

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA
TESE DE DOUTORADO**

JULIA DE BARROS MACHADO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE COTININA E HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS NO LÍQUIDO AMNIÓTICO E CORDÃO UMBILICAL AO NASCIMENTO**

**PORTO ALEGRE
2014**



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA
NÍVEL: DOUTORADO**

JULIA DE BARROS MACHADO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE COTININA E HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS NO LÍQUIDO AMNIÓTICO E
CORDÃO UMBILICAL AO NASCIMENTO**

**PORTO ALEGRE
2014**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA
NÍVEL: DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE COTININA E HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS NO LÍQUIDO AMNIÓTICO E
CORDÃO UMBILICAL AO NASCIMENTO**

JULIA DE BARROS MACHADO

Tese de doutorado apresentada como requisito para obtenção do Grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Chatkin

**PORTO ALEGRE
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M149a Machado, Julia de Barros

Avaliação dos níveis de cotinina e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no líquido amniótico e cordão umbilical ao nascimento / Julia de Barros Machado. – Porto Alegre, 2014.
87 f. : il.

Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração Clínica Médica) – Faculdade de Medicina, PUCRS.
Orientador: Prof. Dr. José Miguel Chatkin.

1. Clínica Médica. 2. Obstetrícia. 3. Gestação. 4. Tabagismo.
5. Cotinina. 6. 1-hidroxipireno. 7. Benzopireno. I. Chatkin, José Miguel. II. Título.

CDD 618.2
NLM WQ 200
NLM QY 335

**Ficha Catalográfica elaborada por
Vanessa Pinent
CRB 10/1297**

Dedico a meu marido Lucas por todo apoio, amor e compreensão e a minha filha Laura que iniciou o Doutorado “dentro da minha barriga”, tendo que entender, desde bebê, que nada vem sem esforço e dedicação, e que sempre devemos transformar a adversidade em aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, Paulo e Flávia, por todo amor, dedicação e ensinamentos. Pela confiança e estímulo em alcançar todos os meus objetivos.

Às minhas irmãs Paula, Bruna e Amanda, pelo apoio e ajuda com a minha filha. Só entendi o quanto o amor de um irmão é grande, no momento em que deixava a minha filha com uma delas e parecia que ela estava comigo.

Ao meu Orientador Dr. José Miguel Chatkin, pela dedicação, disponibilidade, auxílio, confiança e acompanhamento exercido ao longo destes anos.

Às Dras. Flávia Valladão Thiesen e Aline Rigon Zimmer, pela realização de todas as análises laboratoriais, verdadeiras coorientadoras deste trabalho, que, infelizmente, por questões burocráticas não puderam ser assim denominadas.

À Ana Paula Goulart, pela ajuda nas coletas dos materiais, tentei motivar várias pessoas, mas a Ana foi a única que assumiu a reponsabilidade e ajudou-me muito neste processo trabalhoso.

Às Dras. Letícia Paula, Bartira da Costa e Daniela Blanco, por terem participado do processo de qualificação e terem feito sugestões importantes para o crescimento da minha tese.

À Comissão Científica do XXXVII Congresso Brasileiro de Pneumologia e Tisiologia, pelo prêmio de melhor trabalho na área temática do tabagismo e por terem me possibilitado apresentá-lo no Congresso.

Às pacientes que concordaram em participar do trabalho, pois sem elas ele não seria possível.

Enfim, a todas as pessoas que estiveram ao meu lado e souberam entender a minha ausência em alguns momentos, pois...

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”. (Simone de Beauvoir)

RESUMO

O tabagismo na gestação tem sido associado a inúmeras alterações, impactando em várias fases do desenvolvimento fetal, incluindo efeito teratogênico.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição materna a algumas substâncias tóxicas existentes na fumaça do cigarro (cotinina, 1-hidroxi-pireno e benzopireno) são transmitidas ao feto.

Através de delineamento transversal controlado, foram selecionadas 125 gestantes internadas no Centro Obstétrico do Hospital São Lucas da PUCRS, em Porto Alegre. As voluntárias foram classificadas conforme seu status tabágico: 37 tabagistas ativas, 25 tabagistas passivas e 63 não fumantes (controles). Foram realizadas as dosagens de cotinina e 1-hidroxi-pireno na urina materna e líquido amniótico; cotinina e benzopireno no sangue do cordão umbilical através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Para estimar a diferença proporcional das variáveis assimétricas entre os grupos utilizou-se a razão das médias (RM) e intervalo de confiança de 95%. Para o cálculo das diferenças entre os grupos foi utilizado o teste *post-hoc* de Tukey.

Todas as variáveis estudadas apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tabagista. Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e tabagista passivo.

A concentração de cotinina foi cerca de 6 vezes maior na urina das gestantes tabagistas, RM: 5,92 [2,59 - 13,55], $p < 0,001$ em relação aos controles; no líquido amniótico a concentração foi 25 vezes maior que a do grupo controle, RM: 25,09 [11,9 - 52,91], $p < 0,001$; e no sangue do cordão umbilical foi 2,6 vezes maior nos fetos das gestantes tabagistas, RM: 2,64 [1,02-6,84], $p = 0,044$.

A concentração de 1-hidroxi-pireno foi sete vezes maior na urina das gestantes tabagistas, quando comparadas ao grupo controle, RM: 7,3 [1,64 - 29,69], $p = 0,003$. No líquido amniótico, o grupo tabagista apresentou concentração 30% maior que o grupo controle, RM: 1,3 [1,05 - 1,7], $p = 0,012$. A concentração de benzopireno foi cerca de 3 vezes maior no sangue do cordão umbilical dos fetos de mães tabagistas, RM: 2,9 [1,76 - 4,79], $p < 0,001$ quando comparadas ao grupo controle.

Desse modo, conclui-se que fetos de gestantes tabagistas estão mais expostos a substâncias reconhecidamente tóxicas e carcinogênicas. Pelo nosso conhecimento, este estudo é o primeiro que dosou o 1-hidroxi-pireno no líquido amniótico e benzopireno isolado no sangue do cordão umbilical por cromatografia líquida de alta eficiência, comparando gestantes somente em relação à exposição ao tabagismo.

Palavras Chaves: Tabagismo, gestação, cotinina, 1-hidroxi-pireno, benzopireno

ABSTRACT

Cigarette smoking during pregnancy has several impacts on fetal development, including teratogenic effects.

The objective of this study was to assess whether the toxic substances (cotinine and polycyclic aromatic hydrocarbons) found in pregnant smokers are transmitted to their fetuses. The outcomes were analyzed measuring cotinine and 1-hydroxypyrene in the amniotic fluid and maternal urine, benzopyrene and cotinine in the umbilical cord blood.

Through a controlled cross-sectional design, 125 pregnant women were selected and classified according to their smoking status: 37 current smokers, 25 passive smokers and 63 non-smokers (controls). We performed high-performance liquid chromatography to measure substances' concentrations. A post-hoc Tukey's test was used to analyze the differences between the groups.

All variables were significantly different between controls and smokers. The mean ratios between the concentration of cotinine in smokers compared to controls were as follows: 5.9 [2.5 - 13.5], $p < 0.001$ in the urine; 25 [11.9 - 52.9], $p < 0.001$ in the amniotic fluid; and 2.6 [1.0- 6.8], $p = 0.044$ in the umbilical cord blood.

The mean ratios of 1-hydroxypyrene concentration between smokers and controls were 7.3 [1.6 - 29.6], $p = 0.003$ in the urine and 1.3 [1.0 - 1.7], $p = 0.012$ in the amniotic fluid, and of benzopyrene in umbilical cord blood was 2.9 [1.7 - 4.7], $p < 0.001$.

There were no significant differences between controls and passive smokers. When comparing the three groups together, there were statistical differences between all variables.

Thus, the fetuses of pregnant smokers are exposed to toxic and carcinogens substances. To our knowledge, this is the first study to measure 1-hydroxypyrene in the amniotic fluid and benzopyrene in umbilical cord blood by high-performance liquid chromatography when considering pregnant women in relation to smoking exposure only.

Keywords: Pregnancy, tobacco, cotinine, polycyclic aromatic hydrocarbons

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais causas de morte no mundo	12
Figura 2: Detecção de cotinina em gestantes e fetos.....	25
Figura 3: Mecanismos de mutagênese dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	27
Figura 4: Recrutamento das gestantes	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características da população em estudo42

Tabela 2: Comparação de variáveis selecionadas entre os grupos segundo hábito tabágico43

Tabela 3: Médias geométricas e desvios padrões geométricos dos grupos44

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS: Organização Mundial da Saúde

VIGITEL: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

CO: Monóxido de carbono

OR: *Odds Ratio*

IC: Intervalo de confiança

COex: Monóxido de carbono exalado

DPP: Descolamento prematuro de placenta

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

HPAs: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

CIUR: Crescimento intrauterino restrito

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

RM: Razão das médias

1-OHP: 1- hidroxipireno

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1. Tabagismo.....	11
1.1.1. Tabagismo no Mundo	11
1.1.2. Tabagismo no Brasil.....	13
1.1.3. Epidemiologia do Tabagismo na Gestação.....	15
1.1.4. Efeitos do Tabagismo na Gestação	17
1.2. Cotinina	22
1.3. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	26
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	31
2.1. Justificativa.....	31
2.2. Hipótese	32
2.2.1. Hipótese Nula.....	32
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos Específicos.....	32
4. METODOLOGIA.....	33
4.1. Delineamento	33
4.2. População.....	33
4.2.1. Critérios de Inclusão.....	33
4.2.2. Critérios de Exclusão.....	33
4.3. Métodos.....	34
4.3.1. Recrutamento das Gestantes.....	34
4.3.2. Procedimentos Laboratoriais.....	37
4.3.2.1. Extração de cotinina na urina.....	37
4.3.2.2. Extração de cotinina no líquido amniótico.....	37
4.3.2.3. Extração de cotinina no sangue do cordão umbilical	38
4.3.2.4. Análise de cotinina.....	38
4.3.2.5. Extração de 1-hidroxipireno na urina	39
4.3.2.6. Extração de 1-hidroxipireno no líquido amniótico	39
4.3.2.7. Análise do 1- hidroxipireno	40
4.3.2.8. Extração de benzopireno no cordão umbilical	40
4.3.2.9. Análise do Benzopireno.....	40
4.4. Análise Estatística.....	41
4.5. Aspectos Éticos.....	41

5.RESULTADOS.....	42
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÕES.....	50
8. BIBLIOGRAFIA.....	51
9. ANEXOS	58
Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	59
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	60
Anexo 3: Ficha de coleta de dados.....	62
Anexo 4: Resposta da Revista PLOS ONE.....	63
Anexo 5: Título de melhor trabalho por eixo temático de tabagismo do XXXVII Congresso Brasileiro de Pneumologia e Tisiologia.....	64
Anexo 6: Artigo.....	65

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Tabagismo

1.1.1. Tabagismo no mundo

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial adulta seja fumante; dos quais 80% vivem nos países em desenvolvimento e destes, 27% são mulheres. Cerca de metade dos fumantes morrem precocemente devido a condições associadas ao tabagismo ¹.

O tabagismo é a principal causa evitável de morte no mundo ²⁻⁴, mata cerca de 6 milhões de pessoas por ano, 200 mil no Brasil ^{1,5}. O número representa uma morte a cada seis segundos ¹.

Até 2030, a estimativa da OMS é que 8 milhões de pessoas possam morrer em consequência do fumo. O tabaco foi classificado como um dos fatores que mais contribuem para a epidemia de doenças não contagiosas como cardiopatias, doenças vasculares, câncer e enfisema. O grupo é responsável por 63% de todas as mortes no mundo ¹.

A prevalência é maior entre os homens, no entanto, a taxa está aumentando entre as mulheres, especialmente às jovens, em muitos países. Esse grupo frequentemente é vítima de exposição passiva, doença e morte ¹. A exposição ao fumo passivo ocorre mais comumente em casa, local de trabalho e áreas públicas, sendo especialmente perigoso para bebês, crianças, gestantes e fetos, e é responsável por 600 mil mortes por ano ⁶.

O tabaco causou 100 milhões de mortes durante o século XX e se a tendência atual continuar, cerca de um bilhão de pessoas vão morrer durante o século XXI devido ao uso do tabaco. É o produto tóxico com o maior efeito

teratogênico no desenvolvimento humano, além de apresentar impacto negativo na saúde pública e economia das nações ⁶.

Exposição à fumaça do cigarro, voluntária ou involuntária, ocorre em todas as idades e vem de várias fontes, resultando na inalação de produtos químicos, causando efeitos negativos em praticamente todas as fases da vida, inclusive no desenvolvimento e sobrevivência do recém-nascido ⁷. As principais causas de morte no mundo tem o tabagismo como um dos fatores de risco (Figura1).

Causas de morte em 2000	mortes/ milhão	% de morte		Causas de morte em 2011	mortes/ milhão	% de morte
Todas as causas	52,5	100		Todas as causas	54,6	100
1 Doença cardíaca isquêmica	5,9	11,2	→	1 Doença cardíaca isquêmica	7,0	12,9
2 Acidente vascular cerebral	5,6	10,6	→	2 Acidente vascular cerebral	6,2	11,4
3 Infecções do trato respiratório	3,5	6,7	→	3 Infecções do trato respiratório	3,2	5,9
4 Doença pulmonar obstrutiva crônica	3,0	5,8	→	4 Doença pulmonar obstrutiva crônica	3,0	5,4
5 Diarreias	2,5	4,7	→	5 Diarreias	1,9	3,5
6 HIV/AIDS	1,6	3,0	→	6 HIV/AIDS	1,6	2,9
7 Prematuridade	1,4	2,7		7 Câncer de traqueia, brônquios e pulmão	1,5	2,7
8 Tuberculose	1,3	2,6		8 Diabetes Mellitus	1,4	2,6
9 Câncer de traqueia, brônquios e pulmão	1,2	2,2		9 Acidentes de trânsito	1,3	2,3
10 Diabetes Mellitus	1,0	1,9		10 Prematuridade	1,2	2,2
11 Acidentes de trânsito	1,0	1,9		13 Tuberculose	1,0	1,8

Fonte: OMS

Figura 1: Principais causas de morte no mundo

O consumo de tabaco é responsável pela morte de cerca de 1 em cada 10 adultos no mundo inteiro. Nos países de alta renda, sete em cada 10 mortes são de pessoas com 70 anos ou mais. Predominam mortes por doenças cardiovasculares, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica ou diabete.

Infecções respiratórias inferiores permanecem a única causa infecciosa líder de morte. Apenas 1 em cada 100 mortes é de criança com menos de 15 anos ⁸. Em países de baixa renda, quase 4 em cada 10 mortes são de crianças menores de 15 anos e apenas 2 em cada 10 mortes são de pessoas com 70 anos ou mais. Predominam as mortes por doenças infecciosas: infecções respiratórias inferiores, síndrome da imunodeficiência adquirida, doenças diarreicas, malária e tuberculose; sendo coletivamente responsáveis por quase um terço de todas as mortes nesses países. Complicações no parto, prematuridade, asfixia e trauma estão entre as principais causas de morte ⁸.

Enfim, 8 das 10 principais causas de morte no mundo tem o tabagismo como um dos fatores de risco para o desenvolvimento da doença ⁸.

1.1.2. Tabagismo no Brasil

De acordo com o levantamento anual da vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL- 2012), que traça perfil de hábitos que influenciam a saúde do brasileiro, a parcela da população acima de 18 anos que fuma caiu 20% nos últimos seis anos. A pesquisa aponta que 12% da população brasileira fuma, enquanto que em 2006 o índice era de 15%. Apesar da queda, a frequência maior permanece entre os homens: o número passou de 19% (2006) para 15% (2012). Entre as mulheres caiu de 12% (2006) para 9% (2012) ⁹.

Além disso, ocorreu redução na frequência de fumantes passivos, no domicílio e local de trabalho, de 12% para 10%. Continua em queda a frequência de homens que fumam 20 ou mais cigarros por dia, 6% para 5%. Em relação ao número de adultos fumantes por cidade, o levantamento mostra que a capital

com a maior concentração é Porto Alegre (RS) com 18%, que também detém a maior proporção de pessoas que fumam 20 cigarros ou mais por dia (7%). Já a capital com o menor índice é Salvador (BA), onde 6% da população adulta diz ser fumante ⁹. A pesquisa mostrou também que o hábito de fumar é maior entre pessoas com até oito anos de escolaridade (16%), quase o dobro da frequência observada entre as pessoas mais escolarizadas (12 anos ou mais), que atinge 9% ⁹.

No Brasil, as doenças crônicas não transmissíveis foram responsáveis por 72,4% do total de mortes em 2012, com destaque para doenças do aparelho circulatório, neoplasias e diabetes ⁹. De acordo com a OMS, um pequeno conjunto de fatores de risco responde pela grande maioria das mortes por câncer, doenças pulmonares e doenças cardiovasculares. Ainda hoje, o uso do tabaco continua sendo líder global entre as causas de mortes evitáveis ¹⁰.

Apesar de estar ocorrendo um decréscimo no tabagismo, existe uma tendência proporcional de crescimento do tabagismo feminino em relação ao masculino ao longo das últimas décadas. Isso aponta para um quadro extremamente complexo, em que problemas emergentes se articulam aos anteriores e em que questões de saúde reprodutiva se associam às não reprodutivas. O uso do tabaco potencializa os riscos, por exemplo, das associações entre doenças cardiocerebrovasculares e a contracepção hormonal e em várias doenças relacionadas à gravidez e ao parto. As tendências epidemiológicas do tabagismo apontam para um problema que, dentro de poucos anos, será majoritariamente feminino ¹⁰.

1.1.3. Epidemiologia do tabagismo na Gestaçã

O tabagismo antes e durante a gestaçã é a principal causa evitável de doençã e morte entre gestantes e criançãs. As mulheres que param de fumar antes de engravidar ou logo que sabem estar grávidas diminuem significativamente os riscos dos efeitos danosos do fumo ¹¹.

