

KARINE SOUZA DA CORREGGIO

Quantificação de dano de DNA no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos da Maternidade do Hospital Universitário – UFSC e correlação com o sangue materno

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre

Co-orientador: Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Correggio, Karine Souza da
Quantificação de dano de DNA no sangue de cordão
umbilical de recém-nascidos da Maternidade do
Hospital Universitário - UFSC e correlação com o
sangue materno / Karine Souza da Correggio ;
orientador, Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro
Onofre, coorientador, Prof. Dr. Sharbel Weidner
Maluf, 2018.
96 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novo, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. Dano de DNA. 3.
Micronúcleos. 4. Cometa. 5. Sangue do cordão
umbilical. I. Onofre, Prof. Dr. Alexandre Sherlley
Casimiro . II. Maluf, Prof. Dr. Sharbel Weidner .
III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novo.
IV. Título.

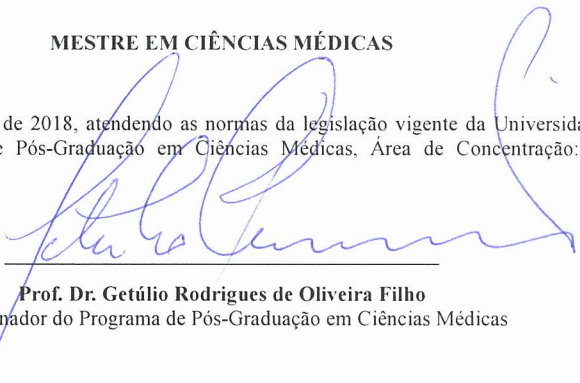
KARINE SOUZA DA CORREGGIO

Quantificação de dano de DNA no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos da Maternidade do Hospital Universitário – UFSC e correlação com o sangue materno

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para obtenção do título de:

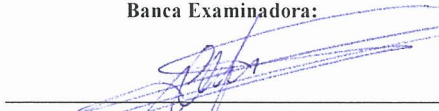
MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS

E aprovada em 12 de março de 2018, atendendo as normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração: **Investigação Biomédica.**



Prof. Dr. Getúlio Rodrigues de Oliveira Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre
Presidente/Orientador



Prof. Dr. Alberto Trapani Junior
Membro



Prof. Dr.ª. Suely Grosseman
Membro

Florianópolis, 2018

*Dedico este trabalho aos meus
filhos, Raphael e Sophia.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e força para concluir mais uma etapa em minha vida profissional.

Aos meus pais, Cleide e Evilásio, pelo exemplo de determinação e perseverança e pelo carinho no cuidado com os netinhos.

Ao Raphael, por esses 16 anos juntos de amor e compreensão, que nos renderam dois lindos seres preciosos e amados: Raphinha e Sophia.

Aos Professores Dr. Alberto Trapani Júnior, Dra. Leisa Beatriz Grando e Dra. Maria Salete Medeiros Vieira por idealizarem o programa de residência médica em Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário – UFSC, do qual terei sempre muito orgulho por ter participado.

Aos meus queridos Professores e amigos Dr. Flávio Luiz Vieira, Dr. Roberto Noya Galluzzo e Dr. Mário Júlio Franco, sempre profissionais exemplares, por me apresentarem de forma apaixonante a Medicina Fetal, por me acolherem com carinho na equipe do HU e por valorizarem meu trabalho também fora do hospital.

Ao Dr. Sérgio Murilo Steffens e ao funcionário e amigo Alécio Carminatti Júnior que muito me incentivaram a ingressar no programa de Mestrado.

Aos meus colegas de Mestrado, Adriana Toledo Gieburowski, Bráulio Leal Fernandes e Roberto Noya Galluzzo e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas - PPGCM pela parceria e incentivo.

Ao meu orientador, Professor Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, por me aceitar como orientanda, por acreditar no meu potencial e por todo apoio durante esses dois anos. Minha sincera admiração e gratidão pelo profissional e pessoa.

Ao querido professor Dr. Marcos José Machado, pela serenidade e competência na elaboração da análise estatística da pesquisa em longas tardes no Centro de Ciências da Saúde.

Aos colegas Dr. Otto Henrique May Feuerschuetten e Sheila Koettker Silveira e aos residentes do programa de Ginecologia e Obstetrícia do HU-UFSC por auxiliarem na coleta e transporte do sangue fetal e por dividirem os anseios dos preparativos da dissertação e artigo.

Aos técnicos de enfermagem da maternidade pelo auxílio na coleta do sangue materno.

Aos profissionais do Laboratório de Genética do Hospital Universitário, especialmente ao Professor Dr. Sharbel Weidner Maluf,

que idealizou e deu suporte à pesquisa, e à Flora Troina Maraslis e à Kamylla Pinheiro pela execução de todos os procedimentos laboratoriais.

À Secretária do PPGCM, Grasiela Cipriani, por toda a atenção e paciência nesses dois anos.

Às pessoas que indiretamente me deram suporte para a realização deste trabalho e que cujos nomes, por ventura, deixo de citar.

Muito obrigada!

*“A journey of a thousand miles begins
with a single step”*

Lao-Tsé, século VI a.C.

RESUMO

O aumento do dano de DNA está envolvido com eventos precoces relacionados à carcinogênese. O feto pode estar suscetível aos efeitos genotóxicos ambientais por exposição transplacentária. Biomarcadores genéticos são amplamente utilizados para quantificar o dano de DNA. Propomos avaliar o dano de DNA em linfócitos do sangue do cordão umbilical (artérias e veia) e do sangue materno aplicando as técnicas do Cometa e CBMN cyt. A correlação entre o dano de DNA pela técnica do Cometa entre recém-nascidos e suas mães foi estatisticamente significativa ($P \leq 0,006$). O dano de DNA pela técnica do Cometa esteve significativamente associado ao consumo de café (veia umbilical), nuliparidade e em mais de uma hora de período expulsivo (veia umbilical e sangue materno). Apesar das mães apresentarem frequências significativamente mais altas de MNi comparadas com os recém-nascidos, não foi observada correlação estatisticamente significativa entre mães e recém-nascidos relacionado a CBMN cyt. Foi encontrada associação positiva entre MNi e idade (sangue materno), escolaridade superior (artérias e veia umbilical) e peso inadequado para idade gestacional (sangue materno). Analgésicos durante a gestação mostraram significância com pontes nucleoplasmáticas (veia umbilical). *Buds* nucleares estiveram significativamente mais elevados em não caucasianas (sangue materno), em recém-nascidos pretermos (artérias umbilicais e sangue materno) e em mais de seis horas de trabalho de parto (artérias umbilicais). A presença de biomarcadores de dano de DNA em recém-nascidos e associação significativa com eventos da gestação e parto sugerem evidências moleculares dos efeitos genotóxicos transplacentários. Entretanto, potencial aumento de risco de doenças degenerativas, como o câncer, nesta população em especial, deve ser cuidadosamente investigado por futuros estudos de coorte.

Palavras-chave: *Dano de DNA, Micronúcleos, Cometa, Sangue do cordão umbilical*

ABSTRACT

Increased DNA damage is associated with early events in carcinogenesis. The fetus may be more susceptible to the effects of the environment by transplacental exposure. Genetic biomarkers are used to assess DNA damage. We purposed to evaluate DNA damage applying Comet and CBMN cyt assay in cells from umbilical cord (arteries and vein) and mother's blood. The correlation between DNA damage frequency by Comet assay from newborns and their mothers was statistically significant ($P \leq 0.006$). DNA damage by Comet assay was significantly associated to coffee consumption (umbilical vein), nulliparity and more than 1 hour of second stage of labor (umbilical vein and mother's blood). Despite of mothers showed significantly higher MNi frequencies compared to their infants, no significant association was observed between mothers and newborns samples related to CBMN cyt. A positive MNi relationship was noticed to age (mother's blood), high educational level (umbilical arteries and umbilical vein) and inappropriate birth weight for gestational age (mother's blood). Analgesics during pregnancy have shown significance on nucleoplasmic bridges (umbilical vein). Nuclear buds increased significantly on no caucasian (mother's blood), on preterm newborns (umbilical arteries and mother's blood), and on more than 6 hours of labor progression (umbilical arteries). The presence of DNA damage biomarkers in newborn, and significant positive associations with pregnancy and birth events, suggest molecular evidences of transplacental genotoxic effect. However, potentially increase risk of degenerative diseases, such as cancers, in this population should be carefully investigated by further prospective cohort studies

Keywords: *DNA damage, Micronucleus, Comet assay, Umbilical cord blood*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Escore visual de dano de DNA pela Técnica do Cometa 42

Figura 2 - Biomarcadores de dano de DNA pelo ensaio do CBMN Cyt44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das Características socio-demográficas da população estudada	45
Tabela 2 - Frequência de dano de DNA pela técnica do Cometa de acordo com sítio de coleta.....	46
Tabela 3 - Características clínico-demográficas da população e dano de DNA pela técnica do Cometa.....	48
Tabela 4 - Condições do nascimento e dano de DNA pela técnica do Cometa	49
Tabela 5 - Frequência de dano de DNA pelo CBMN cyt de acordo com sítio de coleta.....	50
Tabela 6 - Características clínico-demográficas da população e dano de DNA pela técnica CBMN cyt.....	51
Tabela 7 - Condições do nascimento e dano de DNA pela técnica CBMN cyt.....	55
Tabela 8 - Dano de DNA pela técnica do Cometa - Correlação de Spearman entre sangue do cordão e sangue materno.	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

g	Força g ou força centrífuga relativa
®	Marca registrada
h	Hora
M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
° C	Graus Celsius
V	Volts
µl	Microlitro
CBMN cyt	<i>Cytokinesis-block Micronucleus cytome</i> ou Ensaio de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ou ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ou ácido etilenodiamino tetra- acético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EUA	Estados Unidos da América
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HU	Hospital Universitário
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> ou Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

IC	Intervalo de Confiança
IG	Idade Gestacional
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KCl	Cloreto de Potássio
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LMA	Leucemia mielocítica aguda
MNi	<i>Micronuclei</i> ou Micronúcleos
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Alumínio
NBUDs	<i>Nuclear Buds</i> ou <i>Buds</i> Nucleares
NDI	<i>Nuclear Division Index</i> ou Índice de divisão nuclear
NPBs	<i>Nucleoplasmic bridges</i> ou Pontes Nucleoplasmáticas
OR	<i>Odds ratio</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
r_s	Coefficiente de correlação de Spearman
SM	Salários Mínimos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tris	Trisaminometano
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 JUSTIFICATIVA.....	26
1.2 OBJETIVOS	27
1.2.1 Objetivo Geral	27
1.2.2 Objetivos Específicos.....	27
2 REVISAO DA LITERATURA	29
2.1 CÂNCER INFANTIL	29
2.2 EXPOSIÇÃO TRANSPLACENTÁRIA.....	30
2.2.1 Poluição do ar	30
2.2.2 Pesticidas.....	31
2.2.3 Contaminantes na comida	32
2.2.4 Contaminantes na água	33
2.2.5 Radiação.....	33
2.3 INSTABILIDADE GENÔMICA E SUSCETIBILIDADE FETAL	34
2.4 BIOMARCADORES DE DANO DE DNA.....	35
2.4.1 Eletroforese em Gel de Célula Única /Técnica do Cometa	35
2.4.2 Ensaio de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN cyt)	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 DESENHO DO ESTUDO.....	39
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	39
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO ...	39
3.4 AMOSTRA	39
3.5 QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL E DADOS CLÍNICOS	40
3.6 COLETA DE SANGUE.....	40
3.7 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	41
3.7.1 Eletroforese em Gel de Célula Única /Técnica do Cometa	41
3.7.2 Ensaio de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN cyt)	43
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS.....	45

4.1	CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	45
4.2	ANÁLISE PELA ELETROFORESE EM GEL DE CÉLULA ÚNICA OU TÉCNICA DO COMETA	46
4.3	ANÁLISE PELO ENSAIO DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE (CBMN Cyt).....	50
4.4	ANÁLISE MULTIVARIADA.....	57
5	DISCUSSÃO.....	59
6	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICES	77
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	78
	APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL.....	80
	APÊNDICE C – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS.....	88
	APÊNDICE D – INFOGRÁFICO COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE MATERNO E FETAL.....	89
	ANEXO.....	91
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM SERES HUMANOS DA UFSC.....	92

1 INTRODUÇÃO

Das etapas do desenvolvimento humano, o estágio intrauterino é considerado o mais suscetível aos agentes externos (Katic *et al.*, 2010; Fucic *et al.*, 2017). Muitos compostos aos quais a gestante é exposta durante a gravidez podem ser detectados na circulação fetal (Vahakangas, 2011). A rápida proliferação e diferenciação das células fetais as tornam mais sensíveis à ação de xenobióticos, que podem interferir em seu metabolismo. Dessa maneira, até mesmo pequenos períodos de exposição transplacentária a determinados agentes, podem repercutir no organismo por toda a vida (Irigaray *et al.*, 2007; Fucic *et al.*, 2017). Mutações genéticas podem gerar consequências adversas no organismo jovem, incluindo defeitos no desenvolvimento e disfunções no sistema imunológico (Fenech, 2014) e aumento do risco do aparecimento precoce de doenças degenerativas (Fucic *et al.*, 2017).

As células do organismo humano participam de um mecanismo ordenado no qual coexistem replicação e morte celular (Roos *et al.*, 2016). Quando existe um comprometimento da harmonia deste processo, células anormais se multiplicam de maneira desenfreada. As células filhas se tornam cada vez mais anômalas. Células doentes ou senis sobrevivem quando deveriam encerrar seu ciclo celular e novas células se formam onde não são necessárias. Essas células excedentes podem se dividir indefinidamente agrupando-se em formações sólidas conhecidas como tumores. Quanto mais rápido crescerem, mais indiferenciadas forem as células desses tumores e maior for a sua capacidade de infiltração local e disseminação a distância, maior será então seu potencial maligno. Esses tumores malignos também são conhecidos como cânceres (Cotran *et al.*, 2000).

A incidência do câncer no mundo continua a crescer nas últimas décadas e estima-se que foi responsável por mais de sete milhões de mortes em 2012 (Wang *et al.*, 2016). No Brasil, o cenário se assemelha ao panorama mundial. De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), esperam-se cerca de 600 mil novos casos de câncer por ano para o período de 2018 - 2019. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma, ocorrerão cerca de 420 mil casos novos por ano da doença (INCA, 2018).

O câncer, infelizmente, acomete todas as idades. Assim como nos países desenvolvidos, no Brasil o câncer representa a primeira causa de morte por doença entre crianças e adolescentes (8% do total das causas) e sua incidência continua crescendo, embora os motivos ainda permaneçam desconhecidos (INCA, 2018). Segundo o INCA, esperam-se aproximadamente 12.500 novos casos de câncer em crianças e

adolescentes no país para 2018 - 2019. As regiões Sudeste e Nordeste concentrarão a maior parcela de casos novos (5.300 e 2.900 respectivamente), seguidas pela região Centro-Oeste (1.800), Sul (1.300) e Norte (1.200). Os tumores de maior frequência na infância e na adolescência são as leucemias, tumores do sistema nervoso central e linfomas (INCA, 2018).

A etiologia dos tumores malignos na infância é multifatorial e complexa. Alguns estudos concluíram que a exposição materna durante a gestação a fatores ambientais está relacionada ao aparecimento de câncer na infância e adolescência (Pettersson *et al.*, 2004; Latino-Martel *et al.*, 2010; Rumrich *et al.*, 2016; Fucic *et al.*, 2017). Em 2016, uma metanálise incluindo 62 estudos, concluiu que fumar durante a gestação está associado a um aumento no risco de tumores no cérebro e sistema nervoso central (Rumrich *et al.*, 2016). De mesmo modo, em 2004, um estudo revelou um aumento do risco de câncer de testículo nos filhos de mães que fumaram na gestação (Pettersson *et al.*, 2004). O álcool na gravidez também foi responsável pelo aumento no risco de leucemia mielóide aguda na infância segundo uma metanálise de 2010 envolvendo 21 estudos caso-controle (Latino-Martel *et al.*, 2010).

Em nível celular, agentes genotóxicos, como compostos químicos, nanopartículas, radiação e agentes biológicos, tais como vírus, bactérias e parasitas são capazes de gerar dano ao material genético intranuclear. Quando não reparado em tempo, esse dano de DNA sinaliza o crescimento desordenado de tecidos, principalmente quando há disfunção nos diversos processos de manutenção e replicação do genoma (Roos *et al.*, 2016). Não se pode desconsiderar a existência de lesão desencadeada por mecanismos endógenos (causas metabólicas, por exemplo) que, também, comprometem a integridade genômica (De Bont e Van Larebeke, 2004). Os mecanismos envolvidos na instabilidade genômica e no aumento da frequência de mutações incluem defeitos adquiridos ou inatos no reparo do DNA, na replicação do DNA, no controle do ciclo celular e na segregação cromossômica. Esses defeitos podem ser identificados e mensurados por uma frequência elevada de mutações simples ou complexas no genoma, sejam em alterações na sequência de nucleotídeos (substituição ou perda de bases, deleção, inserção ou amplificação de nucleotídeo), quebra de DNA, translocação, inversão e deleção cromossômica ou alterações no número de cromossomos (aneuploidias) (Loeb, 1994; Langie *et al.*, 2015).

