Samuel Curran (apud KNOLL, 1999). Quando a partícula penetra numa câmara repleta de gás produz elétrons livres e íons positivos, os quais imediatamente começam a mover-se no sentido dos elétrons de sinais opostos. Ao serem coletados pelos eletrodos provocam uma pequena corrente no circuito externo, que pode ser detectada eletronicamente pela variação da

voltagem. Em média qualquer tipo de partícula carregada, e com qualquer energia, interagindo em qualquer gás, perde aproximadamente, 30 eV de energia cinética para cada par de elétron-íon produzido (KNOLL, 1999; LAURIA et al., 2003).

O contador é normalmente calibrado em eficiência usando fontes específicas (normalmente Am-241 para alfa e K-40 para emissores beta). Na interpretação dos resultados deve-se supor que a eficiência de contagem é a mesma para todos os radionuclídeos com o mesmo tipo de decaimento. No entanto, a eficiência varia bastante com a energia das partículas beta. Em particular, os contadores proporcionais não detectam as partículas betas de energia inferior a 0,3 MeV (KNOLL, 1999; LAURIA et al., 2003). Contudo, ainda segundo Lauria e col. (2003) devido à alta-absorção, não se recomenda que os métodos diretos de medição alfa e beta total sejam utilizados para analisar amostras de solos, alimentos e pastos, porém o método torna-se preciso quando a amostra é submetida à separação radioquímica. A eficiência e curvas de auto absorção são obtidas em função de radionuclídeos específicos.

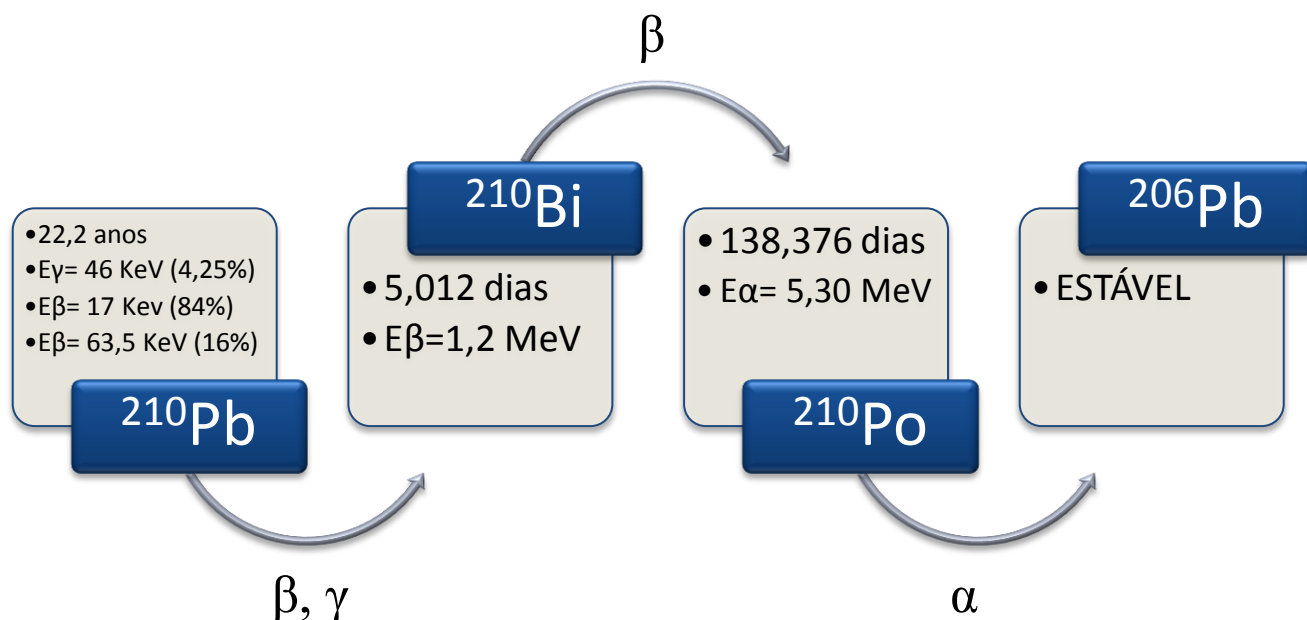
O método de contagem α e β (contador proporcional) total apresenta a vantagem de medir com rapidez a concentração de radionuclídeos que emitem alfa com energias acima de 3 MeV e beta de energia máxima de 0,3 MeV. Este método é comumente empregado para determinação de teores da ordem de 37 mBq de ^{210}Pb . Diversas matrizes podem ser avaliadas como águas, sedimentos, materiais biológicos, cigarros, entre outros. Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas nesta linha sendo que o Chumbo é recuperado sob a forma de PbCrO_4 (MINGOTE, 2006). Um dos pontos críticos, ressaltados por Mingote (2006), é a falta de especificidade, pois a determinação dos radionuclídeos é feita pela medida da atividade de um dos seus filhos, após período de decaimento radioativo adequado. A determinação de ^{210}Pb realizada por Julião et al., (2003), em habitantes de Buena e Rio de Janeiro, deu-se através da contagem beta do ^{210}Bi , filho do ^{210}Pb .

Os métodos para determinação de ^{210}Pb se baseiam nas propriedades radiológicas do ^{210}Pb e seus filhos. A Figura 20 mostra a sequência de decaimento do ^{210}Pb . Mingote (2006) enfatiza que o ^{210}Pb ($T_{1/2} = 22,2$ anos) emite raios γ [$E_\gamma = 46,5$ keV (4,25 %)] e partículas beta de baixa energia [$E_{\beta\text{max}} = 17,0$ keV (84 %); 63,5 keV (16 %)], podendo assim ser medido diretamente por espectrometria γ ou contagem em cintilador líquido.

Contudo estes métodos de contagem direta não alcançam alta sensibilidade, isto é, abaixo de 37 mBq.L^{-1} , devido às incertezas associadas com a medida do fotopico de 46,5 keV de baixo percentual de abundância e às altas taxas de radiação de fundo associadas. A

determinação direta de baixos teores de ^{210}Pb é praticamente impossível sem uma pré-concentração da amostra (MINGOTE, 2006).

Figura 20. Cadeia de decaimento do ^{210}Pb



Legenda. A cadeia de decaimento do ^{210}Pb com suas respectivas emissões e energias, onde a partícula beta é a mais preponderante. O Bismuto-210 é o produto do decaimento do Chumbo-210, seguindo do Polônio-210 que emite uma partícula Alfa. O produto final é o Chumbo estável.

Uma técnica de separação radioquímica bastante utilizada é a troca iônica (JIA; TORRI, 2007; SILVA et al., 2009). A separação radioquímica por troca iônica é na verdade a transferência de íons específicos de uma solução pouco concentrada para outra, mais concentrada, por meio do fenômeno de uma resina trocar seus íons fracamente ligados por outros da solução, quando a resina e a solução estão em contato (HECK, 2010). Pode ser considerado um processo de separação, concentração e análise de materiais que são seletivamente absorvidos em resinas trocadoras de íons (MENDHAM et al., 2002).

As resinas trocadoras de íons (Figura 21) apresentam a característica de serem praticamente insolúveis em água e em solventes orgânicos o que torna este método eficiente em análises químicas, outra vantagem é o fato de conterem íons ativos capazes da troca reversível com outros íons em solução, sem que ocorra mudança estrutural perceptível no material (MENDHAM et al., 2002).

Figura 21. Coluna de percolação contendo a resina trocadora de íons indicado pela seta vermelha



Fonte: Imagem obtida no Laboratório Radioecologia e Controle Ambiental – L@RCA/DEN – UFPE.

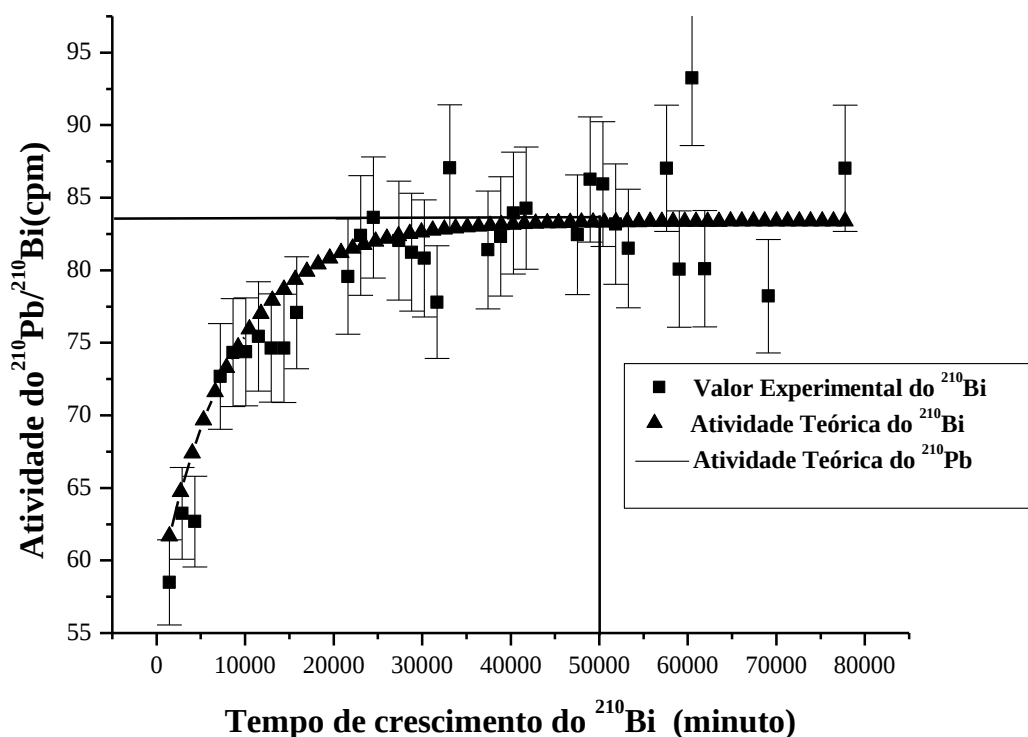
Essa técnica foi utilizada para determinação de ^{210}Pb em sedimentos (GODOY et al., 1998) e em forragem para o gado (SILVA et al., 2009) e em urina de habitantes de áreas de elevada radiação natural (COSTA-JÚNIOR, 2011).

Após pré-concentração do ^{210}Pb e um tempo de crescimento do ^{210}Bi (15-35 dias), a contagem beta total é realizada em um contador proporcional. O método apresenta alta sensibilidade, dependendo da eficiência de contagem (podendo chegar a 40 %) e com baixos valores de radiação de fundo (MINGOTE, 2006).

O método tem mostrado grande aplicabilidade por mensurar baixos níveis de concentração de ^{210}Pb na maioria das amostras biológicas e ambientais que foram estudadas (JIA; TORRI, 2007).

A resina trocadora de íons mostrou ser um procedimento eficaz na separação radioquímica do ^{210}Pb dos demais emissores beta em cinza de urina humana (COSTA-JÚNIOR et al., 2013a). A Figura 22 demonstra que o valor dos dados experimentais se aproxima do modelo matemático teórico e com isso o equilíbrio secular entre o ^{210}Pb e o ^{210}Bi foi alcançando em cerca de 35 dias (50.000 minutos após a eluição das amostras), caso houvesse interferência de outros radionuclídeos a curva para o valor experimental não se aproximaria do valor teórico. Assim, a análise através da resina trocadora de íons apresentou-se com um excelente método para quantificar ^{210}Pb em amostras de urina.

Figura 22. Tempo de crescimento do Bismuto-210 na amostra padrão



Fonte: COSTA-JÚNIOR et al., 2013a

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Características da pesquisa e Considerações éticas

Esta pesquisa, de caráter experimental, utilizou a urina como matriz para o estudo de células esfoliativas e dos teores de Chumbo-210 de indivíduos considerados saudáveis e de indivíduos com hábitos tabagistas. Foi submetida e aprovada sob o parecer nº 84066 (Anexo A) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco.

A população de estudo consistiu de homens e mulheres adultos. Os voluntários foram caracterizados nos seguintes grupos: fumantes e não fumantes. Cada grupo avaliado teve um total de 15 indivíduos, separados por idade e sexo.

Os voluntários doadores de urina foram convidados a participar da pesquisa através do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), e submetido a um questionário sobre os hábitos sociais (Apêndice B).

3.1.1 Critérios de seleção de voluntários

Para a seleção de voluntários foram estabelecidos os seguintes critérios:

➤ **Inclusão:**

- ✓ Não fazer uso de medicação;
- ✓ Ter mais de 18 anos;
- ✓ Não ter realizado qualquer procedimento de radioterapia ou quimioterapia recentemente;
- ✓ Não exercer atividade envolvendo o uso de radiações ionizantes;
- ✓ Não exercer atividades que envolvam o manuseio ou contato de qualquer outra natureza com agrotóxicos;
- ✓ Não ter se submetido a exames de radiodiagnóstico nos últimos 6 meses;
- ✓ Não possuir patologias diagnósticas na região da bexiga e trato urogenital, tais como câncer.

➤ **Exclusão**

- ✓ Recusa em colaborar com a participação na pesquisa;
- ✓ Situações que inviabilizem a condução padrão da investigação.

3.1.2 Características dos voluntários selecionados

Os voluntários foram caracterizados observando variáveis como: idade, sexo, residência e hábitos alimentares, elencados para auxiliar na compreensão dos resultados da concentração de Chumbo-210 e frequência de micronúcleo. Esse perfil foi obtido observando o questionário no Apêndice B. Na Tabela 6 pode-se observar que a idade dos indivíduos pesquisados variou de 20 a 65 anos, 30% estão na faixa etária entre 20 e 27 anos, seguidos de 23,3% entre 27 e 34 anos e 3,33% estão na faixa etária entre 41 e 48 anos.

A maioria dos voluntários pertence a Recife, 70% residem na capital pernambucana e 30% residem na região metropolitana. O sexo masculino foi o gênero predominante com 86,7% e 13,3% são do sexo feminino.

Tabela 6. Distribuição geral da idade e hábitos de vida dos voluntários.

Idade			Mora com fumante			Consome frutos do Mar			Consome Leite e derivados da Região		
Classes	N	%		N	%		N	%		N	%
20 -----27	9	30	Sim	7	23,3	Sim	22	73,3	Sim	27	90
27 -----34	7	23,3	Não	23	76,7	Não	8	26,7	Não	3	10
34 -----41	2	6,7									
41 -----48	1	3,3									
48 -----55	5	16,7									
55 -----62	3	10									
62 -----69	3	10									

M – Masculino

F - Feminino

3.1.2.1 Voluntários fumantes

O perfil dos voluntários fumantes pode ser observado na Tabela 7. O tempo de tabagismo com maior frequência foi entre 2 e 24 anos, com 67%, seguido de 33% dos voluntários que têm entre 24 e 46 anos de tabagismo. Em relação à quantidade, 53% consomem menos de 20 cigarros e 46% mais de 20, respectivamente.

Tabela 7. Distribuição do perfil dos fumantes em relação ao tempo e quantitativo de cigarros consumidos

Tempo de tabagismo			Cigarros consumidos por dia		
Classe (anos)	N	%	Classe	N	%
2 ----- 13	5	33,33	<20	8	53,3
13 ----- 24	5	33,33	>20	7	46,7
> 35	5	33,33			

3.2 Preparação das amostras de urina para determinação do ^{210}Pb

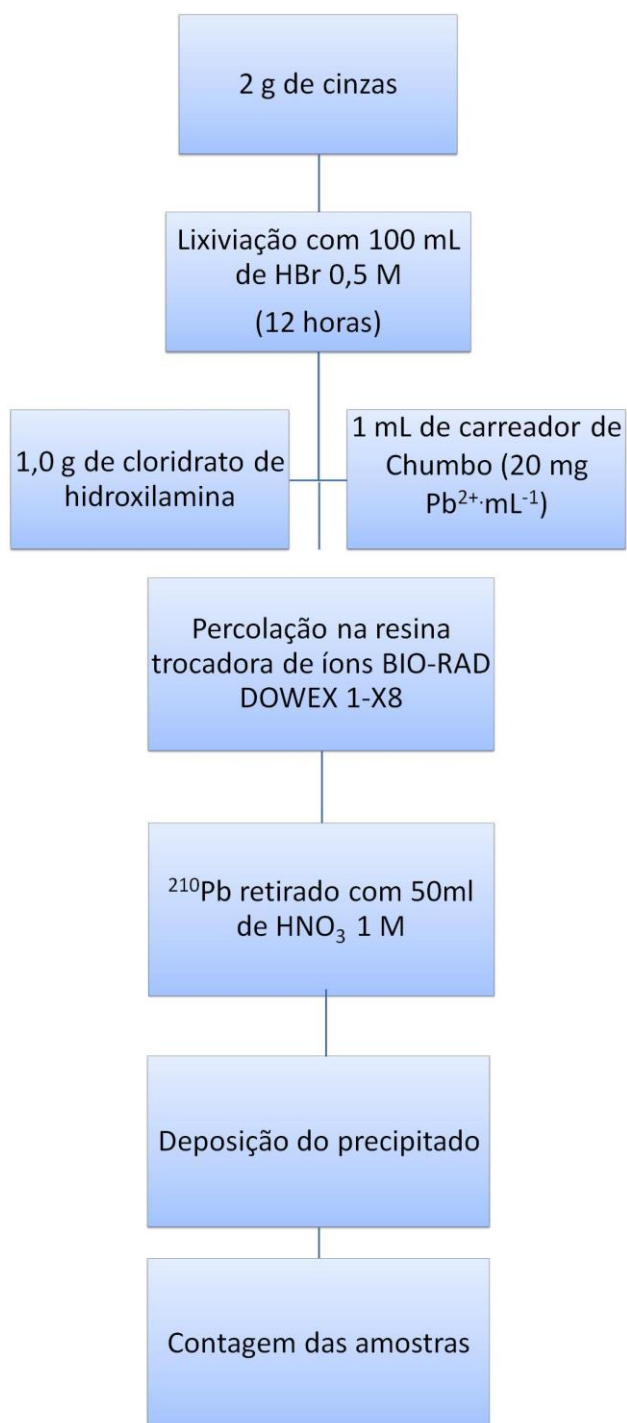
Todas as amostras foram obtidas seguindo os procedimentos adotados pelo Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD, 1983). Neste caso, os voluntários receberam recipientes de polietileno com capacidade para 2 litros, que foram previamente descontaminados.

As amostras foram coletadas durante 24 horas, para obtenção de no mínimo 1,5 litros de urina, para que se tenham amostras suficiente para análise de ^{210}Pb . Após, a coleta, foram adicionados 25 mL de formaldeído a 37%. Em seguida, os recipientes foram devidamente identificados com o nome do doador, data e local. As amostras foram armazenadas na geladeira até a sua análise.

3.3 Determinação de ^{210}Pb nas amostras de urina

Para a determinação do ^{210}Pb o volume de urina foi medido, transferido para cápsulas de porcelana, com capacidade para 750 mL, para secar a 70 °C. A matéria seca obtida foi levada ao forno, cuja temperatura foi aumentada gradativamente até atingir 450 °C, deixando-se, então, a essa temperatura por 48 horas, até a obtenção das cinzas. As cinzas foram utilizadas para determinar as concentrações de ^{210}Pb , a partir do método da troca iônica apresentado por Godoy e col. (1998), cujas etapas são descritas conforme o esquema da Figura 23.

