

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**“Dano Oxidativo, Reparação do DNA e a Influência de  
Polimorfismos Genéticos na Fisiopatogenia da Doença Pulmonar  
Obstrutiva Crônica”.**

**Tese de Doutorado**

**Andréa Lúcia Gonçalves da Silva**

**Porto Alegre, 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**“Dano Oxidativo, Reparação do DNA e a Influência de  
Polimorfismos Genéticos na Fisiopatogenia da Doença Pulmonar  
Obstrutiva Crônica”.**

**Andréa Lúcia Gonçalves da Silva**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biologia Celular e  
Molecular da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como requisito parcial  
para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências.**

**Orientador: Prof. Dr. João Antônio Pegas Henriques**

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Reparação de DNA em Eucariotos do Departamento de Biofísica desta Universidade com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (PRONEX-FAPERGS/CNPq, Projeto número 10/0044-3), nas instalações do Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade de Santa Cruz do Sul- UNISC e no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul- UCS.

“Dedico este trabalho ao meu pai, provedor da minha formação profissional que me permitiu chegar até aqui, e a minha mãe (*in memoriam*), que foi meu alicerce e norteou a minha educação”.

## AGRADECIMENTOS

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS:

Ao professor Henriques, pela oportunidade, confiança, carinho e dedicação nas horas difíceis, muito obrigada. O conhecimento adquirido será eternamente lembrado, é um exemplo de pesquisador, professor e orientador. A excelência na formação e liberdade vigiada que proporciona responsabilidade compartilhada foi fundamental para o desenvolvimento do meu trabalho e para o meu crescimento como pesquisadora. Serei eternamente grata.

A Dra. Temenouga N Guecheva (Nucha), pelas inúmeras revisões, disponibilidade, dedicação, respeito na co-orientação deste trabalho.

A professora Miriam Salvador e Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, pela parceria e dedicação na realização dos ensaios de lesão em membrana celular.

A Clara F. Charlier pela parceria e pelos ensaios de PCR/RFLP realizados na UFRGS.

Ao professor Guido, que sempre com atenção acolheu as minhas solicitações acadêmicas.

A minha Comissão de Acompanhamento, pelas críticas e sugestões na construção do meu trabalho durante estes 04 anos.

A Silvia Centeno e Luciano Saucedo, pela prestatividade de todos os momentos.

Aos colegas do grupo de pesquisa da UFRGS, pelos ensinamentos, momentos de relaxamento, pelo “tráfico de cucas”.

Universidade de Santa Cruz do Sul-UNISC:

A Andreia Valim, pelo companheirismo ao longo destes 08 anos, pela confiança em mim depositada, pelo incentivo a pesquisa de qualidade, pela oportunidade, ensinamentos, carinho e respeito. Serei eternamente grata e espero retribuir a altura. Em teu nome agradeço a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UNISC que incentivou e financiou esta pesquisa.

As colegas Dinara Jaqueline de Moura e Lia Possuelo, pelos ensinamentos, companheirismo, respeito e dedicação a este projeto de pesquisa.

Ao nosso grupo de pesquisa “Reabilitação em Saúde e suas Interfaces” por todo apoio ao longo desta jornada.

A coordenação do Laboratório de Biotecnologia e Genética-UNISC, pela acolhida e

disposição para que tudo desse certo na execução desta pesquisa.

As bolsistas de iniciação científica e demais estudantes colaboradores, Fernanda Fleig Zenkner, Manuella Gomes, Suiam Raabe Meglin, Eduarda Carvalho, Eduarda Bender, Martiele Bizarro, Paulo Ricardo da Rosa, Clairton dos Santos, Tatiane Aquino, Ahlam Hamid, Joel Ellwanger, Rafaela Backar e Paloma Schineider, pela dedicação nesta pesquisa.

A Helen da Rosa, que ao longo destes 04 anos como bolsista de iniciação científica muito me ensinou. Agradeço especialmente pela fidelidade, dedicação e carinho, mesmo quando você não era efetivamente minha bolsista. Jamais esquecerei as horas extras, a social, as divergências em prol do nosso crescimento científico. Você marcou a minha trajetória.

Demais agradecimentos:

A minha família, Jo, Felipe e Pedro, pelo suporte emocional, amparo e amor incondicional principalmente nos momentos *de stress*. Sem vocês eu jamais teria conseguido. Amo vocês.

As minhas irmãs, Claudia e Ellen, pelo eterno laço de amor e amizade.

Aos pacientes portadores de DPOC, pela confiança e parceria ao longo destes 08 anos. Espero poder retribuir tudo o que vocês fizeram, com todo o respeito e dedicação que vocês merecem e muito mais.

## ESTRUTURA DA TESE

O presente trabalho está dividido na seguinte forma: Introdução Geral, Objetivos (geral e específicos), três Capítulos na forma de artigos científicos, Discussão geral, Conclusões (geral e específicas), Perspectivas, Referências, Bibliografias e Anexo.

A Introdução Geral contempla a justificativa para a execução desta pesquisa, alicerçada em dados epidemiológicos atualizados, desenvolvimento da doença e seus respectivos fatores de risco bem como os mecanismos de lesão patológica e agravantes. Aborda ainda o dano e a reparação no DNA em portadores de DPOC, finalizando com as formas de biomonitoramento humano de interesse desta pesquisa.

O Capítulo I descreve os primeiros resultados obtidos sobre o dano no DNA em portadores de DPOC. Avaliou-se o nível de dano e a susceptibilidade ao dano no DNA por agentes mutagênicos exógenos, em sangue periférico de DPOC comparado a controles. O dano oxidativo também foi avaliado pela mensuração de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric acid reactive species-TBARS) em plasma sanguíneo. Estes resultados deram origem a um manuscrito que foi submetido ao *The Open Biomarkers Journal* sob o título “*DNA damage and oxidative stress in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease*”.

O Capítulo II surgiu da estratificação dos resultados obtidos anteriormente para a prática de exercício físico, e agregado os novos resultados do Teste de Micronúcleos de Células de Cavidade Bucal com Análise de Citoma. Após a separação dos portadores de DPOC em dois grupos, um grupo que praticava (EF-DPOC) e outro grupo que não praticava exercício físico (DPOC), foi possível avaliar os efeitos do exercício físico sobre o nível de dano e a susceptibilidade ao DNA após tratamento com mutagênicos exógenos. Estes resultados foram submetidos e aceitos para publicação em janeiro de 2013 no *ISRN Pulmonology* sob o título “*Effect of physical exercise on the level of DNA damage in Chronic Obstructive Pulmonary Disease patients*”.

No Capítulo III estão descritos os resultados oriundos das análises de polimorfismos genéticos em genes de reparação do DNA (*XRCC1* Arg399Gln, *OGG1* Ser326Cys, *XRCC3* Thr241Met e *XRCC4* Ile401Thr). O entendimento do papel dos polimorfismos em genes de reparação na modulação do dano no DNA e evolução da DPOC foi fundamental para traçar o perfil de lesão oxidativa na fisiopatogenia da DPOC. Estes resultados foram submetidos para publicação em janeiro de 2013 no *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*

---

*Journal* sob o título “*Evaluation of DNA damage in COPD patients and its correlation with polymorphisms in repair genes*”

A Discussão contempla os comentários à luz da literatura sobre os resultados apresentados nos Capítulos I, II e III e sua importância para a contribuição científica deste estudo. Para finalizar, foram descritas as Conclusões e as Perspectivas geradas por este trabalho, bem como as Referências Bibliográficas utilizadas na elaboração desta tese seguida de Anexos.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUÇÃO .....	14
1. Introdução Geral.....	15
1.1 Definição e Epidemiologia da DPOC .....	15
1.2 Fatores de Risco e Mecanismo de Lesão da DPOC .....	20
1.3 Dano e Reparação no DNA em Portadores de DPOC .....	24
1.3.1 Reparação por Excisão de Bases (BER).....	27
1.3.2 Reparação Recombinacional .....	29
1.4 Ensaios de Biomonitoramento em Humanos .....	32
1.4.1 Biomarcadores de Exposição .....	33
1.4.2 Biomarcadores de Efeito .....	35
1.4.2.1 Teste de Micronúcleos em Mucosa Oral .....	35
1.4.2.2 Peroxidação Lipídica.....	38
1.4.3 Biomarcadores de Susceptibilidade.....	38
OBJETIVOS.....	41
2.2 Objetivo Geral .....	42
2.2 Objetivos Específicos .....	42
CAPÍTULO I: <i>DNA damage and oxidative stress in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i> .....	43
CAPÍTULO II: <i>Effect of physical exercise on the level of DNA damage in Chronic Obstructive Pulmonary Disease patients</i> .....	56
CAPÍTULO III: <i>Evaluation of DNA damage in COPD patients and its correlation with polymorphisms in repair genes</i> ... ..	70
DISCUSSÃO.....	82
CONCLUSÕES.....	98
PERSPECTIVAS .....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104
<i>Curriculum Vitae</i> .....	122