Estima-se que se todas as mulheres nos Estados Unidos parassem de fumar haveria reduçã de 11% nos natimortos e 5% nas mortes neonatais. Fumar ainda é frequente durante a gravidez, particularmente impactando gestações em mulheres mais jovens e menos instruídas ¹¹. É maior a prevalência de tabagismo entre as mulheres que vivem abaixo da linha da pobreza ¹².

A literatura mundial mostra que a prevalência do tabagismo na gestaçã, embora venha diminuindo nas últimas décadas, ainda é alta, variando entre 12% e quase 40%. Em uma coorte realizada na cidade de Pelotas, RS, foi detectada prevalência de 35,6% de fumo na gestaçã em 1982 e posterior reduçã para 25,1% em 2004 ¹³. Outros estudos ¹⁴⁻¹⁶ mostram prevalência em torno de 23 a 25%. Estudo realizado em Porto Alegre, incluindo 718 puérperas, encontrou um percentual de 23% de fumantes ativas ¹⁷.

Estudo realizado em 2002, na Cantabria (Espanha), revelou um decréscimo importante dessas cifras em apenas 4 anos, em que as taxas caíram de 53.6% (em 1998) para 39.4% (em 2002), permanecendo, entretanto, como uma das mais altas da Uniã Européia ¹⁸. Nos Estados Unidos também houve uma queda na prevalência do tabagismo na gestaçã, caindo de 20%, em 1989 para 12% em 2000 ¹⁹.

Na Inglaterra 38% das gestantes, convivem em casa, com no mínimo um fumante, sofrendo ela e o feto, os efeitos do tabagismo passivo²⁰. Somente um pequeno número das gestantes recebe ajuda para parar de fumar durante a gestação, pois os profissionais tem medo de que a abordagem desse tema interfira na relação médico-paciente²⁰. As gestantes que foram orientadas a parar de fumar obtiveram taxas de cessação efetivamente maiores (38%) do que aquelas que foram orientadas apenas a diminuir o número de cigarros (8%). A recomendação, portanto, é que sempre se oriente as gestantes a parar com o tabagismo e não apenas a reduzir o número de cigarros²⁰.

Estudo recente avaliou a prevalência do uso de tabaco na gestação em países de média e baixa renda. A prevalência global do uso foi de 2,6% (IC 95%; 1,8 - 3,6); a menor prevalência foi na região Africana (2,0%; 1,2 - 2,9) e a maior foi na região do Sudeste Asiático (5,1%; 1,3 - 10,9)²¹.

São fatores de risco para o uso de tabaco na gravidez: pessoas de pele branca, baixo nível socioeconômico, baixa escolaridade e não ser casada. Gestantes que fumam após a 20ª semana de gravidez costumam apresentar maior consumo de álcool do que as que pararam de fumar. Ainda, a condição de sobrepeso pré-gravídico também foi relacionada com a continuidade do tabagismo¹⁶.

Aproximadamente 10,7% das mulheres relatam fumar durante os últimos três meses de gravidez. Das mulheres que fumavam três meses antes da gravidez, 54% pararam durante a gestação. Entre as mulheres que param de fumar, 44% tem recaída dentro de 6 meses após o parto²².

Um dos grandes problemas enfrentados ao estudar a prevalência do tabagismo na gestação, refere-se ao fato da informação obtida pelos

pesquisadores ser fornecida pela própria gestante. Sabe-se que muitas se sentem constrangidas diante da forte pressão social e omitem dados a respeito do tabagismo. Assim, algumas vezes é necessário validar as informações recebidas para assegurar a qualidade científica dos estudos ²³.

1.1.4. Efeitos do Tabagismo na gestação

Os efeitos mais estudados do tabagismo na gestação estão relacionados à nicotina e ao monóxido de carbono. Ambos atravessam rapidamente a placenta, e com a exposição crônica, os níveis dessas substâncias no compartimento fetal, podem exceder os do compartimento materno ⁷.

A nicotina é claramente neuroteratogênica, impactando o cérebro em estágios críticos do desenvolvimento ²⁴. Desse modo, é a mais provável causa de problemas cognitivos, emocionais e comportamentais observados em filhos de fumantes. Além disso, a exposição à fumaça do cigarro ao longo do desenvolvimento pré-natal e ou pós-natal aumenta a probabilidade de comportamento de dependência a drogas lícitas e ilícitas na adolescência ou idade adulta ²⁵.

O desenvolvimento de outros órgãos, incluindo o pulmão ^{26,27}, também é prejudicado pela nicotina nessa fase da vida. O uso de tabaco, durante a gestação, confere aos descendentes, não apenas desta gravidez e sim por várias gerações, frequências aumentadas de inúmeras doenças, em demonstração clara dos fenômenos epigenéticos. Grávidas fumantes tem maior possibilidade de terem filhos e netos com asma, mesmo que não sejam asmáticas e que as mães de gestações posteriores não permaneçam fumando

O monóxido de carbono (CO), presente na fumaça do cigarro, é rapidamente absorvido e liga-se à hemoglobina, formando carboxihemoglobina no sangue materno e fetal. Relatos de casos de intoxicação aguda grave por monóxido de carbono em gestantes incluem morte fetal e malformações. A formação de carboxihemoglobina resulta em hipóxia fetal, que se for suficientemente grave, é teratogênica ao feto ³¹. A exposição ao CO tem sido consistentemente associada à diminuição do peso ao nascer e ao parto prematuro em estudos de exposição à poluição do ar ambiente durante a gravidez ³²⁻³⁸.

O tabagismo tem sido associado também ao aumento de risco de aborto espontâneo. Em um estudo caso-controle de base populacional na Suécia, mulheres foram classificadas pela concentração de cotinina no plasma quanto à exposição tabágica. O risco de aborto espontâneo foi maior nos grupos de exposição passiva (OR 1,67 [IC 95% 1,17-2,38]) e fumantes (OR 2,11 [IC 95% 1,36-3,27]) ³⁹.

O tabagismo materno também altera o fluxo de sangue na placenta e provoca alterações do equilíbrio entre proliferação e diferenciação do citotrofoblasto. Em relação ao fluxo, estudo encontrou um padrão de perfusão materno-fetal com características de hipóxia crônica nas fumantes. Foi realizada a quantificação objetiva do tabagismo em gestantes através das dosagens de cotinina urinária e monóxido de carbono exalado (COex) e avaliada a relação com os índices de resistência das artérias uterinas, umbilical e cerebral média fetal pelo estudo ecográfico dopplervelocimétrico. Ao estratificar as pacientes conforme a carga tabágica, dosada através do COex, observou-se aumento da resistência associado à elevação dos níveis de COex nas medidas das artérias

uterinas e umbilical e diminuição na resistência da artéria cerebral média, todos estatisticamente significativos. Quando foi avaliado em relação aos níveis de cotinina urinária, também detectou aumento dos índices de resistência vascular da artéria uterina esquerda e umbilical associado com os valores da cotinina, estatisticamente significativo. A artéria uterina direita mostrou tendência ao aumento da resistividade, porém não significativo. A artéria cerebral média evidenciou tendência de diminuição da resistência com o aumento da carga tabágica, não significativo ⁴⁰.

Em relação ao citotrofoblasto, alterações no gene e na expressão das suas proteínas, incluindo aqueles que orientam respostas celulares e a tensão de oxigênio, já foram relacionadas ao tabagismo. Observa-se também o espessamento da membrana basal trofoblástica, aumento de colágeno nas vilosidades e diminuição da vascularização da placenta ⁴¹.

Outra complicação relacionada ao tabagismo na gestação é o descolamento prematuro da placenta (DPP) que ocorre em cerca de 1% das gestações e a recorrência é de 20 a 30 vezes maior em fumantes. Uma revisão sistemática e meta-análise sobre descolamento prematuro da placenta em relação ao tabagismo materno incluiu 13 estudos com um total de 1.358.083 gestações ⁴². A incidência global de DPP foi de 0,64% e o tabagismo materno foi associado com um aumento no risco de 90% (OR 1,9 [IC 95% 1,8-2,0]).

Tabagismo materno tem sido associado também com placenta prévia ⁴³. Um estudo populacional em Taiwan também encontrou associação de placenta prévia (OR de 3,3 [IC 95% 1,2-9,1]) com o fumo ⁴⁴. Maior incidência de parto pré-termo em tabagistas também tem sido observada ⁴⁵⁻⁴⁷, particularmente em múltiparas ⁴⁸.

Em 1957, Simpson reconheceu que o tabagismo materno provoca menor peso ao nascer ⁴⁹. Estes resultados têm sido amplamente replicados e hoje se sabe que o tabagismo ativo ^{50,51} ou passivo ^{52,53} causa diminuição do peso ao nascer. Kramer ⁵⁴ estimou redução do peso ao nascer de 5% para cada maço de cigarros fumados por dia, durante a gravidez. Meyer e Comstock ⁵⁵ estimaram decréscimo de peso de 150 - 300 g em prole de mães fumantes. Estudos que avaliaram somente a exposição à fumaça do tabaco durante a gravidez estimaram diminuição de 35-90 g de peso ao nascer nos filhos de mães expostas ^{53,56-58}.

Os efeitos da fumaça do tabaco sobre o peso ao nascer ⁷ são principalmente devido à restrição do crescimento fetal ⁵⁴ e apresentam uma relação dose-resposta clara ⁵⁰. Os mecanismos subjacentes aos efeitos do tabaco sobre o crescimento fetal não são totalmente compreendidos e provavelmente devem ser multifatoriais. Fetos de fumantes tendem a ter hemoglobina e hematócrito elevados ⁵⁹ e respostas nitidamente relacionadas à hipóxia. Outro aspecto importante é o aumento da mortalidade intraútero e neonatal relacionada ao tabagismo materno ⁶⁰.

O tabagismo materno também pode ser teratogênico, afetando as estruturas em desenvolvimento. No entanto, a suscetibilidade exibida pode estar ligada à genótipos específicos do sistema de metabolização e à genes específicos do desenvolvimento ⁶¹.

Para analisar o potencial efeito genotóxico do tabagismo materno durante a gravidez, de la Chica et al. ⁶² analisaram a instabilidade cromossômica em células de líquido amniótico coletadas de fumantes e não-fumantes durante amniocentese. Tabagismo materno de 10 ou mais cigarros por dia, durante pelo

menos 10 anos e durante a gravidez, foi associado com aumento da instabilidade cromossômica. A banda 11q23, implicada em doenças malignas hematopoiéticas, pareceu ser particularmente sensível. Zalacain et al.⁶³ relataram significativa elevação no número de micronúcleos (marcador de dano cromossômico) no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães fumantes em comparação com não fumantes.

O cigarro contém numerosos agentes cancerígenos que podem atravessar a placenta. Sasco e Vainio⁶⁴ revisaram a literatura sobre a associação entre a exposição pré-natal à fumaça do tabaco e aumento do risco de câncer infantil. Foram incluídos 50 estudos de base populacional de vários países, bem como 50 estudos adicionais sobre os mecanismos e metabolismos, sem encontrar nenhuma associação forte e consistente entre fumar durante a gravidez ou exposição ao fumo passivo e câncer na infância. No entanto, estudo de revisão encontrou aumento do risco relativo de alguns tipos de câncer na infância, incluindo tumores cerebrais, leucemia e linfoma⁷. Em um estudo prospectivo de 1,4 milhões de nascimentos na Suécia, Brooks et al.⁶⁵ encontraram risco aumentado de tumores cerebrais benignos e malignos.

Relação entre tabagismo materno, sobrepeso e obesidade infantil tem sido também consistentemente relatada na literatura, incluindo aumento do índice de massa corporal⁷. Mulheres que fumam no início da gestação apresentam maior frequência de diabetes gestacional e obesidade nas suas filhas⁶⁶. Morley et al.⁶⁷ acharam associação entre tabagismo materno e o aumento da pressão arterial nos filhos.

O tabagismo passivo durante a gravidez também está relacionado com restrição de crescimento intrauterino⁶⁸, aborto⁶⁹, ruptura prematura de

membranas, descolamento prematuro da placenta e baixo peso ao nascer ^{70,71}. As pessoas podem estar expostas à fumaça do cigarro em vários lugares tais como casa, trabalho ou áreas públicas ⁷². Mais de 95% das esposas dos fumantes são expostas à fumaça do cigarro durante a gestação ⁷³.

Enfim, o tabagismo tem sido associado a inúmeras alterações, impactando em várias fases do desenvolvimento, e esses efeitos não se restringem ao período gestacional e neonatal, seguem ao longo da vida e podem ser transmitidos às gerações seguintes por efeitos epigenéticos ^{24,25,28-30,66,67}.

1.2. Cotinina

A cotinina é o principal metabólito da nicotina ⁷⁴⁻⁷⁶. Apresenta meia-vida mais longa do que a mesma ^{74,77}; uma característica que a faz ser amplamente utilizada como marcador biológico para medir a exposição ao tabaco ⁷⁸⁻⁸⁰.

A dosagem de cotinina é considerada o padrão-ouro para avaliar *status* tabágico, devido à capacidade de detectar baixo consumo ou mesmo uso esporádico de tabaco ⁸¹, mas tem como desvantagem: alto custo, necessidade de equipamento e equipe treinada. Sua meia-vida prolonga-se por 36 a 40 horas, em média e, mesmo sendo coletada até dois dias após o último cigarro fumado, pode-se recuperar até 90% ⁸². Tanto em fumantes passivos quanto em ativos, seus níveis de concentração são lineares com a quantidade de tabaco inalada direta ou indiretamente ⁸¹.

Esse método é útil para validação das informações prestadas pelo fumante. Porém, é preciso atentar para as variações individuais em relação à nicotina consumida, pois existem diferentes taxas de metabolização de nicotina

e de conversão em cotinina, podendo variar de 55% a 92%. Mesmo assim, a aferição da cotinina reflete com acurácia o grau de exposição tabágica ⁸².

Uma vez absorvida a nicotina pelo trato respiratório, mucosa oral, trato gastrointestinal e até pela derme, a distribuição ocorre de forma livre para todo o organismo ⁸³. Assim, a cotinina aparece em todos os fluidos biológicos de indivíduos expostos em poucos minutos por biotransformação da nicotina no fígado. Por sua vez, a cotinina é oxidada e o produto final é eliminado na urina durante cerca de 2 a 3 dias ⁸³. A quantificação materna pode ser realizada na urina ⁸⁴, plasma ⁸⁵, cabelo ⁸⁶ e saliva ⁸⁷. Como a informação da gestante pode não ser verdadeira, a sua mensuração ajuda a avaliar a exposição, e até mesmo, confirmar o *status* tabágico ⁸⁸.

Os valores de referência para cotinina encontrados na literatura são muito variáveis. Os níveis usados como ponto de corte para a cotinina salivar são de 15 µg/L, enquanto que para a urinária são de 50 µg/L ⁸⁹. A *Society of Research in Nicotine and Tobacco* ⁹⁰, em 2001, definiu os melhores pontos de corte da cotinina plasmática, concluindo que valores acima de 14 µg/L indicam tabagismo ativo, porém tais níveis tendem a subestimar o número de fumantes reais em inquiridos populacionais. Diante disso, sugerem baixar o ponto de corte para até 3,0 µg/L, sendo que a sensibilidade e a especificidade passam a ser de 96% e 97%, respectivamente.

Assim como os outros marcadores, a dosagem da cotinina também possui limitações. O uso concomitante de certas medicações pode elevar seus valores, como as várias formas de reposição nicotínica e isoniazida ⁹⁰. Além disso, existem alimentos que possuem nicotina como o tomate, batata, couve-flor e chá preto, que mesmo apresentando pequenas quantidades da substância, podem

interferir na análise do biomarcador. Entretanto, a quantidade consumida em uma dieta normal não ultrapassa 10% da nicotina consumida por fumantes, resultando em um adicional de 0,7 µg/L de cotinina na urina, não causando impacto que comprometa a interpretação do resultado ⁸².

Os métodos de detecção nos fluídos biológicos são colorimétricos, imunológicos ou cromatográficos. O mais utilizado é o HPLC (*high performance liquid chromatography*) ou cromatografia líquida de alta eficiência. Essa é a técnica de eleição por apresentar alta sensibilidade e especificidade para a análise da cotinina ⁹¹.

A dosagem da cotinina é também considerada o melhor preditor para analisar o *status* tabágico, mesmo durante a gestação ⁹². Gestantes metabolizam a cotinina mais rapidamente que as não gestantes, devendo então ser considerado que sua meia-vida fica reduzida ⁹⁰. Há diferenças no seu metabolismo também entre diferentes etnias, sendo que em afro-americanos e chineses a metabolização se dá de forma mais lenta ⁹³.

A presença de nicotina e seus metabólitos já foram avaliadas também no líquido amniótico. Teoricamente, altas concentrações dessas substâncias poderiam se acumular no líquido amniótico, devido a capacidade de difusão através das membranas amniocoriônicas, adicionalmente à quantidade de nicotina que entra através da placenta. Após a passagem para o líquido amniótico, essas substâncias seguem circulando pelo processo de deglutição do feto e eliminação na urina fetal. O baixo pH, também propicia o acúmulo de substâncias como as estudadas ⁹⁴.

Em comprovação a este raciocínio, Jordanov et al. ⁸⁶ observaram que a concentração de cotinina no líquido amniótico ao nascimento pode ser 2 vezes

maior que na urina materna. Köhler et al. ⁹⁴ detectaram nicotina no líquido amniótico de todas fumantes, porém não nas tabagistas passivas.

Também já foi quantificada cotinina no sangue do cordão umbilical, sendo que os níveis encontrados foram relacionados com tabagismo ativo, tabagismo passivo e com os efeitos do tabagismo no peso ao nascer, parecendo ser um bom marcador ⁷⁶.

Enfim, sabe-se que a cotinina pode ser utilizada como marcador de exposição ao tabaco em gestantes, na urina e sangue materno, mecônio do recém-nascido, líquido amniótico, urina fetal ou sangue do cordão umbilical ⁹⁵.