Figura 23. Representação esquemática da análise do ^{210}Pb em urina



a) Lixiviação

Após os procedimentos de calcinação das amostras de urina, a massa total de cinzas foi aferida. Em seguida, foram retirados apenas 2 gramas, conforme o método estabelecido por Godoy et al., (1998), para serem lixiviados com 100 mL de HBr 0,5 M; 1,0 g de cloridrato de hidroxilamina; 1 mL de carreador de chumbo (20 mg Pb^{2+} .mL⁻¹) por um período de 12 horas.

b) Percolação na resina trocadora de íons

A solução foi colocada para percolar numa coluna contendo resina trocadora de íons do tipo BIO-RAD DOWEX 1-X8 50-100. Durante o procedimento, o ^{210}Pb ficou retido na resina enquanto a solução inicial é eluída. Após a eluição da solução o ^{210}Pb foi retirado da resina utilizando 50 mL de HNO_3 1M. A solução obtida foi aquecida até a secagem total. Foi adicionado 50 mL de água deionizada e o pH corrigido com acetato de amônio a 40% para estar entre 4,5 a 5,0.

Em seguida, a solução foi aquecida até a ebulição, onde 2 mL de Na_2CrO_4 a 25% é adicionado. Nesse caso, o ^{210}Pb foi precipitado na forma de cromato de chumbo (PbCrO_4).

c) Deposição do precipitado

A solução contendo o PbCrO_4 foi filtrada em papel quantitativo, em seguida, o precipitado foi submetido a secagem por 10 minutos (a 100 °C) e pesagem, a fim de se determinar o rendimento químico da recuperação do chumbo (100% = 31,4 mg PbCrO_4). Contudo, antes da realização da contagem β , para evitar a interferência dos emissores alfa nas leituras, o precipitado foi coberto com papel contato. Após essa etapa, foram necessários 35 dias para que o ^{210}Pb entrasse em equilíbrio radioativo com o ^{210}Bi . Após esse período, as contagens do ^{210}Pb foram realizadas num detector proporcional de baixo background. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

3.4 Procedimento para as análises pelo detector proporcional alfa beta

3.4.1 Sistema de medidas

Em qualquer tipo de análise envolvendo a técnica do detector proporcional alfa beta, faz-se necessário uma avaliação completa dos parâmetros relacionados ao sistema de medidas adotado no arranjo experimental. Para tanto, alguns parâmetros foram observados, para obter resposta do detector alfa beta na determinação do ^{210}Pb . Entre os parâmetros estudados estão: a curva de calibração para eficiência do detector e o limite de detecção. Estes parâmetros fornecem maior confiabilidade nos cálculos da concentração em atividade do ^{210}Pb em urina humana.

Para as medidas do ^{210}Pb em urina humana foi utilizado o sistema alfa beta do Departamento de Energia Nuclear, um detector proporcional de fluxo contínuo Tennelec S5E da CANBERRA (Figura 24). O tempo de contagem estabelecido foi de 500 minutos para cada amostra.

Figura 24. Detector Tennelec S5E da CANBERRA



Fonte: O autor

3.4.2 Curva de calibração do detector

Para determinação do ^{210}Pb , utilizando o detector proporcional alfa beta de fluxo contínuo, foi necessário a construção de uma curva de eficiência do detector. Para esta construção foram criadas amostras padrões para avaliar o método descrito por Godoy e col. (1998), em relação à determinação de ^{210}Pb nas amostras de urina. Para tanto, foram utilizados padrões líquidos certificados de ^{210}Pb fornecidos pelo Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD).

Os padrões líquidos foram diluídos em ácido nítrico 1 M, conforme recomendações do IRD. Inicialmente, foram preparadas amostras de urina conformes procedimentos apresentados no item 3.3 em triplicata. As atividades dos padrões de urina estiveram em uma faixa de 0,3295 a 2 Bq. A correção das atividades das fontes padrões foram calculadas pela equação de correção da atividade específica dos padrões (Equação 1). Nesta equação, A_{Eip} é a atividade a ser corrigida, com base na atividade inicial A_{Eip0} e na constante de decaimento radioativo, λ .

$$A_{\text{Eip}} = A_{\text{Eip0}} \times e^{-\lambda t} \quad (1)$$

A curva obtida a partir dos padrões corrigidos representa a eficiência do detector variável dependente das eficiências de contagens, determinadas em função das contagens por minuto e da atividade do ^{210}Pb (Bq). Essa curva foi o ponto de partida na determinação da eficiência de contagem do radionuclídeo em estudo, e foi utilizada para o cálculo da concentração em atividade do chumbo. A eficiência de contagem no platô beta (ϵ_{β}) pode ser determinada diretamente pela curva, pois ela é numericamente igual ao coeficiente angular da reta obtida.

3.4.3 Limite de detecção

O limite de detecção adotado para este trabalho foi definido pelos critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde do Brasil (ANVISA, 2003), em que o limite de detecção representa a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção (LD) foi

estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. O valor de LD é calculado pela Equação 2:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (2)$$

Onde: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é o coeficiente angular.

3.4.4 Cálculo da concentração em atividade do ²¹⁰Pb

A atividade de ²¹⁰Pb (A_{Pb-210}) em Bq/L foi determinada utilizando a Equação 3 (JIA; TORRI, 2007):

$$A_{^{210}Pb} = \frac{C_A - C_B}{R_Q \times Q \times \varepsilon_\beta \times (1 - e^{-\lambda_{Bi-210} \times t})} \quad (3)$$

Onde: C_A é a taxa de contagem da amostra (cpm); C_B é a taxa de contagem do background (cpm); R_Q é o rendimento químico (%) obtido pelo procedimento descrito no item 3.3; Q é a quantidade de amostra utilizada na análise [massa (kg) ou volume (L)]; ε_β é a eficiência de contagem beta (β) do bismuto; λ_{Bi} é a constante de decaimento do Bi-210 = 0,1383 d⁻¹; t é o Tempo transcorrido entre a precipitação do PbCrO₄ e a contagem (dias).

3.5 Avaliação do método de análise

A ausência de amostras padrões certificadas de urina despertou para a necessidade da criação para o procedimento de avaliação do método radioanalítico utilizado nesta pesquisa. Para tanto, foram criados padrões para avaliar o método descrito por Godoy e col. (1998), em relação à determinação de ²¹⁰Pb nas amostras de urina. Foram utilizados padrões líquidos certificados de ²¹⁰Pb fornecidos pelo Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD). Os padrões líquidos foram diluídos em ácido nítrico 1M, conformes recomendações do IRD. Inicialmente, foram criadas amostras padrões de urina em duplicatas. Nessas amostras foram adicionados 7,4 Bq de padrão de ²¹⁰Pb, sendo então, submetidas aos procedimentos

apresentados no item 3.3. Para atender as exigências da avaliação radioanalítica, foram adotados os procedimentos estabelecidos e extraídos diretamente do documento publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde do Brasil (ANVISA, 2003). Para a avaliação de métodos analíticos e bioanalíticos, os seguintes parâmetros foram realizados:

1) Linearidade. É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. O critério aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99.

2) Precisão. A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão (DPR) de um método analítico pode ser expressa com o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, de acordo com a Equação 4.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (4)$$

Onde: DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

3) Exatidão. A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos

intervalos de confiança. A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

A exatidão é calculada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a Equação 5.

$$Exatidão = \frac{Concentração\ média\ experimental}{Concentração\ teórica} \times 100 \quad (5)$$

3.6 Teste do micronúcleo em células esfoliativas na urina

Todo o procedimento para o teste do micronúcleo em células da esfoliativas presentes na urina foi implantado e realizado no Laboratório de Modelagem e Bidosimetria Aplicada, do Departamento de Energia Nuclear, da Universidade Federal de Pernambuco.

Para o teste do micronúcleo foi adotado o protocolo estabelecido por Fortin e col. (2010) que começa com as seguintes etapas:

3.6.1 Coleta de urina

Antes de iniciar a coleta os voluntários receberam as seguintes instruções:

- a) **Homem:** Lavar as mãos, em seguida lavar o pênis, retraindo todo o prepúcio, enxaguar e secar com gaze estéril ou toalha bem limpa.
- b) **Mulher:** No momento da higiene e da coleta, manter os grandes lábios afastados. Lavar a região genital de frente para trás, enxaguar e secar, usando gaze estéril ou toalha bem limpa. Não usar duas vezes a mesma gaze. Nunca inverter este movimento.

Todo o material foi coletado em recipiente estéril, devidamente rotulado com o nome completo do voluntário, data e local. A coleta foi iniciada observando os seguintes passos:

- a) Iniciar a micção. Desprezar o 1º jato da urina, sem interromper a micção. Voluntários do sexo masculinos coletaram entre 250 ml e 400 ml de urina, e 100 ml para voluntárias do sexo feminino.
- b) Após a coleta, o material foi levado ao laboratório no prazo máximo de 2 horas;

3.6.2 Isolamento de células esfoliativas em urina

Antes de iniciar os procedimentos, todos os tubos e recipientes de vidro foram autoclavados, bem como o NaCl a 0,9%. Uma segunda amostra de urina foi coletada de cada voluntário para a realização do teste do micronúcleo. O volume de urina dos voluntários masculinos foi maior para que haja obtenção de um maior número de células (FORTIN et al., 2010).

O procedimento foi iniciado com uma centrifugação das amostras, o volume das amostras de urina foi distribuído em tubos de 50 ml a 400 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado, restando apenas 10 a 15 ml de urina.

O líquido do tubo foi agitado e transferido para tubos cônicos de 15 ml. Uma segunda centrifugação foi realizada a 400 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado em recipiente contendo Hipoclorito de Sódio a 20%, deixando apenas 0,5 ml, para garantir a mínima perda de células. As células foram lavadas com 10 ml de NaCl a 0,9% e centrifugadas novamente a 400 x g por 10 minutos. Foi realizado uma segunda lavagem com NaCl a 0,9%.

Após a segunda lavagem, o sedimento final é ressuspensionado em 1,0 ml de NaCl a 0,9%. As amostras de indivíduos masculinos foram transferidas para micro tubos de 1,5 ml, em seguida, realizou-se uma centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto. A maior parte do sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspensionado em 0,2 ml de NaCl a 0,9% estéril.

3.6.3 Fixação e coloração das lâminas

Para a coloração das lâminas foi preparado o fixador utilizando os reagentes Metanol e Ácido Acético na proporção de 3:1, respectivamente.

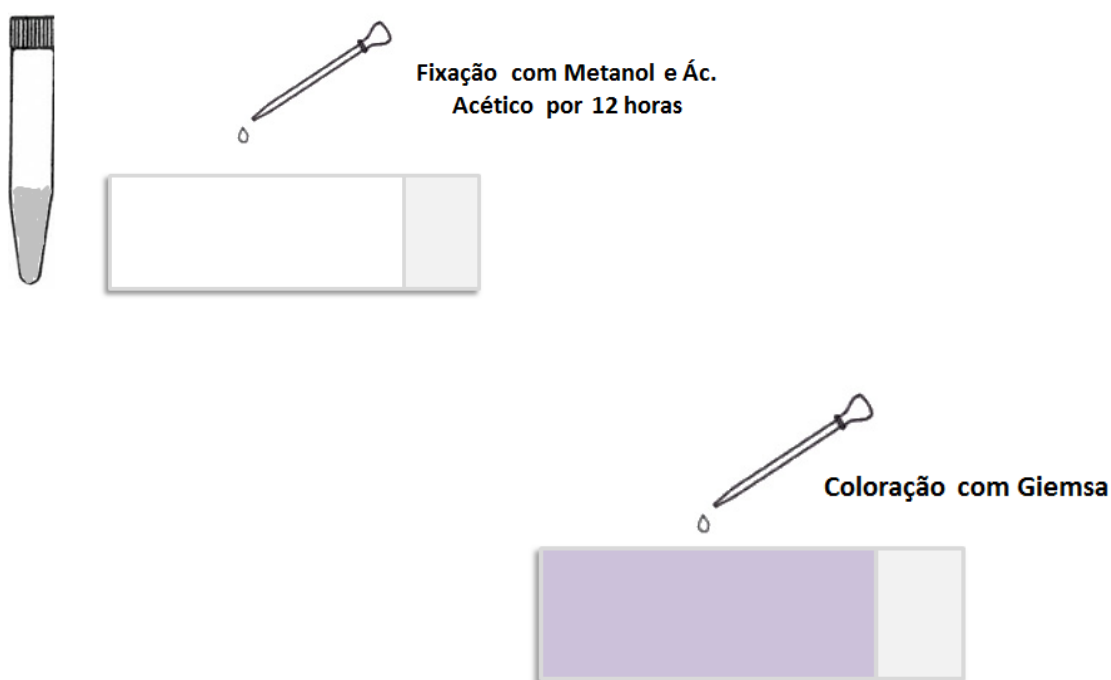
Os sedimentos foram ressuspensionados no fixador e fixados por duas vezes (10 ml para as amostras de voluntárias femininas; 1,5 ml para o sexo masculino) por 10 min. As células

foram espalhadas sobre as lâminas previamente limpas e secas em temperatura ambiente por 12 horas durante a noite (Figura 25).

As lâminas foram coradas com Giemsa a 5%, que foi preparado utilizando uma proveta de 50 ml, previamente limpa onde 30 ml de Solução tampão e 1,5 ml do Giemsa foram adicionados. Após esta etapa, as amostras foram homogeneizadas e em seguida transferidas para recipiente onde foram coradas. As lâminas foram imersas no corante, onde permaneceram por 1 minuto. Posteriormente foram cuidadosamente lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante e postas para secar em temperatura ambiente.

A escolha do corante Giemsa ocorreu devido à durabilidade da coloração das lâminas, o que permite análises posteriores.

Figura 25. Representação esquemática da fixação e coloração das lâminas



3.6.4 Análise das lâminas

Os critérios adotados para análise das lâminas foram aqueles utilizados por Fortin e col. (2010). As lâminas coradas foram analisadas em microscópio óptico comum, utilizando um aumento de 400 x.

Aproximadamente 1000 células foram contadas observando os seguintes critérios para a contagem, conforme as Figuras 26 e 27:

- a) Citoplasma intacto e posição relativamente plana na lâmina;
- b) Pouca ou nenhuma sobreposição com as células adjacentes
- c) Pouco ou nenhum detritos
- d) Núcleo normal e intacto, com o perímetro nuclear distinto.

Para a contabilização e confirmação dos micronúcleos, um aumento de 1000x foi realizado e os seguintes critérios devem foram observados:

- a) Perímetro redondo e regular, sugerindo presença de membrana;
- b) Menos de 1/3 do diâmetro do núcleo associado, mas suficientemente grande para que sejam diferenciados em forma e cor;
- c) Textura Similar ao núcleo;
- d) Mesmo plano focal do núcleo;
- e) Ausência de sobreposição ou ponte com o núcleo.

Foi utilizada a ficha de contagem do Laboratório de Modelagem e Biodosimetria aplicada – LAMBDA/ Departamento de Energia Nuclear/UFPE, conforme o Anexo A.

O auxílio de um segundo observador foi utilizado para a confirmação dos micronúcleos em células esfoliativas.

Figura 26. Representação esquemática dos critérios de inclusão para contabilização do micronúcleo em células esfoliativas.

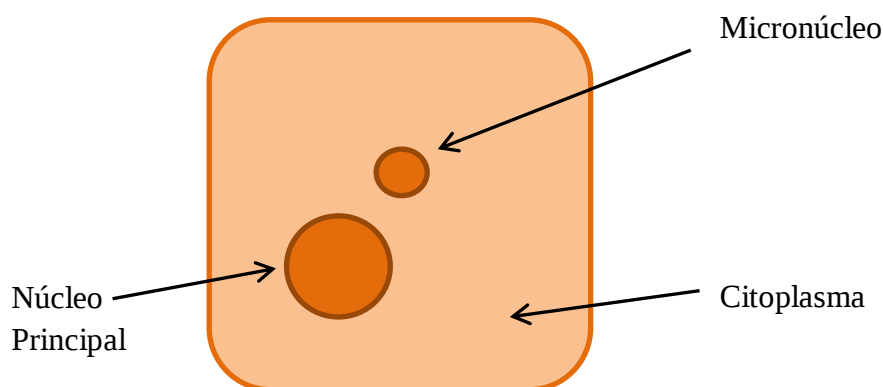
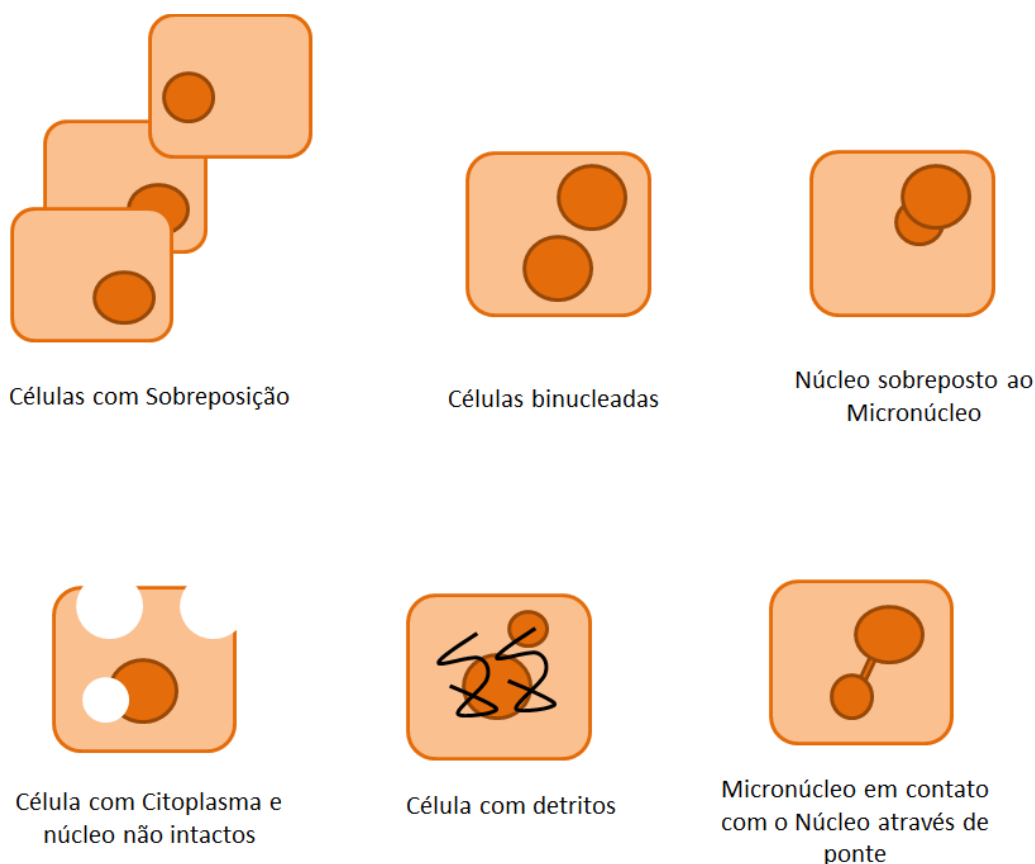


Figura 27. Representação esquemática dos critérios de exclusão para contabilização do micronúcleo em células esfoliativas.



