Érika Negri Moralles

**Estudo dos efeitos mutagênicos do tabagismo
passivo em cães**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Elia Garcia Caldini

**São Paulo
2014**

Érika Negri Moralles

**Estudo dos efeitos mutagênicos do tabagismo
passivo em cães**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Elia Garcia Caldini

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Morales, Érika Negri
Estudo dos efeitos mutagênicos do tabagismo passivo em cães / Érika Negri
Morales. -- São Paulo, 2014.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Elia Tamaso Espin Garcia Caldini.

Descritores: 1.Poluição por fumaça de tabaco 2.Mutagênese 3.Testes para
micronúcleos 4.Cães 5.Nicotina

USP/FM/DBD-358/13

Dedico esta Dissertação a meu filho Fernando Negri Moralles e a meu marido Junio Fernando Moralles pelo amor e apoio.

E a meus pais, Elmo Negri e Najara Rosa Cataldi Negri, pelos ensinamentos e incentivos durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elia Garcia Caldini, pela oportunidade, pela confiança, apoio e sugestões para o estudo. E também por abrir as portas de seu Laboratório para o desenvolvimento do projeto.

À Dra. Elnara Marcia Negri, que esteve sempre ao meu lado em todas as etapas deste trabalho, me dando apoio, incentivo e compartilhando comigo a sua grande experiência em pesquisa científica.

Ao Dr. Marcelo Alves Ferreira, pela ajuda com a estatística e pela amizade, carinho e disponibilidade.

Às Dras. Regiani Carvalho Oliveira e Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues, pela revisão e sugestões valiosas.

À Tania Regina de Souza, Secretária do Programa Fisiopatologia Experimental, por todo apoio, amizade, competência e boa vontade, fundamentais para a conclusão e formatação deste trabalho.

A todos os funcionários do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP (LIM 59), que aqui cito em ordem alfabética: Gildasio Vieira Rocha, Gisele Tainá de Souza, Maria Iris Amorim Mendes e Valéria Veiga Sales, por estarem sempre dispostos a ajudar e me receberem sempre com um sorriso.

À CAPES, que concedeu uma Bolsa de Mestrado, o que permitiu que eu pudesse me dedicar integralmente ao Curso de Pós-graduação.

A todos os proprietários voluntários e aos animais que participaram e tornaram possível nosso estudo.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	11
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	12
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

Morales EM. *Estudo dos efeitos mutagênicos do tabagismo passivo em cães* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O cigarro é considerado pela Organização Mundial de Saúde como o maior agente de poluição ambiental doméstica atualmente. Muitos estudos têm analisado os efeitos do tabagismo passivo em seres humanos, mas pouco tem sido estudado em animais domésticos, assim como crianças, são os mais afetados pelo tabagismo passivo. O presente estudo busca correlacionar o exposição ao fumo passivo com a incidência de mutagênese através do teste da presença de micronúcleos nas células epiteliais da mucosa oral de cães expostos. Paralelamente, foi estudada a possível correlação desde dado com o nível de dependência à nicotina do proprietário, avaliada pelo teste de Fagerstrom. Para a avaliação da mutagênese, esfregaços da mucosa oral foram colhidos de 48 cães, 23 fumantes passivos e 25 não expostos. O número de micronúcleos por célula foi avaliado em todas as amostras. Os dados mostram que a incidência de micronúcleos foi estatisticamente maior nos animais fumantes passivos comparado com o controle ($p < 0,001$). Além disso, nos animais dos proprietários com escore 8 (dependência de nicotina muito alta) no Teste de Fagerstrom, a quantidade de micronúcleos foi significativamente maior do que nos animais de proprietários com escore 6 (alta dependência). Da mesma forma, nos cães de proprietários com escore 6 a incidência de micronúcleos foi estatisticamente maior que nos cães de proprietários com escore 3. Concluiu-se que existe uma associação entre a dependência da nicotina do proprietário e a frequência de alterações citogenéticas no cão exposto ao fumo passivo. Além das implicações para a saúde do animal, as observações do presente estudo podem contribuir para um estímulo à cessação do tabagismo em proprietários de animais domésticos.

Descritores: Poluição por fumaça de tabaco; Mutagênese; Testes para micronúcleos; Cães; Nicotina.

ABSTRACT

Morales EM. *Mutagenic effects of passive smoking in pet dogs* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Cigarette smoking is considered by WHO as the major domestic air pollution agent. Many studies have addressed passive smoking and human beings but little has been studied about domestic animals. Domestic animals as well as children are dramatically affected by passive smoking. The present work tries to correlate passive smoking and micronucleus incidence in oral mucosa smears of pet dogs. In addition we studied a possible correlation between micronucleus incidence and owner's nicotine dependence. With this purpose, owners were submitted to Fagerström questionnaire to address nicotine dependence. In the same way, oral mucosa smears were collected from 48 animals, 23 passive smokers and 25 not exposed to passive smoking. Micronucleus counts were performed in all samples at light microscopy. We observed a statistically significant difference ($p < 0,001$) between the two groups with an increased incidence of micronucleus formation in the passive smokers group compared to controls. Moreover, in the animals whose owners were at score 8 (very high nicotine dependence) on the Fagerstrom Test, the number of micronuclei was significantly higher than in animals with owners of score 6 (high dependency). Likewise, in dogs whose owners had a score 6 the incidence of micronuclei was statistically higher than in dogs whose owners had a score 3. It was concluded that there is an association between nicotine dependence of owners and frequency of cytogenetic alterations in dogs exposed to secondhand smoke. Besides ambient health impacts, the observations of the present study may contribute in helping dog owners quit smoking.

Descriptors: Passive smoking, Mutagenesis, Micronucleus, Dogs, Nicotin.

1 INTRODUÇÃO

A fumaça do cigarro é apontada pela Organização Mundial de Saúde como o maior agente de poluição doméstica ambiental. Isto se torna muito mais relevante, quando se considera que as pessoas passam 80% de seu tempo em locais fechados tais como residências, hospitais e trabalho.

Nesta fumaça estão incluídas mais de 4000 substâncias geradas a partir dos aproximadamente 600 ingredientes do cigarro; muitas dessas substâncias são tóxicas e causam um enorme problema de saúde pública (LOFROTH, 1989).

Somente 15% da fumaça do cigarro são inalados pelo fumante, todo o resto é disperso no meio ambiente, expondo pessoas e animais domésticos ao fumo passivo, ou seja, à inalação de altas doses de substâncias tóxicas, causando milhares de mortes anualmente (OBERG et al., 2011).

Muitos estudos têm analisado os efeitos do tabagismo passivo em seres humanos, mas pouco tem sido estudado em relação a animais domésticos, embora haja evidências de risco aumentado para câncer de pulmão em cachorros expostos ao fumo passivo (REIF et al., 1992). Assim sendo, este trabalho teve como objetivo analisar a incidência de alterações citogenéticas em esfregaço de células epiteliais bucais de cachorros expostos ao fumo passivo em ambiente doméstico, utilizando como marcador o número de micronúcleos por célula, buscando correlacionar este dado ao nível de dependência à nicotina do proprietário do animal.

1.1 Tabagismo como problema de saúde pública

O tabaco é uma droga lícita cujo uso é amplamente disseminado no planeta, tendo sido considerado como um "estilo de vida" até as últimas duas décadas do século XX, quando se reconheceu definitivamente os enormes riscos à saúde associados ao seu consumo. Estima-se que cerca de 1/3 da população mundial adulta seja fumante.