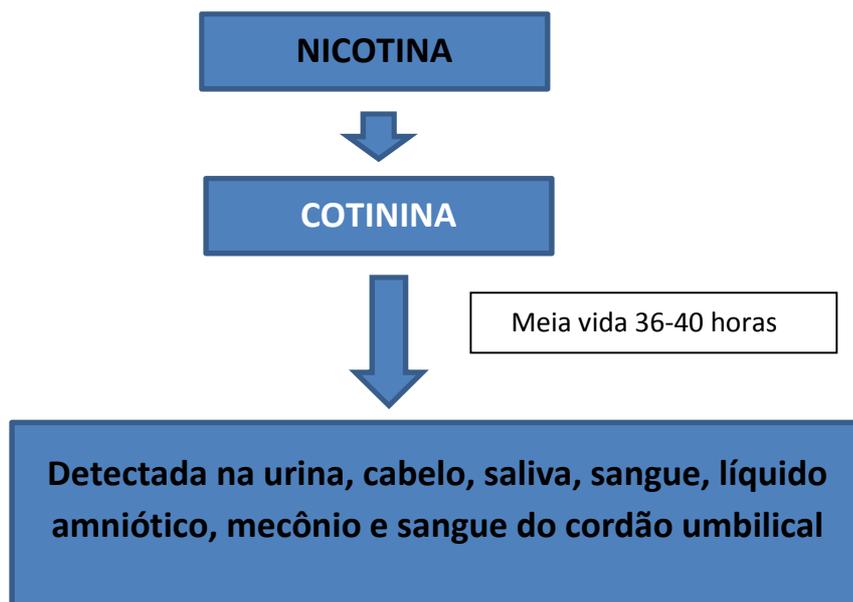


Figura 2: Detecção de cotinina em gestantes e fetos.

1.3. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são uma classe de compostos orgânicos que contém dois ou mais anéis aromáticos condensados, constituídos de átomos de carbono e hidrogênio. À temperatura ambiente, os HPAs são sólidos e as características gerais comuns a essa classe de compostos são o alto ponto de fusão e de ebulição, a baixa pressão de vapor e a pouca solubilidade em água, a qual tende a diminuir com o aumento da massa molecular. Os HPAs são solúveis em muitos solventes orgânicos, altamente lipofílicos⁹⁶. São poluentes do ar gerados pela combustão de motor dos veículos e de fábricas, também são encontrados em algumas comidas, principalmente as defumadas, e pela combustão de folhas de tabaco, através do tabagismo⁹⁷.

A maioria dos compostos HPA são metabolizados e excretados na urina, com meia vida de 18 horas^{98,99}, podendo ser todos utilizados como biomarcadores de exposição recente aos HPAs¹⁰⁰. Desde 1985, o 1-hidroxi-pireno, metabólito principal dos pirenos, tem sido usado como biomarcador dos HPAs¹⁰¹. Llop et al.¹⁰² mostraram que o 1-hidroxi-pireno é um bom marcador para avaliar a exposição ao cigarro, além da exposição recente a poluição aérea.

Quando a dosagem é realizada no sangue, o biomarcador utilizado geralmente é o benzopireno. Está bem estabelecido que a exposição ambiental ao benzopireno causa múltiplos efeitos deletérios, dependendo da dose e do tempo de exposição¹⁰³. O benzopireno é rapidamente metabolizado pela placenta e acumulado no tecido fetal durante a gestação em ratos¹⁰⁴. Perturba os padrões de metilação do DNA em sistemas experimentais^{105,106}, o que está associado à instabilidade do genoma e ao risco de câncer subsequente^{107,108}.

Após a exposição, HPAs são metabolizados para formar produtos fenólicos e epóxidos reativos, que tem a capacidade de se ligar ao DNA, formando o complexo HPA-DNA *adducts* ¹⁰⁹. O HPA-DNA *adducts* aumenta a probabilidade de mutações genéticas e por isso é associado com várias formas de câncer ¹¹⁰. Como hipótese, a via cancerígena para os HPAs, ou seus metabólitos, envolve a produção de espécies reativas de oxigênio, que gera stress oxidativo e pode levar à peroxidação de lípidios, modificação de proteínas e dano ao DNA ¹¹¹.

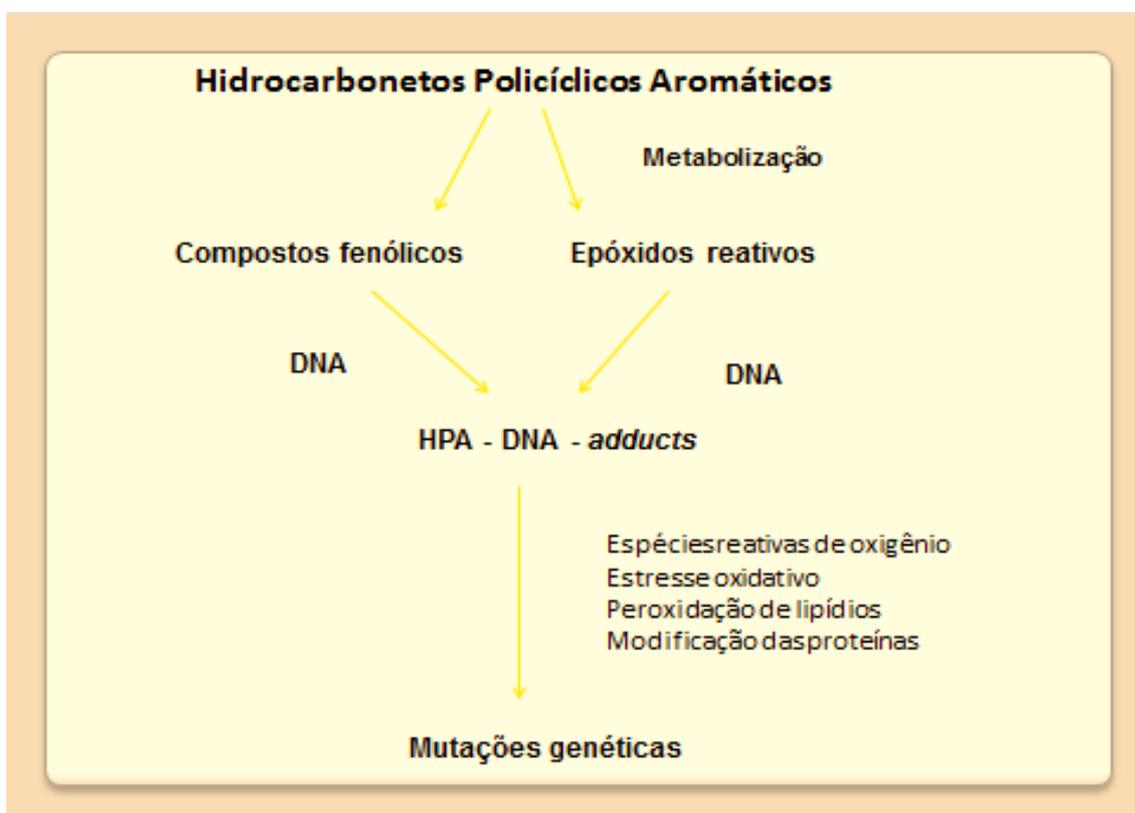


Figura 3: Mecanismos de mutagenese dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Nos seres humanos, a exposição materna a determinados HPAs cancerígenos durante a gravidez pode provocar danos ao DNA, modificação de histona e anomalias cromossômicas fetais ¹¹² em uma faixa de exposição ambiental relevante. DNA-*adducts* foram detectados no DNA do sangue do

cordão umbilical fetal humano, bem como no sangue materno, após a exposição aos HPAs em ar ambiente ¹¹³. A quantificação da exposição pré-natal aos HPAs, realizada por monitoramento de ar, prediz significativo aumento de aberrações cromossômicas em sangue do cordão umbilical, guardando relação dose-resposta ¹¹⁴. Assim, exposição pré-natal a HPAs pode aumentar o risco de câncer também em seres humanos ¹¹⁴.

Os HPAs atravessam a placenta, e o feto por estar em desenvolvimento é até 10 vezes mais sensível do que a mãe para sofrer danos no DNA ¹¹³. O desenvolvimento embrionário precoce é um período particularmente sensível para a desregulação epigenética como consequência de exposições ambientais, porque as taxas de síntese de DNA são altas e os padrões de metilação do DNA estão sendo estabelecidos ¹¹⁵.

Perera et al. ¹¹³ propuseram que a transferência transplacentária de HPA para o feto poderia ter impacto significativo sobre o desenvolvimento fetal. Essa afirmação foi feita com base em uma série de estudos que encontraram redução na circunferência craniana no nascimento correlacionada com um quociente de inteligência menor, além de pobre funcionamento cognitivo e desempenho escolar na infância ^{116,117}. Além disso, encontrou-se associação com restrição do crescimento intra-uterino ¹¹⁸, pequeno para a idade gestacional ¹¹⁹, e parto prematuro ¹¹⁹. Quando o grupo de recém-nascidos monitorados no pré-natal foi seguido na idade escolar, observou-se prejuízo no desenvolvimento neurológico ¹¹² e aumento na probabilidade de sintomas relacionados à asma ¹²⁰.

Jules et al. ¹⁰³ sugerem que a exposição intraútero ao benzopireno predispõe os recém-nascidos a déficits funcionais no desenvolvimento cardiovascular, o que pode contribuir para disfunção cardíaca ao longo da vida.

Rundle et al.¹²¹ sugerem que exposição pré-natal a HPAs causa aumento de ganho de massa gorda durante a infância e aumenta risco de obesidade. Langlois et al.¹²² mostraram associação entre a exposição materna ocupacional a HPAs e aumento de risco de lábio leporino com ou sem fenda palatina.

Estudo recente apoia as outras descobertas de que a exposição transplacentária ao benzopireno através da inalação materna produz danos ao DNA no feto em desenvolvimento. Ele também confirma que aumentou a suscetibilidade fetal à exposição pré-natal HPAs, devido ao DNA *adducts* representar um pró-carcinógeno na alteração do DNA¹²³. Isso deveria ser visto como uma questão de saúde pública, pois está relacionado essencialmente à exposição em áreas altamente poluídas.

Topinka et al.¹²⁴ mostraram resultados que sugerem um efeito protetor significativo da barreira placentária contra o efeito genotóxico de alguns componentes do tabaco, entre a circulação materna e fetal, sob exposição mais intensa, representada por tabagismo ativo ou passivo. Em indivíduos expostos à poluição ambiental, sem significativa contribuição do fumo, o efeito protetor da placenta não foi observado.

Outros estudos confirmaram essa hipótese de que a exposição aos HPAs durante a gravidez pode aumentar o estresse oxidativo, o que influenciaria os resultados do parto e a saúde da criança posteriormente^{111,112,125,126}. Karttunen et al.¹²⁷ confirmaram que a exposição materna ao benzopireno pode conduzir a sua transferência para o feto, bem como a ligação de seu metabólito ao DNA da placenta.

Rappolee et al.¹²⁸ mostraram que benzopireno pode perturbar a diferenciação em células-tronco trofoblásticas placentárias, o que é importante

para produzir os primeiros hormônios placentários que surgem na implantação do concepto. Stejskalova e Pavek ¹²⁹ confirmaram que o HPA-DNA *aducts* na placenta também levaram à complicações na gravidez, tais como parto prematuro, restrição do crescimento intra-uterino (CIUR), anormalidades estruturais, morte fetal, descolamento de placenta, risco de baixo peso ao nascer, baixo comprimento ao nascimento e diminuição da circunferência craniana.

Devido a essas alterações decorrentes da exposição aos HPAs, a rápida urbanização, o aumento do número de fábricas, a extensa rede de auto-estradas e a disponibilidade de carros e outros meios de transporte, que ocorrem no mundo, ocasionando o aumento na emissão de poluentes tem preocupado os pesquisadores ¹³⁰. Apesar desses outros fatores de exposição aos HPAs, o tabagismo é o fator mais importante de exposição na população em geral, e principalmente, na nossa população.

Estudo achou valores com diferença estatística significativa nos níveis de 1-hidroxi-pireno urinário entre tabagistas e não tabagistas ¹³¹. Numa análise multivariada feita por Kawamoto et al. ¹³², o cigarro foi a variável que mais influenciou os níveis de 1-hidroxi-pireno, seguido pela dieta rica em carne e peixes. Merlo et al. ¹³³ não achou associação entre dieta e excreção de 1-hidroxi-pireno na urina. Estudo realizado na Espanha mostrou que as pacientes que fumam tendem a ter também uma dieta rica em HPAs ¹³⁴.

Tabagistas excretam significativamente doses maiores de 1-hidroxi-pireno na urina que não tabagistas e esses valores correlacionam-se muito bem com o número de cigarros fumados ¹³⁵. Apenas poucos estudos investigaram HPAs em mulheres grávidas e sua relação com os resultados do parto ¹³⁶ ou fatores de

estilo de vida ^{102,135}, a maioria foca na exposição ambiental. Sendo o cigarro o principal fator de exposição, esse também deve ser estudado.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2.1. Justificativa

O tabagismo na gestação expõe o feto à fumaça do cigarro, que contém milhares de constituintes químicos e aditivos, incluindo metais pesados tóxicos e agentes cancerígenos conhecidos, dentre eles os HPAs. Esses produtos reconhecidamente têm papel de toxicidade no desenvolvimento fetal, e os efeitos, provavelmente, seguem ao longo da vida e necessitam ainda ser melhor elucidados [6].

Há uma preocupação crescente em relação à exposição das pessoas e gestantes aos HPAs via poluição ambiental ^{117,121-123}, porém o fator que mais expõe o ser humano aos HPAs é o tabagismo.

Em gestantes, o metabolismo de muitas substâncias é diferente, além de ser difícil avaliar a interferência de fatores alimentares e exposição ambiental. Assim, é interessante comparar em uma mesma população, com dieta similar, e mesmo ambiente de poluição, para isolar a verdadeira exposição dos fetos aos produtos químicos decorrentes do tabagismo, tanto ativo quanto passivo, diminuindo os possíveis fatores confundidores.

Como a embriogênese é um período crítico para o desenvolvimento do feto, e sabe-se que exposição nesta fase pode ter efeitos ao longo da vida e em futuras gerações através da epigenética, pretende-se quantificar a exposição fetal a substâncias tóxicas, como os HPAs e nicotina, através de seus

marcadores (1-hidroxicipireno, benzopireno e cotinina) dosados no líquido amniótico e no sangue do cordão umbilical.

2.2. Hipótese

Substâncias tóxicas da fumaça do cigarro inaladas pelas gestantes tabagistas, dosadas através da cotinina e os HPAs, passam para o feto através do líquido amniótico e do sangue do cordão umbilical.

2.2.1. Hipótese Nula (H0)

Substâncias tóxicas da fumaça do cigarro inaladas pelas gestantes tabagistas não passam para o feto através do líquido amniótico e do sangue do cordão umbilical.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar se a exposição materna a substâncias tóxicas do cigarro, dosadas através da cotinina, 1-hidroxicipireno e benzopireno são transmitidas ao feto.

3.2. Objetivos Específicos

- Quantificar o 1-hidroxicipireno e cotinina no líquido amniótico,
- Quantificar a cotinina e benzopireno no sangue do cordão umbilical
- Quantificar o 1-hidroxicipireno e cotinina na urina materna

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento

Estudo transversal controlado.

4.2. População

Foram recrutadas, após assinatura de termo de consentimento, gestantes que internaram em trabalho de parto no Centro Obstétrico do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), entre julho de 2010 e julho de 2013, com idade entre 18 e 35 anos, sem doenças prévias ou gestacionais concomitantes.

4.2.1. Critérios de inclusão

- TABAGISTAS:

Gestantes tabagistas por pelo menos 5 anos (mais de 100 cigarros na vida e fumando na atualidade).

- TABAGISTAS PASSIVAS:

Gestantes não tabagistas (não fumam desde o período pré-concepcional de 6 meses) que resida com um tabagista que fume dentro do domicílio.

- CONTROLE:

Gestantes não tabagistas (nunca fumantes).

4.2.2. Critérios de exclusão

Pacientes que não quiseram participar do estudo, história de psicopatias, analfabetas, trabalho de parto prematuro (antes das 37 semanas), ruprema, infecções e adição a outras drogas.

4.3. Métodos

4.3.1. Recrutamento das Gestantes

As gestantes foram recrutadas no momento da internação no Centro Obstétrico do Hospital São Lucas da PUCRS em trabalho de parto. Após aceitarem participar do estudo, responderam a um questionário em relação a dados demográficos, hábitos e tabagismo. No momento da internação, foi coletada urina materna. No momento da ruptura das membranas, foi coletado líquido amniótico e no parto, sangue do cordão umbilical.

A coleta da urina foi realizada em frasco específico para coleta de exame qualitativo de urina, estéril e armazenado em 2 frascos (1 para análise da cotinina e outro para a análise do 1-hidroxipireno) em freezer a temperatura de -20° C. Os frascos eram identificados somente com o nome do material e o número da paciente.

A coleta de líquido amniótico foi feita conforme a evolução da paciente, quando a ruptura das membranas era espontânea, conforme evolução do trabalho de parto, a coleta era realizada através de espéculo vaginal e seringa na saída do colo uterino e fundo vaginal. Quando a ruptura era realizada pelos médicos, o material era coletado em cuba rim estéril e a ruptura realizada com amniótomo. Após a coleta, o material era armazenado em 2 frascos (1 para análise da cotinina e outro para a análise do 1-hidroxipireno) em freezer a temperatura de -20° C. Os frascos eram identificados somente com o nome do material e o número da paciente.

A coleta de sangue do cordão umbilical foi realizada após o nascimento, logo após o clampeamento do cordão e dequitação da placenta, sendo coletado por aspiração manual, agulha 18G (1,20 x 40 mm) e seringa de 20 mL.

Armazenamento em frasco vacuette com tampa vermelha de coleta de sangue que contém *z serum clot activator*, guardado em geladeira a 5⁰ C por 6 horas, para separação do soro, e coletado com pipeta somente o soro e armazenado em 2 frascos de Eppendorf em freezer a -20⁰ C, também identificados somente com o número da paciente (1 para a análise da cotinina e outro para análise do benzopireno). No processo de validação dos métodos verificamos que a análise do benzopireno não poderia ser realizada em sangue total, porque o mesmo coagulava e dificultava a análise.