**LISTA DE ABREVIATURAS**

8-OHdG	8-hidroxi-deoxiguanosina
BER	Reparo por Excisão de Bases ( <i>Base Excision Repair</i> )
BMCyt	Análise de Citoma de Células de Mucosa Oral ( <i>Buccal Micronucleus Cytome Assay</i> )
BUD	Broto Nuclear
CAT	Catalase
CD8 <sup>+</sup>	<i>Cluster of Differentiation 80</i>
CVF	Capacidade Vital Forçada
DCV	Doença Cardiovascular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EndoIII	Endonuclease III
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FPG	Formamidapirimidina DNA Glicosilase
Gpx	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa Reduzida
GST	Glutationa S-transferase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HR	Recombinação Homóloga ( <i>Homologous Recombination</i> )
KB	Fator Nuclear
MDA	Malondeoldeído
MMP	Matrix Metaloproteinase
MMR	Reparo por Emparelhamento Incorreto de Bases ( <i>Mismatch Repair</i> )
MMS	Metilmetano Sulfonato
MN	Micronúcleos
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NER	Reparo por Excisão de Nucleotídeos ( <i>Nucleotide Excision Repair</i> )

---

NHEJ	Recombinação Não Homóloga ( <i>Non-homologous End Joing</i> )
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion Radical Superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical Hidroxila
ON <sup>•</sup>	Óxido Nítrico
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR/RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Lenght Polymorphism</i> )
SGCE	Eletroforese de Célula Única em Gel
SNPs	Polimorfismo de Substituição de Nucleotídeo Único ( <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> )
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico ( <i>Thiobarbituric Acid Reactive Species</i> )
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VEF <sub>1</sub>	Volume Expiratório Forçado no 1º segundo
VEF <sub>1</sub> /CVF	Relação entre Volume Expiratório Forçado no 1º segundo e Capacidade Vital Forçada
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
XRCC	<i>X-ray repair cross-complementing protein</i>

## RESUMO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma das principais causas de mortalidade em todo mundo, apesar de ser prevenível e tratável. Resultante de uma resposta inflamatória anormal às partículas tóxicas inaladas, a DPOC caracterizada pela limitação progressiva do fluxo aéreo que é pouco responsiva a terapêutica farmacológica. Neste estudo caso-controle, envolvendo 51 portadores de DPOC e 51 controles, objetivou-se avaliar e quantificar danos e capacidade de reparação no DNA, bem como avaliar o papel de polimorfismos em genes de reparação e modulação deste. Foram determinados os níveis de danos no DNA, endógenos em sangue periféricos pelo ensaio cometa nas versões alcalina e neutra. Também foi determinado nível de danos induzidos pelo agente alquilante metilmetano sulfonato (MMS), por 1 e 3 horas pós tratamento pelo ensaio cometa alcalino. O dano residual após 3h de tratamento com MMS foi calculado em relação à 1h (100% dano induzido), para cada sujeito. A peroxidação lipídica foi medida pela mensuração de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) em plasma sanguíneo. Teste de micronúcleos de mucosa oral com análise de citoma (*BMCyt*) foi utilizado para detectar o dano citogenético. Os polimorfismos em genes de reparação de DNA (*XRCC1* Arg399Gln, *OGG1* Ser326Cys, *XRCC3* Thr241Met and *XRCC4* Ile401Thr) foram identificados por PCR/RFLP. Os resultados do ensaio cometa revelaram que o dano basal no DNA em portadores de DPOC foi mais elevado, comparado aos controles, como mensurado pelo ensaio cometa alcalino e neutro. O dano residual, detectado pós-tratamento com MMS, foi maior nos portadores de DPOC, quando comparados aos controles. Os resultados demonstraram claramente uma relação entre os níveis de danos induzidos no DNA e os níveis de TBARS indicando alta suscetibilidade para dano alquilante e/ou inibição do reparo decorrente do estresse oxidativo. Além disso, os pacientes apresentaram uma menor capacidade de reparação aos danos induzidos pelo MMS, quando comparados com os controles. Esta investigação ainda sugere um incremento do dano basal no DNA em portadores de DPOC, como analisado pelo ensaio cometa, nos sujeitos que possuem o alelo de risco dos polimorfismos genéticos *XRCC1* (Arg399Gln) and *XRCC3* (Thr241Met). O dano residual também foi mais elevado nos portadores de DPOC que possuíam o alelo de risco para os quatro genes estudados. Correlações negativas entre *BMCyt* (células binucleadas, broto nuclear, células com cromatina condensada e cariorrética) e função pulmonar foram observadas para os genótipos variantes. Os resultados do ensaio cometa e *BMCyt* estratificados para a prática de exercício físico regular (EF-DPOC) ou não (DPOC) revelaram que o dano basal no DNA do grupo EF-DPOC foi maior que o observado nos grupos de DPOC e nos controles. O dano residual foi similar entre os grupos de EF-DPOC e controles, em contraste com o grupo DPOC que permaneceu elevado, indicando deficiência na reparação do DNA e morte celular precoce por apoptose das células danificadas. Os valores de TBARS foram menores no grupo EF-DPOC indicando resistência ao dano oxidativo. Em conclusão, portadores de DPOC apresentam elevado dano basal no DNA e são mais susceptíveis para danos exógenos no DNA, como o ocasionado pelo agente alquilante MMS. Esta susceptibilidade para dano exógeno, por correlacionar positivamente com o TBARS, sugere o envolvimento do estresse oxidativo na indução do dano e/ou inibição da reparação. A presença do genótipo variante *XRCC1* (Arg399Gln), *OGG1* (Ser326Cys), *XRCC3* (Thr241Met) e *XRCC4* (Ile401Thr) modula o dano do DNA nos portadores de DPOC e incrementa o risco de desenvolvimento de câncer. O exercício físico frequente realizado pelos portadores de DPOC diminuiu níveis de peroxidação lipídica em plasma sanguíneo, a susceptibilidade para danos exógenos e a formação de anomalias celulares como broto nuclear e cromatina condensada.

**Palavras-chave:** DPOC, estresse oxidativo, polimorfismos genéticos, micronúcleos, dano no DNA, reparação do DNA.

## ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a major cause of mortality worldwide, despite being preventable and treatable. Resulting from an abnormal inflammatory response to inhaled toxic particles, COPD is characterized by progressive airflow limitation which has poor responsiveness to pharmacological therapy. In this case-control study, involving 51 patients with COPD and 51 controls, we aimed to assess and to quantify DNA damage and repair capacity as well as the role of genetic polymorphisms in the modulation of DNA damage. Endogenous DNA damage levels were determined in peripheral blood by comet assay in alkaline and neutral versions. DNA damage-induced version with alkylating methylmethane sulfonate agent (MMS) was evaluated for 1 and 3 hours by comet assay in alkaline version. The residual damage after the 3-hour MMS treatment was calculated related to 1 hour (100% damage induced), for each subject. Lipid peroxidation was assessed by measuring thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in blood plasma. The cytogenetic damage was evaluated by the buccal micronucleus cytome assay. The genetics polymorphisms in DNA repair genes (XRCC1 Arg399Gln, OGG1 Ser326Cys, XRCC3 Thr241Met and XRCC4Ile401Thr) were evaluated by PCR/RFLP respectively. The results of the comet assay showed that basal DNA damage in COPD patients was significantly higher compared to controls, as measured by the alkaline and neutral comet assay. The residual damage percentage, detected after the MMS treatment, increased in COPD patients than control group. The results clearly demonstrated a relationship between levels of DNA damage induced with higher levels of TBARS, indicating high susceptibility to alkylating damage and/ or repair inhibition resulting from oxidative stress. In addition, the patients showed a lower capacity to repair the damage induced by MMS, when compared with controls. This study suggests an increase in basal DNA damage in COPD patients, as analyzed by comet assay, in subjects having the risk allele of genetic polymorphisms XRCC1 (Arg399Gln) and XRCC3 (Thr241Met). The residual damage was higher in COPD patients who had the risk allele in the four genes analyzed. Negative correlations between BMCyt (binucleated, bud nuclear, condensed chromatin and kariorrética cells) and pulmonary function were observed for COPD patients with genotype variants. The stratified results (comet assay and BMCyt) related to regular exercise practice (PE-COPD) or not (COPD) showed that basal DNA damage in the PE-COPD group was significantly higher than in the COPD and controls groups. Residual damage was similar between the controls and PE-COPD group; in contrast COPD residual damage remained high indicating deficiency in DNA repair and premature cell death by apoptosis of damaged cells. TBARS values were lower in PE-COPD indicating resistance to oxidative damage. In conclusion, COPD patients have higher basal DNA damage and are more susceptible to exogenous DNA damage, as caused by the alkylating agent MMS. This susceptibility to exogenous damage, being correlated positively with the TBARS, suggests the involvement of oxidative stress-induced damage and/or repair inhibition. This research suggests an increase in DNA damage in COPD patients with the risk allele of genetic polymorphisms XRCC1(Arg399Gln), OGG1 (Ser326Cys), XRCC3 (Thr241Met) and XRCC4 (Ile401Thr), analyzed by comet assay and BMCyt, and increased risk of developing cancer. Regular physical exercise performed by COPD patients significantly decreases lipid peroxidation in the blood plasma as well as susceptibility to exogenous damage and formation of cellular abnormalities, such as condensed chromatin and nuclear bud cells.