3.7 Análises estatísticas

A análise estatística da frequência de MN entre os grupos foi realizada por meio do teste da ANOVA (VIEIRA, 2006), e o teste de TURKEY. Foram utilizados os softwares de estatística BioEstat 5.0; IBM SPSS STATISTICS 20 e o Statistica 7.

Para o estudo das correlações entre as variáveis dessa pesquisa foi utilizado a Técnica de Análise dos Componentes Principais (ACP) e Regressão Logística Multinomial.

A Análise de Componentes Principais (ACP) é um método que pode ser usado para se reduzir a dimensionalidade de dados multivariados. Ela permite que seja possível reescrever os dados (através de combinações lineares dos dados originais) para que as primeiras poucas variáveis novas resultantes (componentes) respondam por tantas informações disponíveis quanto possível. Se uma redundância substancial estiver presente no conjunto de dados, então é possível explicar a maioria das informações do conjunto original de dados com um número relativamente pequeno de componentes. Essa redução de dimensão torna mais direta a

visualização dos dados e sua subsequente análise, mais administrável. Neste método é realizada uma rotação do sistema de eixos originais que tenta simultaneamente encontrar no espaço de dimensão “n” (amostras e análises realizadas) em uma direção ao longo da qual, os pontos se encontrem espalhados de forma máxima, e no qual se espera encontrar algum tipo de padrão abrigando ao máximo a informação de partida (dados brutos) (MORAES, 2009). Neste trabalho a utilização da Análise de Componentes Principais agrupou de forma esclarecedora os dados relacionados ao perfil dos voluntários em um espaço bidimensional.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

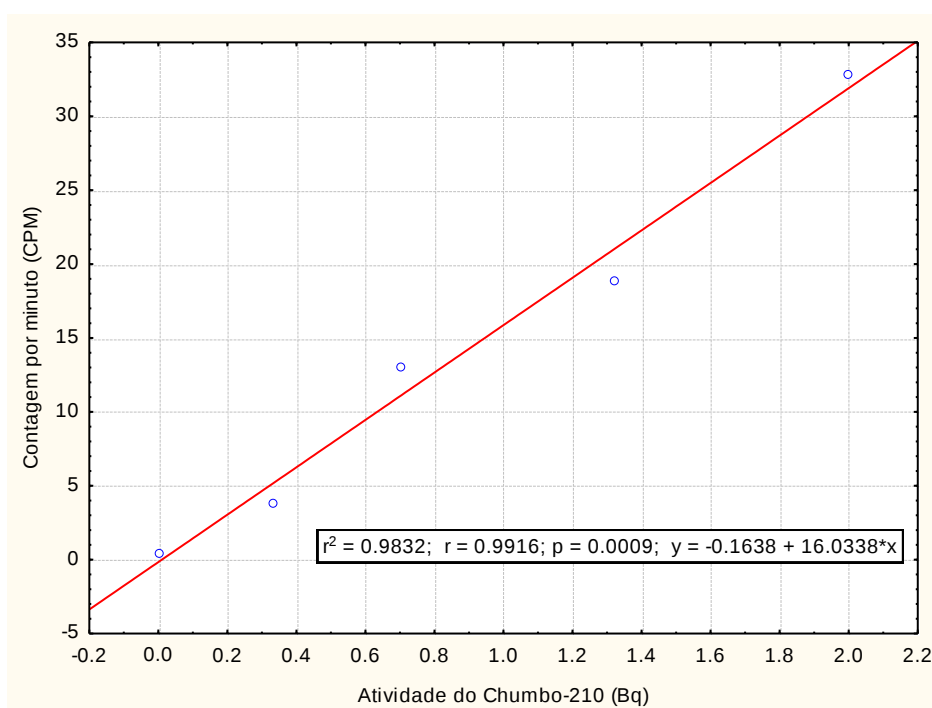
4.1 Sistema de medidas

A padronização da metodologia é fundamental para a pesquisa científica. Para o uso da metodologia proposta, alguns parâmetros devem ser considerados e observados, a fim de minimizar os erros operacionais e sistemáticos. Os parâmetros padronizados (ANVISA, 2005) para os ensaios foram: a curva de eficiência do detector, determinação do limite de detecção e quantificação para as amostras utilizadas, e por fim a avaliação da metodologia.

4.1.1 Curva de calibração para eficiência do detector

A eficiência de contagem no platô beta (ϵ_β) pode ser determinada diretamente na Figura 28, pois, ela é numericamente igual ao coeficiente angular da reta (SILVA et al., 2011). O valor de ϵ_β foi de 16 cpm.Bq⁻¹. Isso significou que na geometria de contagem utilizada, a eficiência de contagem beta é, em média, 26,6%. Essa eficiência foi obtida dividindo-se 16 cpm.Bq⁻¹ por 60 segundos e o resultado da divisão foi multiplicado por 100 para obtermos o resultado em porcentagem.

Figura 28. Curva de calibração média do sistema de medidas utilizando o padrão de ²¹⁰Pb



A eficiência do detector proporcional depende basicamente de suas características, sendo intrínseco ao equipamento e as manutenções periódicas que são realizadas. Trabalhos como de Silva e col. (2011) encontraram um eficiência de 33% para análises de amostras de sal no detector proporcional de fluxo contínuo.

4.1.2 Limite de detecção

Para o cálculo do limite de detecção foi necessário obter as Equações de 3 curvas de calibração com base em concentrações próximas ao limite de quantificação, como podem ser visualizadas na Figura 29.

O desvio padrão, obtido a partir do intercepto com o eixo do Y das equações 6; 7 e 8, da Figuras 29 foi de 0,21, e o valor médio de inclinação das curvas foi de 14,258, calculados conforme o apêndice C;

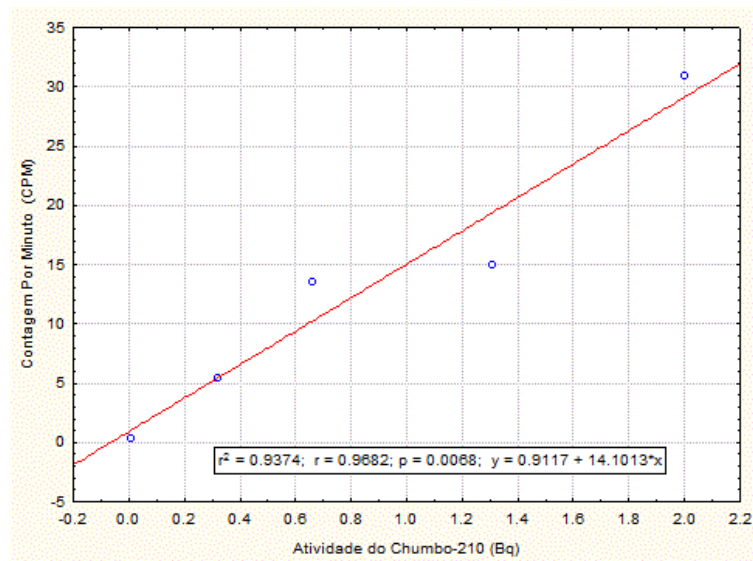
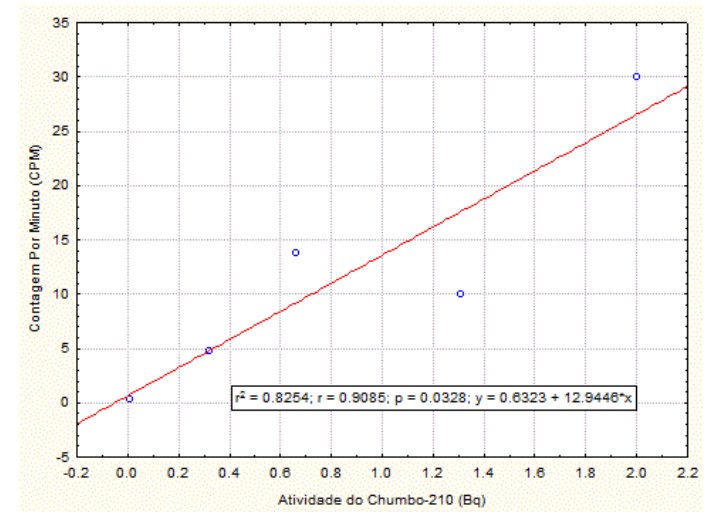
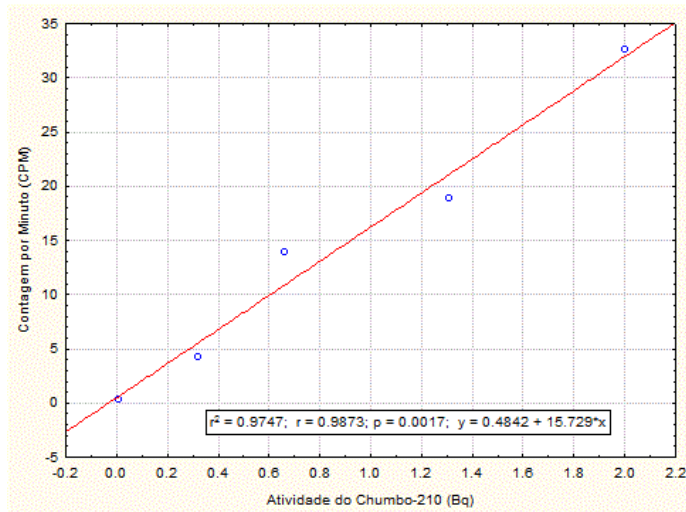
$$y = 0,4842 + 15,729x \quad (6)$$

$$y = 0,6323 + 12,944x \quad (7)$$

$$y = 0,9117 + 14,101x \quad (8)$$

Aplicando o desvio padrão do intercepto do eixo Y e o valor médio da inclinação das curvas, obteve-se o limite de detecção do detector alfa beta, que para esta pesquisa foi de aproximadamente em 45 mBq, conforme a Equação 2.

Figura 29. Curvas de calibração do sistema de medidas utilizando o padrão de ^{210}Pb .



4.1.3 Avaliação do método de análise

A exatidão foi calculada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme as Equações 4 e 5. Nesta pesquisa as médias de exatidão e precisão foram de 85%, e 3,5%, respectivamente. O rendimento químico médio da técnica utilizada foi de aproximadamente 80%.

Os resultados encontrados para os parâmetros de avaliação da separação radioquímica por troca iônica demonstraram eficiência na determinação do ^{210}Pb em amostras biológicas, em específico as cinzas de urina humana. Nesta pesquisa, não foi observado a interferência do grau de pureza dos padrões líquidos sobre a exatidão do resultado final, embora seja possível que a qualidade dos padrões afete este parâmetro. Esse fato pode ser explicado pela atuação de outros emissores beta oriundos das séries radioativas naturais do urânio e de tório (JIA; TORRI 2007). No entanto, os trabalhos apresentados por Godoy e col. (1998), Jia e Torri (2007) e Costa-Júnior e col. (2013) encontraram respostas eficientes para determinação de ^{210}Pb e interferência mínima de outros radionuclídeos naturais, por meio de separação radioquímica através da resina trocadora de íons em amostras ambientais e biológicas, respectivamente.

4.2 Concentrações em atividade do ^{210}Pb nas amostras de urina

Os resultados do presente trabalho para as concentrações de ^{210}Pb em urina, determinadas através do método da troca iônica se encontram na Tabela 8.

Tabela 8. Identificação, volume de urina, cinzas e concentração em atividade do ^{210}Pb .

Amostra	Volume de Urina (L)	Massa total das cinzas (g)	RQ (%)**	Pb-210 (mBq.L^{-1}) $\pm \sigma$
NF-1	1,50	16,40	80	<L.D.*
NF-2	2,00	38,85	80	<L.D.
NF-3	1,80	15,25	76	<L.D.
NF-4	1,90	17,95	78	<L.D.
NF-5	1,20	9,83	63	<L.D.
NF-6	1,67	9,46	60	<L.D.
NF-7	2,00	21,39	87	<L.D.
NF-8	2,00	18,08	80	<L.D.
NF-9	1,75	11,43	83,4	<L.D.
NF-10	1,40	12,00	71,6	<L.D.
NF-11	1,80	10,00	73	51,3 $\pm$ 3,39
NF-12	2,00	9,1	60	<L.D.
NF-13	2,00	28,71	60	<L.D.
NF-14	2,00	19,40	60	<L.D.
NF-15	2,00	25,00	60	<L.D.
F-1	1,40	21,90	60	158,65 $\pm$ 6,06
F-2	1,90	23,50	80	<L.D.
F-3	2,10	16,99	80	111,26 $\pm$ 11,18
F-4	2,15	18,14	67	<L.D.
F-5	2,00	16,19	67	96,77 $\pm$ 5,70
F-6	2,15	15,73	90	<L.D.
F-7	2,18	15,41	97	<L.D.
F-8	2,50	30,94	92	86,19 $\pm$ 10,51
F-9	2,00	15,27	60	49,70 $\pm$ 2,90
F-10	1,80	17,26	94	54,19 $\pm$ 4,50
F-11	2,00	10,03	67	<L.D.
F-12	2,00	12,65	70	<L.D.
F-13	1,00	9,05	62	55,74 $\pm$ 5,75
F-14	2,00	25,30	88	75,7 $\pm$ 5,10
F-15	2,00	12,42	80	141,16 $\pm$ 9,50

*Limite de detecção (45 mBq); **Rendimento Químico

NF – Não Fumante; F – Fumante

Como observado na Tabela 8, as amostras de urina dos voluntários do grupo controle, NF-1, NF-2, NF3, NF-4, NF-5, NF-6, NF-7, NF-8, NF-9, NF-10, NF-12, NF-13, NF-14 e NF-15 apresentaram concentrações de ^{210}Pb na urina inferiores ao limite de detecção (LD), que foi de 45mBq. O único indivíduo do grupo controle que apresentou valores acima do LD foi NF-11, com 51,3 $\pm$ 3,39 mBq.L^{-1} . O voluntário NF-11 informou que consome bebida alcoólica e este fato pode estar contribuindo para o valor encontrado. Salmon e col. (1998)

reportam que o consumo de bebida alcoólica, frutos do mar apresentam alguma contribuição para a exposição ao ^{210}Pb .

Já no grupo de fumantes, as amostras de urina apresentaram concentrações de ^{210}Pb acima do LD, com valores que variaram de 49,7 a 158,6 mBq.L^{-1} . Entretanto, os indivíduos F-2; F-4; F-6; F-7; F-11 e F-12 apresentaram concentrações de ^{210}Pb na urina inferiores ao LD.

Observa-se que os fumantes apresentaram maior concentração em atividade do ^{210}Pb na urina. Em específico, os voluntários F-1; F-3 e F-15 apresentaram as maiores concentrações de ^{210}Pb . O impacto do uso do tabaco é refletido nas concentrações de ^{210}Pb presentes na urina e, muito provavelmente, os valores indicados se devem aos elevados níveis desse radionuclídeo encontrados nos cigarros brasileiros (SANTOS et al., 1994; GODOY et al., 1992). A literatura reporta que fumantes que consomem mais de 20 cigarros por dia estão sujeitos a inalar entre 20 a 215 mBq de ^{210}Pb (SKAWARZEC et al., 2001a).

A hipótese mais provável é que as concentrações de Chumbo-210 na urina tenham maior relação com o hábito de fumar do que os hábitos alimentares. Pois, a combustão a 700 °C deste elemento o torna altamente disponível para ser diretamente inalado, representando assim a maior rota de entrada e, o sangue será responsável pela sua distribuição sistêmica no corpo humano (SCHIFER et al., 2005; ICRP-67, 1993). O sangue contendo o ^{210}Pb sofre filtração glomerular e uma parte desse elemento é reabsorvido parcialmente nos túbulos renais e o restante excretado na urina (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

A concentração de elemento traço, como o ^{210}Pb , em amostras biológicas é afetada por parâmetros ambientais e fisiológicos, podendo existir variações consideráveis entre subgrupos específicos da população (MORTADA et al., 2002). Uma provável razão para a variabilidade de excreção do ^{210}Pb entre os fumantes, está relacionada ao fato deste elemento ter afinidade por tecidos densos. Neste caso, o esqueleto é um reservatório onde o ^{210}Pb encontra-se bioacumulado até ser eliminado e, consequentemente, excretado lentamente através da urina (SADAO, 2002; MITTELSTAEDT, 1983).

A meia vida efetiva deste elemento no osso humano está entre 15 e 18 anos e a meia vida biológica é de 56 anos (SALMON, et. al., 1999). O sangue é o tecido que integra este processo, pois a taxa de excreção urinária do chumbo é proporcional à concentração no plasma (SCHAYER et al., 2010). A literatura reporta resposta linear entre a excreção de ^{210}Pb na urina e a concentração nos ossos (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

Nos resultados apresentados na Tabela 8 não houve diferença significativa entre a quantidade de cigarros consumidos e a concentração em atividade de ^{210}Pb na urina, segundo

a ANOVA ($p = 0,6211$ e $f = 0,9120$). Esses resultados são controversos quando comparados com o estudo realizado em Beijing, na China por Schayer e col. (2010) envolvendo fumantes, onde a concentração de ^{210}Pb e o número de cigarros consumidos foram correlacionados. Neste trabalho, que utilizou a espectrometria alfa, o grupo de fumantes apresentou em média 12 mBq.L^{-1} e o grupo de não fumantes 9 mBq.L^{-1} . Estes valores são de 1 a 3 ordens de grandezas menores do que aqueles apresentados na Tabela 8. Schayer e col. (2010) enfatizam que a atividade ^{210}Pb na urina pode indicar o grau de consumo de cigarro em meses anteriores, ressaltam ainda que um incremento de uma unidade na concentração em atividade do ^{210}Pb (mBq.d^{-1}) está associado em 25% ao tabagismo, segundo a regressão logística empregada nesse estudo. Entretanto esses autores relataram que esse estudo preliminar precisa ser aprofundado e validado (SCHAYER et al., 2010).

A justificativa mais empregada para explicar o Chumbo-210 excretado na urina considera que a concentração desse elemento pode estar associada a fatores mais complexos que a quantidade de cigarros consumidos, absorção do ^{210}Pb no corpo humano e a forma de consumo do cigarro. Fatores como a frequência de consumo e a qualidade do material também devem ser considerados (SISTI et al., 2009, MELI et al., 2009). Além disso, estudos sugerem que a excreção do Chumbo pode ser afetada pelo fluxo urinário (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

A ANOVA indicou que não foi encontrada diferença estatística significativa entre a concentração média do ^{210}Pb , a idade dos voluntários ($p = 0,5336$ e $f = 0,6071$) e o tempo de tabagismo ($p = 0,6755$, $f = 0,4247$). Este resultado está de acordo com a pesquisa de Rosiak e Starościak (2014) onde o aumento da excreção de ^{210}Pb e ^{210}Po na urina em relação à idade foi considerada insignificante. No entanto o cigarro pode contribuir com um ganho de 75% na exposição ao ^{210}Pb , o que será refletido na excreção, se comparado com os não fumantes (SALMON et al., 1998). Utilizando outro teste estatístico, a Regressão Logística Multinomial (Anexo C1), as variáveis idade, tempo de tabagismo e quantidade de cigarros consumidos não explicam as concentrações de Chumbo-210.