Na fumaça do cigarro já foram identificadas cerca de 4.720 substâncias tóxicas, as quais tem ação farmacológica ativa, citotóxica, antigênica, mutagênica e/ou carcinogênica. A fase gasosa da fumaça do cigarro (92%) é composta, entre outros, por monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de nitrogênio, amônia, nitrosamidas voláteis, cianeto, compostos voláteis contendo enxofre, hidrocarbonetos voláteis, álcoois, amônio, cetonas, formaldeído, acetaldeído e acroleína. A fase particulada corresponde a 8% da fumaça do cigarro e contém água, nicotina e o alcatrão, que, sozinho, concentra 43 substâncias altamente tóxicas como arsênico, níquel, benzopireno, cádmio e chumbo (LOFROTH, 1989).

O tabagismo é a maior causa de mortes evitáveis, causando cerca de 6 milhões de mortes a cada ano e criando custos econômicos relacionados a doenças de fumantes ativos e passivos, perda na produtividade profissional e danos ambientais. Deve-se ressaltar que o tabagismo mata mais que a AIDS, acidentes automobilísticos, assassinatos e suicídios juntos (INCA, 2011).

Há uma gama de doenças que para as quais o hábito de fumar representa importante fator de risco, tais como, câncer de pulmão, laringe, esôfago, boca, bexiga, pâncreas, rim, estômago e colo uterino, doenças

ateroscleróticas (doença coronária, doença vascular periférica, derrame cerebral), doença pulmonar obstrutiva crônica e úlcera péptica (INCA, 2011).

Ainda em termos gerais, é importante lembrar que a mulher apresenta risco maior relativo para as doenças associadas ao uso de tabaco (35% maior) que o homem, como acidentes vasculares, infarto agudo do miocárdio e diversos tipos de tumores (MENDELSON, 2011).

Além disso, as mulheres que fumam durante a gestação provocam danos à saúde do feto em desenvolvimento, uma vez que a nicotina atravessa livremente a barreira materno-fetal, reduzindo o fluxo sanguíneo, levando a uma restrição no crescimento fetal com o dobro de risco para aborto e parto prematuro. A literatura científica estabeleceu claramente que a nicotina, por agir uma neurotoxina para o cérebro em desenvolvimento causa problemas cognitivos, emocionais e comportamentais (ROGERS, 2009), além de aumentar o risco pós-natal para doenças respiratórias (GILLILAND et al., 2000, CARLSON e CARLSON, 2008) e cardiovasculares (WESTBROOK et al., 2010) em indivíduos expostos durante a gestação, sendo que o aumento de estresse oxidativo cardíaco parece ser um dos mecanismos associados às alterações morfofuncionais (DAMACENO-RODRIGUES et al., 2009).

1.2 Avaliação da dependência à nicotina

Dentre os componentes do cigarro está a nicotina, um alcalóide vegetal com propriedades psicoativas, que exerce ação estimulante e depressora

ganglionar dose-dependente e que contém elevada capacidade para induzir dependência física e psicológica (VOLKOW, 2006).

O mecanismo de dependência da nicotina depende basicamente da ativação do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, que constitui-se na via da recompensa, que exerce um efeito reforçador positivo, através do relaxamento, redução do estresse, aumento do estado de vigília, melhora da função cognitiva, modulação do humor e perda de peso. Na ausência do reforço positivo, devido à retirada da nicotina, aparecem os efeitos reforçadores negativos como nervosismo, irritabilidade, ansiedade, concentração e função cognitiva prejudicadas, além do ganho de peso devido ao aumento do apetite (DI CHIARA, 2000, PICCIOTO et al., 2000).

A nicotina tem efeitos simpaticomiméticos, pois se liga a receptores colinérgicos nos gânglios autônomos, na medula adrenal, na junção neuromuscular e no sistema nervoso central. Assim sendo, seus efeitos podem ocorrer pela ativação de quimiorreceptores periféricos ou diretamente no tronco cerebral, resultando em aumento da frequência cardíaca, vasoconstrição coronária e aumento da pressão arterial, além de promover a secreção de adrenalina e noradrenalina pela medula adrenal (BENOWITZ, 1996, CUNHA, 2007).

O Questionário de Tolerância idealizado por Fagerstrom, em 1978, (e que ficou conhecido como Teste de Fagerstrom ou Teste de Dependência à Nicotina) tem sido um instrumento amplamente utilizado por pesquisadores e médicos para classificar os fumantes com base na sua dependência da nicotina (DEHEINZELIN et al., 2005).

Em 1991, foi realizada a adaptação desse teste que passou a conter 6 questões ao invés das 8 iniciais (HEATHERTON et al., 1991) e, em 2002, a versão em português do teste foi validada no Brasil (CARMO e PUEYO, 2002).

O teste de Fagerstrom consiste de 6 questões que acredita-se estejam relacionadas com a dependência fisiológica da nicotina, originando um escore de 0-10 pontos.

1.3. Fumo passivo

A hipótese de que o fumo causaria graves danos a pessoas que o inalam de maneira indireta gerou as primeiras pesquisas na década de 70. Esta dúvida surgiu entre médicos japoneses, que constataram grande número de mulheres não fumantes portadoras de adenocarcinoma de pulmão, sendo que na grande maioria, o marido era fumante (REIF, 1992).

O tabagismo passivo é hoje o principal e mais disseminado poluente presente no ambiente interno residencial ou de trabalho. Calcula-se que seja a terceira causa evitável de morte em alguns países desenvolvidos, depois do tabagismo ativo e do alcoolismo (WHO, 2011).

A fumaça inalada pelo fumante passivo é composta por tipos de fumaça:

- fumaça exalada pelo fumante ativo, que é produzida a cerca de 950°C, e chega ao ambiente após ter sido aspirada através do cigarro, filtrada pelos pulmões do fumante e, finalmente, exalada.

- fumaça periférica, que é produzida a temperaturas mais baixas, 350°C, pela queima mais lenta do cigarro, entre uma tragada e outra; cerca de

85% da fumaça ambiental deve-se a este tipo de fumaça que não passa pelo filtro do cigarro e nem nos pulmões do fumante ativo, sendo liberada diretamente no ambiente a partir da queima espontânea do tabaco e do papel na extremidade do cigarro (LAW e HACKSHAW, 1996).

Estas duas fumaças tem basicamente a mesma composição, porém a fumaça inalada pelo fumante passivo possui maior concentração de algumas substâncias (LOFROTH, 1989). Por exemplo, os níveis de nicotina, alcatrão, óxido nítrico e monóxido de carbono são pelo menos duas vezes maiores na fumaça ambiental, além do que aminas aromáticas carcinogênicas como orto-toluidina, 2-naftilamina e 4-aminobifenila são preferencialmente formados na fumaça ambiental o que aumenta o risco à saúde dos fumantes passivos (EPA, 1992).

Os fumantes passivos sofrem os efeitos imediatos da poluição tabágica ambiental, tais como irritação nos olhos, obstrução nasal, tosse, cefaléia, intensificação de problemas alérgicos, principalmente das vias respiratórias, e o aumento de problemas cardíacos, principalmente elevação da pressão arterial e maior incidência de angina (CHAPMAN, 2003). Outros efeitos a médio e longo prazos são a redução da capacidade funcional respiratória, aumento do risco de ter arteriosclerose e aumento da frequência de infecções respiratórias (REIF, 1992).