**Keywords:** COPD, DNA damage, DNA repair, oxidative stress, genetic polymorphisms, micronucleus.

## **INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução Geral

A elevada incidência de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), representada por coeficientes superiores à média nacional na região sul, com o Rio Grande do Sul liderando as taxas de mortalidade no país, torna as abordagens aos pacientes portadores desta patologia de extrema relevância no que tange aos conceitos de saúde pública. A relação custo-efetividade dos tratamentos terapêuticos também emerge como um dos fatores principais na justificativa de se manter e, até mesmo, aprimorar as abordagens discutidas por esta pesquisa.

À medida que a mortalidade pela DPOC vem assumindo uma curva de conformação ascendente, ressalta-se que o número e a gravidade dos casos tende a aumentar e, com isso, as incapacidades físico-funcionais e psicossociais que acompanham a doença. O tabagismo, hábito cada vez mais comum em faixas etárias jovens também pode representar a exacerbação do número de casos no futuro, podendo a DPOC tornar-se um problema mais pronunciado e de início ainda mais precoce, gerando custos sociais criticamente elevados ao sistema previdenciário nacional.

Estudos atuais revelam que a inflamação e a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) têm um papel central na fisiopatogenia da DPOC. Entretanto, esta relação não está totalmente esclarecida, pois se verifica que as ERO podem ser causa ou consequência das doenças pulmonares associadas ao estresse oxidativo. O uso de antioxidantes naturais e sintéticos, de drogas farmacológicas, oxigenoterapia e atividade física têm sido recomendados para alívio dos sinais e sintomas, bem como para reduzir a progressão da doença. Acredita-se que o refinamento do conhecimento sobre os mecanismos de lesão oxidativa e perfis genéticos da DPOC seja necessário para a segurança e utilização criteriosa das modalidades terapêuticas, bloqueando de forma efetiva sua evolução.

Neste contexto, esta pesquisa buscou compreender os danos ocasionados no DNA e os seus mecanismos de reparação em portadores de DPOC, bem como avaliar o papel de polimorfismos genéticos em genes de reparação *XRCC1* (Arg399Gln), *OGG1* (Ser326Cys), *XRCC3* (Thr241Met) e *XRCC4* (Ile401Thr) na modulação destes danos no DNA.

### 1.1 Definição e Epidemiologia da DPOC

A DPOC é definida como uma doença comum, tratável, que se caracteriza por uma resposta inflamatória crônica anormal das vias aéreas e pulmões devido a partículas tóxicas e/ou gases

inalados (GOLD, 2011). Esta inflamação crônica causa alterações estruturais nas pequenas vias aéreas, com obstrução ao fluxo aéreo que é pobremente reversível a terapêutica medicamentosa, e destruição do parênquima pulmonar de caráter progressivo (STEPHENS & YEW, 2008; GOLD, 2011). A limitação ao fluxo aéreo que leva ao declínio da função pulmonar ocorre principalmente pela perda da retração elástica do pulmão, ocasionando colapso expiratório que se manifesta através de diversos sintomas, entre os quais se destacam a dispneia e a limitação da capacidade de realizar atividades físicas. Sua progressão frequentemente é marcada com alguns efeitos extrapulmonares significantes que podem contribuir para a gravidade individualmente (BARNES, SHAPIRO & PAUWELS, 2003; AKPINAR *et al.*, 2012). Recentemente foi incorporada a presença de comorbidades à definição da DPOC (NICE, 2010).

Considerada uma enfermidade de alta morbimortalidade, a DPOC resulta em um impacto econômico e social (PAN *et al.*, 2012). No núcleo familiar, provoca preocupação, limita a vida social e o lazer, compromete o orçamento e abrevia a vida. No campo profissional, reduz a produtividade, antecipa a aposentadoria e é causa de pagamento de pensões e benefícios. No Sistema de Saúde, é motivo de atendimentos repetidos em pronto-socorro, ambulatórios e causa frequente de hospitalizações, levando a despesas elevadas para governos e sociedades (CAMPOS, 2003).

A prevalência da DPOC tem aumentado em todo o planeta, devido a permanente exposição das pessoas aos fatores de risco já conhecidos, como o tabagismo, à exposição ocupacional ao cádmio e a sílica e os índices maiores de poluição em lugares abertos e fechados (RUFINO & SILVA, 2006). Esses fatores, associados à maior expectativa de vida da população, fizeram com que a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerasse a DPOC uma epidemia, prevendo a sua eclosão no ano de 2020, quando poderá se tornar a 3ª maior causa de mortalidade e a 5ª doença em prevalência (GOLD, 2011).

De acordo com as últimas informações atualizadas pela OMS, 65 milhões de pessoas tem DPOC com estadiamento variando de moderada a severa, sendo que em 2002 foi considerada a 5ª causa de morte. Inicialmente a DPOC foi mais frequente em homens, mas devido ao incremento no tabagismo entre mulheres nos países de alta renda e o aumento da exposição à poluição ambiental *indoor* nos países de baixa renda, a doença agora afeta homens e mulheres quase que igualmente (WHO, 2012). Ressalta-se ainda que a DPOC seja mais fatal nas mulheres devido às diferenças morfológicas (pulmões menores) e funcionais dos pulmões (vias aéreas mais reativas a irritantes inalados) quando comparadas aos homens (STEPHENS & YEW, 2008).

No Brasil, em média, 84 mortes por DPOC foram notificadas a cada dia em 1998. As doenças respiratórias representaram importante causa de morte entre 1980 e 1998 (8 a 10%), sendo que a DPOC respondeu por 11 a 15% das mortes por doenças respiratórias ocorridas no período de 1980-95 e correspondeu à cerca de 1/3 dos óbitos por causas respiratórias nos anos de 1996-98. Com base nos dados de mortalidade disponíveis no Sistema de Informação de Mortalidade do DATASUS, pode-se observar que o número de mortes por DPOC aumentou significativamente (de 9.358 mortes em 1980 para 30.801 em 1998, com 229% de incremento). O coeficiente de mortalidade por 100.000 habitantes aumentou de 7,88 em 1980 para 19,04/100.000 em 1998, o que representou um incremento de 142%. As taxas de mortalidade ainda são maiores entre os homens, e 3/4 das notificações são em indivíduos com 65 anos ou mais (CAMPOS, 2003). Observa-se que a mortalidade cardiovascular (infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, dentre outras) está diminuindo em praticamente todas as regiões latino-americanas, mas os óbitos por DPOC permanecem em linha ascendente em quase todos os países, gerando preocupações, sobretudo nas áreas de saúde pública (PEREIRA& MERCADANTE, 2004; JEMAL *et al.*, 2005).

De acordo com o Ministério da Saúde, em 2010 foram registradas 116.680 mil internações por DPOC no Brasil, que custaram ao Ministério da Saúde R\$ 83,6 milhões e em 2011, o número de internações subiu para 116.707, custando R\$ 87,1 milhões aos cofres públicos. Até julho de 2012, já são 57.881 registros de internações, que custaram ao governo R\$ 45,1 milhões. O número de mortes vem aumentando nos últimos anos, cresceu 12%, passando de 33.616 em 2005, para 37.592 em 2010 (DATASUS, 2012).

Na distribuição das mortes por região geográfica, observa-se que as regiões Sul (principalmente o Rio Grande do Sul) e Sudeste apresentam coeficientes superiores à média nacional (CAMPOS, 2003). Sobre a mortalidade por DPOC no Brasil, nos anos de 1980 a 1998, de todos os estados, o Rio Grande do Sul apresentou as maiores taxas de mortalidade (22,02/100.000 em 1980 e 50,75/100.000 em 1998, com 130% de incremento no período) enquanto o Maranhão apresentou as menores taxas (0,48/100.000 em 1980 e 2,41/100.000 em 1998, com incremento de 400% no período). Também foi observado que as taxas de mortalidade foram maiores nas capitais, quando comparadas ao interior. Isso se deve, em parte, à qualidade diagnóstica, que costuma ser superior nas capitais e nos grandes centros (CAMPOS, 2003). Em 2006, segundo Ministério da Saúde/SVS (DATASUS- SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE MORTALIDADE-SIM) o número de óbitos por grupo de causa para o Rio Grande do Sul foi

8.637 mortes, ocupando o 3º lugar.

De acordo com as últimas atualizações do *World Bank- WHO Global Burden of Diseases Study*, no Brasil a prevalência total da DPOC é 12,7% em pessoas maiores de 40 anos, sendo 17,9% para homens e 9,1% para mulheres (WHO, 2012). Por não ser uma doença de notificação compulsória, foi estimada pelo Ministério da Saúde uma prevalência de 7,5 milhões de portadores de DPOC no Brasil (GODOY *et al.*, 2001).