Nos últimos 35 anos, estudiosos esforçam-se para relacionar o dano de DNA ao aparecimento do câncer (Bonassi *et al.*, 2007; Gabelova *et al.*, 2008; Synowiec *et al.*, 2008; Lorenzo *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010;

Vasavi *et al.*, 2010). Em 2011, Bonassi *et al* acompanharam numa coorte 6.718 indivíduos saudáveis de 10 países durante o período de 1980 a 2002 e concluíram que o dano de DNA esteve diretamente relacionado ao aparecimento do câncer, em especial de sítio urogenital e gastrointestinal (Bonassi *et al.*, 2011). Mais recentemente, níveis mais elevados de dano de DNA foram associados a câncer de mama (Synowiec *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010), câncer de colo (Gabelova *et al.*, 2008), linfoma de Hodgkin (Lorenzo *et al.*, 2009) e câncer esofágico (Vasavi *et al.*, 2010).

Alguns métodos bioquímicos acessíveis e amplamente validados são capazes de avaliar e quantificar o grau de dano de DNA como o Ensaio de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN cyt) e Técnica de Eletroforese em Célula Única (Técnica do Cometa). O primeiro objetiva identificar um pequeno núcleo ao lado do núcleo original da célula, resultante de uma mutação em nível cromossômico (fragmentação). Esse micronúcleo é um corpúsculo extranuclear que contém material genético como fragmentos de cromossomos/cromátides acêntricas ou cromossomos/cromátides inteiros que se formaram durante a divisão celular. Esse procedimento, modificado pelo bloqueio da citocinese, detecta, também, pontes nucleoplasmáticas originadas de cromossomos dicêntricos, brotos nucleares originados de amplificação gênica por intoxicação, células apoptóticas e células necróticas (Bonassi *et al.*, 2001). Já a técnica do Cometa consiste na lise de membranas celulares, seguida pela indução da migração eletroforética do DNA liberado em matriz de agarose. À microscopia, a célula migrada adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça, região nuclear e cauda. Esta última apresenta fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo. A avaliação dos cometas é baseada no grau de fragmentação do DNA e sua migração pela microeletroforese. Dados indiretos a respeito do estado do DNA da amostra estudada são relacionados ao comprimento total da "cauda" e a densidade de DNA (Brianezi *et al.*, 2009). Pela simplicidade, sensibilidade, rapidez e baixo custo, esses métodos estão sendo globalmente adotados como biomarcadores populacionais no monitoramento de exposição ocupacional, no teste da suplementação dietética com antioxidantes e na avaliação complementar dos níveis de estresse oxidativo em diversas doenças (Dusinska e Collins, 2008). Os estudos epidemiológicos do câncer também se beneficiam de biomarcadores de dano de DNA (Bonassi *et al.*, 2011).

O acúmulo do dano de DNA nos primeiros 1.000 dias de vida humana (período intrauterino até os 2 anos de idade) pode acelerar o envelhecimento e aumentar o risco de doenças degenerativas na vida adulta, entretanto, raros trabalhos concentraram a sua atenção na avaliação

do dano de DNA nesse período (De Assis *et al.*, 2009; Vande Loock *et al.*, 2011; Dass Singh *et al.*, 2017). Ademais, embora pesquisas sobre exposição transplacentária apontem associação entre câncer infantil e agentes nocivos experimentados pela mãe na gestação, pouco se tentou demonstrar sobre a possibilidade de “herança” do dano de DNA ao comparar o dano de DNA do recém-nascido com o dano materno (Fucic *et al.*, 2017).

A detecção e o monitoramento do dano de DNA em fases precoces do desenvolvimento humano podem permitir intervenções preventivas ao acúmulo de dano adicional ao DNA celular, minimizando a lesão celular e a manifestação de doenças crônicas, como o câncer, em posteriores estágios da vida (Bonassi *et al.*, 2011). Dessa maneira, foi proposto quantificar o dano no DNA de linfócitos extraídos do sangue de cordão umbilical de recém-nascidos da maternidade do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU - UFSC) e correlacioná-lo com o dano no DNA encontrado no sangue periférico materno pela Técnica do Cometa e do CBMN cyt. A circulação fetal difere da circulação do recém-nascido e, por esse motivo, foram avaliados o dano de DNA nas artérias e na veia umbilical do cordão, já que a veia conduz o sangue com maior concentração de oxigênio em direção ao feto e as artérias trazem o sangue com menor teor de oxigênio do feto em direção à placenta.

1.1 JUSTIFICATIVA

Em última análise, a fisiologia e a saúde humana são determinadas pela composição e sequência de bilhões de nucleotídeos que compõem o DNA. Tamanha é a sua importância que existem mecanismos endógenos responsáveis por sua preservação. Entretanto, esta se encontra em constante ameaça pelo ambiente em que habitamos. Compostos químicos, radiação, agentes biológicos e também injúrias relacionadas ao próprio metabolismo interno do organismo tornam árdua a tarefa de manutenção da sua integridade pelos sistemas de reparo. Especula-se que quanto maior a exposição aos agentes potencialmente nocivos, maior o risco de lesão ao DNA. Por essa razão somos cercados por leis que regem a distribuição de substâncias sabidamente tóxicas e que recursos imensuráveis são movimentados pela indústria no desenvolvimento de produtos antioxidantes, com o objetivo de combater o dano de DNA (Kastan, 2008).

Considerando que o dano de DNA está envolvido na gênese do câncer e de outras doenças e que a população proposta para estudo apresenta maior vulnerabilidade à agressão ao genoma, existem potenciais

benefícios clínicos no entendimento das variáveis associadas a maior prevalência do dano.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Quantificar o dano de DNA no sangue do cordão umbilical e no sangue materno.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Comparar o dano de DNA no sangue materno com o dano de DNA no sangue fetal;
- Comparar o dano de DNA no sangue da veia com o dano de DNA no sangue das artérias umbilicais;
- Testar associações entre dano de DNA e características da mãe e do recém-nascido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER INFANTIL

O câncer na criança e no adolescente corresponde de 2 % a 3% dos tumores malignos de uma população, sendo que, a cada dia, no mundo, 250 crianças perdem suas vidas em decorrência dele (Pritchard-Jones *et al.*, 2013). Acomete sítios diferentes e tem comportamento clínico mais agressivo em relação aos tumores dos adultos. Entretanto, responde melhor ao tratamento e, conseqüentemente, apresenta maior taxa de cura (Siegel *et al.*, 2016).

O câncer representa a segunda causa de morte em crianças, perdendo apenas para as causas externas (acidentes e violência). Considerando-se apenas as causas de morte por doença, é responsável por 8% dos óbitos entre um e 19 anos de idade e por 12% dos óbitos entre um e 14 anos (Steliarova-Foucher *et al.*, 2017). No Brasil, esperam-se aproximadamente 12.500 novos casos de câncer em crianças e adolescentes em 2018. Dentre esses, 1.300 casos são aguardados para região Sul do país (Inca, 2018). Os tumores de maior frequência na infância e na adolescência são as leucemias (26%), linfomas (14%) e tumores do sistema nervoso central (13%) (De Camargo *et al.*, 2010). Também assolam essa faixa etária, neuroblastomas, tumores de Wilms, retinoblastomas, tumores germinativos, osteossarcomas e sarcomas (De Camargo *et al.*, 2010).

Nos últimos 30 anos, a taxa de sobrevivência média em cinco anos para todos os cânceres infantis combinados (até 14 anos) nos Estados Unidos aumentou significativamente: de 58% - para pacientes diagnosticados entre 1975 e 1977 para 83% - para pacientes diagnosticados entre 2005 até 2011 (Miller *et al.*, 2016; Siegel *et al.*, 2016). Isso foi resultado da melhoria nos tratamentos destinados à doença (Miller *et al.*, 2016; Siegel *et al.*, 2016). Nos países em desenvolvimento, como o Brasil esses números não são animadores. De acordo com o INCA, a sobrevivência de pacientes infanto-juvenis com câncer varia de acordo com a região. Os índices são mais elevados nas regiões Sul (75%) e Sudeste (70%) do que Centro-Oeste (65%), Nordeste (60%) e Norte (50%), perfazendo uma média nacional de 64% (Inca, 2016).

Desde os anos 80, registra-se mundialmente um aumento na incidência do câncer infantil entre 0-14 anos: de 124,0 para 140,6 casos por milhão de pessoas/ano (Steliarova-Foucher *et al.*, 2017). Esse crescimento é preocupante e estimula a investigação de fatores associados à gênese do câncer na criança. Para cada criança que sobrevive ao câncer

na infância são preservados muitos anos de vida produtiva em relação aos indivíduos adultos e idosos. Então, mesmo que o número de crianças com câncer seja menor do que o número de adultos com a doença, o número de anos de vida salvos é substancialmente maior na criança curada. Além de um problema de saúde pública, portanto, passa também a ser um problema econômico para uma nação (Pritchard-Jones *et al.*, 2013).

2.2 EXPOSIÇÃO TRANSPLACENTÁRIA

O aumento da incidência do câncer em grupos mais idosos pode estar relacionado ao envelhecimento e aumento da expectativa de vida das populações (Torre *et al.*, 2015). Mas essa mesma justificativa não pode ser aplicada a faixa etária infanto-juvenil (Irigaray *et al.*, 2007). A etiologia dos tumores malignos nessa fração da população é complexa e multifatorial. Estudos experimentais e em humanos foram realizados e concluíram que a exposição materna a fatores ambientais tem papel consistente na origem do câncer infanto-juvenil (Katic *et al.*, 2010; Fucic *et al.*, 2017). Essa exposição pode ser tanto ocupacional como ambiental. Estes fatores são apresentados a seguir.

2.2.1 Poluição do ar

São considerados como poluentes externos: fumaça das indústrias, dos automóveis, queima de resíduos, queima do carvão e madeira. Elencam-se como poluentes internos: a poeira de móveis, emissões dos materiais de construção e, principalmente, o tabagismo.

A exposição à poluição decorrente dos automóveis durante a gestação esteve associada a leucemia, astrocitoma, retinoblastoma e teratoma na criança (Heck *et al.*, 2013; Lavigne *et al.*, 2017).

Exposição ocupacional de mulheres em idade fértil pode também trazer consequências a saúde de seus descendentes. A exposição a solventes de tintas durante a gravidez foi relacionada a maior risco de leucemia na criança num estudo caso controle envolvendo 1.842 casos de leucemia linfocítica aguda (Shu *et al.*, 1999).

Há muito se estuda sobre a relação entre tabagismo e câncer. Em geral, o tabaco representa 30% da fração atribuível dos principais fatores de risco para câncer, ficando atrás apenas da alimentação (35%) e superando infecções (10%), comportamento sexual (7%), álcool (3%) e radiação (1%) (Doll e Peto, 1981). Durante a gestação, o tabagismo esteve associado ao aumento de chance para tumores de sistema nervoso central, linfomas não-Hodgkin, leucemia e tumor de Wilms (De Assis *et al.*, 2009;

Rumrich *et al.*, 2016; Fucic *et al.*, 2017). Na idade adulta também esteve relacionado a elevação do risco de câncer de testículo quando a história materna era positiva para o tabagismo na gestação (Pettersson *et al.*, 2004).

2.2.2 Pesticidas

Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) demonstraram que o Brasil, desde 2009, tornou-se o maior consumidor mundial de agrotóxicos ao ultrapassar a marca de 1 milhão de toneladas, o que equivale a um consumo médio de 5,2 kg por habitante ao ano (INCA, 2015). Não bastasse a quantidade, a dispersão destas substâncias no meio ambiente toma proporções ainda maiores. No Brasil ainda se realizam pulverizações aéreas, contaminando amplamente o solo, recursos hídricos e o ar, atingindo todas as populações (INCA, 2015). Outro ponto facilitador é a isenção de impostos aos fabricantes de agrotóxicos oferecidos no país, que auxilia no fortalecimento da indústria produtora (INCA, 2015). Preocupante também é o fato do governo brasileiro permitir a comercialização de pesticidas já proibidos em outros países (INCA, 2015).

Durante a vida intrauterina, o período de susceptibilidade mais crítico compreende a organogênese (entre a terceira e oitava semana de gestação) (Selevan *et al.*, 2000). Perda neuronal permanente com consequente comprometimento futuro da função neurocognitiva podem ocorrer se a exposição a neurotoxinas acontecer durante a diferenciação, proliferação, migração e mielinização neuronal (Selevan *et al.*, 2000). Coortes, como de Eskenazi *et al* observaram uma associação entre exposição pré-natal a diclorodifeniltricloroetano (DDT) e comprometimento do desenvolvimento neurológico de crianças aos 12 e aos 24 meses de idade (Eskenazi *et al.*, 2008).

Além da poluição ambiental e intoxicação aguda pela exposição ocupacional, o contato prolongado com pequenas concentrações de múltiplos pesticidas (bioacumulação) também podem trazer consequências à saúde, como infertilidade, abortamentos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, efeitos sobre o sistema imunológico e também o câncer (INCA, 2015). Em 2015, foi publicada a Monografia da IARC volume 112, em que, após avaliar a carcinogenicidade de pesticidas organofosfatos (tetraclorvinfós, paration, malation, diazinon e glifosato), classificou o herbicida glifosato e os inseticidas malation e diazinon como prováveis agentes carcinogênicos para humanos (Grupo 2A) e os inseticidas tetraclorvinfós e paration como

possíveis agentes carcinogênicos para humanos (Grupo 2B) (Guyton *et al.*, 2015).

Apesar da dificuldade em se caracterizar a exposição transplacentária aos pesticidas, seu uso durante a gestação esteve associado com aumento do risco de desenvolvimento de leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielocítica aguda (LMA) e neuroblastoma na infância e adolescência em alguns estudos (Turner *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2013; Bailey *et al.*, 2014).

2.2.3 Contaminantes na comida

Especula-se que a fração atribuível da alimentação ao câncer seja de aproximadamente 1/3, embora essa relação na exposição transplacentária ainda não esteja completamente esclarecida (Doll e Peto, 1981; Fucic *et al.*, 2017). Muito dessa razão talvez possa ser explicada pelos contaminantes com potencial cancerígeno envolvidos no preparo equivocado e armazenamento desses alimentos. A *European Food Safety Authority (EFSA)* alerta para o efeito nocivo sobre o DNA da acrilamida, bisfenol A e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Panel, 2008; 2015a; b), que por serem compostos lipofílicos podem atravessar a barreira placentária e se bioacumular no feto (Falck *et al.*, 2015). A acrilamida pode ser encontrada em alimentos submetidos a altas temperaturas (batatas fritas industrializadas) ou muito cozidos e até mesmo como contaminante de outros alimentos, como o café (Ullate *et al.*, 2015). Os HPA são liberados no ar pela queima incompleta de combustíveis fósseis, tabaco e outros materiais orgânicos e o bisfenol A pode estar presente em embalagens plásticas (Panel, 2008; 2015a; b; Fucic *et al.*, 2017).

Embora a EFSA desencoraje o consumo da acrilamida por considerá-lo um agente genotóxico cancerígeno capaz de induzir dano oxidativo de DNA (Panel, 2015a), uma recente revisão portuguesa divulga que ainda faltam evidências suficientes para classificá-lo dessa maneira (Baltazar *et al.*, 2017). Essa conclui que mais estudos epidemiológicos são necessários para entender os efeitos em humanos, uma vez que a maioria dos trabalhos foi realizada em roedores, e para estabelecer doses seguras de ingestão no futuro. Porém, enquanto isso, sugerem cautela no consumo.

O consumo de café na gravidez também pode estar relacionado com o câncer infantil (Cheng, 2014). Uma metanálise envolvendo 25 estudos (Yan *et al.*, 2016), concluiu que o uso do café na gestação esteve associado ao desenvolvimento de LLA na infância (OR=1,44, IC 95% = 1,07–1,92). Entretanto, ainda não está suficientemente esclarecido qual

componente presente no café está envolvido neste processo. Especula-se que a acrilamida possa estar contribuindo para esses números (Mojska e Gielecińska, 2013).

A ingestão materna de álcool durante a gestação também é fonte de preocupação no meio acadêmico. Numa recente metanálise envolvendo estudos caso-controle (Karalexi *et al.*, 2017), pesquisadores avaliaram 16.000 casos de leucemia e demonstraram uma associação entre consumo materno de álcool e aumento do risco de LMA na infância - OR consumo moderado: 1,64, IC 95% 1,23–2,17 e OR consumo alto: 2,36, IC 95% 1,60–3,49.

2.2.4 Contaminantes na água

A qualidade da água sempre foi alvo de apreensão no que concerne à saúde. Recentemente, um episódio de contaminação por chumbo nas águas que abasteciam a cidade de Flint em Michigan, Estados Unidos da América (EUA) em 2016 (The Lancet, 2017), fez com que mais de 100.000 pessoas fossem expostas a concentrações elevadas de chumbo na água. De acordo com as monografias de IARC (Irigaray *et al.*, 2007), desde 2006, o chumbo inorgânico é considerado provavelmente carcinogênico em humanos (2A), isto é, embora comprovada a associação em animais, ainda não bem estabelecido que o chumbo seja responsável pela gênese do câncer em humanos.