Fumantes passivos em geral apresentam aumento do risco de câncer de pulmão em 30% e de infarto do miocárdio em 24%, se comparados aos não fumantes (LANNERO, 2002).

Por terem o sistema imunológico mais frágil, crianças e idosos são os mais atingidos pelo tabaco. As crianças, principalmente as de baixa idade, são

normalmente mais prejudicadas em sua convivência involuntária (GEREDA, 2001). Podemos pensar de maneira análoga em relação aos animais de estimação.

1.4 Fumo passivo em animais domésticos

Segundo REIF et al. (1992), uma das perguntas mais comuns feitas pelos donos de animais de estimação a respeito do câncer é se fatores do meio ambiente seriam os responsáveis pela doença em seus animais. Estudos relatam aumento da incidência de dois tipos de câncer em animais, o linfoma em gatos (BERTONI et al., 2002), o câncer de pulmão primário em cães (REIF et al., 1992) e o câncer de cavidade nasal também em cães (REIF et al., 1998). Tais diagnósticos foram associados à exposição dos animais com a fumaça do cigarro, incluindo o número de fumantes da família e o tempo em que o animal permanecia dentro da casa.

ROZA e VIEGAS (2007) também demonstraram que animais domésticos são vítimas dos problemas causados pelo hábito de fumar de seus donos. Foram examinados, durante dois anos, 30 cães da raça yorkshire, sendo que metade deles pertencia a donos que tinham hábito de fumar pelo menos 20 cigarros por dia. Inicialmente os animais passaram por um exame de dosagem da enzima cotinina, um teste feito com a urina para comprovar ou descartar a exposição dos cães à nicotina e ao alcatrão (HORSTMAN, 1985). Em seguida, após uma anestesia geral, os animais foram submetidos à biópsia brônquica e lavado broncoalveolar, no qual foram verificadas alterações de natureza

inflamatória, como o aumento de linfócitos e macrófagos, além da presença de antracose no grupo de animais expostos. Com base nas informações obtidas, os pesquisadores propuseram que, apesar de ainda não terem desenvolvido doenças clínicas sérias, a maioria dos cães considerados fumantes passivos apresentava problemas de saúde que poderiam gerar graves complicações no futuro como, por exemplo, o desenvolvimento de câncer de pulmão. Tais alterações não foram encontradas nos 15 cães do grupo controle, cujos donos eram não fumantes. Embora válido, o estudo de ROZA E VIEGAS (2007) expôs os animais à metodologia invasiva e com implicações éticas.

Paralelamente, já foi também sugerido que a fumaça do cigarro tem uma relação com câncer nasal e sinusal em cães (BUKOWSKI,1998). Por terem o sistema respiratório muito mais sensível que o nosso, cães e gatos expostos frequentemente à fumaça de cigarro podem adquirir várias doenças, sendo frequentes a rinite e a asma, e outros problemas alérgicos, como conjuntivite e dermatites. Casos mais graves podem levar a linfomas e câncer nasal e pulmonar. Em gatos com bronquite asmática, a toxicidade da fumaça aumenta a frequência das crises respiratórias podendo até levar o gato à morte por insuficiência respiratória aguda (BERTONE, 2002).

Também já foi sugerido que animais vivendo em ambientes com fumantes têm 60% mais chance de apresentar câncer de pulmão (BERTONE, 2002). Este autor também observou que gatos de fumantes passivos têm três vezes mais chances de desenvolver linfoma. Uma razão dos gatos serem tão suscetíveis ao fumo passivo se deve aos seus hábitos de limpeza. Os gatos lambem-se constantemente, e dessa forma lambeirão substâncias tóxicas que

se acumularam em sua pele. Este comportamento expõe as mucosas da boca aos carcinógenos.

Um segundo estudo publicado no mesmo periódico, mostrou que cães com focinhos longos como galgos e collies, tem mais predisposição a desenvolver câncer nasal se forem expostos à fumaça. Em contrapartida, cães de focinho curto como pugs, têm maior predisposição a câncer de pulmão (KELSEY,1998).

1.5 Teste de micronúcleos

Os micronúcleos (MN) são corpos citoplasmáticos originados de cromossomos incompletos ou fragmentos cromossômicos condensados que não estão incluídos no núcleo. Este fenômeno ocorre porque estes fragmentos não estavam aderidos ao fuso mitótico de modo que, durante a distribuição dos cromossomos entre as células filhas, estes fragmentos soltos são deixados no citoplasma e não se incorporam aos núcleos reorganizados nas células filhas.

A utilidade do teste de micronúcleos para detectar e quantificar alterações genotóxicas e mutagênicas por vários agentes carcinógenos já foi bem estabelecida em estudos *in vivo* e *in vitro* em animais e plantas (SISENANDO, 2011).

A sensibilidade do teste de micronúcleos é comparável a estudos genéticos de quebra cromossômica e translocações (SCHMID, 1975).

O teste de micronúcleo (MN) foi utilizado pela primeira vez em plantas por EVANS em 1959, e posteriormente em medula óssea de ratos (HEDDLE, 1973). Este teste foi desenvolvido como um método citogenético quantitativo para avaliar a frequência de danos cromossômicos “in vivo” em células nucleadas (VANPARYS, 1992, SILVA, 2012). Além disso, este método tem sido já usado como marcador de mutagênese associada ao hábito de fumar (KARAKALIL, 1999, NEGRI, 2009).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Levando-se em consideração que está estabelecido na literatura científica que fumo passivo aumenta o risco para mutagênese em seres humanos e que crianças, idosos e animais domésticos são mais susceptíveis aos produtos tóxicos, os objetivos deste estudo são:

- investigar os efeitos mutagênicos do tabagismo passivo em cães, através da análise da incidência de micronúcleos em células epiteliais da mucosa oral.
- investigar a existência de correlação entre o grau de dependência tabágica do proprietário e a incidência de micronúcleos em células epiteliais da mucosa oral morbidade nos animais.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram estudados 48 cães, sendo 23 deles pertencentes a proprietários fumantes e outros 25 pertencentes a proprietários não fumantes.

Foram incluídos no estudo animais levados para consulta ao veterinário, no período de abril a setembro de 2011, após concordância explícita dos proprietários em participar do estudo, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os animais eram machos e fêmeas, de 1 a 15 anos de idade, pertenciam a raças variadas, se alimentavam com ração e comida caseira e eram todos residentes nos bairros da Casa Verde e Limão (na cidade de São Paulo).

3.2 Avaliação da dependência à nicotina pelo teste de Fagerstrom

Os proprietários dos animais responderam ao Teste de Fagerstrom, um questionário que tem boa correlação com o grau de dependência à nicotina. O texto do questionário aplicado foi aquele recomendado pela Sociedade

Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, de acordo com o II Consenso Brasileiro de DPOC 2004, a saber:

1– Quanto tempo depois de acordar você fuma seu primeiro cigarro ?

- (A) – Após 60 minutos -----0
- (B) – Entre 31 a 60 minutos -----1
- (C) – Entre 6 a 30 minutos -----2
- (D) – Nos primeiros 5 minutos -----3

2 – Você acha difícil ficar sem fumar nos lugares onde é proibido, como por exemplo: igrejas, local de trabalho, cinemas, shoppings, etc. ?

- () – Não -----0
- () – Sim -----1

3 – Qual o cigarro mais difícil de largar de fumar ?

- (A) – O primeiro pela manhã ----- 1
- (B) – Qualquer outro ----- 0

4 – Quantos cigarros você fuma por dia?