Os custos sociais e com serviços de saúde para a DPOC são substanciais. Taxas de consultas para cuidados primários são altas e as exacerbações da DPOC são a primeira causa de admissão hospitalar. Na União Europeia o custo total e direto com DPOC foi aproximadamente €38.6 bilhões e nos Estados Unidos, em 2002, o custo direto foi de \$18 bilhões e o custo indireto \$14.1 bilhões (LANIADO-LABORÍN, 2009). Uma avaliação econômica da DPOC e de suas agudizações na América Latina revela que é uma doença de elevada prevalência e que pressupõe uma grande carga assistencial. Um paciente com DPOC gera um custo sanitário direto que pode oscilar entre pouco mais de 1.000 e 10.000 mil dólares anuais, segundo a gravidade da doença e os preços de cada país (MIRAVITLLES, 2004).

Com relação ao tabagismo, principal fator de risco para desenvolvimento da DPOC, os dados do Ministério da Saúde estimam a prevalência em torno de 32% da população em geral (PEREIRA & MERCADANTE, 2004; STEPHENS & YEW, 2008). Assim sendo, se considerarmos toda a população brasileira e estimarmos que 15% dos fumantes desenvolvem DPOC clinicamente significativa, teremos aproximadamente 7,5 milhões de pacientes com essa doença, correspondendo a aproximadamente 5% da população em geral (PEREIRA & MERCADANTE, 2004; IGLESIAS *et al.*, 2007).

O tabagismo mostra-se consistentemente mais concentrado entre os grupos com menor nível de escolaridade, que podem também ser os mais pobres. Existe uma maior prevalência (1,5 a 2 vezes) do tabagismo entre os que possuem pouca ou nenhuma educação, em comparação com os que possuem mais anos de escolaridade. No ano de 2006, a prevalência do tabagismo entre adultos nas capitais dos estados variou entre o mínimo de 9,5% em Salvador e 21,2% em Porto Alegre e em Rio Branco. O consumo total por adulto, incluindo-se as vendas ilegais de cigarros, caiu de 1.700 cigarros por ano em 1990 para 1.175 cigarros no período entre 2003 e 2005 (IGLESIAS *et al.*, 2007).

A atividade que mais poupa recursos é o diagnóstico precoce da doença, em fase leve, fato pelo qual se deve estimular a implantação de programas de detecção de casos e de abandono do

tabaco (MIRAVITLLES, 2004). Os elementos chave para o diagnóstico da DPOC são a exposição aos fatores de risco, tais como a fumaça do cigarro, inflamação e obstrução das vias aéreas que é pobremente reversível ao tratamento clínico (STEPHENS & YEW, 2008). Sendo assim, o diagnóstico é baseado na história clínica com levantamento de sinais e sintomas (dispneia aos esforços, sibilos e tosse geralmente produtiva) e confirmado pela prova de função pulmonar através da espirometria (BOER, 2002; BARR *et al.*, 2003; GOLD, 2011).

Atualmente a espirometria é o exame realizado para determinar o critério requerido para diagnóstico da DPOC: relação volume expiratório forçado no primeiro segundo com a capacidade vital forçada ( $VEF_1/CVF$ )  $< 70\%$  do predito pós-broncodilatador (GOLD, 2011). Após a determinação da relação  $VEF_1/CVF$ , a doença é classificada em quatro níveis, de acordo com a gravidade da obstrução das vias aéreas determinadas pelo  $VEF_1$ , com a finalidade de propor orientação terapêutica, definir prognóstico e comparar resultados de tratamentos (GOLD, 2011). No estágio I, a doença é leve, o paciente apresenta  $VEF_1 \geq 80\%$ . No estágio II, a doença é moderada, com  $VEF_1 \geq 50\%$  e  $< 80\%$ . No estágio III a doença é grave, com  $VEF_1 \geq 30\%$  e  $< 50\%$ . Já no estágio IV, a doença é muito grave, com qualquer valor de  $VEF_1$ , geralmente inferior a 30% ou inferior a 50% com falência respiratória crônica traduzida em dispneia incapacitante, hipoxemia e hipercapnia (GOLD, 2011).

A fase inicial da doença é de difícil reconhecimento, devido à obstrução de pequenas vias aéreas que passam de forma assintomática nos métodos rotineiros de investigação (WEDZICHA, 2002; CAMPOS, 2003; GOLD, 2011). Sendo assim, o diagnóstico da DPOC normalmente ocorre quando essa doença se apresenta em estado mais avançado, com sua clínica bem caracterizada (ZAROWITZ & O'SHEA, 2012). Seu prognóstico frequentemente é grave, a sobrevivência do portador de DPOC depois de 10 anos gira em torno de 50%, entre aqueles que persistirem fumando, e é próxima de 80% entre os que pararam de fumar (MAN *et al.*, 2004; RAM *et al.*, 2004; EKLUND *et al.*, 2012). As exacerbações da DPOC constituem o momento de maior risco de morte para o doente, onde oxidantes são formados principalmente pelos granulócitos e macrófagos.

Até agora, exceto a cessação do tabagismo, não existem outras formas terapêuticas capazes de alterar o declínio funcional progressivo do  $VEF_1$ , sendo esse um dos aspectos mais marcantes da doença (MAN *et al.*, 2004; RAM *et al.*, 2004). No entanto, já se observa que em pacientes com DPOC avançada e com idade avançada mesmo após a cessação do tabagismo, as características clínicas continuam mostrando um rápido declínio da função pulmonar e acelerado

declínio do VEF<sub>1</sub> (TAKABATAKE *et al.*, 2009). Na exacerbação aguda da doença, a geração de ERO parece ser maior, contrapondo com menores níveis de glutatona dos eritrócitos e a vitamina C sérica. Esse conhecimento tem evoluído juntamente com os estudos sobre antioxidantes capazes de neutralizar os efeitos das ERO na DPOC (JUNIOR *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2012).

## 1.2 Fatores de Risco e Mecanismo de Lesão da DPOC

Um fator de risco importante é o tabagismo, assim como exposição a poeiras, gases e a fumaça da combustão de lenha durante a investigação e diagnóstico da DPOC (OLIVEIRA *et al.*, 2000; PAUWELS *et al.*, 2001; GOLD, 2011). Estudos têm mostrado forte evidência da associação entre o tabaco e doenças respiratórias, principalmente a DPOC e o câncer de pulmão, pois o cigarro é uma mistura complexa de mais de 4.700 componentes químicos, com radicais livres e outros oxidantes presentes em altas concentrações (VINEIS *et al.*, 2005; CEYLAN *et al.*, 2006). Mais de 80% das mortes por DPOC são atribuídas diretamente ao tabagismo e pessoas que fumam tem aproximadamente 13 vezes mais chance de desenvolver DPOC do que não fumantes (STEPHENS & YEW, 2008). Dessa forma, o risco absoluto de desenvolver DPOC em fumantes ativos varia de 15% a 20% (LAKHDAR R. *et al.*, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2011). Há evidências de que as altas concentrações de óxido nítrico, contidas no cigarro, sejam a principal responsável pelo incremento do estresse oxidativo, principalmente em DPOC moderado e severo e em fase de exacerbação da doença (RYTILA *et al.*, 2006; CIENCEWICKI *et al.*, 2008).

Devido à exposição direta, o cigarro sensibiliza e inicia uma resposta inflamatória anormal no tecido pulmonar o que causará a DPOC. A indução do estresse oxidativo pelo cigarro pode ocorrer por vários mecanismos: pelas ERO, espécies reativas nitrogenadas (ERN) e componentes oxidantes do próprio cigarro; pelo complexo hidroquinona-quinona bem como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e seus catecóis correspondentes; pela debilidade do sistema de defesa antioxidante (HANG, 2010). Ressalta-se que além da exposição aos gases tóxicos do tabagismo, demais fatores de risco podem estar envolvidos no desenvolvimento da DPOC, dentre eles o envelhecimento, a exposição passiva a fumaça de cigarro, a exposição frequente aos poluentes ambientais e ocupacionais, a deficiência genética de alfa<sub>1</sub> antitripsina, as infecções respiratórias recorrentes da infância e a história familiar de DPOC (STEPHENS & YEW, 2008; GOLD, 2011).

Investigações clínicas e experimentais sugerem que oxidantes desempenham um papel

importante na patogênese da DPOC, implicando em efeitos locais e sistêmicos indiretos de oxidantes (CIENCEWICKI *et al.*, 2008; AKPINAR *et al.*, 2012). Na DPOC ocorrem alterações dos componentes celulares do pulmão, com aumento do número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos CD8<sup>+</sup>, que se mantêm ativados no tecido pulmonar acarretando progressiva destruição parenquimatosa, gerando excesso de produtos oxidativos e a facilitação de colonização por microrganismos, que interagem entre si, recrutando mais células pró-inflamatórias (RUFINO & SILVA, 2006; GOLD, 2011). Outras células do parênquima pulmonar também são capazes de gerar ERO, dentre elas as células endoteliais, células alveolares do tipo II e células ciliadas da via aérea (JUNIOR *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2009).