Outra hipótese levantada pela literatura para as concentrações de Chumbo-210 na urina seriam os hábitos alimentares. Dentre os voluntários da Tabela 8, 66,7% dos fumantes relataram consumir frutos do mar, uma das principais fontes de ^{210}Pb para o homem. Contudo, o Chumbo-210 oriundo desta via tem pouca relevância para baixas exposições, pois 90% do elemento que não foi absorvido pelo trato gastrointestinal (TGI) é eliminado nas fezes, além disso, somente 15% do chumbo absorvido será eliminado por essa via, sendo a urina a maior

rota de excreção (80%) (MAVROPOULOS, 1999; MOREIRA; MOREIRA, 2004; SADAQ, 2002).

Absorção do Chumbo pelo TGI depende principalmente do estado nutricional do indivíduo, Moreira e Moreira (2004) e Salmon e col. (1998) explicam que quando há deficiência de minerais como Ferro, Fósforo, Cálcio, Vitamina D, Ferro, Zinco e proteínas, o organismo absorve o chumbo com maior facilidade. No entanto, o contrário também é verdadeiro, pois o chumbo não compete com outros sais minerais em um indivíduo bem nutrido.

Mesmo em situações onde indivíduos que habitam regiões de elevado background radioativo e que estão sujeitos a maiores exposições, devido a ingestão de ^{210}Pb presente na dieta, não é possível verificar diferença significativa dos teores deste elemento nas fezes em relação ao grupo controle. Julião e col. (2003) avaliando concentrações de ^{210}Pb , em fezes de indivíduos em Buena (região de elevada radiação natural) e do Rio de Janeiro (região controle), não encontraram diferenças estaticamente significativas.

Entretanto a excreção de ^{210}Pb nas fezes pode ser influenciada pela ingestão total desse radionuclídeos e, nesse caso, a concentração dos radionuclídeos nos alimentos, a quantidade e frequência destes que são consumidas podem explicar as variações do Chumbo-210 nessa matriz. Bueno (1999) exemplifica tal situação da seguinte forma: a concentração de ^{210}Pb em frutos do mar é alta, mas o consumo deste alimento é esporádico e, portanto, a ingestão do radionuclídeo é baixa. Em geral a concentração do radionuclídeo no leite é baixa, porém o consumo é alto e, portanto, a ingestão do ^{210}Pb é alta. Em outros alimentos como batatas e produtos de padaria, tem-se um alto teor de ^{210}Pb associado a um alto consumo dos produtos alimentícios. Consequentemente, em decorrência da variação da quantidade de radionuclídeos naturais no ambiente e nas dietas, os teores de radioatividade introduzida no corpo humano podem variar de lugar, condições climáticas e também de mudanças da dieta devido aos hábitos alimentares (BUENO, 1999).

Muikku e col. (2011) estudando a variação natural da concentração de Polônio-210 e Chumbo-210 na urina da população de Finlândia encontraram resultados variando de 20 a 70 mBq.L^{-1} , utilizando a técnica da espectrometria alfa. O valor máximo encontrado por Muikku e col. (2011) é da mesma ordem de grandeza das amostras F-14, F-13, F-8, F-5, F-9.

Os valores apresentados na Tabela 8 são de 2 a 3 ordens de grandeza maiores se comparados aos resultados apresentados por Hölgye (2013), o qual avaliou as concentrações de Chumbo-210 em não fumantes habitantes de Praga, no intuito de estabelecer um

background para população em relação ao ^{210}Pb e ao ^{210}Po em casos de contaminação, principalmente depois do caso do agente da KGB Alexander Litvinenko, que veio a óbito. Este trabalho reportou uma média de excreção 6 mBq.L^{-1} de urina.

Santos e col. (1995), utilizando a técnica da espectrometria alfa, analisaram a presença de ^{210}Pb em amostras de urina de fazendeiros que trabalhavam com fertilizantes fosfatados. Neste caso, as concentrações variaram de 3,6 a 6. mBq.L^{-1} Estes valores são de 1 a 3 ordens de grandezas menores do que aqueles apresentados na Tabela 8.

Pesquisas realizadas com a técnica da espectrometria alfa, em urina de pessoas que trabalhavam na reciclagem de baterias de automóveis, em Belgrado, na antiga Iugoslávia, determinaram concentrações de ^{210}Pb variando de 34,1 a 183,0 mBq.L^{-1} (KNEZEVIC et al., 1998). Estes valores encontram-se na mesma ordem de grandeza das amostras de urina F-15, F-5, F-3, F-1.

Naumann e col. (1998), usando a técnica da espectrometria alfa, determinaram concentração de ^{210}Pb variando de 6 a 12 mBq.L^{-1} em amostras de urina de indivíduos do público da cidade de Berlim, Alemanha. O valor máximo encontrado por esses autores foi 4 vezes menor do que aquele encontrado nas amostras NF-11, F-9, F-10, F-11, F-13 e F-14.

Trabalho realizado em Pernambuco avaliou os teores de ^{210}Pb em urina de residentes saudáveis em duas regiões de elevado background, Folha Venturosa e Região Urano-fosfática (COSTA-JÚNIOR et al., 2013b). Usando a técnica da troca iônica e o detector de fluxo proporcional alfa e beta foram encontrados valores que variaram de 65 a 267 mBq.L^{-1} e 62 a 440 mBq.L^{-1} , para a região da Folha Venturosa e Urano-fosfática, respectivamente, estes resultados estão na mesma ordem de grandeza dos apresentados na Tabela 8.

O fato dos fumantes e habitantes de regiões de elevado background radioativo possuírem concentrações de ^{210}Pb na mesma faixa de concentração reforça a necessidade da biomonitoração para o controle da dose devido à exposição aos radionuclídeos naturais (ICRP-60, 1991; EISENBUD; GESELL, 1997; JEFFERSON et al., 2009; COSTA-JÚNIOR et al., 2013).

De acordo com os valores mostrados na Tabela 8, a média encontrada para a concentração de ^{210}Pb na urina dos fumantes no presente trabalho foi de $92,15 \pm 38,86 \text{ mBq.L}^{-1}$. A literatura reporta que a atividade média do ^{210}Pb encontrada na urina da população é de 10 mBq.L^{-1} , com variações que vão de 6 a 69 mBq.L^{-1} (MUIKKU et al., 2011). A Tabela 9 mostra a comparação dos resultados encontrados nessa pesquisa com os trabalhos citados anteriormente.

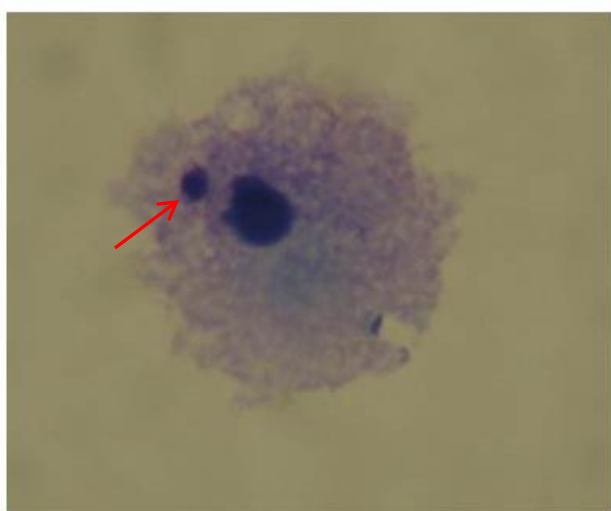
Tabela 9. Comparação dos Teores de ^{210}Pb em urina com os trabalhos existentes na literatura.

Referência	Concentração em Atividade na Urina do ^{210}Pb (mBq.L⁻¹)	Indivíduos avaliados
SANTOS et al., (1995)	3,6 a 6,3	Fazendeiros que trabalhavam com fertilizantes fosfatados.
KNEZEVIC et al., (1998)	34,1 a 183	Trabalhadores de reciclagem de bateria de automóveis.
NAUMANN et al., (1998)	6 a 12	Indivíduos o público não ocupacionalmente expostos.
HÖLGYE (2013)	2 a 16,6	Indivíduos o público não ocupacionalmente expostos.
MUIKKU et al., (2011)	20 a 70	Indivíduos do público, pescadores e indivíduos que consomem água com altos teores de ^{210}Po .
SCHAYER et al., (2010)	2 a 30	Fumantes e não fumantes.
COSTA-JÚNIOR et al., (2013b)	65 a 440	Residentes de Regiões de alto background radioativo em Pernambuco.
Este trabalho	49,7 a 158,65	Fumantes e não fumantes.

4.3 Micronúcleos em células esfoliativas de fumantes e não fumantes

A padronização da metodologia estabelecida por Fortin e col. (2010) permitiu distinguir visualmente os micronúcleos de células esfoliativas da urina. Nesse caso, o processo de isolamento através da série de centrifugações, fixação com Carnoy e coloração com Giemsa foram etapas importantes para o estabelecimento do teste do micronúcleo no Departamento de Energia Nuclear. O resultado pode ser visualizados na Figura 30.

Figura 30. Micronúcleos em células esfoliativas encontradas na urina



Legenda. Imagem obtida com um aumento de 1000x. Os micronúcleos são as estruturas indicadas pelas setas vermelhas. Fonte: O autor.

Na literatura podem ser encontrados trabalhos que enfatizam a importância da coloração na avaliação da frequência de micronúcleos (NERSESYAN et al., 2014; FORTIN et al., 2010; GANDHI et al., 2003; LEHUCHER-MICHEL et al., 1996). Há um comum acordo entre os autores que os critérios estabelecidos para contabilização de células e dos micronúcleos sejam bem definidos para maior confiabilidade dos resultados. Especificamente a coloração com Giemsa, em células esfoliativas, apesar de requerer menos passos para a realização em relação a outras técnicas, deve ser aplicada em associação com processos otimizados de isolamento e fixação (FORTIN et al., 2010).

Por ser uma técnica de fácil aplicabilidade na detecção do dano genotóxico e possibilitar a avaliação do risco devido à exposição a substâncias carcinogênicas, o micronúcleo tem sido considerado uma importante ferramenta de monitoração. Nesse contexto, a frequência de micronúcleos dos voluntários avaliados é apresentada na Tabela 10. Esta Tabela reflete o número de células esfoliativas e a frequência de micronúcleos encontrados na urina dos voluntários após os processos descritos no item 3.6.

Tabela 10. Distribuição geral do número de células contabilizadas e a Frequência de Micronúcleos em células esfoliativas na urina de fumantes e não fumantes.

Amostras	Número de Micronúcleos	Frequência de MN
NF-1	1	0,001
NF-2	1	0,001
NF-3	5	0,005
NF-4	5	0,005
NF-5	5	0,005
NF-6	3	0,003
NF-7	5	0,005
NF-8	4	0,004
NF-9	3	0,003
NF-10	3	0,003
NF-11	4	0,004
NF-12	5	0,005
NF-13	5	0,005
NF-14	4	0,004
NF-15	2	0,002
F-1	5	0,005
F-2	5	0,005
F-3	3	0,003
F-4	9	0,009
F-5	6	0,006
F-6	6	0,006
F-7	7	0,007
F-8	5	0,005
F-9	8	0,008
F-10	13	0,013
F-11	7	0,007
F-12	6	0,006
F-13	7	0,007
F-14	9	0,009
F-15	6	0,006

Os voluntários NF-1 e NF-2, integrantes do grupo controle, apresentaram as menores frequências de micronúcleos, 0,001, já o voluntário F-10 mostrou a maior, 0,013.

Como pode ser observado na Tabela 10, existe uma grande variabilidade em relação à frequência de micronúcleos na urina, o que pode ser explicado por fatores como hábitos de vida e condições fisiológicas de cada indivíduo (BONASSI et al., 2003). Essa variação no

grupo controle pode também ser explicada por outros fatores como sexo, idade, etnia, região geográfica e os critérios de contagem (ESPINOZA et al., 2008; MAJER et al., 2001).

Outra hipótese justifica a variação da frequência de micronúcleos em células esfoliativas:

- Em uma população, a taxa de background de micronúcleos dos indivíduos pode variar intensamente (LEHUCHER-MICHAEL et al., 1996).

Essa hipótese é reforçada pelo estudo cinético da taxa de micronúcleos nas células basais, onde a frequência de MN em células da bexiga de mulheres saudáveis não fumantes foi mensurada em 6 dias consecutivos, por 4 vezes por dia. Cada indivíduo apresentou uma frequência constante relativa em diferentes tempos de amostragem, porém os resultados globais mostram uma variação significativa interindividual da taxa de MN (LEHUCHER-MICHAEL et al., 1996).

A influência do gênero em relação à frequência de micronúcleo em células esfoliativas ainda não é tão clara e os resultados são inconclusivos. No entanto, Bonassi e col. (2011) realizaram um levantamento dos principais fatores associados à frequência de micronúcleos em células esfoliativas, os resultados obtidos mostram que a idade tem maior peso e a relação micronúcleo/sexo não pôde ser estabelecida com clareza. No entanto, o sexo feminino tende a apresentar maior frequência de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico. Isto pode ser explicado devido ao fato das mulheres possuírem duas cópias do cromossomo X, em comparação ao único dos homens. Existe uma tendência a perdê-lo sob a forma de micronúcleos em relação a outros cromossomos (FENECH; BONASSI, 2011).

4.3.1 Análises estatísticas relacionadas às variáveis estudadas e consideradas para a frequência de Micronúcleos

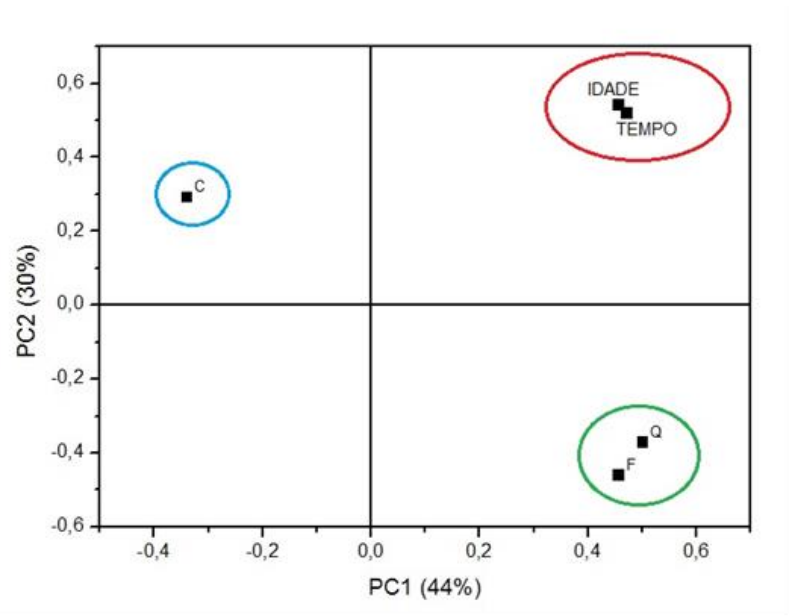
Para melhor compreender a frequência de micronúcleos e a sua relação com a idade, tempo de tabagismo, quantidade de cigarros consumidos e concentração de Chumbo-210 foram elaborados gráficos a partir da Análise de Componentes Principais (ACP).

Na figura 31, o gráfico apresenta a primeira componente principal 1 para as amostras dos fumantes, esta componente apresenta 44% da informação e mostra as relações entre as variáveis definidas para idade, T (tempo de tabagismo), Q (quantidade de cigarros consumidos), F (Frequência de Micronúcleo) e C (Concentração do ^{210}Pb). Na região mais

positiva encontram-se agrupadas entre si fatores como a frequência de micronúcleo e a quantidade de cigarros consumidos.

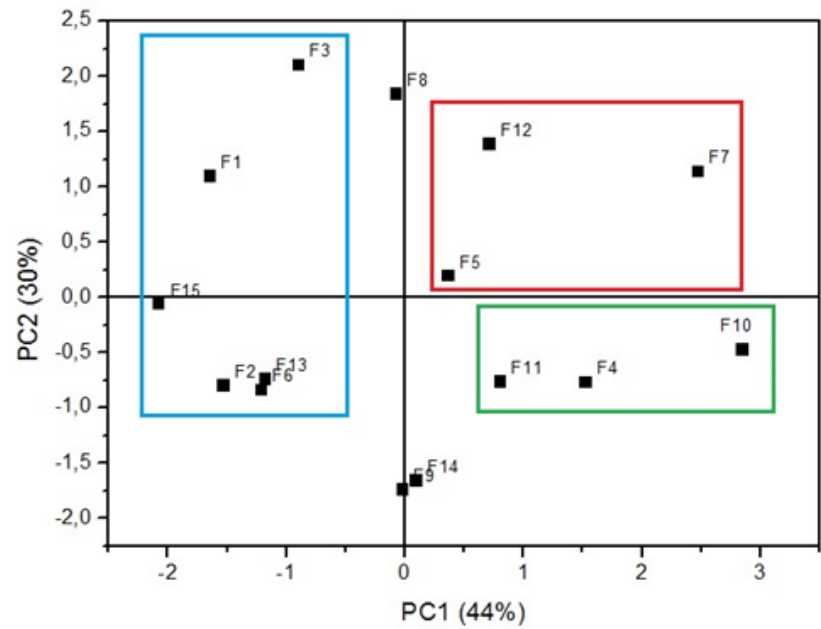
Observa-se no lado negativo do eixo PC1 um grupo associado à concentração de Chumbo-210. Todas essas variáveis estão dispostas conforme suas afinidades naturais e agrupadas com a maior variância possível. Uma sugestão para tal comportamento é que existam comportamentos distintos para os dados de entrada, uma vez que a concentração mensurada para o Chumbo está em uma posição oposta aos demais parâmetros, como o tempo de tabagismo e a idade do indivíduo. Essa possibilidade é corroborada pelo fato de que os organismos e mecanismos de fixação e excreção do Chumbo-210 são distintos e não contemplados neste estudo.

Figura 31. Gráfico obtido por ACP para as correlações entre idade, tempo de tabagismo, quantidade de cigarros consumidos, frequência de micronúcleos e concentração do ²¹⁰Pb na urina de fumantes



Legenda. Na Figura 31 é possível observar no eixo das abscissas (Componente Principal 1 – PC1) que as variáveis Frequência de micronúcleo (F) e Quantidade de cigarros consumidos (Q) apresentaram maior correlação, como indicado pelo círculo verde. O tempo de tabagismo (Tempo) e a idade dos voluntários (idade) aparecem agrupados – indicado pelo círculo vermelho - sem correlação significativa com a concentração de ²¹⁰Pb (C).