As gestantes foram subdivididas em 3 grupos conforme a informação por elas fornecidas em relação ao tabagismo: tabagista, tabagista passiva e grupo controle.

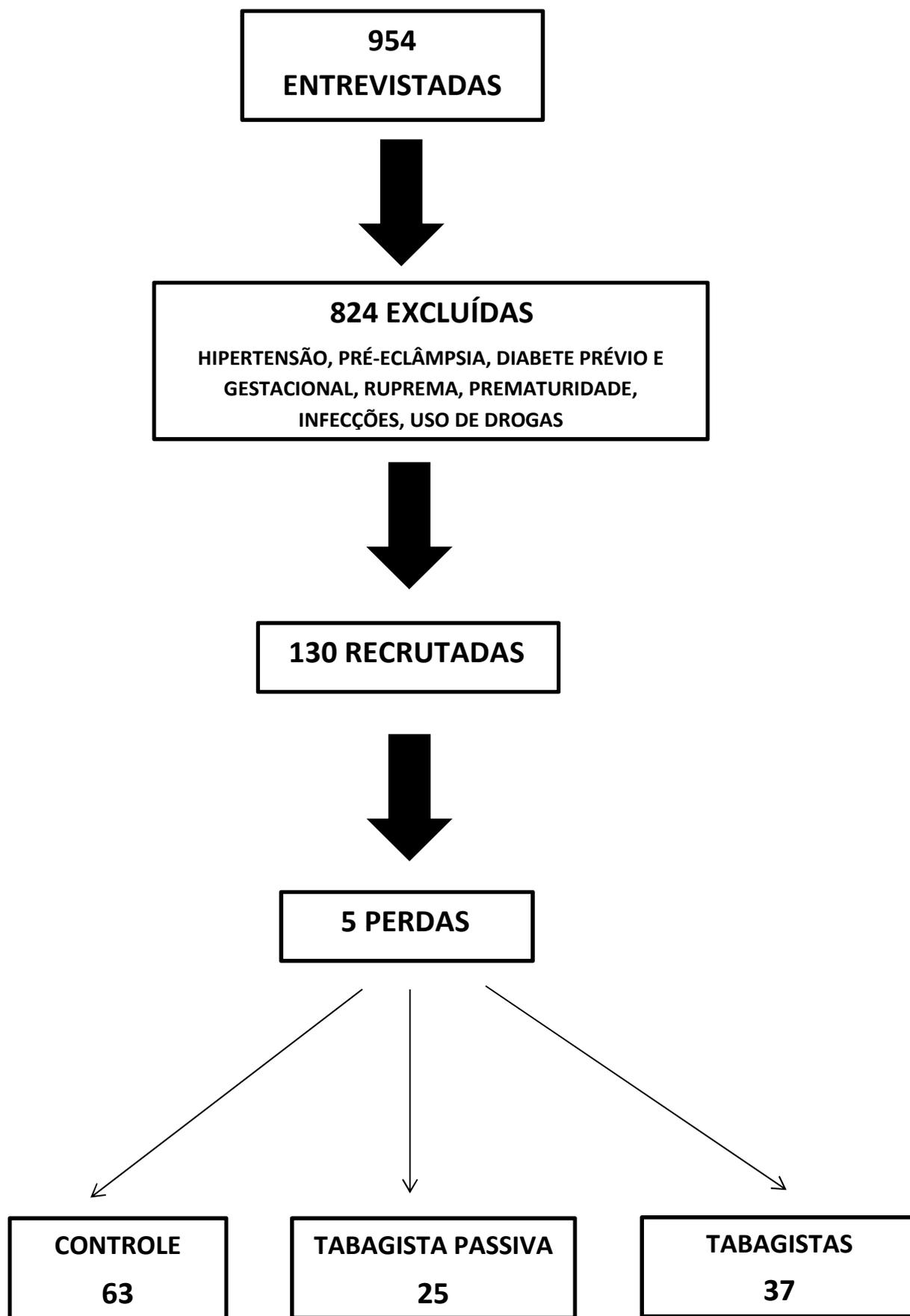


Figura 4: Recrutamento das gestantes

4.3.2. Procedimentos laboratoriais

4.3.2.1. Extração de cotinina na urina

A extração foi realizada seguindo o método de *Cattaneo e colaboradores*¹³⁷. Foram pipetados 2,0 mL de urina centrifugada. Posteriormente, foi adicionado 25 µL de NaOH 10 M, 100 µL de padrão interno (2-fenilimidazol, 1,0µg/mL) e 4,0 mL de diclorometano. A seguir, essa solução foi agitada por 40 minutos em homogeneizador e centrifugada por 10 minutos a 3000 rotações por minuto. Dois mL da fase orgânica foram transferidos para um frasco evaporador e colocados em termobloco (Pierce®, modelo 18940), sob corrente de nitrogênio e temperatura ambiente, até secagem. Posteriormente, o resíduo foi reconstituído com 200 µL de fase móvel e foram injetados 20 µL no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE)¹³⁷.

4.3.2.2. Extração de cotinina no líquido amniótico

Para a extração de cotinina do líquido amniótico, foram pipetados 1 mL de líquido amniótico, 25 µL de hidróxido de sódio, 25 µL de padrão interno 2-fenilimidazol (0,25 µg/mL) e após, foi adicionado 2,0 mL de diclorometano. Essa solução foi misturada por 40 minutos em um homogeneizador e centrifugada por 15 minutos a 3000 rotações por minuto. A fase aquosa foi extraída novamente para maior recuperação, onde foram adicionados 2,0 mL de diclorometano e seguiu-se o mesmo processo de homogeneização e centrifugação. Quatro mL da fase orgânica foram transferidos para um frasco evaporador e colocados em um termobloco (Pierce®, modelo 18940) sob corrente de nitrogênio e temperatura de 37° C, até secura. O extrato foi reconstituído com 200 µL da fase móvel e foram injetados 20 µL no CLAE¹³⁷.

4.3.2.3. Extração de cotinina no sangue do cordão umbilical

Para a análise de cotinina no sangue foi utilizado o método desenvolvido por *Petersen e colaboradores*¹³⁸. O sangue foi centrifugado e separado o soro. Desta forma, 600 µL de soro foram tratados com 25,0 µL de hidróxido de sódio 10 M e 25,0 µL de 2-fenilimidazol (padrão interno, 5,0 µg/mL). Subsequentemente, a amostra foi extraída com 5,0 mL de diclorometano. Uma alíquota de 4 mL da fase orgânica foi separada e seca sob corrente de nitrogênio a temperatura ambiente. A amostra seca foi reconstituída com 100 µL de fase móvel e 20 µL foram injetados no CLAE¹³⁸.

4.3.2.4. Análise de cotinina

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent® (Agilent Technologiess, Santa Clara, CA, USA) equipado com detector de ultravioleta, bomba isocrática e injetor manual de amostras. A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna Zorbax® Eclipse XDB-C8 (4,6mm x 150mm x 5µm Agilent) protegida por uma pré-coluna Zorbax® Eclipse XDB-C8 (4,6 x 12,5 mm, 5 µm Agilent). A fase móvel foi constituída de uma mistura de Água:Metanol:Acetato de Sódio 0,1M:Acetonitrila (50:15:25:10). Cinco mL de trietilamina e 7,14 gramas de ácido cítrico foram adicionados para cada litro de fase móvel e o pH da fase móvel foi ajustado para 4,4 com ácido acético glacial. Foi mantido um fluxo isocrático de 0,5 mL/min com a detecção por ultravioleta em 260 nm, produzindo um tempo total de corrida de 10 minutos. Para determinação dos níveis de cotinina foi utilizado o software ChemStation obtido também da Agilent®.

4.3.2.5. Extração de 1-hidroxi-pireno na urina

Para avaliação de 1-hidroxi-pireno na urina, 2,5 mL de urina foram tratados com 5,0 mL de tampão acetato pH 5,0 e 10 µL da enzima β-glicuronidase-arilsulfatase. Subsequentemente a amostra foi incubada em banho-maria 37°C por 2 horas. Após a incubação, a amostra foi submetida a extração em fase sólida sob pressão com cartuchos de sílica C18, ativados com 2 mL de metanol, seguido de 5 mL de água ultrapura. A amostra hidrolisada foi aplicada a um fluxo de aproximadamente 1,5 mL/min. O cartucho foi sequencialmente lavado com 6 mL de metanol 40% e o analito eluído com 2 mL de isopropanol. O solvente foi evaporado a 37°C sob corrente de nitrogênio e o resíduo foi reconstituído com 200 µL de metanol, dos quais 50 µL foram injetados no CLAE.

4.3.2.6. Extração de 1-hidroxi-pireno no líquido amniótico

Para a extração do 1-hidroxi-pireno do líquido amniótico, a 2,0 mL de líquido amniótico foram adicionados 2,0 mL de tampão acetato pH 5,0 e 20 µL de enzima β-glicuronidase-arilsulfatase. Os tubos foram agitados por 30 segundos e incubados a 37°C por 2 horas para promover a hidrólise dos produtos conjugados. A seguir, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e foram adicionados 4,0 mL de éter etílico. As soluções foram homogeneizadas por inversão e agitação durante 1 minuto e centrifugadas. Após, a fase orgânica foi transferida para frasco evaporador e o procedimento de extração foi repetido para aumentar o rendimento do processo de extração. Evaporaram-se as amostras sobre corrente de ar comprimido a 37°C, e após secas, as mesmas foram reconstituídas com 250 µL de metanol e 20 µL foi injetado no CLAE.

4.3.2.7. Análise de 1-hidroxipireno

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® LC-Class 10 equipado com detector de fluorescência, bomba isocrática e injetor manual de amostras. A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna LiChospher® 100 RP-18 (4,6x150 mm, 5 µm) protegida por pré-coluna (4,6x12,5 mm, 5 µm RP-18 LiChospher® 100). A fase móvel foi constituída de uma mistura de Metanol:Acetonitrila:Água (35:35:30). Foi mantido um fluxo de 1,0 mL/min e a detecção foi feita por fluorescência (Excitação=242nm, Emissão=388nm), produzindo um tempo total de corrida de 30 minutos.

4.3.2.8. Extração de benzopireno no sangue do cordão umbilical

Na análise do benzopireno no sangue do cordão umbilical, para a extração utilizou-se 150 µL de soro/sangue, adicionando 850 µL de água e extraiu-se com 4 mL de ciclohexano, agitou-se em vortex e por inversão. Após centrifugar por 10 minutos, a 1500 rotações por minuto, retirou-se a fase superior para outro tubo. Repetiu-se o processo de extração novamente, retirando a fase superior e juntando com a anterior. A fase orgânica é seca e o resíduo ressuspenso em 250 µL de fase móvel, filtrou-se e injetou-se no CLAE.

4.3.2.9. Análise do benzopireno

As condições cromatográficas foram: cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detector Fluorescência, Shimadzu, fase móvel = ACN:H₂O (750:250), coluna RP-18 (4.6x100mm e 5 micron), fluxo: 1ml/min, volume de injeção: 20µL - Injetor manual, detecção: Excitação=290nm, Emissão=430 nm.

4.4. Análise Estatística

Dados quantitativos foram descritos por média e desvio-padrão. Para a comparação dos grupos as variáveis quantitativas receberam transformação logarítmica sendo apresentadas como médias geométricas e desvio padrão das médias geométricas. Para estimar a diferença proporcional das variáveis assimétricas entre os grupos, utilizou-se a razão das médias (*mean ratio*) e o intervalo de confiança (IC) de 95%. A razão das médias representa, em termos relativos, quantas vezes a média de um grupo é maior do que a de outro. Foi obtida em um modelo de análise de covariância de erro-padrão robusto aplicado aos logaritmos das medidas. Para localização das diferenças entre os grupos, utilizou-se o procedimento de *post-hoc* de Tukey. O nível de significância adotado foi de 0,05. Os dados foram analisados com o programa SPSS versão 21.0.

4.5. Aspectos Éticos

Projeto aprovado no Comitê Científico do HSL em Maio de 2010, aprovado Comitê de Ética em Junho de 2010, número 10/05066. Aprovado em Abril de 2011 no Comitê Científico da Pós-Graduação.

Os exames realizados não ofereceram riscos às gestantes e nem aos fetos. Somente foram incluídas aquelas pacientes que, após lerem o Termo de Consentimento, aceitaram participar da pesquisa, estando cientes de que poderiam sair do estudo a qualquer momento se assim desejassem.

5. RESULTADOS

Foram incluídas 125 gestantes, sendo 63 no grupo controle, 25 tabagistas passivas e 37 tabagistas. Os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em termos de idade e aspectos obstétricos (tabela 1).

Tabela 1 - Características da população em estudo				
Característica	Controle (n= 63)	Tabagista Passiva (n= 25)	Tabagista (n = 37)	P
Idade, anos	26 ± 5	24 ± 6	26 ± 5	0,24
IMC, Kg/m²	27 ± 5	28 ± 5	28 ± 4	0,49
Gestações	2 ± 1	2 ± 2	2 ± 1	0,17
Idade gestacional, Semanas	38 ± 1	38 ± 1	39 ± 1	0,15
Peso, g	3349 ± 409	3375 ± 433	3225 ± 528	0,33
Apgar 5^o minuto	9 ± 0,7	9 ± 0,6	9 ± 1	0,09

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. IMC: Índice de massa corporal¹³⁹.

Na tabela 2 são apresentados os resultados das variáveis cotinina na urina materna, no sangue de cordão umbilical e no líquido amniótico, seguidos das medidas 1-hidroxipireno na urina materna e no líquido amniótico, e benzopireno no sangue do cordão umbilical.

Tabela 2 – Comparação de variáveis selecionadas entre os grupos segundo hábito tabágico

Desfecho	Controle	Tabagista Passiva	Tabagista	RM (TP/C)	RM (TxC)	P
Cotina na urina, µg/L	n=56 0,64 ^a (ND a 68)	n=25 0,94 ^a (ND a 21)	n=35 3,77 ^b (ND a 69)	1,48 [0,59-3,72]	5,92 [2,59- 13,55]	<0,001
Cotina no líquido amniótico, µg/L	n=55 1,47 ^a (ND a 63)	n=22 1,28 ^a (ND a 51)	n=33 36,87 ^b (ND a 527)	0,87 [0,37-2,05]	25,09 [11,90-52,91]	<0,001
Cotina no sangue do cordão umbilical, µg/L	n=59 3,36 ^a (ND a 91)	n=24 3,23 ^{a,b} (ND a 84)	n=37 8,79 ^b (ND a 340)	0,97 [0,32-2,91]	2,64 [1,02-6,84]	0,038
1-hidroxi pireno na urina materna, µmol/mol creatinina	n=60 0,02 ^a (ND a 2,23)	n=25 0,05 ^a (ND a 1,21)	n=37 0,15 ^b (ND a 3,02)	2,42 [0,49-11,96]	7,30 [1,64-29,69]	0,004
1-hidroxi pireno no líquido amniótico, µg/L	n=55 0,48 ^a (ND a 1,14)	n=22 0,51 ^{a,b} (ND a 1,11)	n=33 0,67 ^b (0,37 a 1,42)	1,06 [0,81-1,39]	1,34 [1,05-1,70]	0,015
Benzopireno no sangue do cordão umbilical, µg/L	n=51 0,39 ^a (ND a 1,84)	n=20 0,51 ^a (0,10 a 1,83)	n=26 1,13 ^b (0,17 a 4,30)	1,31 [0,76-2,27]	2,90 [1,76-4,79]	<0,001

Os dados são apresentados como médias geométricas (mínimo a máximo). Razão das médias (RM) e [IC 95%]. P, significância estatística obtida em modelo de análise de variância de erro-padrão robusto aplicada sobre os logaritmos das medidas. Legenda: C, controle; TP, tabagista passiva; T, tabagista; RM, razão das médias; ND, não detectável. Letras-índice não coincidentes (a e b) representam diferenças estatisticamente significativas ao teste post-hoc de Tukey.

Tabela 3 – Média geométrica e desvio padrão geométrico dos grupos

	Controles		Tabagistas Passivas		Tabagistas	
	MG	DPG	MG	DPG	MG	DPG
Cotina urinária ($\mu\text{g/L}$)	0,64	4,33	0,94	4,31	3,77	6,90
Cotina no líquido amniótico ($\mu\text{g/L}$)	1,47	2,56	1,28	2,28	36,87	9,07
Cotina no cordão umbilical ($\mu\text{g/L}$)	3,36	6,34	3,23	6,20	8,79	7,83
1-hidroxipireno na urina materna ($\mu\text{mol/mol creatinine}$)	0,02	17,04	0,05	9,44	0,15	9,63
1-hidroxipireno no líquido amniótico ($\mu\text{g/L}$)	0,48	1,65	0,51	1,65	0,67	1,39
Benzopireno no cordão umbilical ($\mu\text{g/L}$)	0,39	2,71	0,51	2,08	1,13	1,99

Os dados são apresentados por média geométrica (MG) e desvio padrão geométrico (DPG)

Todas as variáveis estudadas apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tabagista. Não foram observadas diferenças significativas entre controles e tabagistas passivas.

A concentração de cotinina foi cerca de 6 vezes maior na urina das gestantes tabagistas, RM: 5,92 [2,59-13,55], $p < 0,001$ em relação aos controles; no líquido amniótico a concentração de cotinina foi 25 vezes maior que o grupo controle, RM: 25,09 [11,9-52,91], $p < 0,001$; e no sangue do cordão umbilical foi 2,6 vezes maior nos fetos das gestantes tabagistas RM: 2,64 [1,02-6,84], $p = 0,044$.

A concentração de 1-hidroxipireno foi sete vezes maior na urina das gestantes tabagistas quando comparadas ao grupo controle, RM: 7,3 [1,64-

29,69], $p=0,003$. No líquido amniótico, o grupo tabagista apresentou concentração 30% maior que o grupo controle, RM: 1,34 [1,05-1,7], $p=0,012$. A concentração de benzopireno foi cerca de 3 vezes maior no sangue do cordão umbilical dos fetos de mães tabagistas RM: 2,9 [1,76-4,79], $p<0,001$ quando comparadas ao grupo controle.