- () – Menos de 10 cigarros ----- 0
- () – Entre 11 e 20 cigarros ----- 1
- () – Entre 21 e 30 cigarros ----- 2
- () – Mais de 30 cigarros ----- 3

5 – Você fuma mais frequentemente nas primeiras horas do dia do que durante o resto do dia ?

- () – Não ----- 0
- () – Sim ----- 1

6 – Você fuma mesmo estando doente ao ponto de ficar acamado na maior parte do dia?

- () – Não ----- 0
- () – Sim ----- 1

O escore obtido pela somatória dos pontos do teste permite classificação da dependência à nicotina em cinco níveis. Assim, uma pontuação entre 0 a 2 pontos classifica o indivíduo como dependência "muito baixa"; de 3 a 4 pontos, a dependência é considerada "baixa"; para um escore de 5 pontos, associa-se uma dependência "média"; de 6 a 7 pontos, o indivíduo é considerado como tendo "alta" dependência à nicotina, e, de 8 a 10 pontos, considera-se dependência "muita alta".

3.3. Técnica de detecção de micronúcleos em esfregaço da mucosa oral

3.3.1. Obtenção e coloração dos esfregaços

As coletas de esfregaço da mucosa oral foram realizadas em consultório veterinário, durante consultas de rotina. Com auxílio de uma espátula de madeira foram colhidas amostras bilaterais da mucosa jugal de cada animal em um único dia. Foram confeccionadas duas lâminas por animal.

Após a coleta das células da mucosa oral em lâmina de vidro, fixou-se em metanol 80% durante 10 minutos. Os esfregaços foram então corados em Giemsa, durante 20 minutos.

O método de Giemsa é utilizado rotineiramente para coloração de células sanguíneas em esfregaços de sangue periférico, medula óssea ou para estudo citológico de elementos celulares colhidos de punção, raspagem ou concentrados celulares de derrames cavitários. Os corantes para esfregaço também denominados de pancrômicos, são uma mistura de corantes de

características neutras, dependendo do pH da solução corante, que em condições apropriadas coram os componentes nucleares e citoplasmáticos com predominância de tons vermelhos (quando ácidos) e azulados diversos (quando básicos). Giemsa desenvolveu, um corante que leva seu nome e que hoje se sabe ser uma mistura de azur II (mistura equimolar de azur 1 e azul de metileno) e eosinato de azur II (corante formado pela combinação equimolar de azur 1, azul de metileno e eosina amarelada) (BARCIA, 2007).

Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água destilada e mantidas por aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente, para a secagem e montadas com lamínula e entellan.

3.3.2 Análise quantitativa dos micronúcleos

O contagem de micronúcleos foi feita em todas as amostras de esfregaço da mucosa oral colhidas. Foram analisadas 500 células em cada lâmina, em microscopia de luz, com aumento de 400x. (Figura 1).

Figura 1: Micrografia de luz obtida de esfregaço da mucosa jugal corado por Giemsa, mostrando célula epitelial com micronúcleo evidente (seta). Barra = 25µm.

Os micronúcleos tem aspecto estrutural idêntico ao do núcleo principal, porém apresenta menor tamanho e são acêntricos. Os critérios seguidos para a identificação dos micronúcleos foram estabelecidos pela *International Atomic Energy Agency* (2001), a saber:

- a) O diâmetro do micronúcleo, usualmente varia entre $1/16$ e $1/3$ do diâmetro do núcleo principal.
- b) O micronúcleo não é refringente e, por isso, pode ser distinguido de artefatos como, por exemplo, precipitados do corante.
- c) O micronúcleo não está conectado ao núcleo principal.
- d) O micronúcleo possui contorno próprio distinto do contorno do núcleo principal.
- e) O micronúcleo se cora com a mesma intensidade de coloração do núcleo principal e, ocasionalmente, pode exibir coloração mais intensa.

3.4. Poluentes na região de domicílio dos animais

Foram obtidos junto à Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), os valores das concentrações de material particulado PM₁₀ e ozônio, medidas hora a hora, na estação de monitoramento Nossa Senhora do Ó, durante os meses de abril a setembro de 2011 (quando foram coletados os esfregaços). Valores médios mensais foram calculados a partir desses dados.

A Estação Nossa Senhora do Ó da CETESB está à Rua Capitão José do Amaral, 80; é o posto de monitoramento da qualidade do ar mais próxima dos bairros do Limão e da Casa Verde onde habitavam os cães (Figura 2).

Figura 2 - Mapa representativo da localização geográfica do estudo. O círculo amarelo corresponde, aproximadamente, à zona onde habitavam os cães. A cerca de 3 km de distância, em linha reta, localiza-se a Estação Nossa Senhora do Ó da CETESB (marcada em verde, no canto inferior esquerdo do mapa).

Conhecer os valores das concentrações de PM₁₀ e ozônio, à época da coleta dos esfregaços, é importante para este estudo, pois concentrações maiores destes poluentes atmosféricos são capazes de aumentar o risco para alterações citogenéticas o que levaria, de modo independente, a um aumento da incidência de micronúcleos, o que poderia vir a ser um fator de confusão para a interpretação dos resultados obtidos neste estudo.

O PM₁₀ é constituído por partículas, menores que 10µm, de material sólido ou líquido, que ficam suspensas no ar, na forma de poeira, neblina, aerosol, fumaça, fuligem, etc, produzidos pela combustão industrial e de veicular, poeira ressuspensa e aerosol secundário (formado na atmosfera).

O ozônio é um gás incolor, inodoro nas concentrações ambientais sendo o principal componente da névoa fotoquímica. Não é emitido diretamente para a atmosfera, sendo produzido fotoquimicamente pela radiação solar sobre os óxidos de nitrogênio e compostos orgânicos voláteis.

Os padrões nacionais de qualidade do ar, fixados pela Resolução CONAMA 03/90, estabelecem como concentrações limites para o PM₁₀ e para o ozônio, 60 µg/m³ e 160 µg/m³ (em 1 hora), respectivamente.

3.5. Análise estatística

A análise da normalidade dos dados foi feita através da aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Para comparação de variáveis numéricas entre os dois grupos, nos casos que a distribuição mostrou-se normal aplicou-se o teste t de Student (paramétrico), enquanto que naqueles casos em que a distribuição não foi normal, usou-se o teste de Mann-Whitney. Comparações de variáveis categóricas, como sexo, foram feitas pelo teste do Qui quadrado.

A comparação do número de micronúcleos por célula segundo a categoria de Fagerstrom foi feita pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

O programa SPSS v16 foi utilizado para todas as análises e o limite de significância foi estabelecido em 5%.

4 RESULTADOS

4.1. Idade dos animais

Os dados descritivos da idade dos animais estão apresentados na Tabela 1 e no Gráfico 1.

Tabela 1- Média, desvio padrão mediana e amplitude interquartil das idades dos animais nos grupos.

	Média $\pm$ Desvio padrão	Mediana (Amplitude interquartil)
Não Fumante	5,36 $\pm$ 3,21	4 (4)
Fumante Passivo	6,04 $\pm$ 2,6	7 (4)

Uma vez que as idades no grupo não-fumante não apresentam distribuição normal, aplicou-se o teste de Mann-Whitney (não paramétrico) para comparação entre os grupos, com resultado de $p = 0,22$; assim, não foi possível identificar diferença significativa entre os grupos, em relação à idade.

Gráfico 1: Box plot mostrando a distribuição das idades dos animais.

4.2 Sexo dos animais

O número de animais, segundo o sexo, está discriminado na Tabela 2 e ilustrado no Gráfico 2.