Figura 32. Gráfico obtido por ACP para o comportamento dos indivíduos fumantes em relação as frequência de micronúcleo, concentração de ²¹⁰Pb e fatores como idade, tempo de tabagismo e quantidade de cigarros consumidos



Legenda. Os indivíduos delimitados pelo quadrado azul representam aqueles que têm maior representatividade para a excreção do ²¹⁰Pb. Por sua vez os indivíduos delimitados pelo quadrado verde são os maiores representantes da relação quantidade de cigarros e frequência de micronúcleo. Os voluntários indicados pelo quadrado vermelho apresentam maior expressividade para as variáveis como a idade e tempo de tabagismo. Os voluntários F4, F5, F7, F10, F11 e F12, estão mais relacionados com os parâmetros idade, tempo, frequência do micronúcleo e quantidade de cigarros. Os indivíduos F8, F9 e F14 não são expressivos por não se enquadrarem em nenhum conjunto das variáveis.

Com essa análise estatística foi possível evidenciar e descrever o comportamento associado à variabilidade natural dos indivíduos que tiveram seu perfil estudado. Conjuntamente com o gráfico das variáveis, o gráfico dos indivíduos (Figura 32) mostra o agrupamento e disposição dos perfis dos indivíduos com maior representatividade entre os grupos de parâmetros formados. Assim, comparando-se os dois gráficos, observa-se que os indivíduos F1, F2, F3, F6, F13 e F15 estão no lado esquerdo do eixo PC1, mostrando sua relação mais representativa com o parâmetro concentração do Chumbo-210. Já no lado direito do eixo PC1 estão os indivíduos F4, F5, F7, F10, F11 e F12, mais relacionados com os parâmetros idade, tempo, frequência do micronúcleo e quantidade de cigarros. Neste método caracterizam-se os indivíduos F8, F9 e F14 por estarem em cima da linha do eixo PC1 como pouco representativos para qualquer um dos lados, e assim podem ser descartados para elaboração deste modelo de representatividade entre perfis e as variáveis. Comparando-se os dois gráficos verifica-se ainda em relação ao eixo componente principal 2 (PC2), que contém 30% da informação da variância, que a concentração de Chumbo-210 tem alguma relação com os parâmetros idade e tempo de tabagismo somente quando totalmente descorrelacionados dos parâmetros de quantidade cigarros e frequência de micronúcleos, e que esse agrupamento é mais significativo com os indivíduos F1, F3, F5, F7, F8 e F12.

Já a aplicação da Regressão Logística Multinomial (Anexo C1), para esta pesquisa, sugere que a idade e o tempo de tabagismo não têm correlação significativa com a frequência de micronúcleos. Esse resultado está de acordo com a pesquisa de Burgaz et al. (1995) que teve por objetivo estudar a excreção do Tioéter e a frequência de micronúcleo em células esfoliativas da urina de fumantes e não fumantes, a idade não exerceu efeito significativo.

No trabalho de Raeli e col. (1987) a avaliação da frequência de micronúcleos em células esfoliativas, e a mutagenicidade em urina de fumantes relacionada com a idade foi inconclusiva, não havendo diferença significativa entre as faixas etárias. Outros estudos também corroboram para os resultados aqui encontrados, para esta variável (ESPINOZA et al., 2008; SUHAS et al., 2004; LEHUCHER-MICHAEL et al., 1996; WARNER et al., 1994).

A relação entre idade e frequência de micronúcleo é mais pronunciada em células esfoliativas da mucosa bucal (BONASSI et al., 2011). Fenech e Bonassi (2011) explicam que aumento da frequência de micronúcleo com idade é devido a uma combinação de fatores que incluem: a) o efeito acumulativo adquirido de mutações envolvendo o reparo do DNA, segregação de cromossomos e os checkpoints do ciclo celular; b) aberrações numéricas e estruturais no cromossomo causadas por genotoxinas endógenas, nutrição inadequada,

exposição ambiental ou ocupacional a agentes genotóxicos, bem como uma ampla gama de fatores envolvendo um estilo de vida pouco saudável.

O efeito desses fatores foi similarmente reportado em pesquisas envolvendo a relação da idade com a frequência de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico (BONASSI et al., 2011).

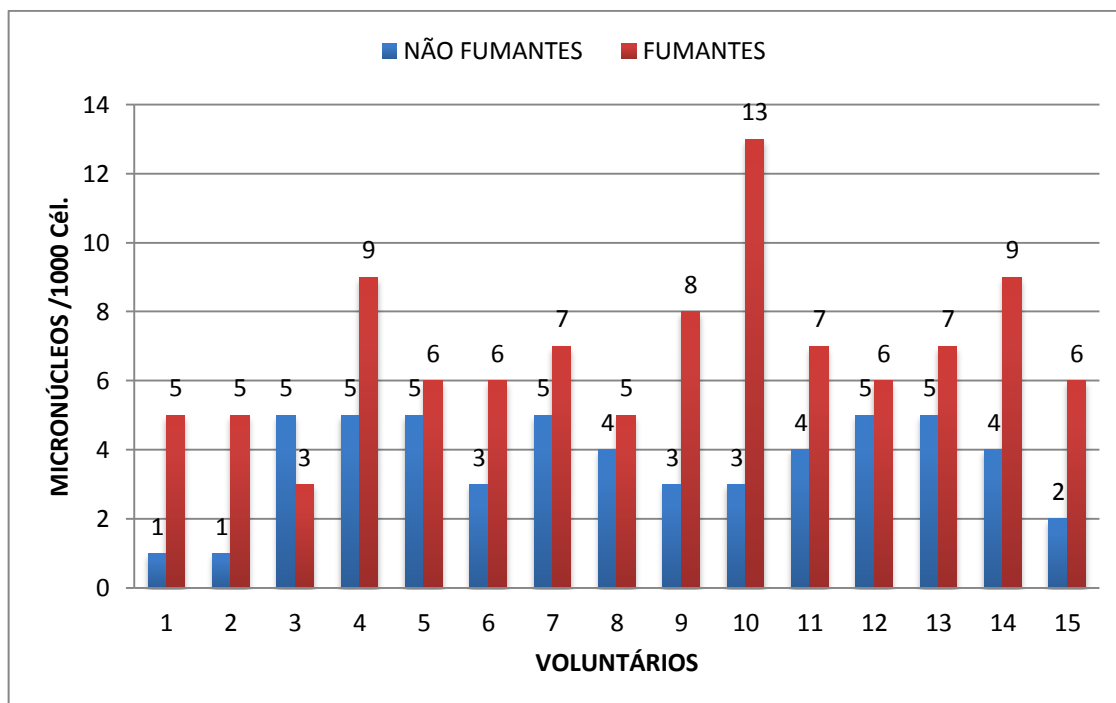
No presente estudo, o consumo de bebida alcoólica não foi levado em consideração para a pesquisa dos micronúcleos, devido ao álcool não ser diretamente um agente carcinogênico para o trato urogenital. Além disso, estudos mostram que consumo de bebidas não resultou em um aumento da frequência de micronúcleos em células esfoliativas da urina (NERSESYAN et al., 2014; BONASSI et al., 2011; FONTANA et al., 2001; BURGAZ et al., 1995; RAELI et al., 1987). Contudo, pode haver uma interação sinérgica entre o consumo de álcool e cigarro, e o efeito disso seria um aumento na frequência de micronúcleos, como observado por Stich e col. (1982) em células da mucosa bucal.

Santos Lima e Chagas (2010) explicam que um dos produtos do álcool, o acetaldeído pode se comportar como um solvente, permitindo que substâncias genotóxicas interiorizem-se nas células. Além disso, o álcool acelera o metabolismo do fígado, ativando assim substâncias capazes de causar danos no DNA. Esses autores encontraram associações positivas entre álcool e micronúcleo em linfócitos de produtores de hortaliças expostos a pesticidas.

4.3.2 Frequência de Micronúcleo e Tabagismo

Com os dados da Tabela 10 foi construído um gráfico para melhor dimensionar a distribuição dos micronúcleos entre os voluntários, o resultado pode ser observado na Figura 33. É possível notar a variabilidade na frequência de micronúcleos nos indivíduos analisados. A Figura 33 apresenta os fumantes destacando-se como grupo com a maior frequência frente aos não fumantes. Essa informação é de grande importância e pode ser encontrada na literatura menções sobre a associação de tabagismo, câncer de bexiga e o micronúcleo como sinalizador (MARTINO-ROTH, 2002).

Figura 33. Distribuição dos micronúcleos em células esfoliativas presentes na urina dos voluntários não fumantes e fumantes.



A frequência média encontrada para micronúcleo em não fumantes foi $0,0036 \pm 0,001$, está em comum acordo com os resultados apontados por Fortin e col. (2010) e Jen e col. (2002) como background.

Em fumantes a frequência foi em média $0,0068 \pm 0,002$. Os resultados mostraram um aumento expressivo da frequência de micronúcleos em células esfoliativas de indivíduos fumantes em relação aos não fumantes. ANOVA seguindo o teste de Turkey mostra que esta diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,01$ e $f = 20.1678$).

Apesar de haver na literatura muita controvérsia sobre a relação entre tabagismo e a frequência de micronúcleos, sabe-se que o material particulado do tabaco demonstra potencial para induzir aberrações cromossômicas e micronúcleos em cultura celular de mamíferos (DeMARINI, 2004; BONASSI et al., 2003; FENECH et al., 1999a). DeMarini (2004) enfatiza ainda que micronúcleos em camundongos podem ser induzidos por radicais livres, com base na fraca associação entre a indução de micronúcleos e adutos de DNA, ao invés de componentes aromáticos. Além disso, agentes mutagênicos estão presentes em alta quantidade na urina de fumantes habituais e suas células uroteliais podem representar um alvo

para absorver e excretar estes mutagênicos (LEHUCHER-MICHEL et al., 1996). O voluntário que apresentou a maior frequência de MN foi o F-10.

O voluntário F-3 foi o único que apresentou a menor frequência de micronúcleo entre os fumantes. Bonassi e col. (2003) relatam que situações como esta podem ser justificadas pelo fato de que exposições ocupacionais a agentes mutagênicos ou carcinogênicos podem estimular a expressão de genes responsáveis pelo reparo do DNA, ou mecanismos de desintoxicação importantes para reduzir os efeitos químicos do consumo do cigarro. Kirsh-Volders e Fenech (2001) enfatizam que respostas adaptativas podem ser observadas quando as células adquirem resistência a altas doses de um agente citotóxico após baixas exposições desse mesmo agente ou outro agente genotóxico. Além disso, adaptações cruzadas podem ser induzidas gerando uma redução da sensibilidade das células a espectros maiores de agentes mutagênicos devido a baixas doses de exposição a agentes radiomiméticos, alquilantes ou a radiações ionizantes. Esse tipo de comportamento, relacionado à reposta adaptativa das células, é observado na formação de micronúcleos em linfócitos (KIRSH-VOLDERS; FENECH, 2001).

Os resultados encontrados por Fontana e col. (2001) reforçam a hipótese da reposta adaptativa, pois o grupo controle, formado por não fumantes, apresentou uma frequência média de $0,0014 \pm 0,0003$. Em contrapartida, os fumantes pesados⁴ e moderados apresentaram as seguintes médias $0,0009 \pm 0,0004$ e $0,0007 \pm 0,0003$, respectivamente, não havendo diferença estatisticamente significativa. As frequências médias encontradas por Fontana e col. (2001) são três vezes menores em relação às médias encontradas na Tabela 10.

Burgaz e col. (1995) estudando a frequência de micronúcleos e a excreção do Tioéter em fumantes evidenciaram um aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos em fumantes em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). A frequência média de $0,006 \pm 0,0005$ foi encontrada para os não fumantes, e $0,019 \pm 0,0001$ para os fumantes, 6 e 3 vezes maior que o grupo controle e o grupo de fumantes da Tabela 10, respectivamente. Entretanto os autores não obtiveram êxito em correlacionar a excreção do Tioéter com os MN, atribuído assim, a presença destes elementos a outros componentes carcinogênicos presentes na urina.

A frequência de micronúcleos em fumantes também foi significativamente alta em relação o grupo controle no trabalho de Reali e col. (1987) que teve por objetivo estudar a correlação da presença do micronúcleo em células esfoliativas encontradas na urina e o efeito

⁴ Fumantes que consomem mais de 40 cigarros por dia

genotóxicos do hábito de fumar. Os valores da frequência variaram de 0,001 a 0,005 para os fumantes e 0,001 a 0,002 para não fumantes. Os resultados encontrados por Cid e col. (1991) mostram um aumento discreto de 2,2% na frequência de micronúcleos em células esfoliativas da urina de indivíduos fumantes em relação aos indivíduos não fumantes do grupo controle, corroborando para os resultados até aqui apresentados.

Lehucher-Michael e col. (1996) estudando a cinética dos micronúcleos em células esfoliativas presentes na urina encontraram diferença significativa entre ex-fumantes e não fumantes, e os resultados mostrados indicaram que as voluntárias que não consumiram cigarro em um ano apresentaram elevada frequência de micronúcleos em relação ao grupo controle. A frequência média de micronúcleos encontrada por Lehucher-Michael e col. (1996) foi de $0,0047 \pm 0,003$. Estes valores estão na mesma ordem de grandeza dos encontrados na tabela 15.

Um ponto a ser destacando na monitoração de indivíduos fumantes, usando a frequência de micronúcleo é a quantidade de cigarros consumidos. Os voluntários fumantes que consomem mais de 20 cigarros por dia apresentaram as maiores frequências de MN em relação aos não fumantes. Esse aumento é estatisticamente significativo quando comparado com grupo que consome menos de 20 cigarros por dia, segundo a ANOVA e o teste de Turkey ($f = 10.9005$ e $p < 0,001$). O teste de ACP (Figura 31) e de Regressão Logística (Anexo C1) também mostram correlação significativa entre o número de cigarros consumidos e a frequência de micronúcleos.

Comportamento semelhante é observado no trabalho de Burgaz e col. (1995) e Wu e col. (2004). Entretanto, trabalhos como os de Fontana e col. (2001), Reali e col. (1987) não apresentaram correlação entre o número de cigarros consumidos e a frequência de micronúcleos em células esfoliativas presentes na urina.

A literatura científica apresenta algumas hipóteses a respeito da correlação entre número de cigarros e a frequência de MN, uma delas é que a forma de consumo do cigarro, o metabolismo e a capacidade de excreção de mutagênicos de cada indivíduo exerça maior influência na frequência de micronúcleos do que a quantidade de cigarros e consequentemente o percentual de mutagênicos na urina (REALI et al., 1987).

Por outro lado, o número de cigarros consumidos e os hábitos alimentares podem ter correlação no seguinte aspecto: fumantes de mais 40 cigarros tendem a ter menor ingestão de ácido fólico e vitamina B12 e a redução de ambos contribui para a frequência de micronúcleos (GABRIEL et al., 2006; BONASSI et al., 2003, FENECH et al., 1999a). Os resultados

encontrados por Gabriel e col. (2006), envolvendo células da mucosa bucal, indicaram redução substancial e significativa do ácido fólico e da vitamina B12 no plasma sanguíneo e em células esfoliativas orais em fumantes, entretanto não foi observada diferença significante entre fumantes que consomem menos de 20 cigarros e os que consomem mais de 20.

Em estudos envolvendo linfócitos humanos, desenvolvido por Bonassi e col. (2003), fumantes que consomem mais de 40 cigarros por dia apresentam um aumento estatisticamente significativo em relação aos não fumantes.

É importante ressaltar que monitoração em indivíduos fumantes de menos 20 cigarros por dia pode ser comprometida, caso estes estejam expostos a outros agentes genotóxicos, pois existe uma probabilidade dos mutagênicos mascararem o efeito do fumo e além de haver uma redução da frequência de micronúcleos em consumidores de menos de 20 cigarros por dia em relação aos não fumantes (BONASSI et al., 2003). Tal efeito pode ser observado no trabalho de Fontana e col. (2001), onde não foi encontrada diferença entre fumantes e não fumantes expostos ocupacionalmente a substâncias genotóxicas.

Trabalhos na literatura científica que enfatizam a influência do tempo de tabagismo são escassos, contudo pelos resultados discutidos até aqui, as variáveis que aparecem com maior frequência na associação com os micronúcleos é a quantidade de cigarros consumidos (GABRIEL et al., 2006; DeMARINE, 2004; WU et al., 2004; BONASSI et al., 2003; BURGAZ et al., 1995) e os hábitos tabagistas (DE MARINE, 2004; GABRIEL et al., 2006; SUHAS et al., 2004; WU et al., 2004; BONASSI et al., 2003; MARTINS;FILHO, 2003; BURGAZ et al., 1995; REALI et al., 1987).

4.3.3 Perspectivas e aplicações da biomonitoração em hábitos tabagistas.

Mutagênicos podem ser encontrados na urina, principalmente quando os indivíduos estão expostos a agentes químicos. Em situações em que o hábito tabagista representa uma fonte de contaminação com esses mutagênicos, as células do uretélcio são um alvo para a ação desses elementos que podem induzir efeitos genotóxicos e aumentar a probabilidade de desenvolver câncer pela absorção e excreção desses mutagênicos (SALAMA et al., 1999). Nesse ponto, o teste do micronúcleo é uma ferramenta para sinalização desses efeitos e uma indicação para uma possível progressão de doenças mais complexas (STICH et al., 1982). É importante considerar que os micronúcleos não representam o dano original na célula que está

sendo expresso, mas sim célula-mãe ou precursoras desta. A expressão do micronúcleo está condicionada a pelo menos um processo de divisão celular (FENECH, 2000).

Em se falando de biomonitoração, há um preocupação em se estabelecer uma relação de causa e efeito, ou seja, um agente responsável por uma resposta biológica. Nesse caso, objetos de estudo elencados nessa pesquisa, a saber, o Chumbo-210 e o micronúcleo podem lançar luz a respeito da previsão do risco a qual os fumantes estão sujeitos. No entanto, a análise dos componentes principais (ACP) e a regressão logística (ANEXO C2) aqui aplicados sugerem que a correlação entre esses dois elementos não é significativa, ou seja, a contribuição única do ^{210}Pb para a frequência de micronúcleos em fumantes provavelmente é mínima ou não é tão bem correlacionada como foi apresentado na Figura 31.

Algumas hipóteses podem ser sugeridas para que esse tipo situação ocorra:

- Fatores como a meia vida biológica e física do ^{210}Pb no corpo humano (SALMON et al., 1999) e a cinética do epitélio urotelial interferem nessa possível relação, uma vez que é mais provável que o dano genético sofrido recentemente nas células basais pode ser refletido sob a forma de micronúcleo nas células esfoliativas mais superficiais (FONTANA et al., 2001; FENECH et al., 1999a).
- A ação de mutagênicos aneugênicos podem também participar na contribuição para a expressão de micronúcleos em células esfoliativas da urina (TITENKO-HOLLAND et al., 1994).

No geral, a literatura científica reporta trabalhos em que os micronúcleos em células esfoliativas têm a contribuição de ações clastogênicas para a sua formação. Um estudo conduzido por Rosin e Anwar (1992, apud FONTANA et al., 2001) observaram que indivíduos fumantes parasitados pelo *Schistosoma haematobium* apresentaram maior quebra de cromossomos em células esfoliativas da bexiga.