Os macrófagos apresentam importante pleomorfismo no pulmão, com tamanhos diferentes, os menores com intensa capacidade de fagocitose e os maiores com grande atividade bioquímica (RUFINO & SILVA, 2006). Nos tabagistas, a liberação de lisossomos é até cinco vezes maior, comparado aos não fumantes, ocasionando a secreção de substâncias tais como metabólitos do ácido araquidônico (tromboxano A<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> e F<sub>2a</sub>, leucotrieno B<sub>4</sub>, 5-HETE), citocinas (IL1, IL6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$   $\beta$  e  $\gamma$ , IL10, IL12, IL15 e fator inibitório de macrófagos), metabólitos de oxigênio (ânion superóxido – O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peróxido de hidrogênio – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radical hidroxila OH<sup>•</sup>), enzimas (metaloproteinases e elastases) e óxido nítrico (RUFINO & SILVA, 2006). Estas células, macrófagos e neutrófilos, têm alta atividade de NADPH- oxidase e sua ativação no endotélio pulmonar parece uma das fontes predominantes de oxidantes (JUNIOR *et al.*, 2005).

A geração de radicais superóxido por neutrófilos de pacientes com DPOC, em exacerbação aguda, parece ser significativamente maior do que em indivíduos saudáveis da mesma idade (JUNIOR *et al.*, 2005). Os níveis plasmáticos de produtos da peroxidação lipídica, medidos pela técnica TBARS, são maiores em pacientes com DPOC do que em indivíduos normais, e também mais elevados naqueles pacientes que apresentam exacerbação aguda da doença. Ainda, em DPOC com hipoxemia noturna e dessaturação de oxigênio entre 50 e 87%, há maiores níveis de peroxidação lipídica ( $15,3 \pm 3,4$  nmolMDA/ml) enquanto em sujeitos controles os níveis permanecem estáveis ( $4,1 \pm 1,2$  nmolMDA/ml) (OKUR *et al.*, 2012). O mesmo foi observado para os níveis de isoprostano-F<sub>2</sub> (isômero de prostaglandinas formadas pela peroxidação lipídica) que foram significativamente maiores na urina de pacientes com DPOC (média de 84 pmol/mmol de creatinina) do que em pacientes controles (média de 35,5 pmol/mmol de creatinina). Esse resultado é mais um indício da participação do estresse oxidativo na fisiopatologia da DPOC

(JUNIOR *et al.*, 2005).

As moléculas reativas do oxigênio podem atuar aumentando a secreção de muco e a permeabilidade da membrana capilar, levando a broncoconstrição, bem como o recrutamento neutrofílico (PETTERSEN & ADLER, 2002). Localmente, maiores níveis de oxidantes foram encontrados na respiração exalada condensada, no escarro, no lavado e fluidos de pacientes com DPOC. Grande número de neutrófilos e macrófagos migra para os pulmões de pacientes com DPOC e geram um excesso de oxidantes, de tal forma que estes doentes têm níveis elevados de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, podendo ser adequados marcadores no monitoramento de paciente com DPOC exacerbada (CIENCEWICKI *et al.*, 2008).

Os pulmões, porém, não são os únicos órgãos envolvidos na DPOC (AKPINAR *et al.*, 2012). Aspectos extrapulmonares, como o aumento no número de células inflamatórias, que resulta em produção anormal de citocinas pró-inflamatórias, o desequilíbrio na formação de radicais livres e a capacidade antioxidante resultando em sobrecarga oxidativa geram as alterações locais e sistêmicas. Essas alterações têm sido apontadas como essenciais na patogênese da doença, mesmo que estas relações não estejam ainda adequadamente estabelecidas (MOUSSALLE, 2007; AKPINAR *et al.*, 2012).

A associação entre o tabagismo e a repetição de agudização da doença reflete na alteração da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, podendo dessa forma facilitar o acesso de proteases para o interstício pulmonar, evidenciando estreita relação com o estresse oxidativo e o incremento do número de neutrófilos (MORRISON *et al.*, 1999). Com isso, inicia-se um círculo vicioso que promove resposta inflamatória anormal, onde oxidantes promovem a inflamação por meio da ativação do fator nuclear-KB, o qual estimula a produção de múltiplos genes inflamatórios (TORRES & GODOY, 2004; GOLD, 2011). Na exacerbação aguda da DPOC, a geração de ERO parece ser maior, contrapondo com menores níveis de glutathiona dos eritrócitos e a vitamina C sérica. Esse conhecimento tem evoluído juntamente com os estudos sobre antioxidantes capazes de neutralizar os efeitos das ERO na DPOC (JUNIOR *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2012).

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais, existe uma produção constante de ERO acompanhada pela contínua inativação dessas formas reativas pelos sistemas antioxidantes (GASPAR, 2003). Os antioxidantes, tais como enzima superóxido-dismutase, glutathiona-reduzida (GSH), também estão aumentados nos tabagistas, mas, apesar do balanço oxidante e antioxidante estar alterados na DPOC, seu real significado funcional ainda não foi

provado (MORRISSON *et al.*, 1999; JUNIOR *et al.*, 2005; RUFINO & SILVA, 2006). A SOD extracelular é abundante no tecido pulmonar e protege o pulmão do estresse oxidativo e parece exercer um papel importante na redução da lesão pulmonar provocada por ERO em modelos animais, após a administração de bleomicina (JUNIOR *et al.*, 2005). Entretanto, seu papel em doenças das vias aéreas não está completamente esclarecido.

A queda da capacidade antioxidante dos portadores de DPOC mostrou não ser somente considerada como um reflexo da ocorrência de estresse oxidativo, mas também como evidência da expansão do estresse oxidativo para fora da corrente sanguínea, podendo gerar assim um efeito sistêmico (CEYLAN *et al.*, 2006). Baseado nisso, o desenvolvimento e a progressão da DPOC tem sido relacionado com o aumento do estresse oxidativo e/ou redução das defesas antioxidantes. Além disso, tem sido mostrado que a DPOC é um predisponente para o desenvolvimento de câncer de pulmão através de vários mecanismos, incluindo estresse oxidativo e processos mediados pelo estresse oxidativo como inflamação e alteração da integridade genômica (CEYLAN *et al.*, 2006).

Uma questão importante a ser ressaltada é que nem todos os tabagistas desenvolvem a doença, sugerindo que fatores genéticos podem modificar o risco individual (TORRES & GODOY, 2004; LAKHDAR *et al.*, 2011). Dessa forma, é possível observar que fumantes passivos desenvolvem a doença enquanto fumantes correntes não (TORRES & GODOY, 2004). Outros fatores estão envolvidos no remodelamento das vias aéreas na DPOC. Além do estresse oxidativo e da inflamação crônica, a apoptose e as alterações na proliferação celular, com atenção especial ao envolvimento das interleucinas, do sistema do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da matrix metaloproteinases (MMP) influenciam nesse processo (LEE *et al.*, 2011; SEIMETZ *et al.*, 2011;). Há evidências que distúrbio no balanço entre apoptose e regeneração de células estruturais pulmonares contribui para patogênese da DPOC. O incremento da apoptose em portadores de DPOC persiste mesmo após a cessação do tabagismo ocasionando um rápido declínio da função pulmonar, principalmente em pacientes mais velhos com DPOC em estágio avançado (TAKABATAKE *et al.*, 2009).

Sendo assim, o potencial individual de susceptibilidade para o rápido declínio da função pulmonar em portadores de DPOC pode ser atribuído às variâncias genéticas e a ocorrência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs-*single nucleotide polymorphisms*) em diferentes genes (TAKABATAKE *et al.*, 2009). Portanto, investigar mecanismos moleculares envolvidos na progressão da doença como base para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é

de fundamental importância (SEIMETZ *et al.*, 2011).