Tabela 2- Número de animais segundo o sexo, em cada grupo.

	Masculino	Feminino
Não Fumante	10	15
Fumante Passivo	12	11

Gráfico 2 - Distribuição do sexo dos animais entre os grupos fumantes passivos e não fumantes.

O teste do Qui quadrado não foi capaz de detectar diferença estatística entre os dois grupos e resultou em $p = 0,397$, de modo que não foi possível detectar diferenças entre os grupos em relação ao sexo.

4.3 Classificação dos proprietários fumantes pelo Teste de Fagerström

A classificação e a distribuição dos proprietários fumantes segundo o grau de dependência à nicotina obtido pelo escore total no Teste de Fagerstrom estão discriminados na Tabela 3 e no Gráfico 3.

Tabela 3 - Distribuição dos proprietários dos animais de acordo com a classificação obtida no Teste de Fagerstrom.

Proprietários fumantes	Escore	Dependência à nicotina
n =04 (17,4%)	2	muito baixa
n = 02 (8,7%)	3	baixa
n = 10 (43,5%)	6	alta
n= 07 (30,4%)	8	muito alta

Gráfico 3 - Distribuição da população de proprietários fumantes, em porcentagem, quanto à sua classificação no teste de Fagerstrom para dependência de nicotina.

A maior parte dos proprietários (74%) pertencia às categorias mais altas do escore de Fagerstrom, com dependência à nicotina "alta" e "muito alta".

4.4. Quantificação de micronúcleos

4.4.1 Análise comparativa entre os grupos

A Tabela 4 e o Gráfico 4 mostram os dados obtidos pela análise da presença de micronúcleos no citoplasma por 1000 células para cada animal.

Tabela 4 - Média, desvio padrão mediana e amplitude interquartil do número de micronúcleos por 1000 células epiteliais da mucosa de cães.

	Média ± Desvio padrão	Mediana (Amplitude interquartil)
Não Fumante	16,5 ± 3,1	12,3 (6,6)
Fumante Passivo	28,3 ± 11,9	25,5 (15,2)

Gráfico 4 - Box plot mostrando a incidência de micronúcleos por 1000 células epiteliais da mucosa oral de cães.

Os dados obtidos para o grupo Não Fumante não possuíam distribuição normal e, portanto, para comparação da incidência de micronúcleos entre os

grupos foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, que mostrou que a incidência de micronúcleos é significativamente maior no grupo de cães cujos proprietários são fumantes ($p < 0,001$).

4.4.2 Análise comparativa segundo a dependência à nicotina dos proprietários

A Tabela 5 e o Gráfico 5 mostram a incidência de micronúcleos nos cães agrupados de acordo com a dependência à nicotina do seu proprietário.

Tabela 5 - Incidência de micronúcleos por 1000 células nas células epiteliais dos animais do grupo Fumante Passivo classificados de acordo com a dependência tabágica do proprietário medida pelo teste de Fagerström

Teste de Fagerstrom	Média ± Desvio padrão	Mediana (Amplitude interquartil)
2	24,9 ± 7,8	27 (7)
3	13,7 ± 3,3	14 (2)
7	26,9 ± 12,9	22 (6)
8	36,29 ± 9,0	36 (11)

Visto que os dados dos animais cujos proprietários com escore 6 não apresentou uma distribuição normal, aplicou-se o teste não paramétrico Kruskal Wallis. O teste mostrou que existe diferença significativa entre os grupos ($p = 0,021$). O pós-teste de Bonferroni mostrou que a incidência de micronúcleos é maior nos animais de proprietários com escore 6 do que aqueles pertencentes a proprietários com escore 3; por sua vez, os cães de proprietários com escore 8 apresentaram maior incidência de micronúcleos do que aqueles de proprietários de escore 6.

Gráfico 5 - Incidência de micronúcleos nos animais fumantes passivos, em relação ao escore de dependência à nicotina medido pelo teste de Fagerstrom.

Esses dados mostram que há uma associação entre o grau de dependência à nicotina dos proprietários e a quantidade de micronúcleos nas células epiteliais da mucosa oral de seus cães.

4.5 Concentração de poluentes atmosféricos na região de domicílio dos animais

A partir dos dados fornecidos pela CETESB, foi calculada a média mensal para os meses de abril a setembro de 2011, período durante o qual foram colhidos esfregaços de mucosa oral dos cães e, paralelamente, os proprietários fumantes responderam ao teste de Fagerstrom.

4.5.1 Ozônio

O Gráfico 6 mostra a concentração de ozônio, medida pela CETESB, na estação de monitoramento Nossa Senhora do Ó.

Gráfico 6 - Média mensal da concentração atmosférica de ozônio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) na região de domicílio dos animais durante o período da coleta dos esfregaços (Fonte: Cetesb).

Observa-se que, em todos os meses, a média ficou abaixo do limite estabelecido pela OMS ($160 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

4.5.2 Material Particulado menor que $10 \mu\text{m}$ (PM10)

O Gráfico 6 mostra a concentração de PM10, medida pela CETESB, na estação de monitoramento Nossa Senhora do Ó.

Gráfico 7 - Média mensal da concentração atmosférica de PM10 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) na região de domicílio dos animais durante o período da coleta dos esfregaços (Fonte: Cetesb).

A análise do gráfico mostra que, em todos os meses, a média ficou abaixo do limite estabelecido pela OMS ($60 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

5 DISCUSSÃO

O tabaco é o maior fator de risco isolado relacionado ao adoecimento e à morte no mundo (MOZAFFARIAN, 2012). O tabagismo passivo consiste na inalação por indivíduos não fumantes da fumaça proveniente da queima de derivados do tabaco do cigarro (RICHTER, 2009). O assim chamado “Secondhand smoke” (SHS) é composto pela fumaça emitida da ponta do cigarro em queima (80 a 90%) e também da fumaça exalada pelo fumante (10% to 20%). Trata-se de uma mistura complexa de mais de 4000 compostos químicos na forma de gases e material particulado (MOZAFFARIAN, 2012). Tais substâncias incluem: amônia, CO, formaldeído, nicotina, óxidos de nitrogênio, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), e SO₂ entre outros. Recentemente, tem-se dado atenção a uma “nova” forma de exposição passiva ao cigarro, chamada de “Thirdhand smoke” (THS). O THS é formado pelos poluentes presentes na fumaça residual do tabaco que permanecem nas superfícies e na poeira do ambiente onde alguém fumou previamente. Tais substâncias permanecem sobre móveis, paredes, utensílios e assoalho e podem sofrer ressuspensão ao longo do tempo e transformações químicas por interação com o ambiente (MATT 2011). As substâncias presentes no THS incluem nicotina, fenol, cresol, naftaleno, formaldeído, nitrosaminas. Permanecem no ambiente por meses e podem ser especialmente nocivas a crianças e animais, pois podem ser involuntariamente inaladas, ingeridas ou absorvidas pela pele. Portanto, o risco de exposição ao fumo passivo não se extingue ao se apagar o cigarro, mas persiste por meses no ambiente do

fumante (MATT 2011). No presente estudo, utilizamos como “laboratório”, o domicílio destes animais, tornando mais realistas nossas observações.

Para o estudo da mutagênese, utilizamos uma ferramenta simples, de baixo custo e principalmente não invasiva e sem nenhum risco para os animais. O teste de micronúcleos em esfregaço da mucosa oral é de fácil execução e leitura, e de boa confiabilidade se forem seguidos os critérios de análise especificados pela IAEA.