Martino-Roth e col. (2002) justificaram o aumento significativo na frequência de micronúcleos em células esfoliativas da mucosa bucal em trabalhadores de reciclagem de baterias devido ao contato com o chumbo, um elemento reconhecidamente genotóxico que causa quebra de cromossomos.

Estudos prévios revelam que elementos clastogênicos presentes em urina fracionada de fumantes foram responsáveis pelo aumento de aberrações cromossômicas em cultura de células oriundas do ovário de hamster. Neste trabalho foi proposto que elementos clastogênicos presentes na urina de tabagistas podem atuar na produção de espécie de oxigênio ativo (DUNN;CURTIS, 1985). Dunn e Curtis (1985) ressaltaram ainda que o material orgânico necessário para causar aberrações cromossômicas na cultura não foi maior em relação aos níveis encontrados na urina que está em contato com a bexiga humana. Entretanto, não foi relatado se tais elementos eram radioativos.

A atuação clastogênica envolvendo elementos radioativos foi estudado em indivíduos expostos ao Césio-137, um emissor beta, em uma área contaminada na ilha de Taiwan, que apresentaram maior frequência de danos no DNA em células esfoliativas e epiteliais da bexiga, o que leva a um aumento no risco de câncer no futuro (JEN et al., 2002).

Apesar da maioria dos trabalhos pesquisados não correlacionarem diretamente os teores dos agentes clastogênicos, especificamente o ^{210}Pb e a frequência de micronúcleos na mesma matriz biológica, e levando-se em consideração que os fumantes apresentam maiores concentrações desse radionuclídeo, é possível que a cadeia de decaimento do ^{210}Pb contribua minimamente para causar dano ao DNA nas células esfoliativas dos fumantes, por meio dos efeitos diretos e indiretos da radiação.

As radiações emitidas pelo Chumbo-210 e o Bismuto-210 poderiam contribuir diretamente com o dano ao DNA das células basais, através da quebra da molécula (ação direta), ou juntamente com a partícula alfa do ^{210}Po , ao interagir com as moléculas de água na urina produzindo radicais livres capazes de promover quebras no DNA (ação indireta), pois tal ação em meio aquoso tem maior predominância (TIWARI et al., 2008; DeMARINI, 2004; DIZDAROGLU et al., 2002; DUNN;CURTIS, 1985) e o alvo são as células basais do uretélcio (FONTANA et al., 2001; FENECH et al., 1999b). Entretanto estudos mais específicos são necessários para verificar essa forma de atuação.

Por outro lado, provavelmente a contribuição do Chumbo para frequência de MN seja afetada pela dinâmica de excreção desse elemento, o que depende principalmente das características fisiológicas de cada indivíduo e, levando-se em consideração sua eliminação lenta, bem como suas características radiológicas (SALMON et al., 1999). No entanto, os mecanismos exatos da cinética e extensão dos danos causados pelo ^{210}Pb não são totalmente conhecidos (MOREIRA; MOREIRA, 2004; SADÃO, 2002). A cinética do próprio epitélio urotelial é outro fator a ser observado.

A velocidade com que há renovação desse tecido é um parâmetro relevante, pois são necessários de 7 a 16 dias para que elas se descolquem até a superfície e comecem a esfoliar (FENECH et al., 1999a), a elevada taxa de renovação celular pode gerar uma diluição e eliminação dos micronúcleos. Esse é um fator importante para a expressão do dano genético, uma vez que o micronúcleo nas células esfoliativas pode ter resultado de um dano mais recente, instabilidade do DNA causado por anomalias hereditárias ou produzido pelos clones de tais células (LEHUCHER-MICHEL et al., 1996).

No caso dos fumantes, há uma contribuição tanto de agentes químicos aneugênicos quanto dos agentes físicos clastogênicos. Neste caso, o uso de sondas de DNA por hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) pode estabelecer a origem dos micronúcleos por ambos os mecanismos de ações. Em uma pesquisa para verificar a origem dos micronúcleos em células esfoliativas de indivíduos saudáveis, através da utilização de hibridização por fluorescência *in situ*, os resultados indicaram que 43% dos MN eram centrômeros negativos (C⁻) e 57% centrômeros positivos (C⁺), sugerindo a formação espontânea de micronúcleos (TITENKO-HOLLAND et al., 1994).

Por fim, avaliações utilizando o micronúcleo são relevantes para a monitoração do dano genético em células epiteliais, principalmente quando é sabido que a urina de fumantes habituais possuem mutagênicos em quantidades consideráveis. A importância desse fato deve ser enfatizada quando se é levada em consideração a correlação entre aumento da incidência de câncer e hábitos tabagistas (LEHUCHER-MICHEL et al., 1997).

5 CONCLUSÕES

- A eficiência das resinas trocadoras de íons pôde ser observada na separação radioquímica do Chumbo-210 em relação aos outros emissores beta presentes na matriz urina. O que pode ser expresso em um rendimento dentro dos critérios aceitáveis estabelecidos pela ANVISA para os métodos analíticos;
- O Detector Proporcional alfa beta apresentou resposta sensível para matriz urina, através das curvas de calibração construídas, as quais apresentaram o Limite de Detecção de 45mBq e a Eficiência no Platô Beta de 26,6%;
- Os resultados obtidos indicam que os indivíduos não fumantes apresentam valores de concentração de ^{210}Pb menores que 45 mBq, justificável pela exposição mínima a este elemento. Os fumantes apresentaram as maiores concentrações, indicando assim uma maior exposição ao ^{210}Pb ;
- Fatores como idade, quantidade de cigarros consumidos e tempo de tabagismo não influenciaram as concentrações de ^{210}Pb . Já para as células esfoliativas da urina, as análises estatísticas sugerem que a correlação entre a quantidade de cigarros consumidos e a frequência de micronúcleos tem maior significância. Entretanto, nos resultados aqui encontrados, o Chumbo-210 não apresentou correlação estatisticamente significativa com frequência de micronúcleos, sugerindo uma contribuição mínima deste elemento para formação do bioindicador.
- A padronização e implementação da técnica do micronúcleo em células esfoliativas da urina, no Departamento de Energia Nuclear, permitiu observar que a frequência de micronúcleos em células esfoliativas de fumantes foi significativamente maior em relação aos não fumantes, reforçando que o grupo consumidor de cigarros está sujeito a sofrer mais danos genéticos, aumentando assim a probabilidade de risco de efeitos estocásticos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa pode contribuir para trabalhos futuros voltados para uma investigação mais ampla da atuação dos radionuclídeos naturais que estão presentes em um produto mundialmente consumido e, por esse motivo, uma grande parte da população mundial, que faz uso do tabaco, está exposta a elementos envolvidos no desenvolvimento de doenças como o câncer, principalmente o de bexiga.

Trabalhos de biomonitoração como este podem auxiliar na avaliação do risco que os fumantes estão sujeitos e assim adotar medidas preventivas para evitar tais doenças.

Outro ponto importante foi a avaliação em conjunto das concentrações do ^{210}Pb e a frequência de micronúcleos em células esfoliativas presentes na urina. Trabalhos dessa natureza são raros na literatura científica.

Deste modo, este trabalho contribuiu para a implantação do teste do micronúcleo em células esfoliativas encontradas na urina no Departamento de Energia Nuclear/UFPE. O ganho obtido com esta pesquisa indica a urina como uma matriz complementar e eficiente na biomonitoração em casos de contaminação com radionuclídeos, agregando-se as outras formas de monitoração em que já são realizadas no Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA).

REFERÊNCIAS

- ACS (AMERICAN CANCER SOCIETY). **Lung Cancer: Non- Small Cell. 2012.** Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003115-pdf.pdf>>. Acesso em 5 mar 2012a.
- ACS (AMERICAN CANCER SOCIETY). **Cancer Facts & Figures 2012.** Atlanta: American Cancer Society; 2012b.
- ACS (AMERICAN CANCER SOCIETY). Bladder Cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003085-pdf.pdf>>. Acesso em 21 jun 2015.
- ALAM, M. N.; CHOWDHURY, M. I.; KAMEL, M.; GHOSE, S.; HAMIDA, B.; CHAKABORTY, D. Radioactivity in chemical fertilizers used in Bangladesh. **Applied Radiation Isotopes**, v. 48, p.1165–1168, 1997.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- BAGWE, A. N.; BHISEY, A. R. Occupational exposure to tobacco and resultant genotoxicity in bidi industry workers. **Mutation Research**, v.299, p. 103-109,1993.
- BARBOSA, I. M. S. S. **Quantificação de micronúcleos em linfócitos como dosímetro biológico em pacientes expostas à radiação gama.** Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Energia Nuclear, 2003.
- BASU, A.; GHOSH, P.; DAS, J. K.; BANERJEE, A.; RAY, K.; GIRI, A. K. Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: A comparative Study in three cell types. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.13, p. 820-827, 2004.
- BEASLEY, T. M.; OSTERBERG, C. L.; JONES, Y. M. **Nature**, v. 221, p. 1207-1209, 1969.
- BIGGS, M. L.; KALMAN, D. A.; MOORE, L. E.; HOPENHAYN-RICH, C.; SMITH, M. T.; SMITH, A. H. Relationship of urinary arsenic to intake estimates and a biomarker of effect, bladder cell micronuclei. **Mutation Research**, v. 386, p. 185-195, 1997.
- BIRDER, L.; ANDERSON K. E. Urothelial signaling. **Physiological Reviews**, v. 93, p.653-680, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 132 p. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigitel Brasil 2013: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico** - Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal

em 2013. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 132 p. 2014.

BONASSI S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, YI-PING.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutation Research**, v.543 p.155–166, 2003.

BONASSI, S.; BIASOTTI, B.; KIRSCH-VOLDERS, M.; KNASMÜELLER, S.; ZEIGER, E.; BURGAZ, S.; BOLOGNESI, C.; HOLLAND, N.; THOMAS, P.; FENECH, M. State of the art survey of the buccal micronucleus assay—a first stage in the HUMN_{XL} project initiative. **Mutagenesis**, v. 24, n.4, p. 295–302, 2009.

BONASSI, S.; COSKUN, E.; CEPPI, M.; LANDO, C.; BOLOGNESI, C.; BURGAZ, S.; HOLLAND, N.; KIRSH-VOLDERS, M.; KNASMUELLER, S.; ZEIGER, E.; CARNESOLTAS, D.; CAVALLO, D.; SILVA, J.; ANDRADE, V. M.; DEMIRCIGIL, G. C.; ODIO, A. D.; DONMEZ-ALTUNTAS, H.; GATTAS, G.; GIRI, A.; GIRI, S.; MEDA-GÓMEZ, B.; ARROYO, S. G.; HADJIDEKOVA, V.; HAVERIC, A.; KAMBOJ, M.; KURTESHI, K.; MARTINO-ROTH, M. G.; MONTOYA, R. M.; NERSESYAN, A.; PASTOR-BENITO, S.; SALVADORI, D. M. F.; SHAPOSHIKOVA, A.; STOPPER, H.; THOMAS, P.; TORRES-BUGARÍN, O.; YADAV, A. S.; GONZÁLEZ, G. Z.; FENECH, M. The Human Micronucleus Project on exfoliated buccal cells (HUMN_{XL}): The role of life-style, host factors, occupational exposure, health status and assay protocol. **Mutation Research**, v. 728, p. 88-97, 2011.

BRUENGER, F. W.; STEVENS, W.; STOVER, B. J. The association of ²¹⁰Pb with constituents of erythrocytes. **Health Physics**, v. 25, p. 37-42, 1973.

BUENO, L. **Análise de radionuclídeos naturais e chumbo em produtos alimentícios e dietas**. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de São Paulo. IPEN, 1999.

BURGAZ, S.; IŞCAN, A.; BÜYÜKBİNGÖL, Z. K.; BOZKURT, A.; KARAKAYA, A. E. Evaluation of micronuclei in exfoliated urothelial cells and urinary thioether excretion of smokers. **Mutation Research**, v.335, p. 163-169, 1995.

BURNS, D. M.; LEE, L.; SHEN, L. Z.; GILPIN, E.; TOLLEY, H. D.; VAUGHN, J., SHANKS, T. G. **Cigarette Smoking Behavior in the United States**. Chapter 2, Smoking and Tobacco Control Monograph No. 8, p. 14-112. Disponível em: <http://www.researchgate.net/profile/David_Burns5/publication/230746283_Birth-Cohort-Specific_Estimates_of_Smoking_Behaviors_for_the_US_Population/links/547928b60cf2a961e48781cf.pdf>. Acesso em 11 mar 2015.

CANCER RESEARCH UK. Bladder Cancer Statistics. Disponível em: <<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/bladder-cancer#heading-Zero>>. Acesso em 21 jun 2015.

CAPITANI, E. M. Diagnóstico e tratamento da intoxicação por chumbo em crianças e adultos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 42. n. 3 p. 319-29, 2009.

CARRARD, V. C.; COSTA, C. H.; FERREIRA, L. A.; LAUXEN, I. S. RADOS, P. V. Teste dos micronúcleos – Um biomarcador de dano genotóxico em Células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v.48, p.77-81, 2007.

CHIECO, P.; DEREZINI. The Feulgen reaction 75 years on. **Histochemistry and Cell Biology**, v.111 p. 345–358, 1999.

CID, M. G.; LORIA, D.; VILENSKY, M.; MIOTTI, J. L.; MATOS. E. Leather tannig workers: chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes and micronuclei in exfoliated cells in urine. **Mutation Research**, v. 259, p.197-201, 1991.

COHEN, B. S.; EISENBUD, M.; HARLEY, N. H.; Measurement of the alpha radioactivity on the mucosal surface of the human bronchial tree. **Health Physics**, v. 39, p 619-632, 1980.

COSTA-JÚNIOR, C. E. O. **²¹⁰Pb em urina de habitantes de áreas com anomalias radioativas naturais no estado de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Energia Nuclear, 2011.

COSTA-JÚNIOR, C. E. O.; SILVA, E. B.; SILVA, C. M.; SANTOS-JÚNIOR, J. A. Estimação da dose de radiação por incorporação de Pb-210 nos ossos de habitantes de Recife/Pernambuco, Brasil. **Scientia Plena**, v.9 p.1-10, 2013a.

COSTA-JÚNIOR, C. E. O.; SILVA, E. B.; AMARAL, A.; SILVA, C. M.; SANTOS-JÚNIOR, J. A. Pb-210 irradiation dose estimation for inhabitants living in high natural background areas on Pernambuco/Brazil. **International Journal of Low Radiation**, v. 9, p.12-22, 2013b.

DeMARINI, D. M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. **Mutation Research**, v.567, p. 447-4474, 2004.

DEMPSEY, R.; COGGINS, C. R. E.; ROEMER, E. Toxicological assessment of cigarette ingredients. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 61, p. 119-128, 20011.

DINDGIRE, S. L.; GOSAVI, S.; KUMAWAT, R. M.; GANVIR, S. HAZAREY. Comparative study of exfoliated oral mucosal cells micronucleus frequency in potentially malignat and malignant lesions. **International Journal of Oral & Maxillofacial Pathology**, vol.3, p. 15-20, 2012.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCIIOGLU, M.; RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and Measurement. **Free Radical Biology & Medicine**,v. 32, p. 1102-1115, 2002.

DOLL R. The first reports on smoking and lung cancer. **Clio Medica** v. 46, p.130–142, 1998.

DUARTE, J. L.; FARIA, F. A. C.; CEOLIN D. S.; CESTARI, T. M.; ASSIS, G. F. Efeitos da inalação passiva da fumaça de cigarro sobre as pregas vocais de ratos. **Revista Brasileira de Otorrinolarigologia**, v. 72, n.2, p. 210-216, 2006.

DUNN, B. P.; CURTIS, J. R.; Clastogenic agents in the urine of coffee drinkers and cigarette smokers. **Mutation Research**, v. 147, p.179-188, 1985.

EISENBUD, M.; GESELL, T. **Environmental radioactivity**: from natural, industrial, and military sources. New York: Academic Press, 1997. 656 p.

ENVIRONMENTAL HEALTH & SAFETY. **Radionuclide safety data sheet: Pb-210/Bi-210/Po210**. Health Physics, Stanford University. Disponível em: <http://web.stanford.edu/dept/EHS/prod/researchlab/radlaser/RSDS_sheets/Pb-210.pdf>. Acesso em 3 mar 2015.

ESPINOZA, F.; SILVERMAN, D.; KOGEVINAS, M.; CREUS, A.; FERNÁNDES, F.; GARCÍA-CLOSAS, M.; TARDON, A.; GARCÍA-CLOSAS, R.; SERRA, C.; CARRATO, A.; ROTHMAN, N.; DOSEMECI, M.; MALATS, N. MARCOS, R. Micronuclei assessment in the urothelial cells of women using hair dyes and its modulation by genetic polymorphisms. **Cancer Letters**, v. 263, p. 256-266, 2008.

ESSON, K.; LEEDER, S. The Millennium Development Goals and Tobacco Control. WHO, Geneve, 2004.

EZZATI, M.; LOPEZ, A.D. Estimates of Global Mortality Attributable to Smoking in 2000. **Lancet**, v. 362, n.9387, p. 847-852, 2003.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The HUMAN MicroNucleus Project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428, p. 271–283, 1999a.

FENECH, M.; CROFT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, Apoptosis, cytotoxicity and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, pp 605-612, 1999b.

FENECH, M. A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. **Mutagenesis**, v.15 p.329–336, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p.1084–1104, 2007.

FENECH, M.; BOLOGNESI, C.; KIRK-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMÜLLER, S.; HOLLAND, N. Harmonization of the micronucleus assay in human buccal cells – a Human Micronucleus (HUMN) project (www.humn.org) initiative commencing in 2007. **Mutagenesis**, v. 22, p. 3-4, 2007.

FENECH, M.; BONASSI, S. The effect of age, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis**, v.26, p. 43-49, 2011.

FERNANDES, T. S. **Emprego das Aberrações Cromossômicas Instáveis e Micronúcleos no Biomonitoramento Individual: Estudo Comparativo**. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Energia Nuclear, 2005.

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. ARIAS, F. A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Ecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 347-354, 2008.

FONTANA, F.; LASFARGUES, G.; UGHETTO, S.; ROGIER, S. MASDIEU, E.; LAFAURE, M.; AUBLET-CUVELIER, B.; CATALINA, P. The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: application in genotoxicity study of workers exposed to a mineral jelly containing sodium nitrite and N-phenyl-1-naphthylamine. **Mutagenesis**, v. 16, n.5, p. 449-452, 2001.

FORTIN, F.; ANGHEL, T.; BROCHU, P.; LEMIEUX, N. Optimizing urothelial cell preparation for the human urinary micronucleus assay. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1821-1827, 2010.

GABRIEL, H. E.; CROTT, J. W.; GHANDOUR, H.; DALLAL, G. E.; CHOI, S.W.; KEYES, M. K.; JANG, Z. L.; NADEAU, M.; JOHNSTON, A.; MARGER, D.; MASON, J.B. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 835-841, 2006.

GAIROLA, C. G.; WU, H.; GUPTA, R. C.; DIANA, J. N. The mainstream and side stream cigarette smoke induced DNA adducts in C7B1 and DBA mice. **Environmental Health Perspective**, v.99, p. 253-261, 1993.