### 1.3 Dano e Reparação no DNA em Portadores de DPOC

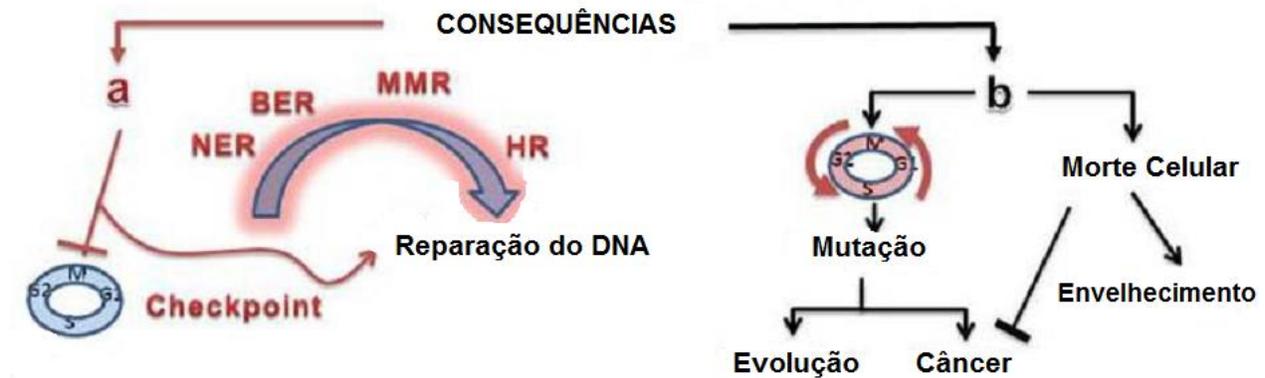
Há considerável variabilidade na susceptibilidade de fumantes desenvolverem DPOC. O único fator de risco genético comprovado cientificamente é a deficiência de  $\alpha 1$ - antitripsina, a qual é presente em 1-2% dos indivíduos com DPOC. Isso sugere que outros fatores genéticos, que predispõe fumantes a obstrução das vias aéreas, devem ainda ser identificados (PILLAI *et al.*, 2009).

Nesse sentido, os mecanismos que estão na base da fisiopatogenia da DPOC e no desenvolvimento da obstrução respiratória, ainda não estão totalmente esclarecidos (ZHANG *et al.*, 2012). Eles envolvem uma série de fatores agressores e genéticos capazes de promover o recrutamento de células inflamatórias para o sítio de lesão pulmonar. O recrutamento destas células inflamatórias irá originar uma resposta alterada das células estruturais do pulmão, com consequente desequilíbrio do balanço proteases/antiproteases e do balanço oxidantes/antioxidantes (GOLD, 2011).

Evidências demonstram que o estresse oxidativo está no papel central da patogênese da DPOC e ocasiona dano oxidativo no DNA (MACNEE & TUDER, 2009; PASTUKH *et al.*, 2011). As ERO podem alterar as estruturas das proteínas, danificarem processos enzimáticos e membranas lipídicas (peroxidação lipídica) e provocar lesões no DNA, que quando não é corretamente reparado pode iniciar e promover a carcinogênese (HANG, 2010). Entretanto, a exata extensão e qual dessas biomoléculas são preferencialmente atingidas, bem como a relação entre dano oxidativo induzido no DNA e mutações somáticas, ainda não são completamente conhecidas (HANG, 2010; TZORTZAKI *et al.*, 2012). Associado a isto, a alta prevalência da DPOC em indivíduos acima de 60 anos sugere que o envelhecimento acelera a progressão da doença em decorrência da falha na eliminação das ERO, aumento do estresse oxidativo e dano no DNA (ITO *et al.*, 2012). Por esses motivos, nos últimos anos as pesquisas têm explorado horizontes fisiopatogênicos, o que permitiu mudar o enfoque, antes relacionado exclusivamente à função pulmonar, para o estado celular e bioquímico da doença.

Descobertas recentes sugerem que o dano no DNA, do tipo quebras de fita dupla, está subjacente aos mecanismos moleculares da apoptose, senescência celular e inflamação crônica dos pulmões enfisematosos (ZHOU *et al.*; 2011). O dano no DNA juntamente com as respostas

celulares a esse dano pode resultar em instabilidade genômica através de muitos caminhos (Figura 1). Mutação de genes, alteração na capacidade de reparação de DNA, aberrações cromossômicas, heterogeneidade clonal e transformações celulares são características de instabilidade genômica. O acúmulo dessas anormalidades no genoma está associado com a transformação celular de um fenótipo benigno para maligno (MORAES *et al.*, 2012).

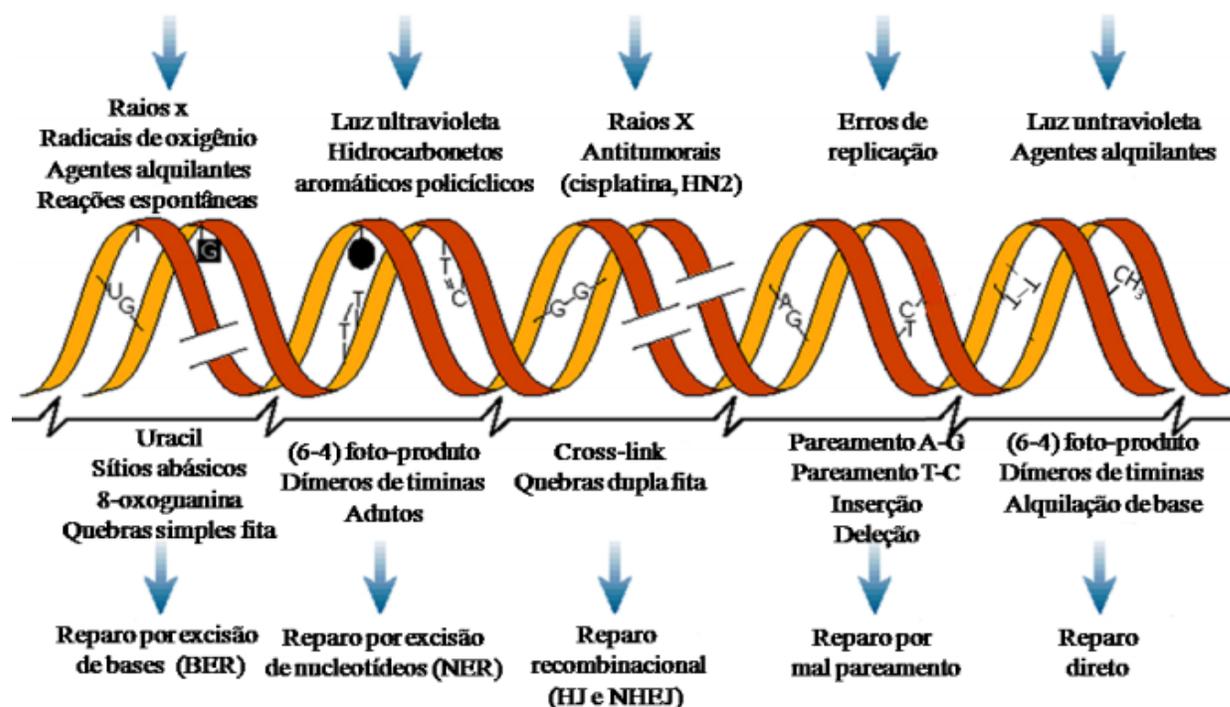


**Figura 1. Consequência das lesões não reparadas no DNA ao longo do tempo.** (a) Vias de reparação do DNA: reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por excisão de bases (BER), erro de emparelhamento de bases (MMR) e reparo recombinacional (HR); (b) diferentes formas de mutações e instabilidade genômica vão constituindo forças de direcionamento para evolução ou carcinogênese; danos não reparados no DNA promovem a morte celular o que, embora estejadicretamente combinado com o processo de envelhecimento, também protege os organismos eliminando as células cancerosas (Adaptado de MORAES *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos têm revelado uma positiva associação entre capacidade de reparação de DNA e o risco de desenvolvimento de câncer e de outras doenças (AGNOLETTO *et al.*, 2007; TZORTZAKI *et al.*, 2012). Uma diminuição na capacidade de reparação resulta em um aumento da suscetibilidade a mutações e instabilidade genética. Indivíduos diferem na sua capacidade intrínseca de reparação de DNA e a hipótese é que polimorfismos genéticos podem alterar a estrutura e função de proteínas, levando a uma alteração da capacidade de reparo (AGNOLETTO *et al.*, 2007).

A reparação do DNA é um processo bioquimicamente complexo, que emprega inúmeras proteínas com funções distintas onde, de acordo com a natureza do dano ou a sua extensão, determinados complexos proteicos são preferencialmente utilizados (SLUPPHAUG *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2012;). Esses complexos proteicos definem as vias de reparação de DNA e são responsáveis pela manutenção e integridade do genoma em quaisquer condições fisiológicas (FRIEDBERG, 2008). A diversidade de vias de reparação do DNA pode ser melhor

compreendida quando as mesmas são agrupadas levando-se em consideração seus mecanismos de ação. Assim, três grandes vias são atualmente conhecidas: a reparação direta, a reparação por excisão e a reparação recombinacional (Figura 2) (SLUPPHAUG *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2012).



**Figura 2. Dano e Mecanismo de Reparação.** Agentes que induzem dano no DNA (acima); exemplos de lesões induzidas por estes agentes (meio); os mecanismos mais relevantes de reparação de DNA para remoção destas lesões (abaixo). Adaptado de HOEIJMAKERS, 2001.