Outras substâncias tóxicas encontradas poluindo a água podem ameaçar a saúde humana. Aschengrau *et al.* (Aschengrau *et al.*, 2015), num estudo em Boston, encontraram associação positiva entre risco de epilepsia e alguns tipos de câncer em indivíduos que foram expostos a tetracloroetileno durante a gestação e/ou nos primeiros anos de vida. Bailey e Fry realizaram alguns estudos associando exposição pré-natal ao arsênico e alterações genômicas e epigenéticas, que teoricamente podem desencadear o câncer em fases seguintes do desenvolvimento humano (Bailey e Fry, 2014).

2.2.5 Radiação

Dados sobre a exposição intrauterina à radiação ionizante em altas doses restringem-se a exposição acidental em acidentes nucleares, como Chernobyl e Fukushima (Fucic *et al.*, 2017). Infelizmente, as localidades diretamente atingidas, carecem de estudos com informações sobre as consequências dessas catástrofes à saúde dos sobreviventes. Alguns países vizinhos assumiram as investigações. Em 1996, pesquisadores na

Grécia, avaliaram o risco de câncer infantil e exposição intrauterina à radiação de Chernobyl e concluíram que recém-nascidos expostos na gestação tinham 2,6 vezes mais incidência de leucemia comparado a crianças não expostas (Petridou *et al.*, 1996).

Baixas doses de raios-X, especialmente durante o terceiro trimestre, podem estar associadas ao aumento do risco de leucemia e outros tipos de câncer na infância (Doll e Wakeford, 1997). Opiniões mais recentes questionam esses achados e afirmam estar longe o fim desta discussão (Brenner, 2014).

2.3 INSTABILIDADE GENÔMICA E SUSCETIBILIDADE FETAL

Instabilidade genômica refere-se ao aumento da tendência a alterações no genoma durante o ciclo de vida das células (Shen, 2011). É considerada a força motriz da tumorigênese e, durante a divisão celular, está associada com a falha na duplicação acurada e/ou na distribuição precisa do material genético entre as células filhas (Shen, 2011). Como consequência, essas células herdarão alterações em seu genoma, como mutações em genes específicos, amplificações, deleções, rearranjos cromossômicos, acréscimo ou perda de cromossomos inteiros, que são eventos causais da transformação oncogênica e da progressão tumoral (Shen, 2011).

O estopim que desencadeia o dano ao DNA pode ser resultado de metabólitos endógenos, agentes carcinogênicos encontrados no ambiente e na dieta, algumas drogas anti-inflamatórias e em terapias genotóxicas para o câncer (Roos *et al.*, 2016). Para limitar a instabilidade genômica, as células apresentam sistemas de resposta ao dano de DNA e proteínas de reparo ao DNA para remover ou tolerar lesões ao material genético nuclear (Hoeijmakers, 2001).

Esses sistemas reparadores do DNA são difíceis de serem mensurados e por isso não costumam participar de estudos de biomonitoramento em humanos (Collins e Azqueta, 2012).

Acredita-se que o feto e a criança nos primeiros anos de vida estejam mais susceptíveis ao dano de DNA induzido por agentes genotóxicos do que os adultos (Falck *et al.*, 2015). O período compreendido entre 3 e 8 semanas de gestação é considerado o mais crítico por corresponder a organogênese fetal (Selevan *et al.*, 2000; Vahakangas, 2011). Mesmo após o desenvolvimento da placenta, algumas propriedades permitem que substâncias químicas ultrapassem a barreira placentária e alcancem o feto em desenvolvimento, como baixo peso molecular, lipossolubilidade e habilidade de usar mecanismos de

transporte ativo placentário (Falck *et al.*, 2015). O monóxido de carbono, composto de baixo peso molecular encontrado na fumaça do cigarro, o etanol, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e os bifenilos policlorados, que são lipofílicos, atravessam a barreira placentária e podem se bioacumular no feto (Falck *et al.*, 2015).

Adicionalmente, a capacidade metabólica do feto difere do organismo adulto. Semelhante aos adultos, o feto humano pode expressar enzimas de fase I em resposta a xenobióticos (CYP1A1, CYP2E e CYP3A), entretanto expressa muito poucas enzimas de fase II desintoxicantes (Miller, 2004). Outra particularidade relevante é que, ao longo da gestação, podem existir respostas diferentes à exposição ao mesmo substrato, dada a imaturidade do sistema de enzimas fetais. Dependendo do estágio de desenvolvimento desse complexo enzimático, o estímulo pode acarretar produção de diferentes metabólitos ou concentrações diferentes dos mesmos metabólitos (Wang e Choi, 2014).

2.4 BIOMARCADORES DE DANO DE DNA

Diariamente, as pessoas são expostas a uma variedade de agentes genotóxicos. Os efeitos dessa exposição à saúde são de difícil investigação por desenhos epidemiológicos tradicionais, uma vez que os níveis de exposição são geralmente baixos e o intervalo entre a exposição e o aparecimento da doença é demasiadamente longo (Lope *et al.*, 2010). Nesse contexto, faz-se necessária a criação de sistemas de biomonitoramento humano. Esses devem ser capazes de estimar o potencial impacto à saúde em nível celular decorrente da exposição ambiental (Lope *et al.*, 2010). Para tanto, dois métodos de avaliação de dano de DNA podem ser utilizados: Técnica do Cometa (Collins *et al.*, 2014), bastante sensível, e o CBMN cyt (Fenech, 2007), capaz de identificar alterações mais duradouras ao material genético nuclear.

2.4.1 Eletroforese em Gel de Célula Única /Técnica do Cometa

Consiste num método simples para quantificar a quebra do DNA em células eucarióticas. Simplificadamente, células embebidas em agarose em lâmina de microscópio são lisadas para formar nucleóides contendo fitas de DNA enveladas aderidas a uma matriz nuclear. Após um processo de eletroforese em meio alcalino, adquirem uma forma semelhante a um cometa, em que o dano de DNA pode ser estimado pela comprimento e intensidade da cauda quando observado à microscopia de fluorescência (Collins, 2004).

As aplicações do método incluem pesquisa de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* e biomonitoramento humano relacionado à exposição ambiental e ocupacional, estudos de genoproteção oferecida por dietas específicas e suplementações, pesquisa sobre fatores intrínsecos que afetam os níveis de dano de DNA em humanos e quantificação de dano de DNA associado a variadas doenças (Collins *et al.*, 2014; Koppen *et al.*, 2017).

Dentre essas doenças investigadas, destacam-se o câncer e outras doenças crônicas. Para estudos epidemiológicos relacionados às mesmas, faz-se importante a existência de biomarcadores moleculares relativamente não invasivos capazes de fornecer um panorama populacional de exposição ocupacional ou ambiental a agentes carcinogênicos (Collins *et al.*, 2014). Embora muitos outros fatores incluindo modificações epigenéticas possam modular a resposta ao dano de DNA, acredita-se que a quantificação do dano de DNA em linfócitos possa estar relacionada ao risco de câncer e de outras doenças crônicas (Bonassi *et al.*, 2011; Collins *et al.*, 2014).

2.4.2 Ensaio de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN cyt)

Micronúcleos (MNi) originam-se de fragmentos ou de cromossomos inteiros não segregados durante a anáfase da mitose, que se tornam-se encapsulados por envoltório nuclear e que ficam fora do núcleo da célula filha durante a telófase. (Fenech, 2000). Tal como a técnica do Cometa, têm sido utilizados como biomarcadores de dano de DNA e instabilidade genômica em populações expostas a agentes genotóxicos e em associação com doenças crônicas e câncer (Bonassi *et al.*, 2001; Andreassi *et al.*, 2011; Bonassi *et al.*, 2011; Migliore *et al.*, 2011). O CBMN cyt também permite quantificar outros marcadores de dano citogenético como pontes nucleoplasmáticas (NPBs) e *buds* nucleares (NBUDs), além de células apoptóticas e necróticas (Fenech, 2007). As NPBs são resultantes de cromossomos dicêntricos, em que cada um dos centrômeros migrou para pólos distintos durante a divisão celular e os NBUDs são provenientes de amplificação do material genético (Bonassi *et al.*, 2001; Fenech, 2007).

Além de identificar micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e *buds* nucleares, esse ensaio permite calcular o índice de divisão nuclear, que fornece uma estimativa do status proliferativo da fração de células viáveis (Eastmond e Tucker, 1989; Fenech, 2007). É considerado uma ferramenta útil para comparação entre a resposta mitogênica dos linfócitos e os efeitos citostáticos dos agentes examinados pela técnica (Fenech, 2007).

Esse índice é calculado a partir da avaliação do número de núcleos de 500 células viáveis para determinar a frequência de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos. Para tanto, utiliza-se a seguinte fórmula: $NDI = \frac{1}{4}(M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4)/N$, onde M1–M4 representa o número de células com 1-4 núcleos e N corresponde ao número total de células viáveis avaliadas (excluindo-se células necróticas e apoptóticas). Dessa maneira, o valor mais baixo possível é 1, quando todas as células viáveis falharam em se dividir durante o bloqueio da citocinese e, portanto, são todas mononucleadas. De mesmo modo, se todas completarem a divisão nuclear e se apresentarem binucleadas, o valor do índice de divisão celular será 2. Valores superiores a 2 podem ser esperados se uma proporção significativa das células viáveis completar mais de uma divisão nuclear durante a fase de bloqueio da citocinese e exibirem mais de dois núcleos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi conduzido um estudo transversal, envolvendo parturientes atendidas na maternidade do HU-UFSC, localizado na cidade de Florianópolis-SC; durante o período de dezembro de 2016 a julho de 2017.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da UFSC sendo aprovado em 26 de setembro de 2016 sob o número 1.745.779 (anexo A). Ressalta-se que a sua aprovação foi um pré-requisito fundamental ao início da pesquisa.

Toda participante foi previamente abordada e informada acerca dos objetivos do estudo. Aquelas que concordaram em participar do mesmo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE-apêndice A) e receberam uma cópia assinada pelo pesquisador responsável com explicações gerais sobre a pesquisa.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

A população examinada preencheu os seguintes critérios de inclusão: (i) ter idade igual ou superior a 18 anos; (ii) estar internada em trabalho de parto, para indução de parto ou interrupção da gestação por indicação materna ou fetal de feto único (iii), vivo (iv), maior que 28 semanas (v).

Os critérios de exclusão foram: (i) idade inferior a 18 anos; (ii) gestação múltipla, (iii) óbito fetal, (iv) idade gestacional abaixo de 28 semanas e (v) impossibilidade de coleta do sangue fetal.

Foram excluídos os pré-termos extremos (abaixo de 28 semanas) pela dificuldade em se coletar o volume da amostra de sangue necessária para o estudo proposto.

3.4 AMOSTRA

A análise de dados preliminares de 35 pacientes junto ao programa computacional *MedCalc Statistical Software* versão 17.4.4 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium), estimou uma amostra mínima composta por 20 parturientes. Neste cálculo, considerou-se 65% da

prevalência de dano de DNA na veia do cordão umbilical e 35% de prevalência para a ausência de dano. Para um poder de 80% e mínimo nível crítico de significância, utilizou-se um erro tipo beta de 0,20 e um erro alfa de 0,05 (95%). Entretanto, resolveu-se por seguir o recrutamento das parturientes até término do período proposto no cronograma, totalizando uma amostra de 58 gestantes. Essas foram selecionadas por conveniência de acordo com a disponibilidade do laboratório de genética em receber e processar as amostras.

3.5 QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL E DADOS CLÍNICOS

Informações clínicas antes e durante a gravidez foram obtidas a partir de um questionário adaptado do “Questionário de Saúde Pessoal” (Carrano e Natarajan, 1988) - apêndice B (Carrano e Natarajan, 1988) realizado na internação na sala de parto da maternidade do Hospital Universitário HU-UFSC. Esse questionário foi aplicado em forma de entrevista dirigida pela pesquisadora principal a todas as participantes. Nele constou observações sobre a história pessoal da gestante (idade, grupo étnico, estado civil, paridade, emprego atual e passados); história de exposição (ocupacional e não ocupacional); história de tabagismo, medicações, doenças, cirurgias, vacinas, radiografias prévias e durante a gestação; história nutricional e genética. Os dados referentes ao pré-natal foram obtidos do cartão da gestante, tais como procedência, escolaridade, idade gestacional, ganho de peso na gestação, diagnóstico de hipertensão, diabetes e infecções na gestação e medicações prescritas durante a gravidez. Já as informações do parto, como motivo da internação, tempo de trabalho de parto, período expulsivo e de bolsa rota, medicações durante o trabalho de parto, tipo de parto, aspecto do líquido amniótico, Apgar e peso do recém-nascido, foram colhidos do prontuário das mães, antes de sua alta do hospital (apêndice C).

3.6 COLETA DE SANGUE

De todas as participantes do estudo foi realizada a coleta do sangue de cordão umbilical logo após a dequitação placentária, como consta no infográfico – apêndice D, com o cordão levemente tracionado em posição vertical, puncionando a veia e as artérias umbilicais junto à inserção placentária do cordão e coletado aproximadamente 4 mL de sangue de cada (veia e artérias). Simultaneamente, coletou-se uma amostra de sangue periférico materno (4 mL). Esses foram armazenados em tubos estéreis heparinizados (Vacuette® 4mL – verde) protegidos da luz por um

envoltório de papel alumínio e mantidos refrigerados a 4° C. Em até 24 horas, os exemplares de sangue de cordão umbilical e sangue materno foram transportados em caixas térmicas e avaliados através do CBMN cyt e da Técnica do Cometa pelo laboratório de genética do Hospital Universitário da UFSC.

3.7 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

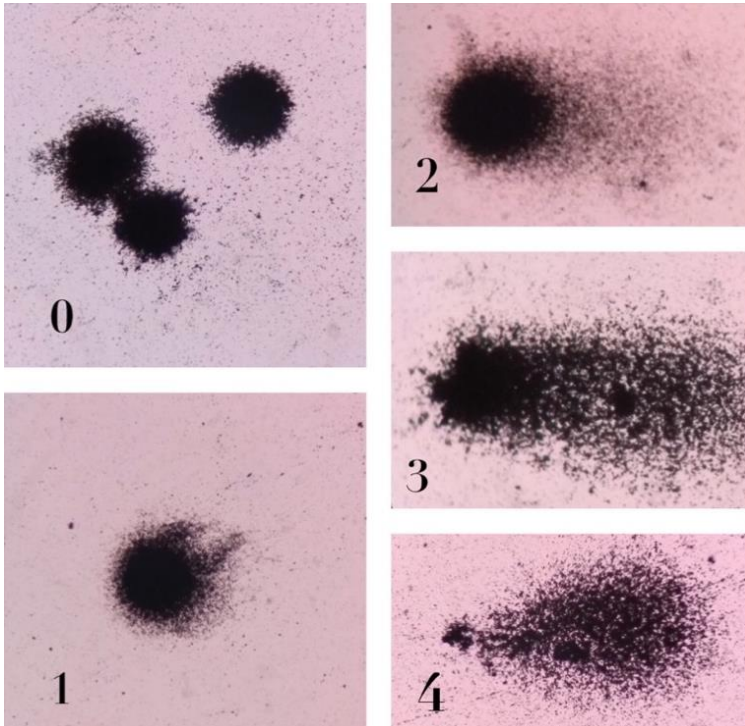
3.7.1 Eletroforese em Gel de Célula Única /Técnica do Cometa

Esta técnica foi realizada conforme a técnica descrita por Singh *et al.* (Singh *et al.*, 1988) e adaptada por Tice *et al.* (Tice *et al.*, 2000). Inicialmente foram preparadas as lâminas com pré cobertura de agarose regular 0,75%, usadas após secagem de no mínimo duas horas. Ao abrigo da luz, em eppendorf, foi misturado 5 µl de sangue periférico heparinizado com 95 µl de agarose *low melting* 0,7% à 37°C. Esta mistura foi imediatamente aspirada e disposta sobre a lâmina com pré cobertura de agarose previamente preparada. Em seguida foi colocada uma lamínula 24 x 50 mm sobre a mistura agarose/amostra. A lâmina com a lamínula ficou em câmara úmida horizontal na geladeira por 5 minutos. Após endurecimento da agarose, a lamínula foi retirada e a lâmina armazenada em cubeta vertical contendo solução de lise gelada (89 mL de solução de lise mãe (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM) com 10 mL de DMSO e 1 mL de Triton X-100) por no mínimo 24 h. As lâminas foram expostas por 20 minutos ao tampão alcalino gelado (NaOH, EDTA 200nM e água destilada) e em seguida submetidas a eletroforese realizada em geladeira, por 20 minutos, 25 V e 300 mA, com o cuidado de não deixar brechas entre as lâminas. Após a eletroforese, as lâminas foram tratadas com tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 5 min, três vezes e em seguida lavadas com água destilada duas vezes. Após no mínimo 2 horas de secagem, as lâminas foram fixadas (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5% e glicerol 5%) por 10 minutos e lavadas três vezes com água destilada. Novamente após no mínimo 2 horas de secagem as lâminas foram coradas. A coloração foi realizada seguindo o método descrito por Nadin *et al.* (Nadin *et al.*, 2001). A mistura das soluções corantes A (carbonato de sódio 5%) e B (nitrito de amônio 0,02%, nitrito de prata 0,02%, ácido tungstosilícico 0,1%, formaldeído 0,05%) foi feita imediatamente antes do uso e as lâminas ficaram imersas nesta solução por aproximadamente 10 minutos. Assim que observada a coloração acinzentada nas lâminas, estas foram lavadas com água destilada e colocadas na solução de parada (ácido acético 1%)

por 5 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com água destilada e após secagem à temperatura ambiente, foram analisadas.