Os resultados de nosso estudo confirmam evidências anteriores de associação entre tabagismo passivo e danos citogenéticos em células do epitélio oral (NEGRI, 2009). Apesar de trazer à tona observações e dados de interesse prático, nosso estudo apresenta várias limitações. A principal delas é devida ao reduzido número de indivíduos estudados, principalmente pela dificuldade em se conseguir voluntários. Outras ressalvas importantes referem-se ao estudo de múltiplas raças. A incidência de cancer em cães é diferente de acordo com a raça estudada, devido às variabilidades do padrão genético dos animais (DOBSON, 2013). Por exemplo, o carcinoma escamoso digital parece ter predileção por algumas raças de cães maiores e de cor negra, como os Schnauzers e Poodles gigantes, sendo que estas raças apresentam grandes semelhanças no perfil genético (HENRY, 2005; WOBESER, 2007). “Scottish Terriers” têm aproximadamente 19 vezes mais chance de sofrerem de câncer de bexiga quando comparados a animais de outras raças. A causa para esta maior incidência é desconhecida, mas pode representar maior predisposição genética devida a déficits de detoxificação e metabolismo de substâncias circulantes (KNAPP, 2000). Sabe-se também que cães mestiços, ou seja, sem raça definida apresentam menor índice de câncer em geral (DOBSON, 2013).

Em nosso estudo, não foi possível isolar uma só raça para a amostragem. A grande maioria dos animais era mestiça, e, portanto, sem possibilidade de acesso a padrões genéticos definidos.

A incidência dos tumores nos cães aumenta com a idade (DOBSON, 2013). No presente trabalho a distribuição das idades dos animais estudados nos dois grupos, não apresentou diferença estatística, portanto, julgamos que a idade dos animais não tenha interferido nos resultados obtidos.

A alimentação dos animais é outro fator importante a ser discutido. Sabe-se que o consumo excessivo de carne vermelha e alimentos industrializados pode causar maior incidência de câncer no trato gastrointestinal tanto de humanos como de animais (NEUMAN, 2012). Mesmo prescrevendo-se uma dieta balanceada e composta por alimentos saudáveis, a proximidade do cão com seus proprietários durante os horários de refeições da família faz com que esse animal ingira vários tipos de alimentos sobre os quais não se consegue controle. No presente estudo, infelizmente, não foi possível controlar este fator.

A poluição ambiental é outro fator que sabidamente interfere na incidência de micronúcleos na mucosa oral de animais e de seres humanos (NEGRI, 2009). Na atmosfera são identificados mais de 3000 componentes químicos diferentes, incluindo uma grande variedade de agentes mutagênicos e carcinogênicos, nocivos às plantas, animais e seres humanos. Vários estudos têm sido feitos apontando a poluição como um dos fatores que ocasionam doenças cardiovasculares (SANTOS, 2008; MARTINS, 2012), outros a associam à incidência aumentada de mutagênese. (MARIANI, 2009; NEGRI, 2009). Dentre os poluentes atmosféricos com potencial mutagênico, destaca-se

o Ozônio (O₃). Trata-se de um gás incolor que se encontra em duas camadas distintas da atmosfera: na estratosfera, de forma natural, formado pela fotólise do O₂, protege a vida sobre a terra através da absorção da radiação ultravioleta do sol que alcança esta camada; na troposfera, o ozônio é formado através de uma série complexa de reações envolvendo compostos orgânicos voláteis e óxidos de nitrogênio, em presença de luz solar. Nesta camada atua sobre a saúde das populações irritando o sistema respiratório, e podendo causar prejuízo na função pulmonar, além de agravamento de asma em indivíduos suscetíveis a este tipo de enfermidade. Devido ao seu elevado poder oxidante é capaz de danificar proteínas e até mesmo o DNA, tendo potencial mutagênico. A legislação brasileira limita a concentração média horária de O₃ em 160 µg/m³ (ABRANTES, 2005). Em nosso trabalho, os animais foram expostos a níveis máximos de 70 µg/m³, conforme média mensal da estação medidora da Cetesb mais próxima da residência dos animais.

Sob a denominação geral de Material Particulado se encontra um conjunto de poluentes constituídos de poeiras, fumaças e todo tipo de material sólido e líquido que se mantém suspenso na atmosfera por causa de seu pequeno tamanho. As principais fontes de emissão de particulado para a atmosfera são: veículos automotores, processos industriais, queima de biomassa, ressuspensão de poeira do solo, entre outros. O material particulado pode também se formar na atmosfera a partir de gases como dióxido de enxofre (SO₂), óxidos de nitrogênio (NO_x) e compostos orgânicos voláteis (COVs), que são emitidos principalmente em atividades de combustão, transformando-se em partículas como resultado de reações químicas no ar. O tamanho das partículas está diretamente associado ao seu potencial para

causar problemas à saúde, sendo que quanto menores maiores os efeitos provocados. O PM₁₀ pode ser definido de maneira simplificada como aquelas partículas cujo diâmetro aerodinâmico é menor que 10 µm. Dependendo da distribuição de tamanho na faixa de 0 a 10 µm, podem ficar retidas na parte superior do sistema respiratório ou penetrar mais profundamente, alcançando os alvéolos pulmonares (LOPES, 2009). A média mensal dos níveis de PM₁₀ em µg/m³ na região de domicílio dos animais durante o período de estudo também ficou em torno do valor limite de referência, considerado nocivo pela OMS que é de 60 µg/m³.

Sabe-se que a exposição ao fumo passivo causa doenças e mortes prematuras em crianças e adultos não-fumantes (RICHTER, 2009). Crianças expostas ao tabagismo passivo têm risco aumentado da síndrome da morte súbita infantil, infecções respiratórias agudas, desenvolvimento e agravamento da asma e (RICHTER, 2009). Os pais fumantes expõem os filhos à poluição tabágica ambiental e aumentam não só o risco dessas doenças, mas também prejudicam o desenvolvimento das crianças. Podemos imaginar que o mesmo ocorra em relação aos animais domésticos.

Através de um estudo da dependência à nicotina medida pelo teste de Fagerström, Deheinzelin e colaboradores (DEHEINZELIN, 2005) demonstraram uma relação independente de risco para a incidência de câncer de pulmão, diretamente proporcional ao nível de dependência à nicotina. Nosso estudo conseguiu demonstrar uma correlação, ainda que fraca, entre o nível de dependência à nicotina e a incidência de micronúcleos na mucosa oral dos cães estudados. O nível de dependência à nicotina medido através do teste de Fagerström correlaciona-se diretamente ao nível sérico de nicotina em

pacientes fumantes (POMERLAU, 1990). Desta forma, tal índice pode ser usado como uma medida indireta da quantidade de fumaça de cigarro inalada passivamente pelos animais.

Estima-se que existam 2 bilhões de fumantes passivos no mundo. Desses, 700 milhões seriam crianças. Nos recém-nascidos, o tabagismo passivo está relacionado a déficits neurológicos e cognitivos, tremores, hipertonicidade, inquietude e hiperatividade (RICHTER, 2009). Já a criança no período pré-escolar apresenta dificuldade no aprendizado. Na idade escolar há déficit de atenção, dificuldades na leitura, no cálculo e no desenvolvimento das habilidades manuais e da linguagem falada (RICHTER, 2009). Em adultos, o tabagismo passivo está relacionado à menor qualidade de vida, além disso, relaciona-se ao desenvolvimento e ao agravamento de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), câncer de pulmão e estima-se que a exposição crônica à poluição tabágica ambiental aumente em 20 a 50% o risco de doenças cardiovasculares (RICHTER, 2009). Interessante ressaltar que no presente estudo, os animais domésticos, além de vítimas do tabagismo passivo, mostraram-se úteis como possíveis indicadores biológicos da poluição ambiental doméstica representada pela fumaça do cigarro. A contagem de MN na mucosa oral destes animais, como ferramenta de fácil execução, poderia até ser utilizada como um possível indicador do risco para os moradores da residência.