GANDHI, G.; SHARMA, P.; KAUR, A.; BADARUDDOZA. The Micronucleus Test in urothelial cells and uterine smears of cervix cancer patients: A comparison. **International Journal of Human Genetics**, v.3, p.121-126, 2003.

GODOY, J. M.; GOUVEA, M. D. R.; AZEREDO, A. M. G. $^{226}\text{Ra}/^{210}\text{Po}/^{210}\text{Pb}$ equilibrium in tobacco leaves. **Radiation Protection Dosimetry**, v.45, p. 289-300, 1992.

GODOY, J. M.; LAURIA, D. C., GODOY, M.^aLUIZA, D. P.; CUNHA R. P. Developement of a sequential method for the determination of ^{238}U , ^{234}U , ^{232}Th , ^{230}Th , ^{228}Th , ^{228}Ra , ^{226}Ra and ^{210}Pb in environmental samples. **Journal Radioanalytical Nuclear Chemistry**, v. 182, n. 1, p. 165-169, 1994.

GODOY, J. M.; MOREIRA, I.; WANDERLEY, C.; SIMÕES FILHO, F. F.; MOZETO, A. A. An alternative method for the determination of excess ^{210}Pb in sediments. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 75, p. 111-115, 1998.

GUILMETTE, R. Why ^{210}Po ? **Health Physics News**. v. 35, n. 2, p. 3-9, 2007.

GUYTON, C. A.; HALL, J. E. **Fisiologia humana e mecanismos de doenças**. Editora Guanabara Koogan. Ed. 6^a. Rio de Janeiro, 1998.

HECK, N. C. Troca Iônica. ENG06631 - Metalurgia Extrativa dos Metais Não-Ferrosos I-A. UFRGS / DEMET. Disponível em < <http://www.ct.ufrgs.br/ntcm/graduacao/ENG06631/TrocaIonica.pdf>>. Acesso em 3 fev 2010.

HILL, C. R.; JAWOROWSKI, Z. S. Lead-210 in Some Human and Animal Tissues. **Nature**. v. 190, p.353-354, 1961.

HÖLGYE, Z. Excretion rates of ^{210}Po and ^{210}Pb in Prague inhabitants. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 156, p. 1-6, 2013.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMÜELLER, S.; FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as atool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**, v. 659, p. 93-108, 2008.

HOLTZMAN, R. B. Measurement of the natural contents of RaD (Pb-210) and RaF (Po-210) in human bone – estimates of whole – body burdens. **Health Physics**, v. 9, p. 385-400, 1963

HURSH, J. B. Natural Lead-210 Content of Man. **Science**. v. 2, n. 132, p. 1666-1667, 1960.

HUSSEIN, E. M. Radioactivity of phosphate ore, superphosphate and phosphogypsum in Abu- Zaabal phosphate plant, Egypt. **Health Physics**, v. 67, p 280–282, 1994.

HYNE, R. V.; MAHER, W. A. Macroinvertebrate Biomarkers: Links to Toxicosis and Changes in Population or Communities. Cooperative Centre for Freshwater Ecology. University of Canberra. Australia. Cooperative Research Centre for Freshwater Ecology. Technical Report ScD5, 2000.

IGLESIAS, R.; JHA, P.; PINTO, M.; COSTA E SILVA, V. L.; GODINHO, J. **Controle do Tabagismo no Brasil. Documento de Discussão – Saúde, Nutrição e População (HNP)**. Banco Internacional para Reconstrução e Desenvolvimento/ Banco Mundial. Washington, DC, 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, v. 38, Tobacco Smoking. Lyon, France: IARC; 1986.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP 60). Recommendations of the International Commission on Radiological Protection 1990. **ICRP Publication 60**. ICRP 21. (1/3), 1991.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP 67). Age-Dependent Doses to Members of Public from Intake of Radionuclides: Part 2, Ingestion Dose Coefficients. **Publication 67**, Ann. ICRP 23. (3/4). Oxford: Pergamon Press, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA (IBGE). **Tabagismo. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios**. ISBN 978-85-240-4101-3. Rio de Janeiro, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). BRASIL, Ministério da Saúde **Abordagem e Tratamento do Fumante-Consenso 2001**. Rio de Janeiro: INCA, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). BRASIL, Ministério da Saúde. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. – Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INSTITUTO DE RADIOPROTEÇÃO E DOSIMETRIA (IRD). Manual de procedimentos técnicos do Departamento de Proteção Radiológica Ambiental. CNEN - Rio de Janeiro. 1983.

JAWOROWSKI, Z. Radioactive lead in the environment and in the human body. **Atomic Energy Review**, v.7, p. 3–45, 1969.

JAWOROWSKI, Z.; KOWNACKA, L. Lead and radium in the lower stratosphere. **Nature**, v. 263, p. 303–304, 1976.

JEFFERSON, R. D.; GOANS, R. E.; BLAIN, P.G. THOMAS, S. H.L. Diagnosis and treatment of Polonium poisoning. **Clinical Toxicology**, v. 47, p. 379-392, 2009.

JEN, M. H.; HWANG, J. J.; YANG, J. Y.; NABYVANETS, Y. B., WANHWA, A. H.; TSAI, M. H.; GUO, S.D.; CHANG, W. P. Micronuclei and nuclear anomalies in urinary exfoliated cells of subjects in radionuclide-contaminated regions. **Mutation Research**, v. 520, p. 39-46, 2001.

JIA, G.; TORRI, G. Determination of ^{210}Pb and ^{210}Po in soil or rock samples containing refractory matrices. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 65, p. 1-8. 2007.

JULIÃO, L. M. Q. C.; SOUSA, W. O.; SANTOS, M. S.; FERNANDES, P. C. P. Determination of ^{238}U , ^{234}U , ^{232}Th , ^{228}Th , ^{228}Ra , ^{226}Ra and ^{210}Pb concentration in excreta samples of Inhabitants of a high natural background area. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 105, n. 1-4, p. 379-382, 2003.

KAMETANI, K., IKEBUCHI, H., MATSUMURA, T. AND KAWAKAMI, H. ^{226}R and ^{210}Pb Concentrations in Foodstuffs. **Radioisotopes**, v.30, p.681–683, 1981.

KHATER, A. E.M. Polonium-210 budget in cigarettes. **Journal of environmental radioactivity**, v. 71, p. 33-41, 2004.

KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis**, v. 16, p. 51-58, 2001.

KNEZEVIC, S.; MILACIC, L. J.; NOVAK, V.; UZELAC, V.; NE~ZIC. The Effect of CaNa_2EDTA on Excretion of ^{210}Pb , ^{210}Po and Stable Lead in Cases of Chronic Lead Intoxication. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 79 , n. 1-4, p. 471-472, 1998.

KNOLL, G. F. **Radiation Detection and Measurement**. Third Edition, 1999.

KUNO, R.; ROQUETTI, M. H.; GOUVEIA, N. Conceitos e derivação de valores de referência para biomonitorização humana de contaminantes ambientais. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n.1, p.74-9, 2010.

KUPER, H.; ADAMI, H. O.; BOFFETTA, P. Tobacco use, cancer causation and public health impact. **Journal of Internal Medicine**, v.251, p.455–466, 2002.

LADINSKAYA, L. A.; PARFENOV, Y. D.; POPOV, D. K.; FEDOROVA, A. V. ^{210}Pb and ^{210}Po content in air, water, foodstuffs and the human body. **Archives Environmental Health**, v. 27, p. 254-258, 1973.

LAURIA, D. C.; MARTINS N. S. F.; ZENARO, R. **Monitoração Ambiental**. Instituto de Radioproteção e Dosimetria. Versão 01, Outubro 2003.

LEHUCHER-MICHEL, M. P.; AMARA-MOKRANE, Y. A.; DEVICTOR, B.; CATILINA, P.; BOTTA, A. Micronuclei kinetics of exfoliated urothelial cells. **Mutation Research** , v. 354, p. 1-7, 1996.

LEHUCHER-MICHEL, M. P.; FAVRE-ELOFF, G.; DEVICTOR, B.; DUFFAUD, F.; BOTTA, A. Effect of smoking on micronucleated epithelial cells in smears from uterine cervix. **Carcinogenesis**, v.18, p.749-753, 1997.

LENTNER, C. Geigy scientific tables. **Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition**, 8th ed.; Med. Education Div., Ciba-Geigy Corp.: West Caldwell, NJ, v.1, p 53– 93. 1981.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.57 p. 195-211, 1993.

LOPES DOS SANTOS, P.; WEINBERG, E. M.; PENNA-FRANCA, E. Determinação de ^{210}Po em cigarros e tabaco. **Reviews in Biological Medical Nuclides**, v.2, p. 73–77, 1970.

MACHADO-SANTELLI, G. M.; CERQUEIRA, E. M.; OLIVEIRA, C. T.; PEREIRA, C. A. A. B. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. **Mutation Research**, v.322, p. 203-208, 1994.

MAGNO, P. J.; GROULX, P. R.; APIDIANAKIS, J. C. Lead-210 in air and total diets in the United States during 1966. **Health Physics**, v. 18, p. 383-388, 1970.

MAJER, B. J.; LAKY, B.; KNASMÜLLER, S.; KASSIE, F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutation Research**, v. 489, p. 147-172, 2001.

MARMORSTEIN, J. Lungcancer: Is the increasing incidence due to radioactive polonium in cigarettes? **South Medical Journal**, v.79, p. 145–152, 1986.

MARTELL, E. A. **Critique of current lung dosimetry models for radon progeny exposure**. ACS Symp. Ser, n. 331. ACS, 1987.

MARTELL, E. A. Radioactivity in cigarette smoke. **The New England Journal of Medical Correspondence**, v. 307 p. 309–310, 1982.

MARTINS, K. F.; FILHO, J. B. Determinação da frequência de micronúcleo e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 5, p.43-55, 2003.

MARTINO-ROTH, M.G.; VIÉGAS, J.; AMARAL, M.; OLIVEIRA, L.; FERRIRA, F.L.S.; ERDTMANN, B. Evaluation of genotoxicity through micronuclei test in workers of car and battery repair garages. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 495-500, 2002.

MAVROPOULOS, E. **Hidroxiapatita como removedora de chumbo**. Dissertação (mestrado). Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, 1999.

MAYNEORD, W. V.; HILL, C. R. Spectroscopic Identification of Alpha-Emitting Nuclides in Biological Material. **Nature**, v. 184, p. 667- 669, 1959.

MELI, M. A.; DESIDERI, D.; ROELLI, C.; FEDUZI, L. ^{210}Po determination in urines of people living in Central Italy. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 100, p.84-88, 2009.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS M. **Vogel Análise Química Quantitativa**, 6 ed. LTC Editora, Rio de Janeiro, p. 123-128, 2002.

MINGOTE, R. M. Atividade α total e β total por contagem em detector proporcional com fluxo de gás. **Métodos de Análises**. CDTN. n. 3, p. 1-6, 2006.

MITTELSTAEDT, R. A. Mobilization of cellular calcium-45 and lead-210: effect of physiological stimuli. **Science**, v. 220, p. 308-310, 1983.

MORAES, A. S. **Geoestatística aplicada à geoquímica ambiental no estudo da qualidade dos sedimentos do Rio Tatuoca, complexo industrial portuário de Suape**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Geociências, 2009.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C.; Cinética do Chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 9, p. 167-181, 2004.

MORTADA, W. I.; SOBH, M. A.; EL-DEFRAWY, M. M.; FERAHAT, S. E. Reference intervals of cadmium, lead and mercury in blood, urine, hair and nails among residents in Mansoura City, Nile Delta, Egypt. **Environmental Research Section**, v. 90, p. 104-110, 2002.

MUIKKU, M.; HEIKKINEN, T.; SOLATIE, D.; VESTERBACKA, P. Natural variation in ^{210}Po and ^{210}Pb activity concentrations in urine of Finnish population groups. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 50, p. 531-538, 2011.

MUNDT, L. A.; SHANAHAN, K. **Exames de urina e de fluídos corporais**. Editora Artmed. Ed. 2ª. Porto Alegre, 2012.

MUSSALO-RAUHAMAA, H.; JAAKKOLA, T. Plutonium-239, ^{240}Pu , ^{210}Po contents of tobacco and cigarette smoke. **Health Physics**, v.49, p 296–301, 1985.

NATIONAL COUNCIL ON RADIATION PROTECTION (NCRP). Exposure of the population of United States and Canada from natural background radiation. **Report 94**. National Council on Radiation Protection and Measurements, Bethesda, Maryland, 1987.

NAUMANN, M.; HÄNISCH, K.; HARTMANN, M. Levels of natural radionuclides in human excreta in the Berlin area. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 79 n. 1-4, p. 197-200, 1998.

NERSESYAN, A.; KUNDI, M.; ATEFIE, K.; HERMANN – SCHULTE, R.; KNASMÜLLER, S. Effect of staining procedures on the results micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 15 p. 1835 – 1840, 2006.

NERSESYAN, A.; KUNDI, M.; F., M.; BOLOGNESI, C.; MISIK, MIROSLA.; WULTSCH, G.; HARTMANN, M.; KNASMUELLER, S. Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): A review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk. **Mutation Research**, v. 762, p. 37–51, 2014.

NORPPA, H.; FALCK, G. C. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v.18, p.221–233, 2003.

OLIVEIRA, J. D. F. **Tabagismo e Aspectos Nutricionais, Capítulo 18**. Disponível em: <http://www.fef.unicamp.br/departamentos/deafa/qvaf/livros/alimen_saudavel_ql_af/alimen_saudavel/alimen_saudavel_cap18.pdf> Acesso em 27 fev 2012.

OSBORNE, R. V. Lead-210 And Polonium-210 in human tissues. **Nature**, v. 199, p. 295, 1963.

PALASKARA, S.; JINDAL, C. Evaluation of Micronuclei using Papanicolaou and May Grunwald Giemsa Stain In Individuals With Different Tobacco Habits – A Comparative Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.4, p. 3607-3613, 2010.

PARFENOV, Y. D. Polonium-210 in the environment and in the human organism. **Atomic Energy Review**, v. 12, p. 75–143, 1974.

PASSARELLI, M. M. **Determinação de Urânio e Trítio em Urina de Trabalhadores**. Dissertação (mestrado) Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. 1977.

PERES A. C.; HIROMOTO, G. Evaluation of ^{210}Pb and ^{210}Po in cigarette tobacco produced in Brazil. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 62, p. 115–119, 2002.

PINTO, M. M. P. L.; SANTOS, N. F. G.; AMARAL, A. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. **Radiation and Environmental Biophysics**, v.49, p.567-581, 2010.

PIRES, J. B.; BEZERRA F. F.; LABOISSIERE, F. P.; MIEKELEY, N.; DONANGELO, C. M. Lead levels in erythrocytes and biomarkers of bone turnover in pregnant and lacting women with marginal calcium intakes. **Nutrition Research**, v.21, p. 831-841, 2001.

POMPEO, A. C. L.; CARRERETTE, F. B.; GLINA, S.; ORTIZ, V.; FERREIRA, U.; FONSECA, C. E. C. Câncer de Bexiga – diagnóstico. **Revista da associação médica brasileira**, v. 54, p. 95-104, 2008.

POPOVA, O. N.; TOSKAEV. Contamination of air by lead-210 and polonium-210 in territories with high natural radioactivity. In: T. F. Gesell, W. M. Lowder (Eds.), Natural radiation environment III, (pp. 440–444). Technical Information Center/US Department of Energy, 1980.

PURKIS, S. W.; MUELLER, C.; INTORP, M. The fate of ingredients in and impact on cigarette smoke. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p. 3238-3248, 2011.

RANGARAJAN, C.; GOPALA KRISHUAM, S.; EAPEN, C. D. Global variation of ²¹⁰Pb in air and precipitation. In: E.P. Hardy (Ed.), Health and safety laboratory environmental quarterly. (pp. 163–182) September 1–December 1 1975, HASL-298, New York: USERDA, 1976.

REALI, D.; DI MARINO, F.; BAHRAMANDPOUR, S.; CARDUCCI, A.; BARALE, R.; LOPRIENO, N. Micronuclei in exfoliated urothelial cells and urine mutagenicity in smokers. **Mutation Research**, v.192, p. 145-149, 1987.

REGO, B. The Polonium brief: a hidden history of cancer, radiation, and the tobacco industry. **Isis**, v.100, p. 453–484, 2009.

RODGMAN, A. Some studies on the effects of additives on cigarette mainstream smoke properties. III. Ingredients reportedly used in various commercial cigarette products in the USA and elsewhere. **Beiträge zur Tabakforschung International**, v.21, p. 47–104, 2004.

RODGMAN, A. Some studies on the effects of additives on cigarette mainstream smoke properties. II. Casing materials and humectants. **Beiträge zur Tabakforschung International**, v.20, p. 279–299, 2002.

ROSIACK, L.; STAROŚCIAK, E. Polonium-210 and Lead-210 in urine samples of Warsaw residents. XVII Radiochemical Conference. Czech Technical University in Prague. Booklet of abstracts, p.75, 2014. Disponível em: <https://indico.fjfi.cvut.cz/event/7/session/20/contribution/258.pdf>. Acesso em 3 jun 2015.

ROSIN, M. P. The use of micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 267, p.265-276, 1992.

SADAO, M. Intoxicação por chumbo. **Revista de Oxidologia**, p.37-42, 2002.

SALAMA, A. S.; SERRANA, M.; AU, W. W. Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. **Mutation Research**, v. 439, p. 99-112, 1999.

SALMON, P. L.; BERKOVSKY, V. I.; HENSHAW, D. L. Relative importance of inhalation and ingestion as sources of uptake of ^{210}Pb from the environment. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 78, n. 4, p. 279-293, 1998.

SALMON, P. L.; BONDARENKO, O. A.; HENSHAW, D. L. DOSE210, a semi-empirical model for prediction of organ distribution and radiation doses from long-term exposure to ^{210}Pb and ^{210}Po . **Radiation Protection Dosimetry**, v.82, n.3, p. 175-192, 1999.

SAMUELSSON, C. Radiological effects of polonium in snuff. University of Lund, Department of Radiation Physics, Report LUNFD6/(NFRA-3087), p. 1–17, 1988.

SANTOS-LIMA, C. D.; CHAGAS, C. A. Avaliação da genotoxicidade através da análise do micronúcleo em produtores de hortaliças expostos a pesticidas. XVIII CONIC e II CONITI. Centro de Tecnologia e Geociências – Universidade Federal de Pernambuco, 2010. Disponível em: < http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2010/conic/pibic/40/Resumo_CONIC_10040511PO.pdf>. Acesso em 2 jun 2015.

SANTOS, P. L.; GOUVEA, R. C.; DUTRA, L. R. Concentrations of ^{210}Pb and ^{210}Po in hair and urine of workers, of the uranium mine at Poços de Caldas (Brasil). **The Science of the Total Environment**, v.148, p.61-65, 1994.

SANTOS, P. L.; GOUVEA, R. C.; DUTRA, I. R. Human occupational radioactive contamination from use of phosphate fertilizers. **The Science of the Total Environment**, v. 162 p. 19-22, 1995.