Para a análise, de forma cega por um único observador, foi utilizado o aumento de 200 vezes em microscópio óptico (ZEISS Primo Star), sendo contadas 100 células por amostra (50 células em cada uma das duas lâminas confeccionadas por indivíduo). Cada célula foi classificada segundo a classe de dano observado e pontuada de 0 a 4, de acordo com a intensidade do dano formado. As células sem migração de fragmentos na eletroforese, ou seja, sem dano, receberam a pontuação 0; células com danos mínimos, receberam pontuação 1; células com danos médios, receberam pontuação 2; células com danos intensos, receberam pontuação 3 e células com danos máximos, receberam pontuação 4, como representado na figura 1. O somatório dos valores (de 0 a 4) dos 100 núcleos analisados pode variar de 0 a 400 unidades, resultando no índice total de dano.

Figura 1 - Escore visual de dano de DNA pela Técnica do Cometa



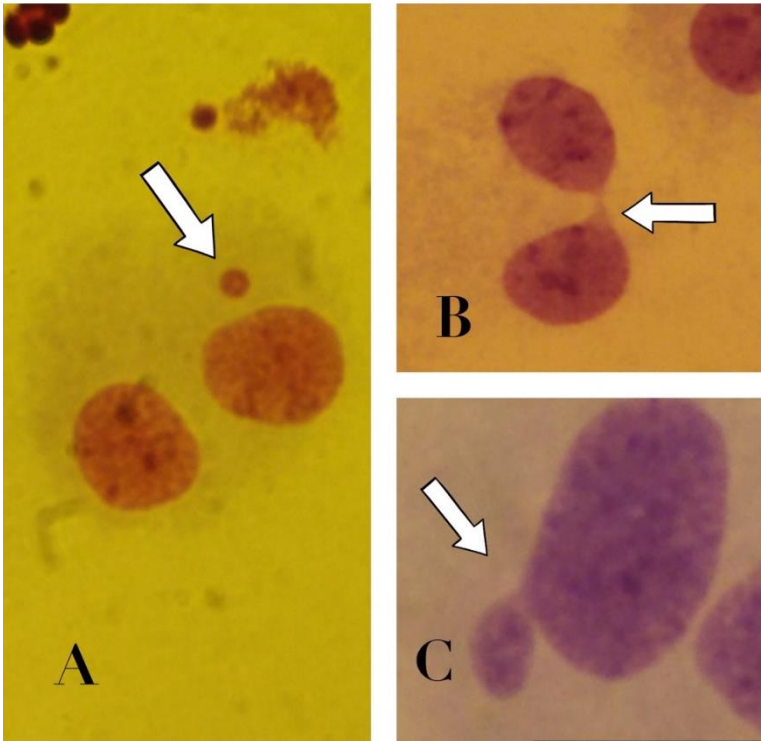
0: dano ausente; 1: danos mínimos; 2: danos médios; 3: danos intensos e 4: danos máximos

3.7.2 Ensaio de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN cyt)

Esta técnica foi adaptada da técnica descrita por Fenech (Fenech, 2007). Foi adicionado, de forma estéril, em cabine de segurança biológica, 0,5 mL de sangue heparinizado em 5 mL de meio de cultura (RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e 2% fitohemaglutinina) em tubo falcon e colocado em estufa a 37°C, por 72 h. Após 44 h em cultura, foi acrescentado citocalasina B (5 mg/ mL de cultura) de forma estéril. Ao completar 72h em cultura, procedeu-se a retirada da cultura celular. Os tubos falcon foram centrifugados à 300 g por 6 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e foi pipetado 5 mL de KCl (0,075 M) que ficou em contato com a amostra por 7 minutos, com posterior adição de 0,5 mL de fixador (metanol e ácido acético - 3:1) e centrifugação (300 g por 6 min). O sobrenadante foi novamente retirado e foi adicionado aos poucos, com cuidadosa homogeneização, 5 mL de fixador (metanol e ácido acético - 3:1). A amostra ficou em geladeira por 10 minutos e em seguida foi centrifugada à 300 g por 6 min. O passo da retirada do sobrenadante e adição do fixador foi repetido no mínimo mais uma vez. Ao se observar o sobrenadante límpido, foi deixado 1 mL do sobrenadante no tubo e o material foi ressuscitado. Em seguida, as lâminas foram confeccionadas pingando três gotas do material sobre a lâmina (previamente lavada e deixada no congelador por alguns minutos para formar uma camada de gelo e permitir o espalhamento do material). Após secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa (10%) por 5 min.

As análises foram realizadas de forma cega por um único observador, por microscopia óptica (ZEISS Primo Star), com aumento de 200 vezes, com confirmação das estruturas em aumento de 1000 vezes. A frequência de biomarcadores de danos de DNA (MNi, NPBs e NBUDs) foi classificada em 1.000 células binucleadas, como demonstrado na figura 2.

Figura 2 - Biomarcadores de dano de DNA pelo ensaio do CBMN Cyt



A Micronúcleo; B Ponte Nucleoplasmática e C BUD nuclear.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no programa *MedCalc Statistical Software* versão 17.4.4 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium). Foi utilizada análise estatística descritiva de todas as variáveis, por meio de distribuição de frequências das variáveis categóricas, medidas de tendência central e dispersão das variáveis contínuas. Os dados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk para testar a normalidade da sua distribuição. Dependendo da distribuição dos resultados, empregou-se os testes ANOVA ou Kruskal-Wallis, teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney para as comparações entre os grupos e as correlações de Spearman ou Pearson, para relacionar os dados quantitativos entre eles. As relações entre variáveis categóricas foram testadas através do teste de qui-quadrado e teste exato de Fisher quando apropriado. Foram consideradas significantes as associações com $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

De acordo com os critérios de inclusão e exclusão propostos, foram analisadas 58 participantes. Quatro amostras de sangue da artéria umbilical foram excluídas por coleta inadequada. Duas avaliações do sangue materno pela técnica CBMN cyt foram descartadas por contaminação ou amostragem insatisfatória. Seis exemplares de sangue das artérias umbilicais e cinco das veias umbilicais foram excluídas por contaminação. Mais de 67% de todas as amostras analisadas apresentaram algum dano de DNA pela técnica do Cometa e apenas três exemplares (dois de artérias umbilicais e um de veia umbilical) foram negativos para MNi no ensaio CBMN cyt.

A tabela 1 mostra as principais características socio-demográficas da população estudada. A idade média foi de 26,6 anos. As gestantes incluídas são de predominância branca e procedentes da grande Florianópolis. Quase metade dessas mulheres tiveram seu primeiro filho. E, em torno de 9% dos casos, os nascimentos ocorreram antes das 37 semanas de gestação. O parto vaginal foi 1,6 vezes mais frequente que a cesariana.

Tabela 1 - Distribuição das Características socio-demográficas da população estudada

Variáveis socio-demográficas		Continua	
		Nº	%
Idade da Paciente	18- 30 anos	41	70,70
	30-34 anos	10	17,20
	>34 anos	7	12,10
Procedência	Florianópolis	38	65,50
	São José	6	10,30
	Palhoça	7	12,10
	Biguaçu	2	3,40
	Outras	5	8,60
Escolaridade	Fundamental	11	19,20
	Médio	32	55,20
	Superior	15	25,90
Renda Familiar *	até 1,5 SM	6	10,30
	1,5 - 3 SM	33	56,90
	> 3 SM	19	32,80
Etnia	Branca	45	77,60

Tabela 1 - Distribuição das Características socio-demográficas da população estudada

Variáveis socio-demográficas		Nº	Conclusão
			%
	Negra	7	12,10
	Parda	6	10,30
Estado Civil	Solteiro	4	6,90
	Casado	15	25,90
Profissão	União Estável	39	67,20
	Serviços domésticos	21	36,20
	Outros	37	63,80
Paridade	Nulípara	26	44,80
	Múltipara	32	55,20
Idade Gestacional	≥ 37 semanas	53	91,40
	< 37 semanas	5	8,60
Fumou na Gravidez	Não	48	82,80
	Sim	10	17,20
Tipo de Parto	Vaginal	36	62,10
	Cesariana	22	37,90
Período expulsivo	Menos de 1 hora	33	91,70
	Mais de 1 hora	3	8,30

* renda mensal em salários mínimos (SM)

4.2 ANÁLISE PELA ELETROFORESE EM GEL DE CÉLULA ÚNICA OU TÉCNICA DO COMETA

Detectou-se presença do dano de DNA, segundo a técnica do cometa, tanto no sangue materno quanto no sangue fetal com escores que variaram de zero à 61 conforme disposto na tabela 2. Não foi verificado diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($P = 0,229520$).

Tabela 2 - Frequência de dano de DNA pela técnica do Cometa de acordo com sítio de coleta.

	Nº	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Artérias umbilicais	54	4,74	3	5,37	0	21
Veia umbilical	58	4,26	2	6,14	0	27
Sangue materno	58	4,05	2	8,68	0	61

As tabelas 3 e 4 descrevem a frequência de dano de DNA referentes às características socio-demográficas e às condições de nascimento,

respectivamente. Os valores médios do dano de DNA foram semelhantes para a maioria das variáveis estudadas nas mães e em seus recém-nascidos. A frequência média de dano de DNA na veia umbilical no grupo que consumiu café na gestação foi significativamente maior do que no grupo que não o consumiu ($P = 0,035$). Três mães admitiram ter usado drogas durante a gravidez. A média de dano de DNA em usuárias de drogas foi duas vezes maior nas artérias umbilicais em relação às mulheres não usuárias ($P = 0,08$). O dano de DNA em múltíparas foi menor do que em nulíparas nas amostras do sangue de cordão e da mãe. Porém, demonstrou significância estatística para valores obtidos da veia umbilical e do sangue materno ($P = 0,025$ e $P = 0,022$, respectivamente).

Em mais de uma hora de período expulsivo, as médias de dano de DNA aumentaram em todas as amostras avaliadas e revelaram significância estatística na veia umbilical e no sangue materno ($P = 0,021$ e $P = 0,020$, respectivamente). Tipo de parto, Apgar e característica do líquido amniótico não mostraram significância em todos exemplares estudados.

Tabela 3 - Características clínico-demográficas da população e dano de DNA pela técnica do Cometa

Variáveis	N°	Técnica do Cometa (média ± DP)			
		Artérias umbilicais	Veia umbilical	Sangue materno	
Idade	<35 anos	51	4,79 ± 5,51	3,94 ± 6,00	4,25 ± 9,19
	≥35 anos	7	4,43 ± 4,69	6,57 ± 7,12	2,57 ± 2,94
Etnia	Caucasiana	45	4,98 ± 5,69	4,38 ± 6,59	3,96 ± 9,23
	Não caucasiana	13	4,00 ± 4,36	3,85 ± 4,39	4,38 ± 6,71
Escolaridade	Fundamental	11	3,90 ± 4,28	3,09 ± 5,08	3,09 ± 3,08
	Médio	32	5,28 ± 11,37	4,72 ± 6,54	5,28 ± 11,37
	Superior	15	5,31 ± 6,28	4,11 ± 6,21	2,13 ± 2,33
Café	Não	7	4,14 ± 3,53	1,00 ± 1,92	2,86 ± 2,97
	Sim	51	4,83 ± 5,62	4,71 ± 6,39 *	4,22 ± 9,20
Tabagismo	Não	36	4,64 ± 5,43	4,47 ± 6,27	2,56 ± 3,03
	Sim	10	6,22 ± 6,69	4,20 ± 5,92	7,90 ± 18,79
Drogas	Não	50	4,57 ± 5,34	4,48 ± 6,49	4,26 ± 9,30
	Sim	3	9,00 ± 5,00 **	3,00 ± 2,33	5,00 ± 1,73
Álcool	Não	45	4,71 ± 5,76	4,40 ± 6,58	4,29 ± 9,74
	Sim	13	4,83 ± 3,95	3,77 ± 4,48	3,23 ± 3,00
Analgésicos	Não	20	5,21 ± 5,78	5,10 ± 6,72	2,55 ± 2,98
	Sim	38	4,49 ± 5,20	3,82 ± 5,85	4,84 ± 10,47
Antibióticos	Não	34	5,66 ± 6,56	4,44 ± 6,90	4,91 ± 11,08
	Sim	24	3,41 ± 2,50	4,00 ± 5,00	2,83 ± 2,79
Ganho de peso na	Adequado	25	5,29 ± 6,37	3,52 ± 4,23	3,00 ± 5,00
Gravidez	Inadequado	33	4,30 ± 4,49	4,81 ± 7,27	4,85 ± 10,67
Diabetes	Não	56	4,81 ± 5,47	4,34 ± 6,22	4,16 ± 8,81
	Sim	2	3,00 ± 0,00	2,00 ± 2,83	1,00 ± 1,41
Hipertensão	Não	50	4,85 ± 5,64	4,02 ± 5,67	4,14 ± 9,28
	Sim	8	4,00 ± 3,16	5,75 ± 8,89	3,50 ± 3,16
Paridade	Nulípara	26	5,91 ± 5,86	6,04 ± 7,44	6,19 ± 12,28
	Múltipara	32	3,87 ± 4,90	2,81 ± 4,45 ***	2,31 ± 3,15 ****

DP, desvio padrão. *P = 0,035; **P = 0,080; ***P = 0,025; ****P = 0,022.

Tabela 4 - Condições do nascimento e dano de DNA pela técnica do Cometa

Variáveis	Nº	Técnica do Cometa (média ± DP)			
		Artérias umbilicais	Veia umbilical	Sangue materno	
Idade gestacional	≥ 37 semanas	53	4,61 ± 5,43	4,34 ± 6,36	4,15 ± 9,06
	< 37 semanas	5	6,00 ± 5,15	2,40 ± 2,41	3,00 ± 2,00
Tempo de trabalho de parto	< 6 h	27	5,72 ± 6,57	3,63 ± 5,44	4,33 ± 11,60
	≥ 6 h	9	4,14 ± 5,61	6,22 ± 8,84	6,67 ± 8,19
Tempo de período expulsivo	< 1h	33	4,87 ± 6,15	3,61 ± 6,06	3,09 ± 4,96
	≥ 1 h	3	13,00 ± 4,24	11,67 ± 6,66 *	25,00 ± 31,32 **
Tempo de bolsa rota	< 12 h	32	5,57 ± 6,60	4,59 ± 6,69	5,22 ± 11,31
	≥ 12 h	4	4,00 ± 4,32	1,75 ± 2,87	2,50 ± 5,00
Tipo de parto	Vaginal	36	5,38 ± 6,32	4,28 ± 6,42	4,92 ± 10,78
	Cesariana	22	3,82 ± 3,51	4,23 ± 5,80	2,64 ± 2,70
Cesariana eletiva	Sim	12	4,25 ± 3,98	4,83 ± 5,92	2,25 ± 2,30
	Não (urgência)	10	3,30 ± 2,98	3,50 ± 5,87	3,10 ± 3,18
Medicamentos durante o parto	Não	23	6,14 ± 7,00	5,61 ± 7,49	6,57 ± 13,17
	Sim	35	3,78 ± 3,71	3,37 ± 4,98	2,40 ± 2,63
Peso ao nascimento para IG	Adequado	46	4,21 ± 4,89	3,83 ± 5,87	4,02 ± 9,63
	Inadequado	12	6,58 ± 6,74	5,92 ± 7,09	4,17 ± 3,30
Gênero do recém-nascido	Feminino	30	5,52 ± 6,16	4,30 ± 6,14	4,57 ± 10,98
	Masculino	28	3,84 ± 4,23	4,21 ± 6,24	3,50 ± 5,39

DP, desvio padrão; IG, idade gestacional. *P = 0,021; **P = 0,020.

4.3 ANÁLISE PELO ENSAIO DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE (CBMN Cyt)

A média de MNi foi significativamente maior nas mães (7,07 por 1000 células binucleadas) do que nos recém-nascidos (4.56 nas artérias e 4.27 por 1000 células binucleadas na veia umbilical) $P = 0,000002$ (tabela 5). Entretanto, a correlação entre a frequência de MNi nas mães e em seus recém-nascidos não foi estatisticamente significativa ($r = 0,11$, $P = 0,46$ nas artérias e $r = 0,11$, $P = 0,44$ na veia). As médias de NPBs e NBUDs não diferiram significativamente entre mães e recém-nascidos.

Tabela 5 - Frequência de dano de DNA pelo CBMN cyt de acordo com sítio de coleta.