O presente estudo confirma os perigosos efeitos do tabagismo passivo promovendo mutagênese também nos animais domésticos. Existe uma relação afetiva muito forte entre o proprietário e seu animal de estimação. A Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas (Fipe) divulgou dados da nova Pesquisa de

Orçamento Familiar (POF) brasileira (2011). O levantamento revela o aumento nos gastos dos paulistanos com artigos para os animais de estimação em relação aos gastos com o feijão! Segundo o estudo, as famílias que vivem na cidade de São Paulo gastam uma fatia equivalente a 0,55% do seu orçamento com a alimentação industrializada de cães e gatos enquanto destinam 0,39% do orçamento ao consumo de feijão.

Segundo Luiz Fernando de Albuquerque diretor comercial de uma empresa de rações para cães: “Os animais domésticos são cada vez mais vistos como membros da família, portanto, têm recebido cuidados específicos, visando sua qualidade de vida”. Estima-se que na cidade de São Paulo exista 1 cão para cada 7 habitantes e 1 gato para cada 50 habitantes. Tendo em vista o assombroso crescimento da população de animais de estimação na cidade e a ligação sentimental entre o animal e seu proprietário, os dados aqui expostos podem vir a influenciar positivamente na cessação do hábito de fumar nesta população, com impacto na saúde ambiental global.

Acreditamos que além do valor epidemiológico, o presente estudo traria também uma mensagem contra o tabagismo, pois encorajaria algumas pessoas a desistir do hábito de fumar. Paralelamente, estudamos a provável correlação entre o grau de dependência tabágica do proprietário e a incidência de morbidade nos animais. O nível de dependência à nicotina tem forte correlação com a incidência de câncer de pulmão em humanos (DEHEINZELIN, 2005). Seria interessante estudar o impacto desta dependência na vida dos animais de estimação, diretamente expostos à carga tabágica de seus proprietários.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo conseguiu demonstrar um efeito pró-mutagênico da fumaça do cigarro na mucosa oral dos cães expostos ao tabagismo passivo. Além disso, observamos uma tendência à correlação positiva entre a frequência de micronúcleos por célula nos esfregaços de mucosa oral dos animais fumantes passivos e o índice de Fagerström apresentado por seus proprietários.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrantes R, de Assunção JV, Hirai EY. Emission of aldehydes from light duty diesel vehicles. *Rev Saude Publica*. 2005 Jun;39(3):479-85.

Barcia JJ. The Giemsa Stain: Its History and Applications. *International Journal of Surgical Pathology* 2007; 15:292-296.

Bertone ER, Snyder LA, Moore AS. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *Am J Epidemiol*. 2002 Aug 1;156(3):268-73.

Bukowski JA, Watenberg D, Goldshmidt M. Environmental causes for sinonasal cancers in pet dogs, and their usefulness as sentinels of indoor cancer risk. *J Toxicol Environ Health*. 1998 Aug 7;54(7):579-91.

Bohrer PL, Filho MS, Paiva RL, da Silva IL, Rados PV.4. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytol*. 2005 May-Jun;49(3):265-72.

Carlson KH, Carlson KC. Respiratory effects of tobacco smoking on infants and young children. *Paediatr Respir Rev* 2008;9:11–9.

Carmo, JT, Pueyo A. A adaptação do português do Fagerström Test for

Nicotine Dependence (FTND) para avaliar a dependência e tolerância à nicotina em fumantes brasileiros. Rev Bras Med 2002; 59: 73-80.

Chapman Rs,Hadden WC , Perlin AS. Influences of asthma and household environment on lung function in children and adolescents: the third national health and nutrition examination survey. Epidemiol. 2003 Jul 15, 158(2): 175-89.

II Consenso Brasileiro de DPOC. Cessação do Tabagismo e Reabilitação Pulmonar: Efetividade das Intervenções Preventivas e Curativas. Jornal Brasileiro de Pneumologia 2004; 29S-31S.

Cook DG, Strachan DP.1999. Summary of effects of parental smoking on the respiratory health of children and implications for research. Thorax 54:357-365.

Cunha, G., Jorge, A., Fonteles, M., Sousa, F., Viana, G., & Vasconcelos, S. Nicotina e tabagismo. Revista Eletrônica Pesquisa Médica [Online] 2007; 1:4.

Damaceno-Rodrigues NR, Veras MM, Negri EM, Zanchi AC, Rhoden CR, Saldiva PH, Dolhnikoff M, Caldini EG. Effect of pre- and postnatal exposure to urban air pollution on myocardial lipid peroxidation levels in adult mice. Inhal Toxicol.2009; 21(13):1129-37.

Deheinzelin D, Lourenço MTC, Costa CL, Younes RN. The level of nicotine dependence is an independent risk factor for cancer. A case control study. Clinics 2005; 60 (3): 221-26.

Di Chiara G- Role of Dopamine in the Behavioural Actions of Nicotine Related to Addiction. Eur. J. Pharmacol. 2000; 30: 393(1-3): 295-314.

Dobson JM. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. Veterinary Science, Volume 1, 2013

Dubus JC, Bodiou AC, Millet V. Respiratory allergy in children and passive smoking. Arch Pediatr. 1999; 6 Suppl 1: 35S-38S.

EPA: Respiratory Health Effects of Passive Smoking: Lung Cancer and Other Disorders. 1992, Report Number EPA/600/6-90/006F:3.1-3.1.

Evans, H.J, Neary, GJ, Williamson, FS. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays in Vicia faba roots and the effects of oxygen: Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. Int. J. Rad. Biol. V. 1, p. 230-40, 1959.

Fagerstrom KO. A comparison of psychological and pharmacological treatment in smoking cessation. J Behav Med, 1982; 5: 343-51.

- Gereda JE, Klinnert MD, Price MR, Leung DY, Liu AH. Metropolitan home living conditions associated with indoor endotoxin levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 May;107(5):790-6.
- Gilliland FD, Berhane K, McConnell R, et al. Maternal smoking during pregnancy, environmental tobacco smoke exposure and childhood lung function. *Thorax*, 5; 2000: 271–276.
- Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerstrom KO. The Fagerström Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire. *British Journal of Addiction* 1991; 86: 1119–1127.
- Heddle, JÁ, Cimino, MC, Hayashi, M, Romagna, F, Sheelby, MD, Tucker, JD, Vanparys, PH, Magregor, JT. Micronuclei as an index of Cytogenetic damage: Past, Present and Future . *Environ. Mol. Mutag.*, v. 18, p.277-91,1991.
- Henry CJ, Brewer WG, Whitley EM. Canine digital tumors: a veterinary cooperative oncology group retrospective study of 64 dogs, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol.19, no. 5, pp. 720–724, 2005.
- Horstmann M. Simple high-performance liquid chromatographic method for rapid determination of nicotine and cotinine in urine. *Journal of Chromatography* 1985;344:391.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Tabagismo um grave problema de saúde pública, 2007.