6. DISCUSSÃO

(Conforme Ato Deliberativo 01/12 da Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde que define que quem publica o artigo da tese em revista Indexada Qualis B2 a A1, pode entregar o artigo e a tese somente com os itens introdução, materiais e métodos. Optamos por incluir os resultados, discussão resumida e conclusão).

Nossos resultados demonstram que gestantes tabagistas expõem seus fetos a substâncias tóxicas, tais como nicotina/cotina e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Encontramos níveis maiores de cotina e HPAs na urina das gestantes tabagistas, no líquido amniótico e sangue do cordão umbilical dos seus fetos quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença estatística entre o grupo tabagista passivo e controle. Quando os 3 grupos foram comparados conjuntamente, houve diferença estatística entre todas as variáveis.

Pelo nosso conhecimento, este estudo foi o primeiro a dosar 1-hidroxipireno no líquido amniótico e benzopireno isolado no sangue do cordão umbilical por cromatografia líquida de alta eficiência, comparando gestantes somente em relação à exposição ao tabagismo. Alguns estudos¹¹¹⁻¹¹⁴ dosaram benzopireno em ratos, *DNA-adducts* em humanos, focados nos efeitos da

exposição à poluição ambiental. Estudo detectou DNA-*adducts* no sangue do cordão umbilical fetal humano, bem como no sangue materno, após a exposição aos HPAs em ar ambiente ¹¹³. Os HPAs atravessam a placenta, e o feto por estar em desenvolvimento é até 10 vezes mais sensível do que a mãe para sofrer danos no DNA ¹¹³. O desenvolvimento embrionário precoce é um período particularmente sensível para a desregulação epigenética como consequência de exposições ambientais, porque as taxas de síntese de DNA são altas e os padrões de metilação do DNA estão sendo estabelecidos ¹¹⁵.

A concentração de cotinina nas gestantes tabagistas foi aproximadamente 6 vezes maior na urina, 25 vezes maior no líquido amniótico e 2,6 vezes maior no sangue do cordão umbilical em relação ao grupo controle.

A concentração de 1-hidroxipireno nas gestantes tabagistas foi 7 vezes maior na urina e 30% maior no líquido amniótico quando comparada ao grupo controle. As concentrações de benzopireno foi 3 vezes maior no sangue do cordão umbilical dos fetos das gestantes fumantes comparadas ao grupo controle.

As substâncias encontradas em maior concentração na urina das gestantes tabagistas (cotinina e HPAs) passam para os fetos através do líquido amniótico e sangue do cordão umbilical. O processo de formação do líquido amniótico, em que os fetos urinam e deglutem a própria urina, forma um ciclo que aumenta a exposição a essas substâncias. Isto justifica a concentração de cotinina ser maior no líquido amniótico. A concentração da cotinina ser mais alta do que a do 1-hidroxipireno no líquido amniótico pode estar relacionada a maior meia-vida da cotinina (36 horas) em comparação ao 1-hidroxipireno (18 horas), ou a solubilidade das substâncias nos diferentes fluidos. Não foi encontrada

diferença estatística entre as tabagistas passivas e controles. Provavelmente as tabagistas passivas não inalam uma quantidade suficiente das substâncias dosadas para transmitir aos fetos.

As gestantes foram classificadas em relação ao *status* tabágico conforme o próprio relato, porque muitas delas ficaram longos períodos em abstinência, devido às horas de pródromo de trabalho de parto. Muitas relataram que já estavam há dias com contrações e dor, e por isso não estavam conseguindo fumar. Devido à meia-vida das substâncias, esse período de abstinência poderia alterar a classificação das gestantes baseada somente nos valores laboratoriais.

No processo da coleta, tivemos 5 perdas, por não termos conseguido coletar todos os materiais da mesma gestante. No processo de análise laboratorial, alguns dos materiais armazenados não estavam em quantidade suficiente ou em condições adequadas para análise, o que justifica o n diferente conforme as substâncias nos diferentes grupos.

Para a análise estatística, foram calculadas inicialmente as médias aritméticas e medianas, porém os resultados não foram satisfatórios devido à intensa assimetria dos dados. Foram calculadas as médias geométricas e razão das médias geométricas, utilizando ferramentas estatísticas específicas para dados assimétricos e próximos ao zero. Também foram calculados os intervalos de confiança das médias geométricas, porém para interpretá-las é necessário realizar uma transformação logarítmica e posteriormente Gauss (média +/- desvio padrão).

Nossos resultados confirmam que a nicotina atravessa a placenta. A nicotina é uma substância que causa danos ao feto, é neuroteratogênica impactando o cérebro nas fases mais críticas do seu desenvolvimento²⁴. Isso

justifica os problemas emocionais, cognitivos observados nos filhos de mães que fumaram na gestação. Além disso, a exposição ao cigarro no período pré e pós-natal aumenta a probabilidade de dependência a drogas lícitas e ilícitas na adolescência e idade adulta ²⁵. O desenvolvimento dos órgãos, incluindo os pulmões, pode ser adversamente afetado pela nicotina ^{26,27}.

Também encontramos aumento da exposição fetal aos HPAs, que são substâncias conhecidamente carcinogênicas. A via da carcinogênese dos HPAs e seus metabólitos envolve a produção de espécies reativas de oxigênio, que geram estresse oxidativo, peroxidação lipídica, modificações das proteínas, dano ao DNA e pode ter influência ao nascimento e ao longo da vida ^{111,112,125,126}.

Perera et al. ¹¹³ propuseram que a transferência placentária de HPAs aos fetos pode ter impactos significativos no desenvolvimento fetal. Vários estudos evidenciaram redução da circunferência cefálica ao nascimento, menor quociente de inteligência e pior desempenho na escola na infância ^{116,117}. Além disso, os HPAs também estão associados à restrição de crescimento intrauterino ¹¹⁸, trabalho de parto prematuro ¹¹⁹ e aumento na probabilidade de vir a desenvolver asma ¹²⁰.

Jules et al. ¹⁰³, através de estudo realizado em ratos, sugerem que a exposição intraútero ao benzopireno predispõe os recém-nascidos a déficits funcionais no desenvolvimento cardiovascular, o que pode contribuir para disfunção cardíaca ao longo da vida. Rundle et al. ¹²¹ sugerem que exposição pré-natal a HPAs causa aumento de ganho de massa gorda durante a infância e aumenta risco de obesidade. Langlois et al. ¹²² mostraram associação entre a exposição materna ocupacional a HPA e aumento de risco de lábio leporino com ou sem fenda palatina.

Os efeitos dos HPAs nos fetos têm sido amplamente estudados, conforme mencionado acima. Entretanto, a maioria dos estudos foca na exposição ambiental ¹¹¹⁻¹¹⁴.

O que este estudo acrescenta é que estudamos a exposição fetal aos HPAs exclusivamente relacionada ao tabagismo, que é o principal meio de exposição. Avaliamos uma população com uma dieta semelhante, vivendo na mesma área geográfica, e sem variações significativas na exposição à poluição. Conseguimos identificar 1- hidroxipireno no líquido amniótico e medimos os níveis de benzopireno no sangue do cordão umbilical por cromatografia líquida de alta eficiência, um método simples e barato. Existem estudos que já dosaram o *HPA-DNA-adducts*, que mede a modificação no DNA causada pelo benzopireno, mas é um método caro e complexo ^{110,113,125}.

Enfim, nossos resultados confirmam que gestantes tabagistas tem uma concentração aumentada de cotinina na urina e transmitem aos seus fetos através do líquido amniótico e sangue do cordão umbilical. Confirmou que gestantes tabagistas apresentam maiores concentrações de HPAs na urina que não tabagistas e que o benzopireno passa para os fetos através do sangue do cordão umbilical. Conseguimos dosar 1-hidroxipireno no líquido amniótico e evidenciar maiores concentrações no líquido dos fetos das gestantes fumantes comparadas ao grupo controle.

7. CONCLUSÕES

O estudo realizado permite chegar às seguintes conclusões:

- As substâncias tóxicas da fumaça do cigarro inaladas pelas gestantes tabagistas, dosadas através da cotinina, 1-hidroxi-pireno e benzopireno são transmitidas ao feto.

- A quantificação das substâncias estudadas permitiu identificar aumento da concentração de cotinina e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na urina das gestantes tabagistas, no líquido amniótico e sangue do cordão umbilical de seus fetos quando comparadas ao grupo controle. Em nenhuma das análises foi encontrada diferença estatística quando comparados os controles com as tabagistas passivas.

Desse modo, fetos de gestantes tabagistas estão expostos a substâncias conhecidamente tóxicas e carcinogênicas.

8. BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Implementing tobacco control 2011. (Accessed 2013, at <http://www.who.int/tobacco/control/en/>.)
2. State medicaid coverage for tobacco-dependence treatments--United States, 1994-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;53:54-7.
3. Tobacco use, access, and exposure to tobacco in media among middle and high school students--United States, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54:297-301.
4. WHO urges more countries to require large, graphic health warnings on tobacco packaging: the WHO report on the global tobacco epidemic, 2011 examines anti-tobacco mass-media campaigns. *Cent Eur J Public Health* 2011;19:133, 51.
5. World Health Organization. Report on the global tobacco epidemic 2013. Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship. (Accessed in 2013, at http://www.who.int/tobacco/global_report/2013/en/.)
6. Eriksen M, Mackay J, Ross H. The Tobacco Atlas. (Accessed 2014, at <http://www.tobaccoatlas.org/>.)
7. Rogers JM. Tobacco and pregnancy. *Reprod Toxicol* 2009;28:152-60.
8. OMS divulga as dez principais causas de morte no mundo de 2000 a 2011. (Accessed 2014, at <http://www.news.med.br/p/saude/367834/oms-divulga-as-dez-principais-causas-de-morte-no-mundo-de-2000-a-2011.htm>)
9. Tabagismo: tabelas e indicadores 2012. (Accessed 2013, at <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabagismo>)
10. Mulher e tabaco. (Accessed 2013, at <http://www.inca.gov.br/tabagismo>)
11. Fact sheet: preventing smoking and exposure to secondhand smoke before, during and after pregnancy 2007. (Accessed 2013, at <http://www.cdc.gov/nccdphp/publications/factsheets/Prevention/smoking.htm>)
12. Eaton DK, Kann L, Kinchen S, et al. Youth risk behavior surveillance--United States, 2005. *MMWR Surveill Summ* 2006;55:1-108.
13. Barros FC, Victora CG, Barros AJ, et al. The challenge of reducing neonatal mortality in middle-income countries: findings from three Brazilian birth cohorts in 1982, 1993, and 2004. *Lancet* 2005;365:847-54.
14. Bergen AW, Caporaso N. Cigarette smoking. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1365-75.
15. Pollack HA. Sudden infant death syndrome, maternal smoking during pregnancy, and the cost-effectiveness of smoking cessation intervention. *Am J Public Health* 2001;91:432-6.
16. Raatikainen K, Huurinainen P, Heinonen S. Smoking in early gestation or through pregnancy: a decision crucial to pregnancy outcome. *Prev Med* 2007;44:59-63.
17. Galão AO, Soder SA, Gerhardt M, Faertes TH, Krüger MS, Pereira DF, Borba CM. Efeitos do fumo materno durante a gestação e complicações perinatais. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre & Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul* 2009;29:6.
18. Palma S, Pardo-Crespo R, Llorca J, Mariscal M, Delgado-Rodríguez M. Smoking among pregnant women in Cantabria (Spain): trend and determinants of smoking cessation. *BMC Public Health* 2007;7:1.
19. REIS LG et al. Tabagismo e gravidez: um estudo no Rio de Janeiro. *Arquivos Brasileiros de Psiquiatria, Neurologia e Medicina Legal* 2005;99.
20. How to stop smoking in pregnancy and following childbirth 2010. (Accessed 2013, at <http://www.nice.org.uk/guidance/ph26>)
21. Caleyachetty R, Tait CA, Kengne AP, Corvalan C, Uauy R, Echouffo-Tcheugui JB. Tobacco use in pregnant women: analysis of data from Demographic and Health Surveys from 54 low-income and middle-income countries. *Lancet Glob Health* 2014;2:e513-20.

22. Tobacco Use and Pregnancy. (Accessed 2013, at www.cdc.gov/reproductivehealth/tobaccousepregnancy/)
23. Leopercio WG, A. Tabagismo e suas peculiaridades durante a gestação: uma revisão crítica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004;30:9.
24. Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM. Nicotine and brain development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008;84:30-44.
25. Hellstrom-Lindahl E, Nordberg A. Smoking during pregnancy: a way to transfer the addiction to the next generation? *Respiration* 2002;69:289-93.
26. Maritz GS. Nicotine and lung development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008;84:45-53.
27. Wang L, Pinkerton KE. Detrimental effects of tobacco smoke exposure during development on postnatal lung function and asthma. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008;84:54-60.
28. Vassoler FM, Byrnes EM, Pierce RC. The impact of exposure to addictive drugs on future generations: Physiological and behavioral effects. *Neuropharmacology* 2014;76 Pt B:269-75.
29. Li YF, Langholz B, Salam MT, Gilliland FD. Maternal and grandmaternal smoking patterns are associated with early childhood asthma. *Chest* 2005;127:1232-41.
30. Hollams EM, de Klerk NH, Holt PG, Sly PD. Persistent effects of maternal smoking during pregnancy on lung function and asthma in adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:401-7.
31. Norman CA, Halton DM. Is carbon monoxide a workplace teratogen? A review and evaluation of the literature. *Ann Occup Hyg* 1990;34:335-47.
32. Gilboa SM, Mendola P, Olshan AF, et al. Relation between ambient air quality and selected birth defects, seven county study, Texas, 1997-2000. *Am J Epidemiol* 2005;162:238-52.
33. Mannes T, Jalaludin B, Morgan G, Lincoln D, Sheppard V, Corbett S. Impact of ambient air pollution on birth weight in Sydney, Australia. *Occup Environ Med* 2005;62:524-30.
34. Wilhelm M, Ritz B. Local variations in CO and particulate air pollution and adverse birth outcomes in Los Angeles County, California, USA. *Environ Health Perspect* 2005;113:1212-21.
35. Ziaei S, Nouri K, Kazemnejad A. Effects of carbon monoxide air pollution in pregnancy on neonatal nucleated red blood cells. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2005;19:27-30.
36. Leem JH, Kaplan BM, Shim YK, et al. Exposures to air pollutants during pregnancy and preterm delivery. *Environ Health Perspect* 2006;114:905-10.
37. Ritz B, Wilhelm M, Hoggatt KJ, Ghosh JK. Ambient air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the University of California, Los Angeles. *Am J Epidemiol* 2007;166:1045-52.
38. Liu S, Krewski D, Shi Y, Chen Y, Burnett RT. Association between maternal exposure to ambient air pollutants during pregnancy and fetal growth restriction. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2007;17:426-32.
39. George L, Granath F, Johansson AL, Anneren G, Cnattingius S. Environmental tobacco smoke and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology* 2006;17:500-5.
40. Machado Jde B, Plinio Filho VM, Petersen GO, Chatkin JM. Quantitative effects of tobacco smoking exposure on the maternal-fetal circulation. *BMC Pregnancy Childbirth* 2011;11:24.
41. Jauniaux E, Burton GJ. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit. *Early Hum Dev* 2007;83:699-706.
42. Ananth CV, Smulian JC, Vintzileos AM. Incidence of placental abruption in relation to cigarette smoking and hypertensive disorders during pregnancy: a meta-analysis of observational studies. *Obstet Gynecol* 1999;93:622-8.
43. Chelmow D, Andrew DE, Baker ER. Maternal cigarette smoking and placenta previa. *Obstet Gynecol* 1996;87:703-6.

44. Hung TH, Hsieh CC, Hsu JJ, Chiu TH, Lo LM, Hsieh TT. Risk factors for placenta previa in an Asian population. *Int J Gynaecol Obstet* 2007;97:26-30.
45. Kyrklund-Blomberg NB, Cnattingius S. Preterm birth and maternal smoking: risks related to gestational age and onset of delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1051-5.
46. Fantuzzi G, Aggazzotti G, Righi E, et al. Preterm delivery and exposure to active and passive smoking during pregnancy: a case-control study from Italy. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2007;21:194-200.
47. Nabet C, Lelong N, Ancel PY, Saurel-Cubizolles MJ, Kaminski M. Smoking during pregnancy according to obstetric complications and parity: results of the EUROPOP study. *Eur J Epidemiol* 2007;22:715-21.
48. Burguet A, Kaminski M, Abraham-Lerat L, et al. The complex relationship between smoking in pregnancy and very preterm delivery. Results of the Epipage study. *BJOG* 2004;111:258-65.
49. Simpson WJ. A preliminary report on cigarette smoking and the incidence of prematurity. *Am J Obstet Gynecol* 1957;73:807-15.
50. Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res* 2004;6 Suppl 2:S125-40.
51. DiFranza JR, Aligne CA, Weitzman M. Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children's health. *Pediatrics* 2004;113:1007-15.
52. Windham GC, Eaton A, Hopkins B. Evidence for an association between environmental tobacco smoke exposure and birthweight: a meta-analysis and new data. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1999;13:35-57.
53. Ward C, Lewis S, Coleman T. Prevalence of maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure during pregnancy and impact on birth weight: retrospective study using Millennium Cohort. *BMC Public Health* 2007;7:81.
54. Kramer MS. Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis. *Bull World Health Organ* 1987;65:663-737.
55. Meyer MB, Comstock GW. Maternal cigarette smoking and perinatal mortality. *Am J Epidemiol* 1972;96:1-10.
56. Misra DP, Nguyen RH. Environmental tobacco smoke and low birth weight: a hazard in the workplace? *Environ Health Perspect* 1999;107 Suppl 6:897-904.
57. Hegaard HK, Kjaergaard H, Moller LF, Wachmann H, Ottesen B. The effect of environmental tobacco smoke during pregnancy on birth weight. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85:675-81.
58. Dejmek J, Solansk y I, Podrazilova K, Sram RJ. The exposure of nonsmoking and smoking mothers to environmental tobacco smoke during different gestational phases and fetal growth. *Environ Health Perspect* 2002;110:601-6.
59. al-Alawi E, Jenkins D. Does maternal smoking increase the risk of neonatal polycythaemia? *Ir Med J* 2000;93:175-6.
60. Hogberg L, Cnattingius S. The influence of maternal smoking habits on the risk of subsequent stillbirth: is there a causal relation? *BJOG* 2007;114:699-704.
61. Shi M, Wehby GL, Murray JC. Review on genetic variants and maternal smoking in the etiology of oral clefts and other birth defects. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008;84:16-29.
62. de la Chica RA, Ribas I, Giraldo J, Egozcue J, Fuster C. Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA* 2005;293:1212-22.
63. Zalacain M, Sierrasesumaga L, Larrannaga C, Patinno-Garcia A. Effects of benzopyrene-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE) in vitro and of maternal smoking in vivo on micronuclei frequencies in fetal cord blood. *Pediatr Res* 2006;60:180-4.
64. Sasco AJ, Vainio H. From in utero and childhood exposure to parental smoking to childhood cancer: a possible link and the need for action. *Hum Exp Toxicol* 1999;18:192-201.