Variáveis	N°	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo
Artérias umbilicais						
Micronúcleos	48	4,56	4	3,57	0	15
Pontes nucleoplasmát	48	2,38	2	3,08	0	15
Buds	48	4,81	4	3,05	0	17
Veia Umbilical						
Micronúcleos	52	4,27	3,5	3,64	0	19
Pontes	52	2,64	1	3,27	0	13
Buds	52	4,48	3,5	3,31	1	17
Sangue materno						
Micronúcleos	56	7,07	7	3,62	1	18
Pontes	56	2,86	1	3,68	0	14
Buds	56	4,59	3,5	3,83	0	16

CBMN cyt, ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese. DP, desvio padrão.

Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre uso de café, cigarro, drogas, álcool, antibióticos e biomarcadores de dano de DNA pelo CBMN cyt no sangue umbilical e no sangue materno (tabela 6). De mesmo modo, não se obteve correlação significativa entre CBMN cyt e histórico de diabetes, hipertensão e paridade. A frequência de MNi demonstrou associação significativa à idade, no sangue materno ($P = 0,030$) e ao grau de instrução mais elevado, no sangue do cordão umbilical (artérias, $P = 0,032$ e veia, $P = 0,043$). Gestantes que tomaram analgésicos apresentaram significativo aumento nas NPBs na veia umbilical ($P = 0,030$) em relação às que não tomaram durante a gestação. NBUDs revelaram associação significativa com idade, nas artérias umbilicais ($P = 0,012$) e com etnia no sangue materno ($P = 0,040$).

Tabela 6 - Características clínico-demográficas da população e dano de DNA pela técnica CBMN cyt

Variáveis	Nº	Ensaio Citômico de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (média ± DP)									
		Artérias umbilicais			Veia umbilical			Sangue materno			
		Micronúcleos	Ponte	Bud	Micronúcleos	Ponte	Bud	Micronúcleos	Ponte	Bud	
Idade	< 35 anos	49	4,88 ± 3,65	2,45 ± 3,10	5,19 ± 3,03	4,20 ± 3,63	2,82 ± 3,39	4,58 ± 3,39	6,71 ± 3,56	2,84 ± 3,80	4,38 ± 3,75
	≥ 35 anos	7	2,33 ± 1,86	1,83 ± 3,13	2,17 ± 1,60 *	4,71 ± 3,95	1,43 ± 2,15	3,86 ± 2,91	9,57 ± 3,16**	3,00 ± 2,83	6,00 ± 4,40
Etnia	Caucasiana	43	4,92 ± 3,90	2,50 ± 3,25	4,84 ± 3,12	4,54 ± 3,85	2,72 ± 3,47	4,30 ± 3,31	7,07 ± 3,49	2,54 ± 3,76	3,88 ± 3,16
	Não caucasiana	13	3,20 ± 1,14	1,90 ± 2,42	4,70 ± 2,91	3,00 ± 2,06	2,22 ± 2,17	5,33 ± 3,35	7,08 ± 4,15	3,92 ± 3,28	6,92 ± 4,96 ***
Escolaridade	Fundamental	11	4,80 ± 3,58	4,10 ± 5,20	5,60 ± 4,40	3,80 ± 5,55	3,70 ± 4,97	3,60 ± 2,68	9,09 ± 3,18	6,00 ± 5,62	3,64 ± 2,38
	Médio	30	3,32 ± 2,23	1,80 ± 1,23	4,76 ± 2,88	3,52 ± 1,88	1,83 ± 2,30	4,48 ± 3,55	6,50 ± 3,61	1,97 ± 2,16	4,40 ± 3,75
	Superior	15	6,77 ± 4,66†	2,15 ± 3,26	4,31 ± 2,14	6,31 ± 4,33††	3,62 ± 3,31	5,15 ± 3,26	6,73 ± 3,64	2,33 ± 3,33	5,67 ± 4,75
Café	Não	7	3,67 ± 3,27	2,17 ± 1,17	4,17 ± 2,86	2,50 ± 1,87	3,00 ± 4,05	3,67 ± 2,66	6,14 ± 5,84	2,29 ± 1,11	5,14 ± 5,18
	Sim	51	4,69 ± 3,63	2,41 ± 3,27	4,91 ± 3,10	4,50 ± 3,76	2,59 ± 3,20	4,59 ± 3,40	7,20 ± 3,25	2,94 ± 3,91	4,51 ± 3,66
Tabagismo	Não	46	4,75 ± 3,75	2,20 ± 2,63	4,58 ± 3,74	4,55 ± 3,85	2,76 ± 3,34	4,62 ± 3,53	6,91 ± 3,58	2,67 ± 3,35	4,61 ± 3,87
	Sim	10	4,50 ± 2,67	3,25 ± 4,89	4,50 ± 2,67	3,10 ± 2,38	2,10 ± 3,04	3,90 ± 2,18	7,80 ± 3,91	3,70 ± 5,06	5,50 ± 3,87
Drogas	Não	53	4,54 ± 3,49	2,15 ± 2,49	4,54 ± 3,49	4,28 ± 3,69	2,54 ± 3,14	4,50 ± 3,37	6,98 ± 3,51	2,72 ± 3,48	4,66 ± 3,90
	Sim	3	5,00 ± 7,07	7,50 ± 10,61	5,00 ± 7,07	4,00 ± 2,83	5,00 ± 7,07	4,00 ± 1,41	8,67 ± 6,03	5,33 ± 6,81	3,33 ± 2,31
Álcool	Não	44	4,76 ± 3,66	2,32 ± 3,13	4,82 ± 3,15	4,33 ± 3,24	2,72 ± 3,10	4,59 ± 3,59	6,89 ± 3,90	2,73 ± 3,27	4,77 ± 3,85
	Sim	12	3,80 ± 3,26	2,60 ± 3,03	4,80 ± 2,78	4,08 ± 4,79	2,39 ± 3,86	4,15 ± 2,38	7,75 ± 2,30	3,33 ± 5,03	3,92 ± 3,85
Analgésicos	Não	20	5,44 ± 4,40	1,44 ± 1,09	4,56 ± 2,61	4,00 ± 3,48	1,83 ± 2,96	4,72 ± 4,03	7,20 ± 3,32	1,90 ± 3,08	5,45 ± 3,27
	Sim	36	4,13 ± 3,06	2,84 ± 3,62	4,94 ± 3,28	4,41 ± 3,76	3,06 ± 3,38†††	4,35 ± 2,92	7,00 ± 3,82	3,39 ± 3,91	4,11 ± 4,08
Antibióticos	Não	32	4,50 ± 3,72	2,27 ± 3,34	4,50 ± 3,73	3,87 ± 3,00	2,07 ± 2,38	4,39 ± 3,66	6,22 ± 3,13	2,13 ± 2,97	4,34 ± 3,58
	Sim	24	4,64 ± 3,46	2,50 ± 2,81	4,63 ± 3,45	4,86 ± 4,43	3,48 ± 4,18	4,62 ± 2,80	8,21 ± 3,97	3,83 ± 4,32	4,92 ± 4,20
Ganho de peso	Adequado	24	5,47 ± 3,78	2,63 ± 4,04	5,47 ± 2,82	4,52 ± 2,45	3,09 ± 3,16	5,56 ± 4,10	7,75 ± 3,73	2,79 ± 3,43	6,13 ± 4,46#
	Inadequado	32	3,97 ± 3,35	2,20 ± 2,31	4,38 ± 3,17	4,07 ± 4,39	2,28 ± 3,36	3,62 ± 2,24	6,56 ± 3,50	2,90 ± 3,90	3,44 ± 2,85
Diabetes	Não	54	4,59 ± 3,62	2,30 ± 3,01	4,57 ± 2,52	4,30 ± 3,69	2,56 ± 3,23	4,46 ± 3,32	7,09 ± 3,67	2,91 ± 3,73	4,54 ± 3,87
	Sim	2	4,00 ± 2,83	4,00 ± 5,66	10,50 ± 9,19	3,50 ± 2,12	4,50 ± 4,95	5,00 ± 4,24	6,50 ± 2,12	1,50 ± 0,71	6,00 ± 2,83
Hipertensão	Não	48	4,60 ± 3,74	2,41 ± 3,13	4,55 ± 2,39	4,18 ± 3,63	2,58 ± 3,32	4,36 ± 2,89	6,87 ± 3,78	3,02 ± 3,81	4,67 ± 3,87
	Sim	8	4,33 ± 2,16	2,17 ± 2,93	6,67 ± 5,99	4,86 ± 3,93	3,00 ± 3,11	5,29 ± 5,59	8,25 ± 2,25	1,88 ± 2,70	4,13 ± 3,83
Paridade	Nulípara	25	4,00 ± 3,21	1,48 ± 1,12	4,48 ± 2,46	4,00 ± 2,46	2,08 ± 2,77	4,70 ± 2,97	6,20 ± 3,18	2,36 ± 3,60	5,12 ± 3,96
	Múltípara	31	5,00 ± 3,82	3,07 ± 3,87	5,07 ± 3,46	4,50 ± 4,44	3,11 ± 3,62	4,29 ± 3,62	7,77 ± 3,85	3,26 ± 3,74	4,16 ± 3,73

SD indicates standard deviation, * P = 0,012; ** P = 0,030; *** P = 0,040; † P = 0,032; †† P = 0,043; ††† P = 0,030; # P = 0,016.

A tabela 7 apresenta os resultados do CBMN cyt relacionados à condição de nascimento. Variáveis como tempo de período expulsivo, rotura de membranas, cesariana eletiva, medicamentos durante o trabalho de parto e gênero do recém-nascido não revelaram diferença estatística entre as amostras. O aumento de MNi no sangue materno esteve associado ao peso inadequado para idade gestacional ao nascimento ($P = 0,017$). Houve significativo aumento no sangue materno de NPBs nas mães que ganharam por cesariana ($P = 0,037$). NBUDs apresentaram maiores frequências em prematuros (artérias umbilicais, $P = 0,044$ e sangue materno, $P = 0,012$), e em mais de seis horas de trabalho de parto (artérias umbilicais, $P = 0,027$).

Tabela 7 - Condições do nascimento e dano de DNA pela técnica CBMN cyt.

Variáveis	N°	Ensaio Citômico de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (média ± DP)									
		Artérias umbilicais			Veia umbilical			Sangue materno			
		Micronúcleos	Ponte	Buds	Micronúcleos	Ponte	Buds	Micronúcleos	Ponte	Buds	
Idade	≥ 37 semanas	51	4,61 ± 3,70	2,30 ± 3,12	4,37 ± 2,25	4,45 ± 3,75	2,51 ± 3,25	4,17 ± 2,84	6,94 ± 3,69	2,82 ± 3,76	4,14 ± 3,49
	< 37semanas	5	4,20 ± 2,28	3,00 ± 2,92	8,60 ± 6,03*	2,60 ± 1,82	3,80 ± 3,56	7,40 ± 5,94	8,40 ± 2,70	3,20 ± 2,95	9,20 ± 4,55**
Tempo de trabalho de parto	< 6 h	26	4,84 ± 3,96	3,00 ± 4,19	4,42 ± 2,34	4,04 ± 4,11	2,78 ± 3,64	3,35 ± 2,10	6,96 ± 3,79	3,42 ± 3,87	4,54 ± 3,88
	≥ 6 h	8	3,57 ± 1,13	2,00 ± 1,63	6,43 ± 1,61***	3,13 ± 1,64	1,88 ± 2,70	5,13 ± 3,27	6,25 ± 3,92	4,50 ± 5,40	4,13 ± 2,64
Tempo de period expulsivo	< 1h	31	4,74 ± 3,61	2,65 ± 3,88	4,87 ± 2,38	4,07 ± 3,73	2,75 ± 3,52	3,64 ± 2,45	6,71 ± 3,82	3,48 ± 4,02	4,35 ± 3,61
	≥ 1 h	3	2,67 ± 0,58	3,33 ± 1,53	5,67 ± 2,08	1,33 ± 0,58	0,67 ± 0,58	5,33 ± 3,22	7,67 ± 3,79	5,67 ± 6,66	5,33 ± 4,04
Tempo de bolsa rota	< 12 h	30	4,46 ± 3,49	2,82 ± 3,94	4,68 ± 2,32	4,11 ± 3,80	2,48 ± 3,17	3,85 ± 2,38	6,43 ± 3,34	4,00 ± 4,38	4,47 ± 3,77
	≥ 12 h	4	4,75 ± 3,78	2,25 ± 1,89	6,50 ± 1,92	1,75 ± 0,96	3,00 ± 5,35	3,50 ± 3,79	9,50 ± 6,14	1,25 ± 0,96	4,25 ± 2,22
Tipo de parto	Vaginal	34	4,50 ± 3,46	2,73 ± 3,67	4,96 ± 2,32	3,81 ± 3,64	2,55 ± 3,40	3,81 ± 2,52	6,79 ± 3,77	3,68 ± 4,21	4,44 ± 3,60
	Cesariana	22	4,64 ± 3,77	1,96 ± 2,19	4,64 ± 3,79	4,95 ± 3,61	2,76 ± 3,13	5,48 ± 4,08	7,50 ± 3,40	1,59 ± 2,18†	4,82 ± 4,25
Cesariana eletiva	Não/urgência	12	3,25 ± 1,66	1,67 ± 2,15	3,25 ± 1,66	4,00 ± 1,91	1,50 ± 1,68	4,50 ± 2,61	6,75 ± 3,86	0,75 ± 1,22	5,00 ± 4,88
	Sim	10	6,30 ± 4,92	2,30 ± 2,31	6,30 ± 4,92	6,22 ± 4,94	4,44 ± 3,88	6,78 ± 5,38	8,40 ± 2,68	2,60 ± 2,68	4,60 ± 3,60
Medicações durante o parto	Não	22	5,19 ± 3,75	3,31 ± 4,53	5,31 ± 2,55	4,58 ± 4,34	2,63 ± 3,39	4,21 ± 2,88	6,46 ± 3,53	3,55 ± 4,15	4,23 ± 3,77
	Sim	34	4,25 ± 3,49	1,90 ± 1,91	4,56 ± 3,28	4,09 ± 3,23	2,64 ± 3,25	4,64 ± 3,57	7,47 ± 3,67	2,41 ± 3,32	4,82 ± 3,91
Peso ao nascer para IG	Adequado	44	4,35 ± 3,53	2,11 ± 2,31	5,03 ± 3,08	3,88 ± 2,89	2,41 ± 2,86	4,29 ± 2,87	6,55 ± 3,63	2,32 ± 3,05	4,41 ± 3,92
	Inadequado	12	5,27 ± 3,77	3,27 ± 4,92	4,09 ± 2,98	5,90 ± 5,76	3,60 ± 4,67	5,30 ± 4,88	9,00 ± 2,95††	4,83 ± 5,08	5,25 ± 3,57
Gênero do recém-nascido	Feminino	28	4,68 ± 4,02	3,00 ± 4,01	4,64 ± 3,59	4,69 ± 4,16	2,69 ± 3,28	4,27 ± 2,33	7,39 ± 3,36	3,21 ± 3,81	4,75 ± 4,20
	Masculino	28	4,44 ± 3,09	1,70 ± 1,33	5,00 ± 2,39	3,84 ± 3,04	2,58 ± 3,31	4,69 ± 4,11	6,75 ± 3,89	2,50 ± 3,56	4,43 ± 3,49

DP, desvio padrão; IG, idade gestacional. *P = 0,044; ** P = 0,012; ***P = 0,027; †P = 0,037; †† P = 0,017

4.4 ANÁLISE MULTIVARIADA

A correlação de Spearman entre a frequência de dano de DNA pela técnica do Cometa entre o sangue dos recém-nascidos e o das suas mães é estatisticamente significativa como demonstrado na tabela 8.

Tabela 8 - Dano de DNA pela técnica do Cometa - Correlação de Spearman entre sangue do cordão e sangue materno.

Variáveis	R_s	P
Veia umbilical X Artérias	0,521	0,0001
Veia umbilical X Sangue	0,355	0,0062
Artérias umbilicais X Sangue	0,460	0,0005

r_s , coeficiente de correlação de Spearman.

Uma correlação fraca foi encontrada entre a frequência total de MNi e o dano de DNA pelo Cometa no sangue materno, entretanto não foi atingido o grau de significância estatística proposto ($r = 0,258$; $P = 0,0549$).

5 DISCUSSÃO

O aumento da incidência de doenças degenerativas, como o câncer, é uma preocupação internacional. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado melhoram consideravelmente o prognóstico dessas doenças. Para tanto, alguns especialistas sugerem estratégias inovadoras no entendimento das modulações de integridade e estabilidade do DNA e na detecção de manifestações clínicas adversas em fases precoces do desenvolvimento humano (Collins *et al.*, 2014; Dass Singh *et al.*, 2017; Fucic *et al.*, 2017). As técnicas do Cometa e CBMN cyt são amplamente utilizadas no biomonitoramento de dano citogenético de populações expostas a mutagênicos ambientais, químicos e a fatores relacionados ao estilo de vida (Fenech e Bonassi, 2011; Holland *et al.*, 2011; Migliore *et al.*, 2011; Collins *et al.*, 2014; Dass Singh *et al.*, 2017).

Foram analisadas as amostras de sangue de 58 gestantes e de seus respectivos recém-nascidos no momento do parto. Exemplares do sangue das artérias e veia umbilicais de cada recém-nascido, bem como do sangue materno, foram submetidas aos testes do Cometa e CBMN cyt. Os autores não encontraram estudos semelhantes, em busca minuciosa na literatura, que tenham investigado dano de DNA entre mães e recém-nascidos utilizando as duas técnicas de quantificação de dano descritas e, que tenham incluído na avaliação, sangue das artérias umbilicais.