A reparação direta apresenta dois mecanismos principais de reparação que são a fotorreativação, catalisada por enzimas pertencentes à família das fotoliasas/criptocromos, e a reversão de bases alquiladas, catalisadas pelas DNA metiltransferases (CHRISTMANN *et al.*, 2003). Os processos de reparação por excisão de bases e por excisão de nucleotídeos (BER - *base excision repair* e NER - *nucleotide excision repair*) fazem parte de uma grande via de reparação de lesões no DNA, ou seja, a via de excisão (LIU *et al.* 2010; MORAES *et al.*, 2012). A reparação recombinacional está envolvida na resposta às quebras duplas na molécula de DNA e possui dois

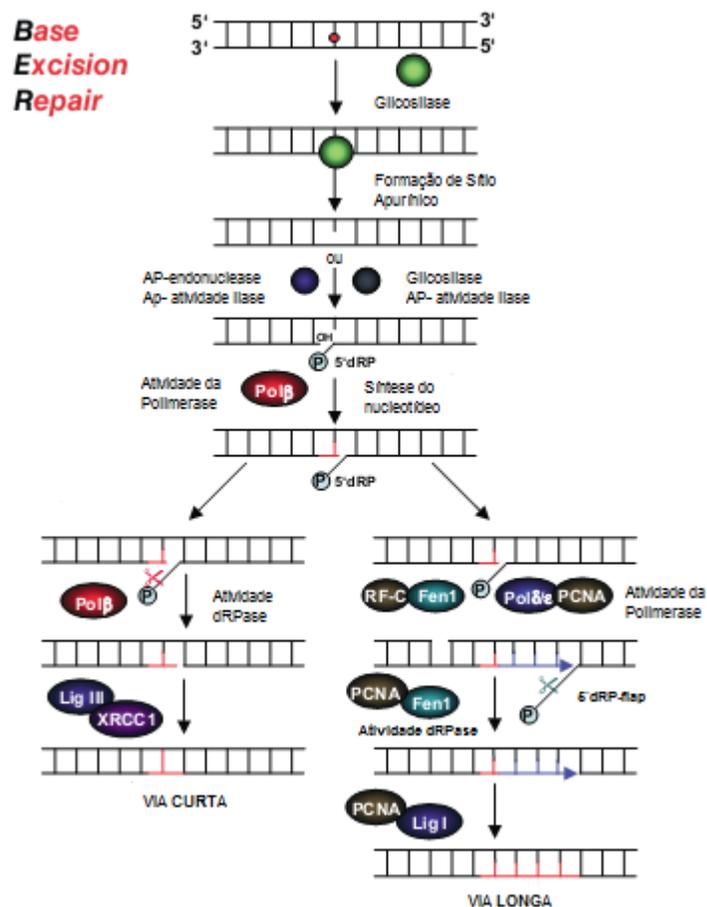
mecanismos principais: a recombinação homóloga (HR- *homologous recombination*) e a recombinação não homóloga (NHEJ- *non-homologous end joining*), ambas com requerimentos enzimáticos únicos, podendo ter funções sobrepostas para manutenção da integridade cromossomal em eucariotos (PARDO *et al.*, 2009; SHRIVASTAV *et al.*, 2008; MLADENOV & ILIAKIS, 2011).

Por apresentar baixa capacidade de reparação de DNA, sujeitos fumantes apresentam risco alterado para o desenvolvimento de DPOC e câncer de pulmão. Os componentes do tabaco causam vários tipos de modificações no DNA, os quais podem ser reparados por diferentes vias, dentre elas a via de BER, envolvido na remoção de bases modificadas, e as vias HR e NHEJ envolvidas na reparação de quebras duplas do DNA (YANG *et al.*, 2009; HANG, 2010).

### 1.3.1. Reparação Por Excisão de Bases (BER)

O reparo por excisão de bases é um processo de reparação multienzimático, que é requisitado quando uma única base do DNA é modificada. É ativado quando há um dano gerado por agentes alquilantes, por radiações ionizantes, pelo metabolismo normal oxidativo da célula e quando uma base errônea é incorporada durante replicação e reparação do DNA (ALMEIDA E SOBOL, 2007; PRASAD *et al.*, 2011).

No BER as bases modificadas são reconhecidas e excisadas por uma enzima DNA glicosilase específica, a qual origina um sítio apurínico/apirimidínico (sítios AP) (CHRISTMANN *et al.*, 2003). Esses sítios AP são processados por uma AP-endonuclease, levando a interrupções de cadeia simples, que são então preenchidas por uma DNA polimerase, em uma via curta (*short patch* BER), preenchendo um trecho de apenas um nucleotídeo, ou uma via longa (*long patch* BER), que substitui de 2 a 13 nucleotídeos (Figura 3). A escolha de uma das vias é geralmente determinada pela natureza da DNA glicosilase e do sítio AP resultante, mas também pode depender do momento do ciclo celular e da localização sub-nuclear do processo. Por exemplo, a remoção de 8-Oxoguanina ocorre principalmente através da via curta de BER, além disso, apenas 25% das lesões no DNA são realizadas através da via de reparação longa. Por fim, as extremidades da fita de DNA são seladas pela DNA ligase (BOITEAUX & GUILLER, 2004; ALMEIDA & SOBOL, 2007; WILSON III *et al.*, 2011).



**Figura 3. Reparação por Excisão de Bases (BER).** Reconhecimento das lesões no DNA ocorre por uma DNA glicosilase específica, que remove a base danificada pela hidrólise da ligação N-glicosídica. O sítio AP restante é processado por APE. Dependendo do resultado da clivagem feita pela enzima polimerase  $\beta$  ( $POL\beta$ ), reparação é realizada através da via curta ou longa de BER. Adaptado de CHRISTMANN *et al.*, (2003).

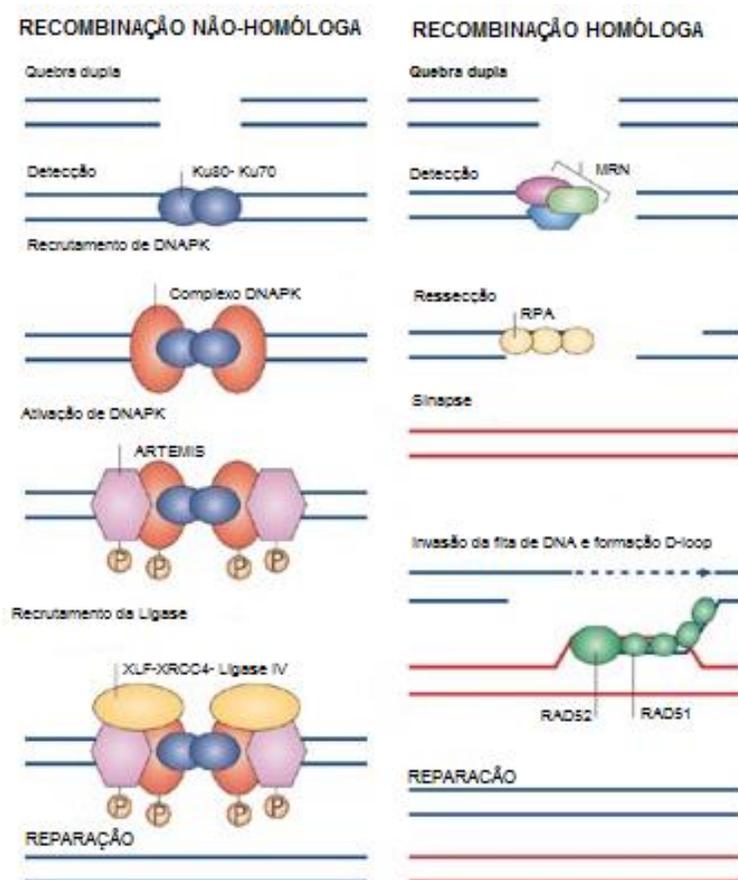
O estresse oxidativo nos pulmões de portadores de DPOC leva ao dano no DNA e aumenta a expressão de produtos de genes do BER, conhecidos por regularem a via de reparação (KREMER *et al.*, 2004). Em condições de hiperóxia, o dano induzido é capaz de super-expressar o gene 8-Oxoguanina DNA glicosilase (*OGG1*), que codifica uma proteína com função de DNA glicosilase (WU *et al.*, 2002; KREMER *et al.*, 2004). A proteína *OGG1* catalisa a excisão da base modificada do DNA, incluindo a 8-Oxoguanina. Estudos sobre o efeito da substituição Ser326Cys de *OGG1*, em várias populações, revelaram que o alelo Cys tem uma menor atividade de reparação do que o alelo do tipo selvagem (ROHR *et al.*, 2011). Nesse contexto, a habilidade de alterar a sobrevivência celular pelo incremento dos mecanismos de reparo pode adicionar outra abordagem para o tratamento de lesão pulmonar mediada por oxidante (KREMER *et al.*, 2004).

O produto do gene *XRCC1* (*X-ray repair cross-complementing protein 1*) tem sido definido como essencial no BER. A proteína *XRCC1* desempenha um papel importante na reparação da excisão de base (BER), interage com a DNA ligase III, a DNA polimerase e PARPpoli (ADP-ribose polimerase), facilitando a reparação de vários tipos de danos no DNA (DUARTE *et al.*, 2005; HANSEN-BAUER *et al.*, 2011). Esse gene é altamente polimórfico e alterações genéticas mais estudadas estão no éxon 6 (Arg194Trp) e no éxon 10 (Arg399Gln) (FALAGAN-LOTSCH *et al.*, 2009). Polimorfismo genético em *XRCC1* tem sido associado a vários tipos de câncer relacionado ao tabagismo, pela modulação do nível de reparo no DNA (YIN *et al.*, 2007).