International Atomic Energy Agency - Cytogenetic analysis for radiation dose assessment : a manual. The Micronucleus (MN) Assay. Technical reports series 2001; 405: 81-86.

Karahalil B, Karakaya AE, Burgaz S. 1999. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* Jun 7;442(1):29-35.

Kelsey JL, Moore AS, Glickman LT. Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiol Rev.* 1998;20(2):204-17.

Knapp DW, Glickman NW, Denicola DB, Bonney PL, Lin TL, Glickman LT. Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a relevant model of human invasive bladder cancer. *Urologic Oncology*, vol. 5, no. 2, pp. 47–59, 2000.

Knight JM , Eliopoulos C, Klein J, Greenwald M, Korean G. 1996. Passive smoking in children. Racial differences in systemic exposure to cotinine by hair and urine analysis. *Chest* 109:446-450.

Lannero E, Kull I, Wickman M, Pershagen G, Nordvall SL. Environmental risk factors for allergy and sócioeconomic status in a birth cohort. *Pediatr Allergy Immunol.* 2002 Jun;13(3):182-7.

Law RL, Hackshaw AK. Environmental tobacco smoke. *Br Med Bull* 1996; 52:22-34.

Lofroth G: Environmental tobacco smoke: overview of chemical composition and genotoxic components. *Mutat Res* 1989, 222:73-80

Lopes FD, Pinto TS, Arantes-Costa FM, Moriya HT, Biselli PJ, Ferraz LF, Lichtenfels AJ, Saldiva PH, Mauad T, Martins MA. Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. *Environ Res.* 2009 Jul;109(5):544-51.

Mariani RL, Jorge MP, Pereira SS, Melione LP, Carvalho-Oliveira R, Ma TH, Saldiva PH. Association between micronuclei frequency in pollen mother cells of *Tradescantia* and mortality due to cancer and cardiovascular diseases: a preliminary study in Sao José dos Campos, Brazil. *Environ Pollut.* 2009 Jun;157(6):1767-70.

Martins PC, Valente J, Papoila AL, Caires I, Araújo-Martins J, Mata P, Lopes M, Torres S, Rosado-Pinto J, Borrego C, Annesi-Maesano I, Neuparth N. Airway changes related to air pollution exposure in wheezing children. *Eur Respir J.* 2012 Feb;39(2):246-53.

Matt GE, Quintana PJE, Zakarian JY, Fortmann AL, Chatfield AC, Hoh E, Uribe AM, Hovell MF. When smokers move out and non-smokers move in: residential thirdhand smoke pollution and exposure. *Tobacco Control* 2011; 20:e1.

Mendelsohn C. Women who smoke - A review of the evidence. *Aust Fam Physician* 2011; 40(6):403-7.

Meneses-Gaya IC, Zuardi, AW, Loureiro SR, Crippa JAS. Psychometric Properties of the Fagerstrom test for nicotine dependence. *J Bras Pneumol*, 2009; 35 (1): 73-82.

Mozaffarian D, Afshin A, Benowitz NL, Bittner V, Daniels SR, Franch HA, Jacobs DR Jr, Kraus WE, Kris-Etherton PM, Krummel DA, Popkin BM, Whitsel LP, Zakai NA. Population Approaches to Improve Diet, Physical Activity, and Smoking Habits: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation*, 2012; 126: 1514-63.

Negri, A. Estudo dos efeitos mutagênicos da poluição ambiental em trabalhadores de rua em São Paulo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina; 2009.

Neuman ZL, Modiano JF, Turesky RJ. Biomonitoring the cooked meat carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in canine fur.

J Agric Food Chem. 2012 Sep 12;60(36):9371-5

Öberg M, Woodward A, Jaakkola MS, Peruga A, Prüss-Ustün A. Global Estimate of the Burden of Disease from Second-hand Smoke. Geneva: World Health Organisation; 2011.

Picciotto MR; Calderone BJ; King SL; Zachariou V- Nicotine Receptors in Brain: Links between Molecular Biology and Behavior. Neuropsychopharmacology 2000; 22: 451-64.

Pomerlau CS, Pomerleau OF, Majchrzak MJ, Kloska DD, Malakuti R. Relationship between nicotine tolerance questionnaire scores and plasma cotinine. Addict Behav. 1990;15(1):73-80.

Reif JS, Dumn K, Ogilvie GK, Harris CK. Passive smoking and canine lung cancer risk. Epidemiol. 1992;135(3):234-9.

Reif JS, Bruns C, Lower KS. Cancer of the Nasal Cavity and Paranasal Sinuses and Exposure to Environmental Tobacco Smoke in Pet Dogs. Am J Epidemiol 1998;147:488-92.

Richter PA, Bishop EE, Wang J, Swahn MH. Tobacco smoke exposure and levels of urinary metals in the U.S. youth and adult population: the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. Int J Environ Res Public Health. 2009 Jul;6(7):1930-46.

Rogers JM. Tobacco and pregnancy. *Reproductive Toxicology* 2009; 28:152–60.

Roza, MR, Viegas CA . The dog as a passive smoker: Effects of exposure to environmental cigarette smoke on domestic dogs. *Nicotine & Tobacco Research* 2007 v. 9: 1171-1176.

Santos UP, Terra-Filho M, Lin CA, Pereira LA, Vieira TC, Saldiva PH, Braga AL. Cardiac arrhythmia emergency room visits and environmental air pollution in Sao Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health*. 2008 Mar;62(3):267-72

Sisenando HA, de Medeiros SR, Saldiva PH, Artaxo P, Hacon SS. Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by *Tradescantia* micronucleus bioassay: a toxicity assessment study. *Environ Health*. 2011 May 17;10:41.

Schmid. The micronucleus test. *Mutation Research*, 1975 31, g-15.

Silva I C, Peron MCC, Arbex MA, Lichtenfels AJFC, Lobo DJA, Giocondo MP, Macchione M, Saiki M, Saldiva PHN, Soares CP. Micronucleus formation induced by biomass burning particles derived from biomass burning induce high micronucleus frequency in *Tradescantia pallida* assay (TRAD-MN). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 7, n. 1, 2012, 1-7

Thomas RD, Vigerstad Tj. Use of laboratory animal models in investigating emphysema and cigarette smoking in humans. *Regul toxicol Pharmacol*. 1989 Dec;10 (3):264-71.

Torous, DK, Dertinger,SD, Hall, NE, Tometsko, CR. An automated method for discrimination Aneugen vs. Clatogeninduced micronuclei. *Environ. Mol. Mutag.*, v.31, p. 340-44,1998.

Vanparys, P, Deknudt, G, Vermeiren, F, Sysmans, M, Marsboom, R. sampling times in micronucleus testing. *Mutat. Res*. V. 282, p. 191-96, 1992.

Volkow, ND. Tobacco Addiction. National Institute on Drug - Abuse Research Report Series 2006; 06: 4342.

Westbrook DG, Anderson PG, Pinkerton KE, Ballinger SW. Perinatal tobacco smoke exposure increases vascular oxidative stress and mitochondrial damage in non-human primates. *Cardiovasc Toxicol*. 2010; 10(3):216-26.

World Health Organization. Confronting the tobacco epidemic in an era of trade liberalization. Geneva: World Health Organization; 2003.

World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic: warning about the dangers of tobacco. Geneva: World Health Organization; 2011.

Wobeser BK, Kidney BA, Powers BE. Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. *Veterinary Pathology*, vol. 44, no. 3, pp. 355–361, 2007.