Os resultados dos testes do Cometa foram obtidos por escore visual. Essa análise é considerada tão acurada quanto a mensuração por métodos eletrônicos sofisticados (Collins, 2004; Koppen *et al.*, 2017).

A média de dano de DNA encontrada em nosso estudo pela técnica do Cometa foi de 4,74 nas artérias umbilicais, 4,26 na veia umbilical e 4,05 no sangue materno. Nossos resultados não estão concordantes com estudos anteriores (Sram *et al.*, 1998; Bajpayee *et al.*, 2002; Møller, 2006b; Hilali *et al.*, 2013; Dobrzynska *et al.*, 2017). Bajpayee *et al.* encontraram $3,37 \pm 1,47$ entre 106 estudantes saudáveis (não grávidas) com idade média de 25 anos (Bajpayee *et al.*, 2002). Outro estudo, que coletou sangue materno duas horas após admissão hospitalar por trabalho de parto espontâneo, revelou $13,70 \pm 4,32$ em mães e $14,40 \pm 3,22$ no sangue de cordão (Hilali *et al.*, 2013). Em 2017, Dobrzyńska *et al.* encontraram $18,49 \pm 14,90$ como valor médio de dano de DNA pela avaliação do Cometa em doadores de sangue menores de 30 anos de idade (Dobrzynska *et al.*, 2017). Até o momento, nenhum dado foi encontrado relacionado a dano de DNA em sangue coletado de artérias umbilicais.

Alguns pesquisadores observaram associação positiva entre risco de leucemia na infância e consumo de café durante a gravidez (Cheng *et*

al., 2014; Fucic *et al.*, 2017). Entretanto, biomarcadores de dano de DNA não foram utilizados para investigar essa correlação. Em nossa avaliação, encontramos um aumento significativo de dano de DNA na veia umbilical associado a ingestão de café na gestação. Dois componentes do café apresentam efeitos genotóxicos e podem aumentar o dano de DNA: cafeína e acrilamida (Ross *et al.*, 1996; Panel, 2008; Cheng *et al.*, 2014; Ullate *et al.*, 2015; Baltazar *et al.*, 2017). Cafeína supostamente age inibindo o reparo do dano de DNA e está relacionada a aberrações cromossômicas, como anormalidade no cromossomo 11q23 (Ross *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2014). Acrilamida é considerada uma substância provavelmente carcinogênica em humanos e é encontrada em alguns produtos com alto teor de amido e baixo teor de proteínas após serem submetidos a processos de alta temperatura (Panel, 2015a; Ullate *et al.*, 2015; Baltazar *et al.*, 2017). Quando o café é torrado, a acrilamida é produzida e ao ser ingerida, é absorvida pelo trato gastrointestinal. Então, é metabolizada, principalmente por conjugação com glutatona, mas também por epoxidação com glicidamida, que representa a via de genotoxicidade da acrilamida (Panel, 2015a).

O teste do Cometa detecta principalmente o dano de DNA inicial ou agudo, entre uma e quatro horas da exposição (Tice *et al.*, 2000; Møller, 2006a). Nulíparas e gestantes que passaram por mais de uma hora de período expulsivo de trabalho de parto, assim como seus recém-nascidos, provavelmente vivenciaram um período de estresse psicofisiológico maior do que múltíparas e mulheres com período expulsivo mais curto. Catecolaminas e cortisol são considerados hormônios do estresse e estão associados a elevação de dano de DNA (Flint *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2011). É conhecido que as concentrações de cortisol aumentam durante a gestação e continuam a se elevar durante o trabalho de parto (Benfield *et al.*, 2014), o que incrementa o dano de DNA (Flint *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2011). Isso talvez contribua para justificar os níveis mais elevados de dano de DNA pelo Cometa em nulíparas e em gestantes com mais de uma hora de período expulsivo, bem como, em seus recém-nascidos. Contudo, em nossos resultados, não foram encontradas diferenças significativas relacionadas ao dano de DNA pelo Cometa e tempo de trabalho de parto e tipo de parto.

O tabagismo durante a gravidez aumenta o risco de câncer nos filhos durante a infância (Rumrich *et al.*, 2016; Fucic *et al.*, 2017). De Assis *et al.*, em 2009 concluíram que mães que fumaram na gestação apresentaram maiores escores de dano de DNA no parto comparado às mães que não fumaram, com resultados similares observados nos recém-nascidos (De Assis *et al.*, 2009). Todavia, nossa análise não encontrou

associação entre o hábito de fumar na gestação e dano de DNA pelo Cometa.

MNi são corpúsculos extranucleares resultantes de efeitos clastogênicos e aneugênicos após exposição crônica a agentes genotóxicos (Fenech, 2007). Está estabelecido que as taxas de MNi são relativamente mais baixas nos recém-nascidos do que nos adultos (Decordier *et al.*, 2007; Holland *et al.*, 2011; Vande Loock *et al.*, 2011) e nossos resultados reafirmam esta diferença. Em relação a nossa análise para CBMN cyt, a média de MNi por 1000 células binucleadas foi de 4,56 nas artérias umbilicais, 4,27 na veia umbilical e 7,07 nas amostras de sangue materno. Nossas frequências de MNi nas mães e em recém-nascidos são mais altas do que estimada na maioria dos estudos (Levario-Carrillo *et al.*, 2005; Neri *et al.*, 2005; Lope *et al.*, 2010; Vande Loock *et al.*, 2011; Dass Singh *et al.*, 2017). Numa coorte grega, a frequência de MNi foi de 1,9 em recém-nascidos e 2,9 em suas mães (Vande Loock *et al.*, 2011). Um importante estudo transversal espanhol, encontrou médias de MNi semelhantes as nossas: 3,9 em recém-nascidos e 6,5 nas mães (Lope *et al.*, 2010). Uma coorte sérvia registrou um decréscimo significativo da taxa de MNi em recém-nascidos após 12 meses de um período intenso de poluição registrada naquela localidade: de $9,36 \pm 5,60$ para $4,73 \pm 3,38$ MNi por 1000 células binucleadas (Milosevic-Djordjevic *et al.*, 2007). Recentemente, em 2017, uma coorte prospectiva australiana observou valores de MNi, NPBs and NBUDs de 2,0; 5,8 e 11,1 por 1000 células binucleadas em recém-nascidos respectivamente (Dass Singh *et al.*, 2017). Alguns estudos reportaram associação significativa entre frequência de MNi em mães e seus recém-nascidos (Levario-Carrillo *et al.*, 2005; Lope *et al.*, 2010), mas a mesma correlação não foi replicada por nossos resultados. É possível que as variações na exposição ambiental a poluentes genotóxicos, por exemplo, e outras características intrínsecas de cada população possam explicar as diferentes frequências de MNi evidenciadas entre as coortes (Milosevic-Djordjevic *et al.*, 2007; Katic *et al.*, 2010; Holland *et al.*, 2011; Fucic *et al.*, 2017).

Encontramos significância estatística na correlação entre a frequência de MNi no sangue materno e idade. É conhecido que os níveis de MNi se elevam com a idade em populações saudáveis (Fenech e Bonassi, 2011; Fenech *et al.*, 2011). Entre mulheres grávidas foi observada a mesma relação (Levario-Carrillo *et al.*, 2005; Lope *et al.*, 2010; Vande Loock *et al.*, 2011). Associação positiva entre valores médios de MNi no sangue do cordão umbilical (veia e artérias) e nível superior de escolaridade também foram observados em nossos resultados.

No estudo BioMadrid nenhuma associação foi relatada entre frequência de MNi e grau de instrução materno (Lope *et al.*, 2010).

Relacionada às variáveis clínico-demográficas de nossa população, houve frequência significativamente maior de NBUDs no sangue materno de não caucasianas em relação às caucasianas. Em desacordo com nossos achados, o estudo BioMadrid não observou associação entre dano de DNA no sangue materno e etnia pelo CBMN cyt (Lope *et al.*, 2010).

A média de NPBs nas amostras de veia umbilical foi maior em mulheres que usaram analgésicos na gestação. Acetaminofeno ou Paracetamol, o analgésico mais comumente usado na gravidez, apresenta efeitos hepatotóxicos conhecidos (Mcgill e Jaeschke, 2014). Em trabalhos experimentais com roedores, foi observado um aumento significativo na frequência de MNi em recém-nascidos quando administrado alguns fármacos às mães, incluindo acetaminofeno. Curiosamente, esse mesmo aumento não foi encontrado no sangue materno para as drogas testadas (Markovic *et al.*, 2013). O aumento do dano de DNA em recém-nascidos sem a mesma repercussão nas mães, sustenta a possibilidade de uma maior vulnerabilidade intrauterina que comprometa apenas o feto. Consequentemente, o dano de DNA na mãe não pode ser usado como preditor de dano genético em recém-nascidos (Markovic *et al.*, 2013).

As frequências similares dos biomarcadores do ensaio do CBMN cyt observadas nas amostras de nosso estudo relacionadas ao uso de cigarro e álcool na gestação estão em concordância com os resultados de vários autores (Bonassi *et al.*, 2003; Milosevic-Djordjevic *et al.*, 2007; Lope *et al.*, 2010; Fenech *et al.*, 2011; Dass Singh *et al.*, 2017). Bonassi *et al.* relataram que o tabagismo provavelmente possa danificar os linfócitos e essas células talvez apresentem dificuldade em se dividir ou não sobrevivam ao período de cultura do ensaio do CBMN cyt (Bonassi *et al.*, 2003). Então, se essas células não se dividirem, elas não poderão ser avaliadas como células binucleadas (Bonassi *et al.*, 2003). Outra explicação plausível, consiste no fato de que as mulheres tendem a reduzir o número de cigarros consumidos durante a gravidez e apenas tabagistas mais assíduos demonstraram um aumento significativo no dano de DNA pelo CBMN cyt em literatura pregressa (Bonassi *et al.*, 2003; Fenech *et al.*, 2011).

Quanto às variáveis relacionadas ao nascimento, mães que tiveram recém-nascidos com peso adequado para idade gestacional, apresentaram significativamente menos MNi por 1.000 células binucleadas do que as mães que tiveram recém-nascidos com peso inadequado para idade gestacional. Uma coorte australiana e uma espanhola encontraram essa mesma associação no sangue do cordão (Lope *et al.*, 2010; Dass Singh *et*

al., 2017). Outro estudo analisou dano de DNA materno às 20 semanas pelo ensaio do CBMN cyt e comparou com o desfecho da gestação (Furness *et al.*, 2010). Os resultados sugeriram que a frequência de MNi no sangue materno às 20 semanas foi significativamente maior em gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia e/ou crescimento intrauterino restrito em comparação às mães com desfecho normal (Furness *et al.*, 2010). Futuramente, outros estudos podem investigar em diferentes idades gestacionais, se um aumento na frequência de MNi, pode predizer peso inadequado ao nascimento.

Artérias umbilicais de recém-nascidos pré-termo revelaram aumento significativo de NBUDs em comparação aos recém-nascidos termo. Essa associação também foi verificada no sangue materno. Entretanto, esses biomarcadores de genotoxicidade não diferiram significativamente de acordo com a idade gestacional em outros estudos (Lope *et al.*, 2010; Vande Loock *et al.*, 2011). Além de que, mesmo associações positivas entre idade gestacional e MNi já foram descritas recentemente (Dass Singh *et al.*, 2017).

Observamos que recém-nascidos após seis horas de trabalho de parto exibiram maior quantidade de NBUDs nas artérias umbilicais do que recém-nascidos que nasceram mais rapidamente. E que, mães que tiveram seus filhos por cesariana apresentaram significativamente menos NPBs do que mães que tiveram por parto vaginal. Provavelmente esses achados foram encontrados ao acaso. Seria pouco razoável justificar que parâmetros genotóxicos crônicos tivessem aumentado durante o trabalho de parto (Fenech, 2007).

A correlação de Spearman entre a frequência de dano de DNA pelo teste do Cometa no sangue do cordão umbilical e no sangue materno foi estatisticamente significativa neste estudo. Alguns autores encontraram essa mesma associação (Sram *et al.*, 1998; De Assis *et al.*, 2009). Esses resultados sugerem que exposições genotóxicas agudas podem comprometer as células maternas e fetais na mesma proporção e que talvez a placenta não seja suficientemente capaz, como barreira, de evitar o dano de DNA fetal. A correlação estatisticamente significativa a respeito do dano de DNA pela técnica do Cometa observado entre os vasos do cordão umbilical estabelece algumas suposições sobre o processo de reparo do dano genético pelo metabolismo do feto. As enzimas fetais de reparo de DNA talvez não estejam completamente preparadas para lidar com a injúria genotóxica (Anderson *et al.*, 2000; Perera *et al.*, 2004). Então, o dano de DNA nos linfócitos da veia umbilical não foi suficientemente reparado pelo metabolismo fetal e, conseqüentemente, o

dano de DNA nas artérias umbilicais praticamente foi o mesmo mensurado na veia umbilical.

Por último, uma fraca correlação foi observada entre a frequência de MNi e dano de DNA pelo teste de Cometa no sangue materno. Entretanto, não foi alcançada significância estatística para essa análise. Isso pode mostrar a existência de alguma associação entre dano de DNA estabelecido decorrente de efeitos clastogênicos e aneugênicos (MNi) e suscetibilidade ao dano agudo (Cometa). Recentemente, Jacobsen-Pereira *et al.* (Jacobsen-Pereira *et al.*, 2018) investigaram a relação entre exposição ocupacional a pesticidas e dano de DNA em trabalhadores rurais. Perceberam, então, uma correlação significativa entre todos os biomarcadores de dano genético: Cometa, MNi, NBUDs e NPBs (Jacobsen-Pereira *et al.*, 2018).

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, dois terços de todos os exemplares avaliados foram positivos para dano agudo de DNA. MNi em linfócitos binucleados foram detectados em todas as amostras maternas e em quase todas oriundas de recém-nascidos. Uma correlação significativa foi observada entre mães e recém-nascidos quanto ao dano de DNA pelo teste do Cometa. Isso corrobora para a interação entre fatores genéticos e efeitos ambientais compartilhados por mãe e feto.

A presença de marcadores do ensaio de CBMN cyt em recém-nascidos sem correspondência em suas mães levanta evidências de que o dano de DNA materno pelo teste do CBMN cyt não pode presumir o dano de DNA nos recém-nascidos.

Quase todas as amostras de sangue umbilical apresentaram MNi. Esse achado estabelece uma ligação entre exposição transplacentária e dano genético. Entretanto, o potencial aumento de risco para doenças degenerativas, como cânceres, deve ser interpretado com cautela nesta população especial.

Futuros estudos de coorte que aprofundem a investigação entre dano de DNA em recém-nascidos e o desenvolvimento de doenças degenerativas na infância e em outras fases da vida devem ser realizados para atestar a associação entre o risco dessas doenças e biomarcadores de dano de DNA mensurados ao nascimento.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, L. M. et al. Critical Windows of Exposure for Children's Health: Cancer in Human Epidemiological Studies and Neoplasms in Experimental Animal Models. **Environ Health Perspect**, v. 108, n. suppl 3, p. 573-594, 2000.

ANDREASSI, M. G. et al. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 77-83, Jan 2011.

ASCHENGRAU, A. et al. Long-term health effects of early life exposure to tetrachloroethylene (PCE)-contaminated drinking water: a retrospective cohort study. **Environ Health**, v. 14, p. 36, Apr 12 2015.

BAILEY, H. D. et al. Parental occupational pesticide exposure and the risk of childhood leukemia in the offspring: findings from the childhood leukemia international consortium. **Int J Cancer**, v. 135, n. 9, p. 2157-72, Nov 01 2014.

BAILEY, K.; FRY, R. C. Long-term health consequences of prenatal arsenic exposure: links to the genome and the epigenome. **Rev Environ Health**, v. 29, n. 1-2, p. 9-12, 2014.

BAJPAYEE, M. et al. Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of healthy Indian population using the alkaline Comet assay. **Mutat Res**, v. 520, p. 83-91, 2002.

BALTAZAR, A.; JOAQUIM, J. J.; MATOS, C. Potential Risks of Acrylamide for Humans – Review. **Clinical Therapeutics**, v. 39, n. 8, p. e93, 2017.

BENFIELD, R. D. et al. Cortisol as a biomarker of stress in term human labor: physiological and methodological issues. **Biol Res Nurs**, v. 16, n. 1, p. 64-71, Jan 2014.

BONASSI, S. et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 93-100, Jan 2011.

BONASSI, S. et al. HUman MicroNucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of

Micronuclei. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 37, p. 31-45, 2001.

BONASSI, S. et al. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutation Research**, v. 543, n. 2, p. 155-166, 2003.

BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625-31, Mar 2007.

BRENNER, D. J. What we know and what we don't know about cancer risks associated with radiation doses from radiological imaging. **Br J Radiol**, v. 87, n. 1035, p. 20130629, Mar 2014.

BRIANEZI, G.; DE CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutat Res**, v. 204, p. 379-406, 1988.

CHENG, J. et al. Maternal coffee consumption during pregnancy and risk of childhood acute leukemia: a metaanalysis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 210, n. 2, p. 151 e1-151 e10, Feb 2014.