65. Brooks DR, Mucci LA, Hatch EE, Cnattingius S. Maternal smoking during pregnancy and risk of brain tumors in the offspring. A prospective study of 1.4 million Swedish births. *Cancer Causes Control* 2004;15:997-1005.
66. Mattsson K, Kallen K, Longnecker MP, Rignell-Hydbom A, Rylander L. Maternal smoking during pregnancy and daughters' risk of gestational diabetes and obesity. *Diabetologia* 2013;56:1689-95.
67. Morley R, Leeson Payne C, Lister G, Lucas A. Maternal smoking and blood pressure in 7.5 to 8 year old offspring. *Arch Dis Child* 1995;72:120-4.
68. Castles A, Adams EK, Melvin CL, Kelsch C, Boulton ML. Effects of smoking during pregnancy. Five meta-analyses. *Am J Prev Med* 1999;16:208-15.
69. Hausteil KO. Cigarette smoking, nicotine and pregnancy. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1999;37:417-27.
70. de Jong-Pley EA, Wouters EJ, de Jong PA, Voorhorst FJ, Stolte SB, Kurver PH. Effects of maternal smoking on neonatal morbidity. *J Perinat Med* 1994;22:93-101.
71. Schellscheidt J, Jorch G, Menke J. Effects of heavy maternal smoking on intrauterine growth patterns in sudden infant death victims and surviving infants. *Eur J Pediatr* 1998;157:246-51.
72. Wang X, Tager IB, Van Vunakis H, Speizer FE, Hanrahan JP. Maternal smoking during pregnancy, urine cotinine concentrations, and birth outcomes. A prospective cohort study. *Int J Epidemiol* 1997;26:978-88.
73. Moyer TP, Charlson JR, Enger RJ, et al. Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry, with clinically relevant metabolic profiles. *Clin Chem* 2002;48:1460-71.
74. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 1996;18:188-204.
75. Binnie V, McHugh S, Macpherson L, Borland B, Moir K, Malik K. The validation of self-reported smoking status by analysing cotinine levels in stimulated and unstimulated saliva, serum and urine. *Oral Dis* 2004;10:287-93.
76. Pichini S, Basagana XB, Pacifici R, et al. Cord serum cotinine as a biomarker of fetal exposure to cigarette smoke at the end of pregnancy. *Environ Health Perspect* 2000;108:1079-83.
77. Kohler E, Sollich V, Schuster R, Thal W. Passive smoke exposure in infants and children with respiratory tract diseases. *Hum Exp Toxicol* 1999;18:212-7.
78. Kohler E, Bretschneider D, Rabsilber A, Weise W, Jorch G. Assessment of prenatal smoke exposure by determining nicotine and its metabolites in maternal and neonatal urine. *Hum Exp Toxicol* 2001;20:1-7.
79. Kohler E, Avenarius S, Rabsilber A, Gerloff C, Jorch G. Assessment of prenatal tobacco smoke exposure by determining nicotine and its metabolites in meconium. *Hum Exp Toxicol* 2007;26:535-44.
80. Ostrea EM, Jr., Knapp DK, Romero A, Montes M, Ostrea AR. Meconium analysis to assess fetal exposure to nicotine by active and passive maternal smoking. *J Pediatr* 1994;124:471-6.
81. Haley NJ, Sepkovic DW, Hoffmann D. Elimination of cotinine from body fluids: disposition in smokers and nonsmokers. *Am J Public Health* 1989;79:1046-8.
82. Santos S SF, Iamont V. Marcadores Biológicos do Tabagismo. *Pneumologia Paulista: órgão informativo da sociedade paulista de pneumologia e fisiologia* 2008;21.
83. Wu FY, Chiu HT, Wu HD, Lin CJ, Lai JS, Kuo HW. Comparison of urinary and plasma cotinine levels during the three trimesters of pregnancy. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008;22:296-301.
84. Law KL, Stroud LR, LaGasse LL, Niaura R, Liu J, Lester BM. Smoking during pregnancy and newborn neurobehavior. *Pediatrics* 2003;111:1318-23.
85. Dempsey DA, Benowitz NL. Risks and benefits of nicotine to aid smoking cessation in pregnancy. *Drug Saf* 2001;24:277-322.

86. Jordanov JS. Cotinine concentrations in amniotic fluid and urine of smoking, passive smoking and non-smoking pregnant women at term and in the urine of their neonates on 1st day of life. *Eur J Pediatr* 1990;149:734-7.
87. Jauniaux E, Gulbis B, Acharya G, Thiry P, Rodeck C. Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1999;93:25-9.
88. Ruhle W, Graf von Ballestrem CL, Pult HM, Gnirs J. [Correlation of cotinine level in amniotic fluid, umbilical artery blood and maternal blood]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1995;55:156-9.
89. Benowitz NL, Jacob P, 3rd. Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on nicotine and cotinine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 2000;67:653-9.
90. Biochemical verification of tobacco use and cessation. *Nicotine Tob Res* 2002;4:149-59.
91. Karaconji IB SL, Karaciv V. Determination of nicotine and cotinine in urine by headspace solid phase microextraction gas chromatography with mass spectrometric detection. *Acta Chim Slov* 2007;54:74-8.
92. Klebanoff MA LR, Clemens JD, DerSimonian R, Wilkins DG. . Serum cotinine concentration and self-reported smoking during pregnancy. *Am J Epidemiol* 1998;148:259-62.
93. Caraballo RS, Giovino GA, Pechacek TF. Self-reported cigarette smoking vs. serum cotinine among U.S. adolescents. *Nicotine Tob Res* 2004;6:19-25.
94. Kohler E, Avenarius S, Rabsilber A, Gerloff C, Jorch G. Nicotine and its metabolites in amniotic fluid at birth--assessment of prenatal tobacco smoke exposure. *Hum Exp Toxicol* 2010;29:385-91.
95. Florek E, Breborowicz GH, Lechowicz W, et al. [Cotinine in urine of mother and their newborn and in cord serum and placenta as a biomarker of foetal exposure to tobacco smoke]. *Przegl Lek* 2006;63:900-6.
96. WHO. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. In; 1998:883.
97. Bostrom CE, Gerde P, Hanberg A, et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect* 2002;110 Suppl 3:451-88.
98. Buchet JP, Gennart JP, Mercado-Calderon F, Delavignette JP, Cupers L, Lauwerys R. Evaluation of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a coke production and a graphite electrode manufacturing plant: assessment of urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a biological indicator of exposure. *Br J Ind Med* 1992;49:761-8.
99. Jongeneelen FJ. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann Occup Hyg* 2001;45:3-13.
100. Ramesh A, Walker SA, Hood DB, Guillen MD, Schneider K, Weyand EH. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Toxicol* 2004;23:301-33.
101. Strickland P, Kang D, Sithisarankul P. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine as biomarkers of exposure and effect. *Environ Health Perspect* 1996;104 Suppl 5:927-32.
102. Llop S, Ballester F, Estarlich M, et al. Urinary 1-hydroxypyrene, air pollution exposure and associated life style factors in pregnant women. *Sci Total Environ* 2008;407:97-104.
103. Jules GE, Pratap S, Ramesh A, Hood DB. In utero exposure to benzo(a)pyrene predisposes offspring to cardiovascular dysfunction in later-life. *Toxicology* 2012;295:56-67.
104. Bouayed J, Desor F, Rammal H, et al. Effects of lactational exposure to benzo[alpha]pyrene (B[alpha]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology* 2009;259:97-106.

105. Sadikovic B, Andrews J, Rodenhiser DI. DNA methylation analysis using CpG microarrays is impaired in benzopyrene exposed cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;225:300-9.
106. Wilson VL, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by chemical carcinogens in vitro. *Cell* 1983;32:239-46.
107. Hoffmann MJ, Schulz WA. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol* 2005;83:296-321.
108. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775:138-62.
109. Whyatt RM, Bell DA, Jedrychowski W, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta and modulation by CYP1A1 induction and genotype. *Carcinogenesis* 1998;19:1389-92.
110. Kriek E, Rojas M, Alexandrov K, Bartsch H. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. *Mutat Res* 1998;400:215-31.
111. Rossner P, Jr., Milcova A, Libalova H, et al. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the fetus. Part II. Oxidative damage. *Mutat Res* 2009;669:20-6.
112. Perera FP, Li Z, Whyatt R, et al. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years. *Pediatrics* 2009;124:e195-202.
113. Perera F, Tang D, Whyatt R, Lederman SA, Jedrychowski W. DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo[a]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from Northern Manhattan, the World Trade Center Area, Poland, and China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:709-14.
114. Bocskay KA, Tang D, Orjuela MA, Liu X, Warburton DP, Perera FP. Chromosomal aberrations in cord blood are associated with prenatal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:506-11.
115. Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL. Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reprod Toxicol* 2007;23:297-307.
116. Jedrychowski W, Perera FP, Tang D, et al. Impact of barbecued meat consumed in pregnancy on birth outcomes accounting for personal prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons: Birth cohort study in Poland. *Nutrition* 2012;28:372-7.
117. Edwards SC, Jedrychowski W, Butscher M, et al. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland. *Environ Health Perspect* 2010;118:1326-31.
118. Dejmek J, Solansky I, Benes I, Lenicek J, Sram RJ. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ Health Perspect* 2000;108:1159-64.
119. Choi H, Rauh V, Garfinkel R, Tu Y, Perera FP. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. *Environ Health Perspect* 2008;116:658-65.
120. Perera F, Tang WY, Herbstman J, et al. Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One* 2009;4:e4488.
121. Rundle A, Hoepner L, Hassoun A, et al. Association of childhood obesity with maternal exposure to ambient air polycyclic aromatic hydrocarbons during pregnancy. *Am J Epidemiol* 2012;175:1163-72.
122. Langlois PH, Hoyt AT, Lupo PJ, et al. Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of oral cleft-affected pregnancies. *Cleft Palate Craniofac J* 2013;50:337-46.
123. Jedrychowski WA, Perera FP, Tang D, et al. The relationship between prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-DNA adducts in cord blood. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2013;23:371-7.

124. Topinka J, Milcova A, Libalova H, et al. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part I: bulky DNA adducts. *Mutat Res* 2009;669:13-9.
125. Obolenskaya MY, Teplyuk NM, Divi RL, et al. Human placental glutathione S-transferase activity and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts as biomarkers for environmental oxidative stress in placentas from pregnant women living in radioactivity- and chemically-polluted regions. *Toxicol Lett* 2010;196:80-6.
126. Kim H, Hwang JY, Ha EH, et al. Fruit and vegetable intake influences the association between exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and a marker of oxidative stress in pregnant women. *Eur J Clin Nutr* 2011;65:1118-25.
127. Karttunen V, Myllynen P, Prochazka G, Pelkonen O, Segerback D, Vahakangas K. Placental transfer and DNA binding of benzo(a)pyrene in human placental perfusion. *Toxicol Lett* 2010;197:75-81.
128. Rappolee DA, Awonuga AO, Puscheck EE, Zhou S, Xie Y. Benzopyrene and experimental stressors cause compensatory differentiation in placental trophoblast stem cells. *Syst Biol Reprod Med* 2010;56:168-83.
129. Stejskalova L, Pavek P. The function of cytochrome P450 1A1 enzyme (CYP1A1) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the placenta. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12:715-30.
130. Ellassouli SM, Alqahtani MH, Milaat W. Genotoxicity of air borne particulates assessed by comet and the Salmonella mutagenicity test in Jeddah, Saudi Arabia. *Int J Environ Res Public Health* 2007;4:216-33.
131. Huang W, Caudill SP, Grainger J, Needham LL, Patterson DG, Jr. Levels of 1-hydroxypyrene and other monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in children: a study based on U.S. reference range values. *Toxicol Lett* 2006;163:10-9.
132. Kawamoto T, Yang M, Kim YD, et al. Effects of lifestyle on urinary 1-hydroxypyrene concentration. *J Occup Health* 2007;49:183-9.
133. Merlo F, Andreassen A, Weston A, et al. Urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a marker for exposure to urban air levels of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:147-55.
134. Duarte-Salles T, Mendez MA, Pessoa V, et al. Smoking during pregnancy is associated with higher dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons and poor diet quality. *Public Health Nutr* 2010;13:2034-43.
135. Polanska K, Hanke W, Sobala W, Brzezniński S, Ligońka D. Predictors of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among pregnant women--prospective cohort study in Poland. *Int J Occup Med Environ Health* 2011;24:8-17.
136. Suzuki Y, Niwa M, Yoshinaga J, Mizumoto Y, Serizawa S, Shiraishi H. Prenatal exposure to phthalate esters and PAHs and birth outcomes. *Environ Int* 2010;36:699-704.
137. Cattaneo RA, Andrighetti AP, Sagebin FR, Abreu CM, Petersen GO, Chatkin JM, Thiesen FV. Validação de método para determinação de cotinina em urina por cromatografia líquida de alta eficiência. *Brazilian Journal of Toxicology* 2007;19:6.
138. Petersen GO, Leite CE, Chatkin JM, Thiesen FV. Cotinine as a biomarker of tobacco exposure: development of a HPLC method and comparison of matrices. *J Sep Sci* 2010;33:516-21.
139. Atalah E, Castillo C, Castro R, Aldea A. [Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women]. *Rev Med Chil* 1997;125:1429-36.

9. ANEXOS

ANEXO 1- APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-570/10

Porto Alegre, 18 de junho de 2010.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 10/05066 intitulado **“Avaliação de cotinina e hidroxipireno no líquido amniótico e cordão umbilical ao nascimento”**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Julia de Barros Machado
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

AVALIAÇÃO DE COTININA E HIDROXIPIRENO NO LÍQUIDO AMNIÓTICO E CORDÃO UMBILICAL AO NASCIMENTO

I- Justificativa e objetivos da pesquisa

Este estudo tem como objetivo principal avaliar a presença de hidroxipireno (substância carcinogênica, ou seja, que pode predispor ao câncer) e quantificação de cotinina no líquido amniótico e sangue do cordão umbilical ao nascimento. Também serão avaliados a dosagem quantitativa de cotinina urinária e hidroxipireno na urina fetal e materna.

O estudo quer avaliar as substâncias decorrentes do cigarro que podem passar para o bebê, no líquido amniótico, sangue cordão umbilical, urina mãe e do bebê.

II- Procedimentos a serem utilizados

Será realizado coleta de urina da mãe no momento da internação no centro obstétrico. No momento em que romper a bolsa, será coletado líquido amniótico. Após o nascimento do bebê e cortado o cordão umbilical, será coletado sangue da parte do cordão em que foi cortada e não está mais ligado ao nenê. Será também coletado com um saquinho externo a urina do bebê.

III- Desconfortos ou riscos esperados

Nenhum dos exames realizados oferece qualquer risco para a mãe nem para o bebê, nem serão coletados de forma invasiva.

IV e V- Benefícios que se pode obter e procedimentos alternativos que possam ser vantajosos

Conhecer os componentes do cigarro que passam para o bebê.

VI- Garantia de resposta a qualquer pergunta

VII- Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si

VIII- Garantia de privacidade

Ressaltamos que a concordância em participar desse estudo não implica em alterações no pré-natal, e o fato de não querer participar também não mudará nada na maneira que será conduzido o atendimento neste hospital.

Eu, _____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informações a respeito dos exames que serão realizados e esclareci as minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento

ANEXO 3 – FICHA DE COLETA DE DADOS

PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

Nome:

Idade:

G P A

Idade gestacional:

IMC:

Tabagista: SIM

NÃO

Número de cigarros/dia:

Tempo de tabagismo:

Tempo último cigarro(min):

Tempo internação, até o parto(min):

Tabagismo passivo:

Exposição ambiental/ medicamentos:

Alimentação:

Medidas:

	Hidroxi pireno/Benzopireno	Cotina urinária
Urina materna		
Urina fetal		
Sangue Cordão		
Líquido amniótico		

Via de parto:

Apgar:

Peso:

ANEXO 4- RESPOSTA DA REVISTA PLOS ONE

The screenshot shows the Editorial Manager interface for a submission in production. The browser address bar displays <http://www.editorialmanager.com/pone/default.asp>. The page header includes the PLOS ONE logo and navigation links: HOME, LOGOUT, HELP, REGISTER, UPDATE MY INFORMATION, JOURNAL OVERVIEW, MAIN MENU, CONTACT US, SUBMIT A MANUSCRIPT, and INSTRUCTIONS FOR AUTHORS. The user is logged in as 'Julia-279' with the role of 'Author'. The main content area is titled 'Submissions in Production' and contains the following information:

Contents: Listed below are one or more submissions you have authored that are currently in production.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	DOI	Article Title	Initial Date Submitted	Accept Date
Send E-mail	PONE-D-14-32686R2	10.1371/journal.pone.0116293	COTININE AND POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS LEVELS IN THE AMNIOTIC FLUID AND FETAL CORD AT BIRTH AND IN THE URINE FROM PREGNANT SMOKERS	Jul 21 2014 11:01PM	Dec 8 2014 11:04AM

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

PLOS ONE PONE-D-14-32686R2 10.1371/journal.pone.0116293 - Sent to Production - [EMID:70b5ea5854bbb8d6]

De: "Tessa Brunton" <em@editorialmanager.com>
 Para: "Julia de Barros Machado" <juliamachado@terra.com.br>
 Enviado em: Sex 12/12/14 20:07
 Recebido em: Sex 12/12/14 20:07

Dear Mrs Machado,
 Your manuscript has a tentative publication date of Dec 30 2014 12:00AM. Please note your manuscript will remain under a strict press embargo until 2 PM ET on the date of publication.