SANTOS JÚNIOR, J. A.; AMARAL, R. S.; SILVA, C. M.; MENZES, R. C. S.; BEZERRA, J. D. B. Estudo Comparativo Entre Detectores Estudo comparativo entre os detectores HPGe e NaI(Tl) na determinação de ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K em amostras de solo. **Scientia Plena**. v. 5, n.4 p.1-16, 2009.

SANTOS, J. D. P.; SILVEIRA, D. V.; OLIVEIRA, D. F.; CAIAFFA, W. T. Instrumentos para Avaliação do Tabagismo: Uma revisão sistemática. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 12, p. 4707-4720, 2011.

SANTOS, U. P.; ISSA, J.; KALIL FILHO, R.; CARVALHO, C. R. R. A tragédia de um legado Americano. **Scientific American Brasil**, n. 55, p. 6 -13, 2013.

SASCO, A. J.; SECRETAN M. B.; STRAIF. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. **Lung Cancer**, v. 45 n.2, p. 53-59, 2004.

SCHAYER, S. R.; QU, Q.; WANG, Y.; COHEN, B. S. ^{210}Pb : a Predictive Biomarker of Restrospective Cigarette Smoke Exposure. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, n. 19, v. 2, p. 338-350, 2010.

SCHIFER, T. S.; BOGUSZ-JUNIOR, S.; MONTANO, M. A. E. Aspectos toxicológicos do Chumbo. **Informa**, v.17, p. 67-72, 2005.

SCHOUW, N. L.; DANTERAVANICH, S.; MOSBAECK, H.; TJELL, J. C. Composition of human excreta, a case study from Southern Thailand. **Science of the Total Environment**, v. 286, p. 155–166, 2002.

SILL, C. W.; WILLIS, C. P. Radiochemical Determination of lead-210 in mill products and biological materials. Health and Safety Division, U.S. Atomic Energy Commission, Idaho Falls, **Analytical Chemistry**, v. 37, n. 13, 1965.

SILVA, C. M.; AMARAL, R. S.; TABOSA, J. N.; SANTOS JÚNIOR, J. A.; MENEZES, R. S. C.; FARIAS, E. E. G.; BEZERRA, J. D.; SILVESTRE, R. G.; OLIVEIRA, G. F. ^{210}Pb in Forage Consumed by Dairy Cows. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, p. 943-946, 2009.

SILVA, C. M.; AMARAL, R. S.; SANTOS JÚNIOR, J. A.; MENEZES, R. S. C. ^{210}Pb em sal mineral consumido por bovinos leiteiros da região do agreste semi-árido de Pernambuco. **Scientia Plena**, v.7, p.1-11, 2011.

SILVA, C. M. **Urânio, Radônio-222 e Polônio-210 em águas de abastecimento público da região metropolitana do Recife**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Energia Nuclear, 2000.

SILVA, L. R. S. **Detecção de Micronúcleo em Hemócitos de *Biomphalaria glabrata* exposto a Radiação Gama de ^{60}Co** . Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Energia Nuclear, 2010.

SISTI, D.; ROCCHI, M. B. L.; MELI, M. A.; DESIDERI, D. ^{210}Po Log-normal distribution in human urines: Survey from Central Italy people. **Toxicology Mechanism and Methods**, v. 19, p. 197-201, 2009.

SKWARZEC, B.; ULATOWSKI, J.; STRUMINSKA, D. I.; BORYLO, A. Inhalation of ^{210}Po and ^{210}Pb from cigarette smoking in Poland. **Journal of Environmental Radioactivity**, v.57, p.221-230, 2001a.

SKWARZEC, B.; STRUMIŃSKA, D. I.; ULATOWSKI, J.; GOŁĘBIEWSKI, M. Determination and distribution of polonium ^{210}Po in tobacco plants from Poland. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, inpress, 2001b.

SKWARZEC, B.; STEPNOWSKI, P. Polon w ekosystemie Bałtyku. Lab 2, AGA, **Analytical, Warszawa**, v.2, p. 9–10, 1998.

SMITH, C. J.; LIVINGSTON, S. D.; DOOLITTLE, D. J.; An international literature survey of 'IARC Group I carcinogens' reported in mainstream cigarette smoke. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 1107–1130, 1997.

SPENCER, H.; HOLTZMAN, R. B.; KRAMER, L.; ICEWICZ, F. H. Metabolic balances of ^{210}Pb and ^{210}Po at natural levels. **Radiation Research**. v. 69, p. 166-184, 1977.

STANNARD, J.N. **Radioactivity and health: A history**. Washington, DC: US Department of Energy, 1988.

STICH, H.; CURTES, J.; PARIDA, B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. **International Journal of Cancer**, v.30, p. 553-558, 1982.

STRASINGER, S. K.; DI LORENZO, M. S. *Urinálise e fluidos corporais*. 5ª edição, Editora Livraria Médica Paulista, São Paulo, 2009.

SUHAS, S.; GANAPATHY, K.S.; RAMESH, GAYATRIDEVI, C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. **Mutation Research**, v. 561, p.15–21, 2004.

SULLIVAN, L. P.; GRANTHAM, J. J. **Physiology of the Kidney**, 2nd ed.; Lea & Febiger: Philadelphia, PA, p. 236, 1982.

THIERENS H, VRAL A. The micronucleus assay in radiation accidents. **Ann Ist Super Sanità**, v.45, p.260-264, 2009.

THOMAS, P.; HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMÜELLER, S.; FENECH, M. Buccal micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v.4, p.295-302, 2009.

TITENKO-HOLLAND, N.; MOORE, L. E.; SMITH, M. T. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. **Mutation Research**, v. 312, p. 39-50, 1994.

TIWARI, P.; KUMAR, A.; BALAKRISHNAN, S.; KUSHWAHA, H.S.; MISHRA, K.P. Radiation-induced micronucleus formation and DNA damage in human lymphocytes and their prevention by antioxidants thiols. **Mutation Research**, v. 676, p.62-68, 2009.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v. 271, p. 69-77, 1992.

TURNER, R. C.; RADLEY, J. M.; MAYNEORD, W. V. Alpha-Ray Activities of Humans and their Environment. **Nature** , v.181, p. 518-521, 1958.

UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION. Ionizing radiation (UNSCEAR): sources and effects. New York: United Nations, 1982.

UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION (UNSCEAR). Report. Ionising Radiation Levels and Effects. Report to the General Assembly, with annexes. New York: United Nations, 1988.

VIEGAS, C. A. A. Formas não habituais de uso do tabaco. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.34, p.1069-1073, 2008.

VIEIRA, S. **Análise de variância: ANOVA**. São Paulo: Atlas, 2006. 206 p.

WATSON, A. P. Polonium-210 and Lead-210 in Food and Tobacco Products. Transfer Parameters and Normal Exposure and Dose. **Nuclear Safety** , v.26, p. 179–191, 1985.

WARNER, M. L.; MOORE, L. E.; SMITH, M. T.; KALMAN, D. A.; FANNIG, E.; SMITH, A. H. Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest

arsenic-contaminated water in Nevada. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 3, p. 583-590, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Environmental health criteria 165: inorganic lead. Geneva: **World Health Organization**; 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The World Health Report (Relatório Mundial de Saúde). Genebra: Organização Mundial da Saúde, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Nações Unidas. Conselho Econômico e Social, Força-Tarefa Ad hoc Inter- Agências para o Controle do Tabaco**, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Report: Mortality Attributable to tobacco. ISBN 978 92 41564434, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The World Health Report. **Shaping the Future**. ISSN 1020-3311, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World health statistics. ISBN 978 92 4 156458 8, 2013.

WU, P. A.; LOH, C.H.; HSIEH, L. L.; LIU, T. Y.; CHIEN-JEN, C.; LIOU, S. H.; Clastogenic effect for cigarette smoking but no areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. **Mutation Research**, v. 562, p. 27-38, 2004.

YAPRAK, G.; UYSAL, B. Determination of low level ^{210}Pb in tobacco. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 229, p.153–155, 1998.

YAMAMOTO, M.; HINOIDE, M.; OHKUBO, Y.; UENO, K. Concentration of ^{226}Ra in human teeth. **Health Physics**, v. 67, n. 5, p. 535-540, 1994.

YOKOYA, A.; SHIKAZONO, N.; FUJI, K.; URUSHIBARA, A.; AKAMATSU, K.; WATANABE, R. DNA damage induced by direct effect or fadiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 77, p. 1280-1285, 2008.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Título do Projeto: **“Chumbo-210, Polônio-210 em urina e frequência de micronúcleos da mucosa bucal como indicadores da exposição radiológica em fumantes e não fumantes”**

Pesquisador Responsável: Carlos Eduardo de Oliveira Costa Júnior

Instituição a que pertence: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço onde o pesquisador pode ser encontrado: Av. Prof.º Luiz Freire, Nº1000. Cidade Universitária CEP: 50740-540. Recife-PE. Departamento de Energia Nuclear.

Telefones para contato: (081) 9946-5120

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – CCS/UFPE

Contato: Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, Sala 4, Cidade Universitária, Recife-PE/ Brasil. CEP: 50740-600

Telefone/Fax do CEP: (81) 2126-8588

E-mail do CEP: *cepccs@ufpe.br*

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

Responsável legal (quando for o caso): _____

R.G. Responsável legal: _____

O Sr. (a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa **“Chumbo-210, Polônio-210 em urina e frequência de micronúcleos da mucosa bucal como indicadores da exposição radiológica em fumantes e não fumantes”**, de responsabilidade da pesquisadora Edvane Borges da Silva.

A avaliação através da análise da urina determina a quantidade de chumbo e polônio inalado pelo indivíduo, sendo importante para o controle da contaminação interna dos fumantes e fumantes passivos. Com os dados das análises de urina e células esfoliativas da mucosa bucal e com modelos estabelecidos, pode-se avaliar o grau de exposição ao chumbo-210 e polônio-210 o risco que está sujeita os usuários de cigarro.

Tendo em vista a importância da monitoração biológica, particularmente na avaliação da exposição a metais pesados, pretende-se avaliar os teores de chumbo-210 e polônio-210 em urina humanas de fumantes, fumantes passivos e não fumantes através de amostras, que consistem tão somente da urina (1,5 litro) do voluntário, coletadas durante 24 horas em recipientes plásticos. Estas serão evaporadas (urina) ou aquecidas em alta temperatura e

posteriormente analisadas. As células da mucosa bucal serão recolhidas, no Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada no Departamento de Energia Nuclear da UFPE, pelo próprio voluntário ao passar cuidadosamente a lâmina histológica pela mucosa bucal, com o auxílio do pesquisador, em seguida as lâminas serão coradas com o corante papanicolau e analisadas em microscópio óptico.

Riscos: Os riscos referem-se ao constrangimento na doação de amostras de urina pelo voluntário e nas respostas ao questionário de hábitos sociais.

Benefícios: O estudo fornecerá meios para que seja realizado o acompanhamento dos indivíduos fumantes e fumantes passivos através da análise da urina, permitindo que, no caso de haver resultados elevados, possa se orientar os voluntários fumantes e fumantes passivos para que os hábitos sociais e/ou as condições de trabalho sejam alterados, de tal forma que se minimize as incorporações desnecessárias.

Privacidade e Confidencialidade: A participação do voluntário nesta pesquisa é livre e desimpedida, podendo o mesmo retirar o seu consentimento a qualquer tempo, caso sinta necessidade para tal.

Os registros da participação no estudo (questionários e termos de consentimento livre e esclarecido) serão mantidos confidenciais. Estes documentos serão guardados na sala da pesquisador responsável pelo projeto, Carlos Eduardo de Oliveira Costa Júnior, no Departamento de Energia Nuclear.

Eu, _____, RG nº _____ declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Ou

Eu, _____, RG nº _____, responsável legal por _____, RG nº _____ declaro ter sido informado e concordado com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Local: _____, _____ de _____ de 2009.

Assinatura do voluntário ou responsável legal

1ª Testemunha

2ª Testemunha

APÊNDICE B – Questionário de hábitos alimentares e de higieneProfissão: **QUESTIONÁRIO DE HÁBITOS ALIMENTARES, SOCIAIS E DE HIGIENE****1) Qual a sua idade?****2) Onde mora? (Região) e quanto tempo?****3) Qual o seu peso e altura?****4) Toma remédio Controlado ou algum outro remédio com frequência?**☐ Sim, qual? _____☐ Não**5) É fumante ?**☐ Sim, a quanto tempo? _____☐ Não☐ Fui. A quanto tempo não fuma? _____**6) Quantos cigarros fuma por dia**☐ mais de 20☐ menos de 20**7) Qual a marca de cigarro você costuma consumir?****8) Faz o consumo de tabaco não fumado**☐ Sim, a quanto tempo? _____☐ Não☐ Fui. A quanto tempo não fuma? _____**9) Mora com fumante ?**☐ Sim, a quanto tempo? _____☐ Não☐ Morei. A quanto tempo não morou? _____**10) Faz uso de bebida alcoólica enquanto fuma?**☐ Sim,☐ Não**11) Consome frutos do mar?**☐ Sim,☐ Não**12) Com que frequência consome frutos do mar?****13) Utiliza água tratada na residência?**☐ Sim☐ Não**14) Se não, de onde você obtém sua água?**☐ Poço☐ Cacimba☐ Riacho☐ Açude**15) Costuma consumir verduras e legumes?**☐ Sim☐ Não**16) De onde vem as verduras e legumes que você consome?**☐ Cultivo próprio☐ Costumo comprar em feiras livres ou em mercados☐ outros _____☐ Não sabe informar**17) Costuma lavar as verduras e legumes com qual água?**☐ Tratada☐ Poço☐ Cacimba☐ Riacho☐ Açude☐ Não lava**18) Costuma consumir leite e derivados da região?**☐ Sim☐ Não**19) Costuma trabalhar com solo?**☐ Sim☐ Não**20) Costuma tomar banho de rio, açude ou riacho?**☐ Sim☐ Não

APENDICE C – Cálculo do Desvio Padrão

O desvio padrão (S) constitui uma medida da precisão de um determinado conjunto de resultados, sendo calculado pela Equação 9.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (9)$$

Aplicando os valores das equações 6, 7 e 8 na equação 9, temos:

$$S = \sqrt{\frac{(0,4842 - 0,676067)^2 + (0,6323 - 0,676067)^2 + (0,9117 - 0,676067)^2}{3-1}} = 0,21$$

O valor médio da inclinação das curvas é obtido pelas médias ponderadas dos valores obtidos da seguinte forma.

$$X = \frac{15,7290 + 12,9440 + 14,1010}{3} = 14,2580$$

ANEXO A1 – Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PROJETO DE PESQUISA

Título: CHUMBO-210, POLÔNIO-210 EM URINA E FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS DA MUCOSA BUCAL COMO INDICADORES DA EXPOSIÇÃO RADIOLÓGICA EM FUMANTES E NÃO FUMANTES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 02820812.1.0000.5208

Pesquisador: Carlos Eduardo de Oliveira Costa Júnior

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 84066

Data da Relatoria: 17/08/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado do estudante Carlos Eduardo de Oliveira Costa Júnior vinculado ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares. A proposta consiste basicamente em um estudo experimental com 45 voluntários fumantes, fumantes passivos e não fumantes visando estabelecer uma correlação entre os indicadores biológicos quantidade de Polônio-210, Chumbo-210 na urina e o teste de micronúcleo em células da mucosa bucal.

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar as concentrações de ^{210}Pb e ^{210}Po em urina, onde o ^{210}Po será determinado indiretamente através do equilíbrio secular com o ^{210}Pb ;
- Avaliar a frequência de micronúcleos (MN) em células esfoliativas da mucosa bucal de fumantes, fumantes passivos e não fumantes de tal forma que seja possível estabelecer se existe uma correlação entre esses indicadores biológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos aos voluntários da pesquisa são aceitáveis e inerentes aos protocolos experimentais do projeto. Os benefícios estão bem delineados e devidamente explicitados no projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um tema bastante interessante que tentar estabelecer uma nova abordagem para mensurar a exposição de humanos fumantes (passivo e ativo) aos agentes do tabaco. A proposta esta bem delineada do ponto de vista técnico-científico. Os critérios de inclusão e exclusão dos voluntários à pesquisa, estão bem delineados e aceitáveis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as cartas de anuência e os currículos estão devidamente anexados e o do termo de consentimento livre e esclarecido estar redigido conforme a legislação.

Recomendações:

Exclusão do termo de consentimento livre e esclarecido para menores, uma vez que, ao definir os novos critérios de inclusão (APÓS SUGESTÃO DO RELATOR) consta que todos os voluntários da pesquisa serão maiores de idade.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO A2 – Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão para início da coleta de dados.
Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE

RECIFE, 28 de Agosto de 2012

Assinado por:

GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO B – Folha de Contagem

[illegible]

ANEXO C1 – Resultado dos Testes Estatísticos

- 1) Regressão Logística Multinomial para as concentrações de ^{210}Pb nas amostras de urina dos fumantes:

Likelihood Ratio Tests				
Effect	Model Fitting Criteria	Likelihood Ratio Tests		
	-2 Log Likelihood of Reduced Model	Chi-Square	df	Sig.
Intercept	29,620 ^a	0.000	0	
IDADE	29.975	.355	2	.837
TempoFumando	29.696	.077	2	.962
Ncigarros	30.678	1.059	2	.589
The chi-square statistic is the difference in -2 log-likelihoods between the final model and a reduced model. The reduced model is formed by omitting an effect from the final model. The null hypothesis is that all parameters of that effect are 0.				
a. This reduced model is equivalent to the final model because omitting the effect does not increase the degrees of freedom.				

- 2) Regressão Logística Multinomial para as correlações idade, tempo de tabagismo e quantidade de cigarros consumidos pelos fumantes:

Univariate Tests of Significance Frequencia de Micronúcleo (Pasta1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0.00004	1	0.00004	12.3757	0.00481
IDADE	0.00000	1	0.00000	0.0011	0.97338
TempoFumando	0.00000	1	0.00000	0.0032	0.95545
N-cigarros	0.00003	1	0.00003	8.6930	0.01324
Error	0.00004	11	0.00000		

Descriptive Statistics for Dependent Variables (Pasta1)							
Effect	Level of Factor	N	Frequencia de Micronúcleo Mean	Frequencia de Micronúcleo Std.Dev.	Frequencia de Micronúcleo Std.Err	Frequencia de Micronúcleo -95.00%	Frequencia de Micronúcleo +95.00%
Total		15	0.00680	0.00233	0.00060	0.00550	0.00809
N-cigarros	<20	8	0.00537	0.00118	0.00042	0.00438	0.00636
N-cigarros	>20	7	0.00842	0.00229	0.00086	0.00630	0.01055

ANEXO C2 – Resultado dos Testes Estatísticos

- 3) Regressão Logística Multinomial para as correlações entre a Concentração de ^{210}Pb e frequência de micronúcleo.

Effect	Univariate Tests of Significance Frequencia de Micronúcleo (Pastal)				
	Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0.00065	1	0.00065	155.061	0.00000
Concentração	0.00002	2	0.00001	3.0712	0.08373
Error	0.00005	12	0.00000		