COLLINS, A. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 759, p. 27-39, Jan-Mar 2014.

COLLINS, A. R.; AZQUETA, A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. **Mutat Res**, v. 736, n. 1-2, p. 122-9, Aug 01 2012.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Neoplasia. In: KOOGAN, G. (Ed.). **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6. Rio de Janeiro, 2000. cap. 8, p.233-95.

DASS SINGH, M. et al. Infant birth outcomes are associated with DNA damage biomarkers as measured by the cytokinesis block micronucleus

- cytome assay: the DADHI study. **Mutagenesis**, v. 32, n. 3, p. 355-370, May 01 2017.
- DE ASSIS, K. R. et al. Genotoxicity of cigarette smoking in maternal and newborn lymphocytes. **Mutat Res**, v. 679, n. 1-2, p. 72-8, Sep-Oct 2009.
- DE BONT, R.; VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**, v. 19, n. 3, p. 169-85, May 2004.
- DE CAMARGO, B. et al. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **Int J Cancer**, v. 126, n. 3, p. 715-20, Feb 01 2010.
- DECORDIER, I. et al. Genetic susceptibility of newborn daughters to oxidative stress. **Toxicol Lett**, v. 172, n. 1-2, p. 68-84, Jul 30 2007.
- DOBZYNSKA, M. M.; PACHOCKI, K. A.; OWCZARSKA, K. DNA strand breaks in peripheral blood leucocytes of Polish blood donors. **Mutagenesis**, Sep 13 2017.
- DOLL, R.; PETO, R. The Causes of Cancer: Quantitative Estimatives of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. **Journal of the National Cancer Institute**, p. 1192-1201, 1981.
- DOLL, R.; WAKEFORD, R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. **Br. J. Radiol**, v. 70, p. 130-139, 1997.
- DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 191-205, May 2008.
- EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. **Environ Mol Mutagen**, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.
- ESKENAZI, B. et al. Pesticide Toxicity and the Developing Brain. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, n. 102, p. 228-236, 2008.
- FALCK, A. J. et al. Developmental Exposure to Environmental Toxicants. **Pediatr Clin North Am**, v. 62, n. 5, p. 1173-97, Oct 2015.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc**, v. 2, n. 5, p. 1084-104, 2007.

FENECH, M.; BONASSI, S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 43-9, Jan 2011.

FENECH, M. et al. The HUMN and HUMN_xL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 239-45, Jan 2011.

FENECH, M. F. Nutriomes and personalised nutrition for DNA damage prevention, telomere integrity maintenance and cancer growth control. **Cancer Treat Res**, v. 159, p. 427-41, 2014.

FERREIRA, J. D. et al. In utero pesticide exposure and leukemia in Brazilian children < 2 years of age. **Environ Health Perspect**, v. 121, n. 2, p. 269-75, Feb 2013.

FLINT, M. S. et al. Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 470-9, Jun 2007.

FUCIC, A.; GUSZAK, V.; MANTOVANI, A. Transplacental exposure to environmental carcinogens: Association with childhood cancer risks and the role of modulating factors. **Reprod Toxicol**, v. 72, p. 182-190, Sep 2017.

FURNESS, D. L. et al. Increased lymphocyte micronucleus frequency in early pregnancy is associated prospectively with pre-eclampsia and/or intrauterine growth restriction. **Mutagenesis**, v. 25, n. 5, p. 489-98, Sep 2010.

GABELOVA, A. et al. Radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes from healthy donors and cervical cancer patients; the correspondence of in vitro data with the clinical outcome. **Neoplasma**, v. 55, n. 3, p. 182-91, 2008.

GUYTON, K. Z. et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 5, p. 490-491, 2015.

HARA, M. R. et al. A stress response pathway regulates DNA damage through beta2-adrenoreceptors and beta-arrestin-1. **Nature**, v. 477, n. 7364, p. 349-53, Aug 21 2011.

HECK, J. E. et al. Childhood cancer and traffic-related air pollution exposure in pregnancy and early life. **Environ Health Perspect**, v. 121, n. 11-12, p. 1385-91, Nov-Dec 2013.

HILALI, N. et al. DNA damage and oxidative stress in patients with mild preeclampsia and offspring. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 170, n. 2, p. 377-80, Oct 2013.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, p. 366-374, 2001.

HOLLAND, N. et al. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 51-6, Jan 2011.

INCA. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 11/12, p. 31-34, 2015.

_____. INCA: Sobrevida de pacientes infanto-juvenis com câncer é de 64% no Brasil., Brasília, 2016. Disponível em: < <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-11/inca-sobrevida-de-pacientes-infantojuvenis-com-cancer-no-brasil-e-de-64> >. Acesso em: Oct 04, 2017.

_____. Estimativa 2018. Incidência de Câncer no Brasil. 2018. Disponível em: < www2.inca.gov.br >. Acesso em: 16/02/2018.

IRIGARAY, P. et al. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. **Biomed Pharmacother**, v. 61, n. 10, p. 640-58, Dec 2007.

JACOBSEN-PEREIRA, C. H. et al. Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 148, p. 177-183, Feb 2018.

KARALEXI, M. A. et al. Parental alcohol consumption and risk of leukemia in the offspring: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Cancer Prev**, v. 26, n. 5, p. 433-441, Sep 2017.

KASTAN, M. B. DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. **Mol Cancer Res**, v. 6, n. 4, p. 517-24, Apr 2008.

KATIC, J.; FUCIC, A.; GAMULIN, M. Prenatal, early life, and childhood exposure to genotoxicants in the living environment. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 61, n. 4, p. 455-64, Dec 2010.

KOPPEN, G. et al. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 32, n. 3, p. 397-408, May 01 2017.

LANGIE, S. A. et al. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. **Carcinogenesis**, v. 36 Suppl 1, p. S61-88, Jun 2015.

LATINO-MARTEL, P. et al. Maternal alcohol consumption during pregnancy and risk of childhood leukemia: systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 19, n. 5, p. 1238-60, May 2010.

LAVIGNE, É. et al. Maternal exposure to ambient air pollution and risk of early childhood cancers: A population-based study in Ontario, Canada. **Environment International**, v. 100, p. 139-147, 2017.

LEVARIO-CARRILLO, M. et al. Micronucleus frequency in human umbilical cord lymphocytes. **Mutat Res**, v. 586, n. 1, p. 68-75, Sep 05 2005.

LOEB, L. A. Microsatellite Instability: Marker of a Mutator Phenotype in Cancer. **Cancer Research**, v. 54, p. 5059-5063, 1994.

LOPE, V. et al. Cytogenetic status in newborns and their parents in Madrid: the BioMadrid study. **Environ Mol Mutagen**, v. 51, n. 4, p. 267-77, May 2010.

LORENZO, Y. et al. Differential genetic and functional markers of second neoplasias in Hodgkin's disease patients. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 15, p. 4823-8, Aug 01 2009.

MARKOVIC, D. et al. Lipid peroxidation, detoxification capacity, and genome damage in mice after transplacental exposure to pharmaceutical drugs. **Braz J Med Biol Res**, v. 46, n. 12, p. 1014-1020, Dec 10 2013.

MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H. Mechanistic biomarkers in acetaminophen-induced hepatotoxicity and acute liver failure: from

preclinical models to patients. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 10, n. 7, p. 1005-17, Jul 2014.

MIGLIORE, L. et al. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 85-92, Jan 2011.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 4, p. 271-89, Jul 2016.

MILLER, M. S. Transplacental lung carcinogenesis: molecular mechanisms and pathogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 198, n. 2, p. 95-110, 2004.

MILOSEVIC-DJORDJEVIC, O. et al. Micronuclei in cord blood lymphocytes as a biomarker of transplacental exposure to environmental pollutants. **Tohoku J Exp Med**, v. 213, n. 3, p. 231-9., 2007.

MOJSKA, H.; GIELECIŃSKA, I. Studies of acrylamide level in coffee and coffee substitutes: influence of raw material and manufacturing conditions. **Rocz Panstw Zakl Hig**, v. 64, n. 3, p. 173-181, 2013.

MØLLER, P. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposure. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 336–345, 2006a.

_____. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. **Mutation Research**, v. 612, n. 2, p. 84-104, 2006b.

NADIN, S. B.; VARGAS–ROIG, L. M.; D.R., C. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1183-1186, 2001.

NERI, M. et al. Baseline Micronuclei Frequency in Children: Estimates from Meta- and Pooled Analyses. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 9, p. 1226-1229, 2005.

PANEL, E. C. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **The EFSA Journal** v. 724, p. 1-114, 2008.

_____. Scientific Opinion on acrylamide in food. **EFSA Journal**, v. 13, n. 6, p. 4104, 2015a. ISSN 18314732.

_____. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. **EFSA Journal**, v. 13, n. 1, p. 3978, 2015b. ISSN 18314732.

PERERA, F. P. et al. Biomarkers in Maternal and Newborn Blood Indicate Heightened Fetal Susceptibility to Procarcinogenic DNA Damage. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1133-1136, 2004.

PETRIDOU, E. et al. Infant leukaemia after in utero exposure to radiation from Chernobyl. **Nature**, v. 382, p. 352-353, July, 25 1996.

PETTERSSON, A. et al. Women smoking and testicular cancer: one epidemic causing another? **Int J Cancer**, v. 109, n. 6, p. 941-4, May 10 2004.

PRITCHARD-JONES, K. et al. Sustaining innovation and improvement in the treatment of childhood cancer: lessons from high-income countries. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 3, p. e95-e103, 2013.

ROOS, W. P.; THOMAS, A. D.; KAINA, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 1, p. 20-33, Jan 2016.

ROSS, J. A. et al. Maternal exposure to potential inhibitors of DNA topoisomerase II and infant leukemia (United States): A report from the Children's Cancer Group. **Cancer Causes & Control**, v. 7, p. 581-590, 1996.

RUMRICH, I. K. et al. Maternal Smoking and the Risk of Cancer in Early Life - A Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0165040, 2016.

SANTOS, R. A. et al. Basal levels of DNA damage detected by micronuclei and comet assays in untreated breast cancer patients and healthy women. **Clin Exp Med**, v. 10, n. 2, p. 87-92, Jun 2010.

SELEVAN, S. G.; KIMMEL, C. A.; MENDOLA, P. Identifying Critical Windows of Exposure for Children's Health. **Environ Health Perspect**, v. 108, n. 3, p. 451-5, 2000.

SHEN, Z. Genomic instability and cancer: an introduction. **J Mol Cell Biol**, v. 3, n. 1, p. 1-3, Feb 2011.

SHU, X. O. et al. Parental Occupational Exposure to Hydrocarbons and Risk of Acute Lymphocytic Leukemia in Offspring. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 8, p. 783-791, 1999.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7-30, Jan-Feb 2016.

SINGH, N. et al. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SRAM, R. J. et al. Single cell gel electrophoresis assay: sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. **Mutagenesis**, v. 13, n. 1, p. 99-103, 1998.

STELIAROVA-FOUCHER, E. et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 6, p. 719-731, 2017.

SYNOWIEC, E. et al. Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristics in breast cancer patients. **Mutat Res**, v. 648, n. 1-2, p. 65-72, Dec 15 2008.

THE LANCET, O. Cancer risk paradox: grand plans fall short? **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 5, p. 555, 2017.

TICE, R. R. et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 2, p. 87-108, Mar 2015.

TURNER, M. C.; WIGLE, D. T.; KREWSKI, D. Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 1, p. 33-41, Jan 2010.

ULLATE, C. C.; MATA, A. I.; ECHANDI, M. L. A. Acrylamide formation during the processing of food. A review. **Rev. Costarricense de Salud Publica**, v. 25, n. 2, p. 28-35, 2015.

VAHAKANGAS, K. Chemical exposure as etiology in developmental origin of adult onset human cancer. **Front Pharmacol**, v. 2, p. 62, 2011.

VANDE LOOCK, K. et al. Maternal and gestational factors and micronucleus frequencies in umbilical blood: the NewGeneris Rhea

cohort in Crete. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 10, p. 1460-5, Oct 2011.

VASAVI, M. et al. Assessment of Genetic Damage in Inflammatory, Precancerous, and Cancerous Pathologies of the Esophagus Using the Comet Assay. . **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 14, n. 4, p. 477-82, Aug 2010.

WANG, H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 388, p. 1459- 544, 2016.

WANG, L.; CHOI, H. Using semiparametric-mixed model and functional linear model to detect vulnerable prenatal window to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons on fetal growth. **Biometrical Journal**, v. 56, n. 2, p. 243–255, 2014.

YAN, K. et al. Corrigendum: The Associations Between Maternal Factors During Pregnancy and the Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-Analysis. **Pediatr Blood Cancer**, v. 63, n. 5, p. 953-4, May 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Karine Souza Da Correggio, sou Médica da Maternidade do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, mestranda do programa de Pós Graduação em Ciências Médicas e estou desenvolvendo a pesquisa: ***Avaliação do dano de DNA em sangue de cordão umbilical em recém-nascidos do HU –UFSC: correlação com intercorrências no período pré-concepcional, gestação e parto***, com o objetivo de avaliar se a história gestacional e as intercorrências durante o parto (tipo de parto, medicamentos, bem estar do bebê ao nascimento) influenciam nos níveis de estresse oxidativo e de dano de DNA encontrados no sangue de cordão umbilical após o parto. A partir desses dados, espera-se compreender melhor os fatores relacionados ao dano genético relacionado à gestação e ao parto.

Durante a pesquisa você será entrevistada de maneira breve e serão colhidos uma amostra do seu sangue e uma amostra do sangue do cordão umbilical (logo após o parto e clampeamento) bem como alguns dados sobre o tipo de parto e condições do nascimento do bebê do prontuário médico, no momento da alta hospitalar.

A entrevista consiste de questionamentos básicos sobre sua saúde antes e durante a gestação e sobre uso medicações e outras drogas, o que pode deixá-la um pouco constrangida. Na coleta do seu sangue você poderá sentir algum desconforto, entretanto nem o bebê e nem você sentirão qualquer dor na coleta do sangue de cordão, já que a mesma ocorrerá após o clampeamento do mesmo. Ressalta-se que durante os procedimentos de coleta de dados você estará sempre acompanhada por um dos pesquisadores, que lhe prestará toda a assistência necessária.

Espera-se que o trabalho possa contribuir no entendimento das variáveis relacionadas ao maior dano de material genético fetal, para que no futuro possa ser melhorada a atenção à saúde da gestante e do feto durante a assistência pré-natal e nascimento.

Você tem a liberdade de se recusar em participar do estudo, sem que isto prejudique seu atendimento pelo profissional de saúde. Se você estiver de acordo em participar, posso garantir que as informações fornecidas serão confidenciais, tratadas com respeito pelos pesquisadores e só serão utilizadas neste trabalho. Os resultados desta pesquisa com um todo poderão ser apresentados em revistas ou encontros científicos pertinentes, entretanto não serão, em hipótese alguma, revelados seu nome ou qualquer informação relacionada à sua privacidade. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do

mesmo a qualquer momento, sem ter que apresentar nenhuma justificativa, sinta-se à vontade e faça contato pelos telefones (48) 3721 9104 ou (48) 9977 8879 ou pelo email kdacoregio@yahoo.com.br para que eu possa excluir seus dados da pesquisa. Se sentir necessidade, você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC pelo telefone (48) 3721 6094 ou pessoalmente na rua Desembargador Vitor Lima, 222, (Prédio Reitoria II, sala 401), Campus Universitário UFSC, Trindade, Florianópolis.

O pesquisador responsável, que também assina esse documento, compromete-se a conduzir a pesquisa de acordo com o que preconiza a Resolução 466/12 de 12/06/2012, que trata dos preceitos éticos e da proteção aos participantes da pesquisa, mesmo assim caso você tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa, poderá solicitar indenização de acordo com a legislação vigente.

Para participar, você receberá duas vias deste documento que serão rubricadas e assinadas por você e pelo pesquisador responsável. Guarde sua via cuidadosamente, pois é um documento que traz informações importantes de contato e garante seus direitos de participante da pesquisa.

Assinaturas: Pesquisador principal _____

Pesquisador responsável _____

Eu, _____, fui esclarecida sobre a pesquisa: *Avaliação do dano de DNA em sangue de cordão umbilical em recém-nascidos do HU –UFSC: correlação com intercorrências no período pré-concepcional, gestação e parto* e concordo com que meus dados sejam utilizados na realização da mesma. Estou ciente que não obterei qualquer benefício financeiro ou de outra ordem ao fazer parte desta pesquisa e que posso desistir a qualquer tempo sem ter que prestar nenhuma justificativa.

Florianópolis, ____/____/____ (Data)

Assinatura: _____

RG: _____

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

Por favor, leia cuidadosamente as questões a seguir e responda-as com toda a sinceridade. As suas informações não serão associadas ao seu nome em nenhum documento público e apenas será conhecida pelo investigador principal do estudo. As suas respostas têm um impacto direto na interpretação dos resultados. Então, pedimos que você preencha todas as questões com informações corretas. Obrigada pela sua contribuição.