If you or your institution will be preparing press materials for this manuscript, please inform our press team in advance at onepress@plos.org. Again, we appreciate your adherence to the 2 PM ET press embargo.

PLOS ONE routinely tracks the media coverage our articles receive; however, we aren't always able to capture all of it. Therefore, if you discover or produce news content about your article that you would like to be added, please let us know. To submit a media link, fill out the online form found on the related content tab of your paper. The coverage you submit will be posted pending staff approval.

We thank you again for your contribution to PLOS ONE.

Regards,
 PLOS ONE Production Team

ANEXO 5 – TÍTULO DE MELHOR TRABALHO POR EIXO TEMÁTICO DE TABAGISMO DO XXXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA



ANEXO 6 – ARTIGO**COTININE AND POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS LEVELS IN THE AMNIOTIC FLUID AND FETAL CORD AT BIRTH AND IN THE URINE FROM PREGNANT SMOKERS**

Julia de Barros Machado¹, José Miguel Chatkin¹, Aline Rigon Zimmer², Ana Paula Szezepaniak Goulart¹, Flávia Valladão Thiesen²

¹ School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² School of Pharmacy, Pontifícia Universidade Católica, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

Julia de Barros Machado, MD, MSc

Avenida Ipiranga, 6690/302

Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

90610001, Porto Alegre, RS

Brazil

E-mail: juliamachado@terra.com.br

ABSTRACT

Cigarette smoking during pregnancy has several impacts on fetal development, including teratogenic effects.

The objective of this study was to assess whether the toxic substances (cotinine and polycyclic aromatic hydrocarbons) found in pregnant smokers are transmitted to their fetuses. The outcomes were analyzed measuring cotinine and 1-hydroxypyrene in the amniotic fluid and maternal urine, benzopyrene and cotinine in the umbilical cord blood.

Through a controlled cross-sectional design, 125 pregnant women were selected and classified according to their smoking status: 37 current smokers, 25 passive smokers and 63 non-smokers (controls). We performed high-performance liquid chromatography to measure substances' concentrations. A post-hoc Tukey's test was used to analyze the differences between the groups.

All variables were significantly different between controls and smokers. The mean ratios between the concentration of cotinine in smokers compared to controls were as follows: 5.9 [2.5 - 13.5], $p < 0.001$ in the urine; 25 [11.9 - 52.9], $p < 0.001$ in the amniotic fluid; and 2.6 [1.0- 6.8], $p = 0.044$ in the umbilical cord blood.

The mean ratios of 1-hydroxypyrene concentration between smokers and controls were 7.3 [1.6 - 29.6], $p = 0.003$ in the urine and 1.3 [1.0 - 1.7], $p = 0.012$ in the amniotic fluid, and of benzopyrene in umbilical cord blood was 2.9 [1.7 - 4.7], $p < 0.001$.

There were no significant differences between controls and passive smokers. When comparing the three groups together, there were statistical differences between all variables.

Thus, the fetuses of pregnant smokers are exposed to toxic and carcinogens substances. To our knowledge, this is the first study to measure 1-hydroxypyrene in the amniotic fluid and benzopyrene in umbilical cord blood by high-performance liquid chromatography when considering pregnant women in relation to smoking exposure only.

Introduction

Smoking is the leading cause of preventable deaths in the world [1-3], causing the deaths of approximately 6 million people per year [4, 5]. Cigarette smoking before and during pregnancy is an important cause of preventable illness and death among mothers and their children and particularly impacts on pregnancies in younger women with lower educational level [6]. Smoke exposure during pregnancy has been repeatedly and consistently related to numerous risks to the fetus, including low birth weight, preterm delivery, increased risk of miscarriage [7-13], and increased teratogenic effects on the development of several organs [14].

The ultrasound pattern of maternal-fetal chronic hypoxia has already been described in pregnant smokers [15]. Placental abruption, which occurs in approximately 1% of pregnancies, is 20 to 30 times more frequent in pregnant smokers [16]. Also, cigarette smoke contains numerous carcinogens that cross the placenta [17], increasing the risk of childhood cancer, such as brain tumors, leukemia and lymphoma [18].

Cotinine, nicotine metabolite [19-21], is widely used as a biological marker to measure tobacco exposure [22-24] and is also used in cases of low or intermittent tobacco use [25]. It is also considered the best marker of smoking status, even during pregnancy [26].

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are related to the teratogenic and carcinogenic effects of cigarette smoke. PAHs are a class of organic compounds containing two or more fused aromatic rings consisting of carbon atoms and hydrogen [27]. These substances are air pollutants generated by burning tobacco leaves, motor vehicles, and factory combustion and can also be found in some smoked foods [28]. Most PAH compounds have an 18-hour half-life [29, 30] and are metabolized and excreted in the urine. Benzopyrene and 1-hydroxypyrene can be used as biomarkers of recent tobacco exposure [31].

Llop et al. [32] demonstrated that one of the PAHs, urinary 1-hydroxypyrene, is a good marker for assessing exposure to cigarette smoke and air pollution. When the

determination is performed on the blood, the biomarker used is benzopyrene. After inhalation, the PAHs are metabolized to form reactive epoxide and phenolic compounds that have the capacity to bind to DNA, forming complex PAH-DNA adducts [33]. These PAH-DNA adducts increase the probability of genetic mutations and, therefore, might be associated with several forms of cancer [34].

Smokers excrete significantly higher urine levels of 1-hydroxypyrene than nonsmokers, and these values correlate well with the number of cigarettes smoked [35]. However, only a few studies have investigated the levels of PAHs in pregnant smokers [36], and the majority of these studies have focused on environmental exposure [32, 35]. Considering that cigarette smoke is the primary source of exposure to these substances, this area of study requires further investigation.

The metabolism of pregnant smoker is altered, and it is difficult to evaluate the effects of dietary factors and environmental exposure. Thus, it is necessary to compare women from the same population with similar diets and exposures to environmental pollution to try to isolate the true exposure of fetuses to chemicals arising from both active and passive smoking.

The objective of this study was to assess whether cotinine and PAH found in pregnant smokers are transmitted to their fetuses. We measured the amount of 1-hydroxypyrene and cotinine in the amniotic fluid and maternal urine and benzopyrene and cotinine in the umbilical cord blood.

Materials and Methods

In a controlled, cross-sectional design study, we recruited pregnant women in labor admitted at the Obstetric Center Hospital São Lucas (HSL), Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, from July 2010 to July 2013. This project was submitted and approved by the PUCRS Research Ethics Committee under the number 10/05066.

The inclusion criteria were signing the informed consent; age 18 to 35 years old; women must have received regular prenatal care at the Department of Obstetrics at the same hospital; and no previous or concomitant gestational diseases. Smokers were defined as pregnant women who had smoked more than 100 cigarettes throughout life and were smoking at the time of the interview [37]. Passive smokers were defined as non-smoking pregnant women who lived with a smoker who smoked inside their home. Non-smokers served as the control groups. The exclusion criteria were patients who declined to participate in the study; women with severe psychopathic disorders; preterm labor; illiteracy; and addiction to other licit or illicit drugs. Former smokers were also excluded.

The volunteers in labor were recruited at the moment of admission to the HSL Obstetric Center. They completed a questionnaire regarding their demographics and smoking habits. Maternal urine was then collected. Upon rupture of the membranes, amniotic fluid was collected. During delivery, the umbilical cord blood sample was collected.

The cotinine in maternal urine and umbilical cord blood were analyzed according to the methods described by Cattaneo *et al* [38] and Petersen *et al.* [39] respectively. The quantitative methodologies for the determination of cotinine and 1-hydroxypyrene in amniotic fluid, as well as, the 1-hydroxypyrene (1-OHP) in the maternal urine and benzopyrene in the umbilical cord blood were previously validated by our research group in accordance with the International Conference on the Harmonization (ICH) guideline [40]. To assess the specificity of the methodologies blank samples (or drug-free human samples) of urine, amniotic fluid and umbilical cord blood were compared to spiked samples with cotinine, 1-hydroxypyrene or benzopyrene and no interference of the different biological matrices was seen in the peak determination. The calibration curves for each analyte were linear ($r > 0.99$) over the concentration ranges of 10.0 – 1000 $\mu\text{g/L}$ for cotinine in urine; 5.0 - 500 $\mu\text{g/L}$ for cotinine in umbilical cord blood; 2.0 - 600 $\mu\text{g/L}$ for cotinine in amniotic fluid; 0.1 – 10.0 $\mu\text{g/L}$ for 1-OHP in urine; 0.25 – 15.0 $\mu\text{g/L}$ for 1-OHP

in amniotic fluid; and 0.1 - 7.5 µg/L for benzopyrene in umbilical cord blood. The limits of quantification (LOQ) were defined as the lowest point of calibration curves, and limits of detection (LOD) were calculated as the minimum concentration providing chromatographic signals 3 times higher than the background noise. The analytical methods fulfilled the acceptance criteria for precision and accuracy showing a coefficient of variation lower than 13.4 % and a recovery range of 91.5 - 110 %.

The specimens for the cotinine analysis were alkalized with 25 µL of sodium hydroxide 10 M and submitted to liquid-liquid extraction with dichloromethane using 2-phenylimidazole as internal standard (IS). For each analysis 2 mL of maternal urine, 600 µL of umbilical cord blood, and 1 mL of amniotic fluid were employed.

To determine 1-hydroxypyrene, 2.5 mL of urine samples were treated with acetate buffer (5 mL, pH 5) and β-glucuronidase/arylsulfatase (10 µL), to promote the hydrolysis of urinary 1-hydroxypyrene, and subsequently submitted to solid phase extraction (SPE) using a C18 cartridge (Chromabond® MN, Germany). For the analysis of 1-hydroxypyrene in the amniotic fluid 2 mL of sample was submitted to liquid-liquid extraction with ethyl ether. To the determination of benzopyrene in the umbilical cord blood 150 µL of sample was extracted with cyclohexane. The organic phase was separated and dried under nitrogen flow at room temperature. Then, the samples were recovered with mobile phase and injected into the HPLC system.

Cotinine analysis was performed using an Agilent® high-performance liquid chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a UV detector isocratic pump, manual injection and ChemStation software. The chromatographic separation was performed with a Zorbax Eclipse® XDB-C8 (Agilent 4.6 x 150 mm x 5 µm) column protected by a Zorbax Eclipse® XDB-C8 guard column (Agilent 4.6 x 12.5 mm, 5 µm). The mobile phase consisted of a mixture of water:methanol:sodium acetate (0.1 M):acetonitrile (50:15:25:10, v / v / v / v), and the flow was maintained at 0.5 mL/minute with UV detection at 260 nm, yielding a total run time of 10 minutes.

A high-efficiency liquid chromatograph Shimadzu® Class LC-10 equipped with a fluorescence detector, isocratic pump and manual injector was used to analyze the presence of 1-hydroxypyrene and benzopyrene. The chromatographic separation was performed with a LiChospher® 100 RP-18 (4.6 x 150 mm, 5 µM) column protected by a guard column (4.6 × 12.5 mm, 5 µM, 18 LiChospher® RP-100). The mobile phase consisted of a methanol:acetonitrile:water (35:35:30, v/v/v) mixture for 1-hydroxypyrene, and acetonitrile:water (75:25, v/v) for benzopyrene analysis. A 1.0 mL/min flow rate was maintained isocratically with fluorescence detector set at 242 nm (excitation) and 388 nm (emission) for 1-hydroxypyrene, and 290 nm (excitation) and 430 nm (emission) for benzopyrene (see also [Table S1](#)).

To characterize the patients and fetal birth we used means and standard deviations. For analyses the group comparisons of cotinine and PAHs concentration according to smoking habit, the quantitative variables were logarithmically transformed and presented as geometric means and geometric mean deviation. The difference between the 3 groups together was calculated using ANOVA .

To estimate the proportional difference of asymmetrical variables between groups, we used the mean ratio (MR) and 95% confidence interval (CI). In relative terms, the MR expresses how many times the average of a group is larger than the other. The MR was obtained in a model of analysis of covariance, and a robust standard error was applied to the logarithms of the measures. The post-hoc Tukey's test was used to determine the group differences, letters a & b denote non-significant or significant difference between groups, respectively. The groups with no significant difference were labeled as (a) and the groups, with significant difference as (b). The significance level was 0.05. The data were analyzed using SPSS version 21.0.

Results

A total of 125 patients were enrolled in the study: 37 (29.6%) were smokers; 25 (20%) were passive smokers; and 63 (50.4%) were non-smokers. There were no significant differences in age or obstetric aspects between the groups (Table 1).

Table 1 here

Table 2 presents the cotinine and 1-hydroxypyrene levels in the maternal urine and amniotic fluid and the benzopyrene and cotinine levels in the umbilical cord blood.

When compared the three groups together were statistical difference between all variables (P in table 2). When compared in pair all variables also were significantly different between the control and smoker groups, represented by letter b in Table 2. There were no significant differences between controls and passive smokers, represented by letter a in Table 2: urinary cotinine $P=0.57$, amniotic fluid cotinine $P=0.92$, umbilical cord cotinine $P= 0.99$, 1-hydroxypyrene in maternal urine $P= 0.39$, 1-hydroxypyrene in amniotic fluid $P= 0.86$ and benzopyrene in umbilical cord $P= 0.47$.

The number is not the same in all groups because some samples not able to be analyzed.

Table 2 here

The MRs of the cotinine concentrations of pregnant smokers compared to controls were 5.9 [95%CI 2.5 to 13.5] ($p < 0.001$) in the urine; 25 [95%CI 11.9 - 52.9] ($p < 0.001$) in the amniotic fluid; and 2.6 [95%CI 1.0 - 6.8] ($p = 0.044$) in the umbilical cord blood.

The MRs of the 1-hydroxypyrene concentrations in pregnant smokers compared to controls were 7.3 [95%CI 1.6 - 29.6] ($p = 0.003$) in the urine and 1.3 [95%CI 1.0 - 1.7] ($p = 0.012$) in the amniotic fluid. The concentration of benzopyrene in the umbilical cord blood of fetuses from mothers who smoked had an MR of 2.9 [95%CI 1.7 - 4.7] ($p < 0.001$) compared to controls.

In Table 3 data of groups are presented as geometric mean (GM) and geometric standard deviation (GSD).

Table 3 here**Discussion**

Cotinine and polycyclic aromatic hydrocarbons in the urine and amniotic fluid of pregnant smokers and umbilical cord blood of their fetuses had significant higher levels compared to the non-smokers (controls). There were no significant differences between passive smokers and controls. When comparing the three groups together were statistical differences between all variables.

To our knowledge, this study is the first to measure 1-hydroxypyrene in the amniotic fluid and benzopyrene in umbilical cord blood by high-performance liquid chromatography when considering pregnant women in relation to smoking exposure only.

Our results demonstrate that pregnant smokers expose their fetuses to several substances in cigarette smoke, such as nicotine / cotinine and PAHs.

The cotinine concentrations in pregnant smokers were approximately 6 times higher in the urine, 25 times higher in the amniotic fluid, and 2.6 times higher in the cord blood when compared to non-smokers (control group).

The concentrations of 1-hydroxypyrene in pregnant smokers were seven times higher in the urine and 30% higher in the amniotic fluid compared to the control group. The benzopyrene concentration was approximately 3 times higher in cord blood of fetuses of the smokers compared to the control group.

Thus, these substances found in the urine of pregnant smokers pass to the fetus through the amniotic fluid and umbilical cord blood. The process of amniotic fluid formation, in which the fetus urinates and swallows his own urine, forms a cycle in which they are more exposed to these substances. The higher concentration of cotinine in the amniotic fluid compared to the concentration of 1-hydroxypyrene can be explained by its longer half-life (36 hours versus 18 hours, respectively) [29, 41]. The non-significant

difference among passive pregnant smokers and controls is probably related that they do not inhale enough cigarette smoke to transmit to the fetus such toxic substances.

We classified the patient smoking status according to their self-report because many smokers were abstinent for many hours before labor. Thus, the smoking status could be affected if it were based on the cotinine levels only (due to the half-life rating). Also, many participants did not smoke when the pain of labor contractions began. Some of the collected samples could not be analyzed by having insufficient amount of material for analysis.

For the statistical analyses, we calculated the mean and median, but the results were not satisfactory due to the intense asymmetry data. We then used the geometric mean and geometric mean ratios, more appropriate tools for studying asymmetric data and values close to zero. We also calculated the geometric standard deviation, but to interpret the values is necessary perform logarithmic transformation and then Gauss (mean \pm 1.96 SD).

Our results confirms that nicotine cross the placenta and is already known that it can cause extensive damage to the fetus, since nicotine is clearly neuroteratogenic and impacts the fetal brain at critical stages of development in pregnant women using tobacco [42]. This may explain the cognitive, emotional and behavioral problems observed in these children. Furthermore, exposure to cigarette smoke throughout prenatal and postnatal development increases the likelihood of dependence on licit and illicit drugs in adolescence or adult age [43]. The development of other organs, including the lungs, is also adversely affected by nicotine [44, 45].

We also found an increased fetal exposure to 1-hydroxypyrene, a known carcinogenic substance. The carcinogenic pathway for PAHs or their metabolites involves the production of reactive oxygen species, which generate oxidative stress, lipid peroxidation, protein modifications, and DNA damage, and may influence birth outcomes and child health in later life [46-49].

Perera et al. [50] showed that a range of relevant environmental exposures to certain carcinogenic PAHs during pregnancy may damage the fetal DNA through histone modification, which may result in fetal chromosomal abnormalities. PAH-DNA adducts were detected in the umbilical cord blood and maternal blood after exposure to ambient air PAHs [50] and predisposes the fetus to aberrations in the cord blood. Thus, prenatal exposure to PAHs may increase the risk of cancer in humans [51].

The early embryonic period, when the rates of DNA synthesis are high and the patterns of DNA methylation are established [52], may be a particularly sensitive phase for epigenetic dysregulation due to environmental exposures.

Perera et al. [50] proposed that the transplacental transfer of PAHs to the fetus could have significant impacts on fetal development. Several studies found a reduction in head circumference at birth, which is correlated with a lower intelligence quotient and poor cognitive functioning and school performance in childhood [53, 54]. Furthermore, PAHs are associated with restricted intrauterine growth [55], small gestational age [56] and preterm delivery [56]. When a group of newborns monitored prenatally was followed through school age, there was a decline in neurological development [47] and an increased likelihood of asthma-related symptoms [57].

Jules et al. [58] suggests that intrauterine exposure to benzopyrene predisposes newborn rats to functional deficits in cardiovascular development, which may contribute to cardiac dysfunction throughout life. Rundle et al. [59] suggests that prenatal exposure to PAHs causes increased fat mass gains during childhood and an increased risk of obesity. Langlois et al. [60] showed an association between maternal occupational exposure to PAHs and increased risk of cleft lip with or without cleft palate.

Stejskalova and Pavek [61] confirmed that PAH-DNA adducts in the placenta also led to pregnancy complications, such as preterm labor, intrauterine growth restriction, structural abnormalities, fetal death, placental abruption, low birth weight, and small birth length.

The measurement of PAH and its fetal effects have been extensively studied, as mentioned above. However, most of these studies focused on environmental exposures.

What this study adds is that we studied the fetal exposure to PAHs solely related to smoking, which is the primary means of exposure, in a population with a similar diet, living in the same geographic area, and without significant variations in pollution exposure. We measured benzopyrene levels in the umbilical cord blood by high-performance liquid chromatography, a simple and inexpensive method. Our results confirmed that benzopyrene also passes to the fetus from cigarette smoke exposure. We also showed that PAHs were also transmitted to the fetus through the amniotic fluid.

Thus, the fetuses of pregnant women who smoke are exposed to notoriously toxic and carcinogenic substances.

REFERENCES

1. Centers for Disease Control and Prevention, *State medicaid coverage for tobacco-dependence treatments--United States, 1994-2002*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2004. **53**(3): p. 54-7.
2. Centers for Disease Control and Prevention, *Tobacco use, access, and exposure to tobacco in media among middle and high school students--United States, 2004*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2005. **54**(12): p. 297-301.
3. *WHO urges more countries to require large, graphic health warnings on tobacco packaging: the WHO report on the global tobacco epidemic, 2011 examines anti-tobacco mass-media campaigns*. Cent Eur J Public Health, 2011. **19**(3): p. 133, 151.
4. World Health Organization. *Implementing tobacco control*. 2011-2013]; Available from: <http://www.who.int/tobacco/control/en/>.
5. WHO, *report on the global tobacco epidemic Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship* 2013. Available from: http://www.who.int/tobacco/global_report/2013/en/.
6. Centers for Disease Control and Prevention. *Fact sheet: preventing smoking and exposure to secondhand smoke before, during and after pregnancy*. 2007-2013]; Available from: <http://www.cdc.gov/nccdphp/publications/factsheets/Prevention/smoking.htm>.
7. Gilboa, S.M., et al., *Relation between ambient air quality and selected birth defects, seven county study, Texas, 1997-2000*. Am J Epidemiol, 2005. **162**(3): p. 238-52.
8. Mannes, T., et al., *Impact of ambient air pollution on birth weight in Sydney, Australia*. Occup Environ Med, 2005. **62**(8): p. 524-30.
9. Wilhelm, M. and B. Ritz, *Local variations in CO and particulate air pollution and adverse birth outcomes in Los Angeles County, California, USA*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(9): p. 1212-21.

10. Ziaei, S., K. Nouri, and A. Kazemnejad, *Effects of carbon monoxide air pollution in pregnancy on neonatal nucleated red blood cells*. Paediatr Perinat Epidemiol, 2005. **19**(1): p. 27-30.
11. Leem, J.H., et al., *Exposures to air pollutants during pregnancy and preterm delivery*. Environ Health Perspect, 2006. **114**(6): p. 905-10.
12. Ritz, B., et al., *Ambient air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the University of California, Los Angeles*. Am J Epidemiol, 2007. **166**(9): p. 1045-52.
13. Liu, S., et al., *Association between maternal exposure to ambient air pollutants during pregnancy and fetal growth restriction*. J Expo Sci Environ Epidemiol, 2007. **17**(5): p. 426-32.
14. Shi, M., G.L. Wehby, and J.C. Murray, *Review on genetic variants and maternal smoking in the etiology of oral clefts and other birth defects*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2008. **84**(1): p. 16-29.
15. Machado Jde, B., et al., *Quantitative effects of tobacco smoking exposure on the maternal-fetal circulation*. BMC Pregnancy Childbirth, 2011. **11**: p. 24.
16. Ananth, C.V., J.C. Smulian, and A.M. Vintzileos, *Incidence of placental abruption in relation to cigarette smoking and hypertensive disorders during pregnancy: a meta-analysis of observational studies*. Obstet Gynecol, 1999. **93**(4): p. 622-8.
17. Sasco, A.J. and H. Vainio, *From in utero and childhood exposure to parental smoking to childhood cancer: a possible link and the need for action*. Hum Exp Toxicol, 1999. **18**(4): p. 192-201.
18. Rogers, J.M., *Tobacco and pregnancy*. Reprod Toxicol, 2009. **28**(2): p. 152-60.
19. Benowitz, N.L., *Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure*. Epidemiol Rev, 1996. **18**(2): p. 188-204.
20. Binnie, V., et al., *The validation of self-reported smoking status by analysing cotinine levels in stimulated and unstimulated saliva, serum and urine*. Oral Dis, 2004. **10**(5): p. 287-93.

21. Pichini, S., et al., *Cord serum cotinine as a biomarker of fetal exposure to cigarette smoke at the end of pregnancy*. Environ Health Perspect, 2000. **108**(11): p. 1079-83.
22. Kohler, E., et al., *Assessment of prenatal smoke exposure by determining nicotine and its metabolites in maternal and neonatal urine*. Hum Exp Toxicol, 2001. **20**(1): p. 1-7.
23. Kohler, E., et al., *Assessment of prenatal tobacco smoke exposure by determining nicotine and its metabolites in meconium*. Hum Exp Toxicol, 2007. **26**(6): p. 535-44.
24. Ostrea, E.M., Jr., et al., *Meconium analysis to assess fetal exposure to nicotine by active and passive maternal smoking*. J Pediatr, 1994. **124**(3): p. 471-6.
25. Haley, N.J., D.W. Sepkovic, and D. Hoffmann, *Elimination of cotinine from body fluids: disposition in smokers and nonsmokers*. Am J Public Health, 1989. **79**(8): p. 1046-8.
26. Klebanoff MA, L.R., Clemens JD, DerSimonian R, Wilkins DG. , *Serum cotinine concentration and self-reported smoking during pregnancy*. Am J Epidemiol, 1998. **148**(3): p. 259-62.
27. World Health Organization and International Programme on Chemical Safety, *Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons*. 1998, Geneva: World Health Organization. 883.
28. Bostrom, C.E., et al., *Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air*. Environ Health Perspect, 2002. **110 Suppl 3**: p. 451-88.
29. Buchet, J.P., et al., *Evaluation of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a coke production and a graphite electrode manufacturing plant: assessment of urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a biological indicator of exposure*. Br J Ind Med, 1992. **49**(11): p. 761-8.

30. Jongeneelen, F.J., *Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons*. Ann Occup Hyg, 2001. **45**(1): p. 3-13.
31. Ramesh, A., et al., *Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons*. Int J Toxicol, 2004. **23**(5): p. 301-33.
32. Llop, S., et al., *Urinary 1-hydroxypyrene, air pollution exposure and associated life style factors in pregnant women*. Sci Total Environ, 2008. **407**(1): p. 97-104.
33. Whyatt, R.M., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta and modulation by CYP1A1 induction and genotype*. Carcinogenesis, 1998. **19**(8): p. 1389-92.
34. Kriek, E., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk*. Mutat Res, 1998. **400**(1-2): p. 215-31.
35. Polanska, K., et al., *Predictors of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among pregnant women--prospective cohort study in Poland*. Int J Occup Med Environ Health, 2011. **24**(1): p. 8-17.
36. Suzuki, Y., et al., *Prenatal exposure to phthalate esters and PAHs and birth outcomes*. Environ Int, 2010. **36**(7): p. 699-704.
37. *State-specific secondhand smoke exposure and current cigarette smoking among adults—United States, 2008*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep., 2009. **58**: p. 1232–5. .
38. Cattaneo, R.A., A. P; Sagebina, F. R; Abreuc, C. M; Petersen, G.O; Chatkin, J.M ; Thiesen, F. V. , *Validação de método para determinação de cotinina em urina por cromatografia líquida de alta eficiência*. BRAZILIAN JOURNAL OF TOXICOLOGY, 2007. **19**: p. 6.
39. Petersen, G.O., et al., *Cotinine as a biomarker of tobacco exposure: development of a HPLC method and comparison of matrices*. J Sep Sci, 2010. **33**(4-5): p. 516-21.

40. Harmonization, I.C.o.t., *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, ICH, Geneva November, 2005
41. Santos, S., F. Studart, and V. Lamont, *Marcadores biológicos do tabagismo*. Pneumologia Paulista: Órgão Informativo da Sociedade Paulista de Pneumologia e Tisiologia, 2008. **21**(2).
42. Dwyer, J.B., R.S. Broide, and F.M. Leslie, *Nicotine and brain development*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2008. **84**(1): p. 30-44.
43. Hellstrom-Lindahl, E. and A. Nordberg, *Smoking during pregnancy: a way to transfer the addiction to the next generation?* Respiration, 2002. **69**(4): p. 289-93.
44. Maritz, G.S., *Nicotine and lung development*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2008. **84**(1): p. 45-53.
45. Wang, L. and K.E. Pinkerton, *Detrimental effects of tobacco smoke exposure during development on postnatal lung function and asthma*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2008. **84**(1): p. 54-60.
46. Rossner, P., Jr., et al., *Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part II. Oxidative damage*. Mutat Res, 2009. **669**(1-2): p. 20-6.
47. Perera, F.P., et al., *Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years*. Pediatrics, 2009. **124**(2): p. e195-202.
48. Obolenskaya, M.Y., et al., *Human placental glutathione S-transferase activity and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts as biomarkers for environmental oxidative stress in placentas from pregnant women living in radioactivity- and chemically-polluted regions*. Toxicol Lett, 2010. **196**(2): p. 80-6.
49. Kim, H., et al., *Fruit and vegetable intake influences the association between exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and a marker of oxidative stress in pregnant women*. Eur J Clin Nutr, 2011. **65**(10): p. 1118-25.
50. Perera, F., et al., *DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo[a]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from Northern*

- Manhattan, the World Trade Center Area, Poland, and China. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(3): p. 709-14.
51. Bocskay, K.A., et al., *Chromosomal aberrations in cord blood are associated with prenatal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(2): p. 506-11.
 52. Dolinoy, D.C., J.R. Weidman, and R.L. Jirtle, *Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. Reproductive Toxicology*, 2007. **23**(3): p. 297-307.
 53. Jedrychowski, W., et al., *Impact of barbecued meat consumed in pregnancy on birth outcomes accounting for personal prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons: Birth cohort study in Poland. Nutrition*, 2012. **28**(4): p. 372-7.
 54. Edwards, S.C., et al., *Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland. Environ Health Perspect*, 2010. **118**(9): p. 1326-31.
 55. Dejmek, J., et al., *The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. Environ Health Perspect*, 2000. **108**(12): p. 1159-64.
 56. Choi, H., et al., *Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. Environ Health Perspect*, 2008. **116**(5): p. 658-65.
 57. Perera, F., et al., *Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. PLoS One*, 2009. **4**(2): p. e4488.
 58. Jules, G.E., et al., *In utero exposure to benzo(a)pyrene predisposes offspring to cardiovascular dysfunction in later-life. Toxicology*, 2012. **295**(1-3): p. 56-67.

59. Rundle, A., et al., *Association of childhood obesity with maternal exposure to ambient air polycyclic aromatic hydrocarbons during pregnancy*. *Am J Epidemiol*, 2012. **175**(11): p. 1163-72.
60. Langlois, P.H., et al., *Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of oral cleft-affected pregnancies*. *Cleft Palate Craniofac J*, 2013. **50**(3): p. 337-46.
61. Stejskalova, L. and P. Pavek, *The function of cytochrome P450 1A1 enzyme (CYP1A1) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the placenta*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011. **12**(5): p. 715-30.

TABLES

Table 1 - Patients and fetal birth characteristics

Characteristics	Control (n = 63)	Passive Smokers (n = 25)	Smokers (n = 37)	P
Age (years)	26 +/- 5	24 +/- 6	26 +/- 5	0.24
BMI (kg/m ²)	27 +/- 5	28 +/- 5	28 +/- 4	0.49
Pregnancies	2 +/- 1	2 +/- 2	2 +/- 1	0.17
Gestational age (weeks)	38 +/- 1	38 +/- 1	39 +/- 1	0.15
Weight (g)	3349 +/- 409	3375 +/- 433	3225 +/- 528	0.33
Apgar (5-minute)	9 +/- 0.7	9 +/- 0.6	9 +/- 1.0	0.09

Data are presented as means +/- standard deviations. BMI (Body Mass Index). Apgar score index. is a method for assessing a neonate's heart rate, respiratory effort, muscle tone, skin color, and reflex irritability.

Table 2 - Group comparisons of selected variables according to smoking habit

	Controls	Passive Smokers	Smokers	MR (PS/C)	MR (S/C)	P
Urinary Cotinine (µg/L)	n=56 0.64 ^a (ND-68)	n=25 0.94 ^a (ND-21)	n=35 3.77 ^b (ND-69)	1.4 [0.5-3.7]	5.9 [2.5- 13.5]	<0.001
Amniotic fluid cotinine (µg/L)	n=55 1.47 ^a (ND-63)	n=22 1.28 ^a (ND-51)	n=33 36.87 ^b (ND-527)	0.8 [0.3-2.0]	25 [11.9-52.9]	<0.001
Umbilical cord cotinine (µg/L)	n=59 3.36 ^a (ND-91)	n=24 3.23 ^{a,b} (ND-84)	n=37 8.79 ^b (ND-340)	0.9 [0.32-2.9]	2.6 [1.0-6.8]	0.038
1-hydroxypyrene in maternal urine (µmol/mol creatinine)	n=60 0.02 ^a (ND-2.2)	n=25 0.05 ^a (ND -1.2)	n=37 0.15 ^b (ND-3)	2.4 [0.4-11.9]	7.3 [1.6-29.6]	0.004
1-hydroxypyrene in amniotic fluid (µg/L)	n=55 0.48 ^a (ND-1.1)	n=22 0.51 ^{a,b} (ND-1.1)	n=33 0.67 ^b (0.3-1.4)	1.0 [0.8-1.3]	1.3 [1.0-1.7]	0.015
Benzopyrene in umbilical cord (µg/L)	n=51 0.39 ^a (ND-1.8)	n=20 0.51 ^a (0.1-1.8)	n=26 1.13 ^b (0.1-4.3)	1.3 [0.7-2.2]	2.9 [1.7-4.7]	<0.001

The data are presented as geometric means (minimum-maximum) or mean ratios (MRs) and [95% CI]. P: statistical significance obtained from analysis of variance model with robust standard error applied to the logarithms of the measurement. Legend: C, control; PS, passive smoker; S, smoker; MR mean ratio, ND not detected. Letters denote significant difference between groups (Tukey's post-hoc test). a: without statistical significant difference (similar groups) , b: groups with statistical difference.

Table 3 - Geometric mean and standard geometric deviation of groups

	Controls (C)		Passive Smokers (PS)		Smokers (S)	
	GM	GSD	GM	GSD	GM	GSD
Urinary Cotinine ($\mu\text{g/L}$)	0.64	4.33	0.94	4.31	3.77	6.90
Amniotic Fluid Cotinine ($\mu\text{g/L}$)	1.47	2.56	1.28	2.28	36.87	9.07
Umbilical Cord Cotinine ($\mu\text{g/L}$)	3.36	6.34	3.23	6.20	8.79	7.83
1-hydroxypyrene in maternal urine ($\mu\text{mol/mol creatinine}$)	0.02	17.04	0.05	9.44	0.15	9.63
1-hydroxypyrene in amniotic fluid ($\mu\text{g/L}$)	0.48	1.65	0.51	1.65	0.67	1.39
Benzopyrene in umbilical cord ($\mu\text{g/L}$)	0.39	2.71	0.51	2.08	1.13	1.99

Data are presented as geometric mean (GM) and geometric standard deviation (GSD).

Supporting Information

Table S1 - Parameters of analytical performance

Biomarker/ Matrix	Range of linearity (ng/mL)	Coefficient of correlation (<i>r</i>)	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)	Precision (CV%)	Accuracy (%)
Cotinine/ urine	10.0 – 1000.0	0.9989	10.0	5.0	8.1-12.3	97.0-107.0
Cotinine/ cord blood	5.0 – 500.0	0.9980	5.0	0.18	1.3-11.6	97.0-110.0
Cotinine/ amniotic fluid	2.0 - 600.0	0.9992	2.0	0.50	3.9-13.4	91.5-101.7
1-hydroxypyrene/ urine	0.10 - 10.0	0.99989	0.10	0.045	3.2-12.5	94.0-102.5
1-hydroxypyrene/ amniotic fluid	0.25 - 15.0	0.9977	0.25	0.06	8.7-10.4	98.0-102.2
Benzopyrene/ cord blood	0.10 - 7.5	0.9965	0.10	0.04	5.1-8.6	100.4-108.3

LOQ: limit of quantification; LOD: limit of detection; CV: coefficient of variation