- 1 Nome completo: _____
- 2 Data (preenchido pelo investigador): _____
protocolo (preenchido pelo investigador): _____

Esta porção do papel será destacada do restante do questionário e guardada pelo investigador principal. Apenas o número do protocolo será usado para identificar as páginas subseqüentes. Se for preciso espaço adicional para responder as questões, utilize o verso da página e identifique com o número da questão.

Protocolo: _____

HISTÓRIA PESSOAL

- 3 Data: _____
- 4 Idade: _____ Data de nascimento: _____
- 5 Grupo étnico: () branco () negro () pardo () japonês
() índio () outro
- 6 Estado civil: () casada () união estável () solteira ()
separada/divorciada () viúva
- 7 Número de gestações: __ Número de filhos: __ Número de abortos: __
- 8 Você está empregada no momento: () sim () não
- 9 Qual o nome da empresa em que trabalha atualmente ou a última em
que você trabalhou? _____
- 10 Quanto tempo você trabalhou/ trabalha nessa empresa? _____
- 11 Nos últimos 10 anos, para qual empresa trabalhou e por quanto tempo?

Empresa: _____ Anos: _____
 Empresa: _____ Anos: _____
 Empresa: _____ Anos: _____
 Empresa: _____ Anos: _____
 Empresa: _____ Anos: _____

12 Qual tipo de trabalho você faz ou costumava fazer? _____

HISTÓRIA DE EXPOSIÇÃO

13 Você já foi exposta a algum dessas substâncias em seu trabalho?

Substância	Sim/Não	Mês e ano da primeira exposição	Mês e ano da última exposição	Quanto tempo de exposição em termos de dias, meses ou anos no total
Asbesto	() sim () não			
Radiação	() sim () não			
Derivados do carvão	() sim () não			
Poeira (madeira, couro, partículas finas de metais)	() sim () não			
Pesticidas/Herbicidas	() sim () não			
Derivados do petróleo	() sim () não			
Tinta/corante	() sim () não			
Solventes	() sim () não			
Outros (especifique)	() sim () não			

14 Liste o nome de qualquer substância específica que você sabe que foi exposta por inalação ou por contato direto com a pele no trabalho no último ano e nos últimos dez anos.

Substância no último ano: _____

Frequência média de exposição no mês: _____

Substâncias nos últimos 10 anos: _____

Frequência média de exposição no mês: _____

- 15 Por favor, liste as exposições químicas ou físicas que você experienciou no último ano e nos últimos dez anos durante a prática de um “hobby” ou outras atividades não ocupacionais.

Substância no último ano: _____

Frequência média de exposição no mês: _____

Substâncias nos últimos 10 anos: _____

Frequência média de exposição no mês: _____

HISTÓRIA DE TABAGISMO

- 16 Você já fumou? Sim Não (vá à questão 17)

a. Se sim, por quantos anos? _____ anos

b. Você continua fumando?

Sim (vá à questão 16 c)

Não. Parei em _____ (mês e ano) (vá à questão 16 f)

c. Você costuma fumar cigarros? Sim Não

Se sim, quantos maços por dia?

menos de ½ maço

½ a 1 maço

mais de 1 maço. Quantos? _____

Você fuma cigarros com filtro? Sim Não

Qual sua marca de escolha? _____

d. Você costuma fumar charutos? Sim Não

Se sim, quantos charutos por dia? 1 charuto

2-3 charutos

4 ou mais charutos

e. Você costuma fumar cachimbo? Sim Não

Se sim, quantos charutos por dia? 1 charuto

2-3 charutos

4 ou mais charutos

O que você costumava fumar no passado?

cigarros

charutos

cachimbo

f. Você costuma mascar fumo Sim Não

g. Você costuma usar cigarro de corda/ palheiro? Sim Não

17 Você tomou alguma medicação prescrita por médico no último ano (por exemplo, anti-hipertensivo, antibióticos, insulina, tranquilizantes, relaxantes musculares, ácido fólico, sulfato ferroso etc?)

() Sim () Não. Se sim, quais?

Tipo de medicação	de	Dose	Frequência por dia	Mês do início e final
-------------------	----	------	--------------------	-----------------------

18 Você tomou alguma medicação sem prescrição no último ano (por exemplo, aspirina, dipirona, paracetamol, antiácidos, anti-histamínicos, sedativos etc?) () Sim () Não

Se sim, quais?

Tipo de medicação	Dose	Frequência por dia	Mês do início e final
-------------------	------	--------------------	-----------------------

19 Você toma ou tomou alguma vitamina nos últimos 6 meses? () Sim () Não. Se sim, quais?

Tipo de Vitamina	Dose	Frequência na semana
------------------	------	----------------------

20 a. Você já teve uma dessas doenças:

Câncer	() Sim	() Não
Hepatite	() Sim	() Não
Mononucleose	() Sim	() Não
Herpes	() Sim	() Não
AIDS	() Sim	() Não
Meningite	() Sim	() Não
Infecções virais ou bacterianas	() Sim	() Não

Doenças cardiovasculares () Sim () Não
 Diabetes () Sim () Não
 Outra doença mais grave () Sim () Não

b. Se sim, especifique qual, quando ficou doente e indique o tratamento.

Doença	Período de acometimento (Mês/ano até mês/ano)	Tratamento
---------------	--	-------------------

c. Liste qualquer outra doença e tratamento que você realizou nos últimos 12 meses (incluir resfriados, gripe etc)

Doença	Período de acometimento (Mês/ano até mês/ano)	Tratamento
---------------	--	-------------------

d. Liste qualquer vacina que tenha recebido nos últimos 12 meses.

Tipo de vacina	Data da administração
-----------------------	------------------------------

e. Liste qualquer Raio X diagnóstico ou terapêutico recebido nos últimos 10 anos (não odontológico)

Razão para o Raio X	Ano que recebeu
----------------------------	------------------------

f. Você já realizou algum raio X odontológico? () Sim () Não

Se sim, quando?

- () no último mês
- () nos últimos 6 meses
- () entre 6 e 12 meses
- () há mais de 12 meses

g. Você realizou alguma cirurgia durante o último ano?

Data

Cirurgia/Motivo

h. Dê as datas em que você teve alguma febre alta durante o último ano

Data

Doença associada

Medicações que tomou

HISTÓRIA NUTRICIONAL (deve refletir os hábitos do dia a dia)

21. Você se alimenta apenas de vegetais? () Sim () Não

22. Você come carne? () Sim () Não

a. Se sim, com que frequência?

	Dias por semana			
	1-2	3-4	5-6	Todo dia
Bife(bovino)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Peixe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frango	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Porco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Outro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

b. Como você prefere seu bife? () Mal passado () ao ponto
() bem passado

23.a Você usa adoçante? () Sim () Não

b. Quantas vezes por dia? _____

24.a Você toma bebidas dietéticas? () Sim () Não

b. Quantos copos por dia? _____

25. Liste abaixo algum comentário sobre sua dieta não abordado nas questões anteriores (dieta hiperprotéica, baixo teor de carboidratos...)

26. a. Você toma café? () Sim () Não

b. Quantas vezes por dia? _____

c. Descafeinado? () Sim () Não

27. a. Você toma chá? () Sim () Não

b. Quantas vezes por dia? _____

c. Você toma cerveja? () Sim () Não

Se sim, quanto?

- 1-6 garrafas ou latas por semana
- 7-12 garrafas por semana
- 13-24 garrafas por semana
- mais de 24 garrafas por semana. Se essa categoria for escolhida, qual a média consumida por semana? _____ garrafas ou latas/ semana.

d. Você toma vinho? () Sim () Não

Se sim, quanto?

- 1-4 taças por semana
- 5-8 taças por semana
- 9-16 taças por semana
- mais de 16 taças por semana. Se essa categoria for escolhida, qual a média consumida por semana? _____ taças/ semana.

28. Você toma outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho)?

() Sim () Não

Se sim, quanto?

- 1-4 taças por semana
- 5-8 taças por semana
- 9-16 taças por semana
- mais de 16 taças por semana. Se essa categoria for escolhida, qual a média consumida por semana? _____ taças/ semana.

29. Você usa regularmente saunas ou toma banhos muito quentes?

() Sim () Não

Com que frequência? _____ Quão recente? _____

HISTÓRIA GENÉTICA

30. Você conhece algum defeito de nascimento, doenças genéticas ou doenças hereditárias que afetam seus pais, irmãos, irmãs e/ou os filhos deles? () Sim () Não

Se sim, por favor, especifique: _____

31. Você e seu esposo tiveram dificuldade em engravidar? (mais de 12 meses tentando)

() Sim () Não

32. Você já teve uma criança com algum defeito de nascimento, doenças genéticas ou doenças hereditárias? () Sim () Não

Se sim, por favor, especifique e diga quando foi: _____

33. Você já teve abortamento espontâneo, provocado ou feto morto ao nascer?

() Sim () Não

34. Você tem uma irmã gêmea idêntica viva? () Sim () Não

APÊNDICE C – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

Formulário de Coleta de Dados**AVALIAÇÃO DO DANO DE DNA EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL EM RECÉM-NASCIDOS DO HU-UFSC: relação com intercorrências durante o período pré-concepcional, gestação e parto.**

PROCEDÊNCIA:

PARIDADE:

DATA:

ESCOLARIDADE:

IDADE GESTACIONAL:

RENDA:

DADOS PRÉ-CONCEPCIONAIS: questionário. Histórico de drogadição:**DADOS GESTACIONAIS:**

USO DE ÁCIDO FÓLICO:

DOENÇAS NA GESTAÇÃO:

HAS:

DIABETES:

INFECÇÕES:

OUTRAS:

PESO E ALTURA:

GANHO DE PESO NA GESTAÇÃO:

DADOS DO PARTO:

Motivo da internação:

Tempo de trabalho de parto:

Tempo de período expulsivo:

Tempo de bolsa rota:

Medicações durante trabalho de parto:

Tipo de parto:

Horário nascimento:

Líquido meconial:

sexo RN:

Apgar do recém-nascido:

Peso do recém-nascido

AVALIAÇÃO GENÉTICA: MÃE**RECÉM-NASCIDO****RESULTADO TESTE MICRONÚCLEO:**

TESTE COMETA:

APÊNDICE D – INFOGRÁFICO COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE MATERNO E FETAL.



9

PASSOS PARA COLETA SANGUE DA MÃE E DO CORDÃO UMBILICAL - DANO DE DNA -

- 1 CLAMPEAR CORDÃO**
Procedimento padrão da maternidade
- 2 COLETA SANGUE DAS ARTÉRIAS UMBILICAIS**
Com uma seringa e agulha colher 4 mL * de sangue das artérias umbilicais
- 3 COLETA SANGUE DA VEIA UMBILICAL**
Com uma seringa e agulha colher 4 mL * de sangue da veia umbilical
- 4 COLETA SANGUE MATERNO**
Colher 4 mL * de sangue periférico materno.
- 5 TRANSFERÊNCIA AMOSTRAS**
Cada amostra deve ser transferida para um tubo verde (heparina), num total de 3 tubos
- 6 HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS**
Homogeneizar a amostra invertendo cada tubo por 5 vezes sem chacoalhar
- 7 REVESTIMENTO DOS TUBOS**
Cobrir os tubos com papel alumínio para proteger as amostras da luz
- 8 IDENTIFICAÇÃO**
Prontuário Iniciais da mãe Data
Sítio de coleta (veia e artéria umbilical/ materno)
- 9 ARMAZENAMENTO**
Tubos em pé, dentro do isopor aberto refrigerado em geladeira por até 24 h (sem contato com gelo e sem congelar)

* mínimo de 2 mL.

ANEXO

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM SERES HUMANOS DA UFSC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do dano de DNA em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos da maternidade do HU-UFSC: correlação com intercorrências pre-concepcionais, gestação e parto.

Pesquisador: Alexandre Sherley Casimiro Onofre

Área Temática: Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 54373316.4.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.745.779

Apresentação do Projeto:

Projeto de Da Correggio, Maluf e Onofre, sem identificação de graduação a ser obtida com a pesquisa. Será conduzido um estudo prospectivo transversal, envolvendo parturientes atendidas na maternidade do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina – HU-UFSC, localizado na cidade de Florianópolis-SC; O estudo será conduzido de novembro de 2016 a maio de 2017.

Propõe-se avaliar o dano de DNA em células do sangue de cordão umbilical de recém-nascidos da maternidade do Hospital Universitário HU-UFSC e correlacioná-lo com dados pré-concepcionais, intercorrências da gestação e do parto. Essa avaliação do dano será estimada com auxílio dos métodos de micronúcleos e cometa. A história gestacional e as intercorrências durante o parto influenciam nos níveis de estresse oxidativo e de dano de DNA no sangue do cordão umbilical.

A população e as amostras (100 participantes) examinadas deverão obedecer aos seguintes

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Rectoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.745.779

critérios de inclusão:

- (i) ter idade igual ou superior a 18 anos;
- (ii) estar sendo internada em trabalho de parto, para indução de parto ou interrupção da gestação por indicação materna ou fetal de feto único, vivo, maior que 28 semanas
- (iii) aceitar participar da pesquisa através da assinatura do TCLE.

O presente estudo contará com a participação do laboratório de Genética do Hospital Universitário HUUFSC, que tem condições técnicas para contribuir com o projeto.

Serão coletados dados complementares ao parto antes da alta materna como tipo de parto, tempo de trabalho de parto, tempo de período expulsivo, medicações usadas durante a internação e condições de nascimento do bebê.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o dano de DNA no sangue do cordão umbilical e correlacionar com achados pre-concepcionais, da gestação e do parto.

- 1 Analisar os dados sócio-demográficos das gestantes que consentiram participar do estudo;
- 2 Correlacionar o dano de DNA no sangue do cordão umbilical com hábito de vida pré-concepcional;
- 3 Correlacionar o dano de DNA no sangue do cordão umbilical com injúrias à saúde materna durante a gestação;
- 4 Correlacionar o dano de DNA no sangue do cordão umbilical com fármacos e outros xenobióticos utilizados durante a gestação;
- 5 Correlacionar o dano de DNA no sangue do cordão umbilical com características do trabalho de parto e parto;
- 6 Testar a associação entre condições de nascimento do recém-nascido e dano de DNA no sangue de cordão.
- 7 Comparar o dano de DNA no sangue materno com o do sangue fetal

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.745.779

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores alteraram na PB delineando os riscos ao participante com clareza.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente proposta possui relevância acadêmica e institucional, com a possibilidade de ofertar dados da história gestacional e as intercorrências durante o parto influenciam nos níveis de estresse oxidativo e de dano de DNA no sangue do cordão umbilical.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

FOLHA DE ROSTO - Apresentada e assinada pelo Sub-coordenador - Leonardo Schiavon, sem carimbo de identificação, assinada em 10/03/2016.

Apresenta Anuência da Instituição onde os dados serão coletados;

Apresenta Anuência do laboratório de Genética do Hospital Universitário HU-UFSC, citado como colaborador;

Apresenta dois formulários que serão utilizados e incluiu as traduções dos questionários solicitadas.

Calendário apresentado com proposta de início da pesquisa para 1/11/2016.

Recomendações:

Diante das alterações solicitadas no Parecer: 1.694.076, e das reestruturações apresentadas não temos novas recomendações de alteração ao projeto. Porém, no senti de reafirmar a necessidade de manter-se atento aos preceitos éticos recomenda-se encaminhar a este comitê, caso ocorram alterações no decorrer da pesquisa as notificações necessárias e os relatórios descritos na Resolução 466/12.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Consideramos o protocolo adequado para execução do projeto apresentado, sendo o parecer favorável a aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	09/09/2016		Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.745.779

Básicas do Projeto	ETO_665864.pdf	11:15:44		Aceito
Outros	Questionariosauudepessoal.pdf	09/09/2016 11:15:22	Alexandre Sherlley Casimiro Onofre	Aceito
Outros	Formulariocoletadados.pdf	09/09/2016 11:14:29	Alexandre Sherlley Casimiro Onofre	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETODEPESQUISA.pdf	09/09/2016 11:13:23	Alexandre Sherlley Casimiro Onofre	Aceito
Outros	CarranoeNatarajan.pdf	14/07/2016 14:29:15	Alexandre Sherlley Casimiro Onofre	Aceito
Outros	CartaRespostaPendencias.pdf	14/07/2016 14:28:50	Alexandre Sherlley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoAlberto.pdf	14/07/2016 14:27:10	Alexandre Sherlley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoAlexandre.pdf	14/07/2016 14:27:02	Alexandre Sherlley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoKarine.pdf	14/07/2016 14:26:44	Alexandre Sherlley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoScharbel.pdf	14/07/2016 14:26:29	Alexandre Sherlley Casimiro Onofre	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEnovo.pdf	14/07/2016 14:24:53	Alexandre Sherlley Casimiro Onofre	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoatualizada.pdf	14/07/2016 14:24:44	Alexandre Sherlley Casimiro Onofre	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_projeto_investigador.docx	21/03/2016 11:29:40	Karine Souza Da Correggio	Aceito
Outros	Formulario_coleta_dados.docx	21/03/2016 11:26:26	Karine Souza Da Correggio	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_inst.jpg	21/03/2016 11:25:17	Karine Souza Da Correggio	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	22/02/2016 23:16:19	Karine Souza Da Correggio	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.745.779

FLORIANOPOLIS, 26 de Setembro de 2016

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br