Polimorfismos genéticos em *OGG1*(Ser326Cys) e *XRCC1*(Arg399Gln) estão associados com o risco de desenvolvimento da DPOC, principalmente entre fumantes correntes leves, porém os resultados ainda não são robustos o suficiente (YANG *et al.*, 2009). Outros estudos demonstraram que as exposições ambientais podem regular negativamente a expressão de alguns genes de reparação de DNA por *XRCC1*. No entanto, esses resultados são mais prováveis devido às amostras reduzidas observadas em grupo nãoexposto (WENG *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2012a). Ressalta-se que a proteína do gene *XRCC1* é capaz de sensibilizar e interagir com várias outras proteínas e dessa forma organizar o BER dentro de um complexo multiproteico (HANSEN-BAUER *et al.*, 2011). Mudanças nessas proteínas podem alterar a capacidade de reparo por excisão de base, aumentando a suscetibilidade a condições adversas de saúde (FALAGAN-LOTSCH *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Reparação Recombinacional

A reparação recombinacional é recrutada para as lesões do tipo quebras em fita dupla do DNA (SYMINGTON & GAUTIER, 2011). Há duas vias principais envolvidas neste tipo de reparação: recombinação homóloga (*homologous recombination* – HR, não mutagênica); e junção de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining* – NHEJ, mutagênica). Cada uma dessas vias possui requerimentos enzimáticos únicos (Figura 4), sendo que o recrutamento de uma ou outra via é dependente de uma série de fatores fisiológicos celulares (MISTELI & SOUTOGLOU, 2009).



**Figura 4. Reparação por Recombinação Não-homóloga (painel a esquerda):** o dano no DNA (do tipo quebras duplas- DSB) é reconhecido por Ku80–Ku70, o qual recruta o complexo de proteínas DNAPK e ativação da sua propriedade cinase. DNAPK também aumenta o recrutamento de XRCC4, DNA-ligase IV, e XLF e Artemis, que realizar a reação de união final da fita de DNA. **Recombinação Homóloga (painel a direita):** o dano no DNA do tipo DSB é reconhecido pelo complexo MRN (MRE11–RAD50–NBS1), o qual é recrutado para gerar quebra simples na cadeia de DNA através de ressecção. As extremidades de cadeia simples são ligadas por uma proteína de replicação (RPA); RAD51 e RAD52 posteriormente invadem o modelo de homologia, criando um D-loop e uma junção Holliday para a síntese de DNA e para copiar e finalmente restaurar a informação genética (Adaptado de MISTELI & SOUTOGLU, 2009).

As vias HR e NHEJ podem ter funções sobrepostas para manutenção da integridade cromossomal em eucariotos. Recentemente, uma terceira via envolvida na reparação de quebras duplas no DNA foi identificada, a via de junção de extremidades mediada por micro-homologia (*microhomology-mediated end joining – MMEJ*) (SYMINGTON & GAUTIER, 2011).

A recombinação homóloga de quebras duplas do DNA é iniciada pela remoção das extremidades 5' pelo complexo MRX(N) (Mre11/Rad50/Xrs2 em *Saccharomyces cerevisiae* e Mre11/Rad50/Nbs1 em mamíferos). Em seguida, ocorre à ligação de diversas unidades da proteína RPA (*replication protein A*), que realiza a retirada de estruturas secundárias da cauda de

DNA de fita simples. Após, a proteína Rad52 liga-se às duas outras terminações 3' das cadeias opostas situadas a cada lado da cadeia dupla, para proteger contra a digestão por endonucleases celulares. Posteriormente, a proteína Rad51 juntamente com a proteína Rad54, aproxima a dupla fita contendo a lesão a uma dupla fita intacta (cromátide irmã ou de um cromossomo homólogo) formando um heteroduplex. As cadeias servem de molde para a síntese de reparo por uma DNA polimerase. Finalizando, as duas cadeias se separam (resolução das junções de *Holliday*) e a ligação das terminações das cadeias reparadas é garantida pela DNA ligase sem perda de informação genética (MISTELI & SOUTOGLU, 2009).

Na reparação por HR se utiliza predominantemente a cromátide irmã para reparação das quebras duplas no DNA. Essa exigência gera, automaticamente, uma especificidade do ciclo celular para esta via de reparação, uma vez que as cromátides irmãs totalmente formadas só estão disponíveis durante a fase G2 do ciclo celular (MLADENOV & ILIAKIS, 2011).

O reconhecimento de quebras duplas no DNA pelo NHEJ é realizado da mesma forma que na HR, sendo o complexo MRX(N) o responsável pelo reconhecimento destas quebras no DNA (MLADENOV & ILIAKIS, 2011). Após a sinalização do dano no DNA, o processo de NHEJ é iniciado pela ligação de dois heterodímeros formados pelas proteínas Ku70/Ku80 que estão localizados nas extremidades danificadas do DNA, possivelmente protegendo as extremidades da degradação e sinalizando o dano para as demais proteínas da via. Em seguida, as extremidades danificadas da cadeia se complementam com as subunidades catalíticas da proteína cinase-dependente de DNA (DNA-PKcs). Posteriormente, a lacuna é preenchida por uma DNA polimerase e após o alinhamento das cadeias, essas são religadas pela DNA ligase IV, em presença da proteína *XRCC4* (Figura 4). O reparo por NHEJ é um mecanismo capaz de evitar a morte celular, porém à custa de alterações na molécula de DNA, já que é uma via que pode ser mutagênica (MLADENOV & ILIAKIS, 2011).

A reparação de quebras do DNA pelos genes *XRCC3* (HR) e *XRCC4* (NHEJ) é um importante mecanismo de manutenção da integridade genômica e polimorfismos nesses genes são sugeridos desempenhar um papel essencial no desenvolvimento da carcinogênese. A proteína de *XRCC3* interage com a RAD51 formando um filamento de nucleoproteína que permitirá o alinhamento de regiões homólogas de DNA para o reparo (VASILEVA *et al.*, 2012). Recentemente assumiu-se que o gene *XRCC4* também pode ser necessário para o recrutamento de ligase IV na reparação de quebras duplas. Em resumo, sugere-se que *XRCC4* modula a interação dinâmica do complexo Ligase IV/*XRCC4* com a maquinaria de reparação NHEJ (BERG *et al.*,

2011).

A associação entre polimorfismos de genes de reparação, como *XRCC1* (Arg399Gln) e *XRCC3* (Thr241Met), e frequência de aberrações cromossômicas também tem sido demonstrada. A presença do alelo de risco Gln/Gln do gene *XRCC1* e Thr/Met do gene *XRCC3* foi associada com o maior número de aberrações cromossômicas (VASILEVA *et al.*, 2012).

Devido à escassez de trabalhos relacionando essas vias de reparação com o desenvolvimento da DPOC, nós buscamos outros marcadores envolvidos na reparação do DNA para esta doença. Estudos prévios mostraram que a inflamação persistente na DPOC leva para alta acetilação das histonas, resultando em incremento da transcrição de genes pró-inflamatórios, resistência aos esteroides, dano no DNA e instabilidade genômica (YAO & RAHMAN, 2012; RAHMAN *et al.*, 2012). Nesse sentido, a desacetilação das histonas (HDAC) pode apresentar um papel importante na regulação inflamatória, modificações na estrutura do DNA, senescência celular e resposta a danos no DNA. Da mesma forma, as Sirtuínas (SIRT1) desempenham um papel crucial na desacetilação das histonas em células de mamíferos, sugerindo que, em doenças como a DPOC, onde há uma diminuição na atividade de HDAC e SIRT também haverá diminuição na capacidade e especificidade do reparo de DNA (NEOFYTOU *et al.*, 2012).

#### 1.4 Ensaios de Biomonitoramento em Humanos

Em humanos, o sangue é uma excelente fonte de marcadores *in vivo e in vitro* de estresse oxidativo, uma vez que nele são transportados e redistribuídos antioxidantes e endobióticos modificados por ação de ERO (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Modificações em células sanguíneas resultam em um aumento da sua sensibilidade, permitindo o monitoramento e a detecção de dano no DNA através de metodologias específicas (COLLINS *et al.*, 2008)

Entre as diversas definições para monitoramento biológico, ou biomonitoramento, as mais completas são as que preveem uma aplicação epidemiológica, capazes de mensurar diariamente a espécie e a distribuição de elementos tóxicos na população. Nesse sentido, biomarcadores podem ser definidos como indicadores de eventos moleculares e celulares em sistemas biológicos que podem ajudar a esclarecer relações entre riscos ambientais e saúde humana e susceptibilidades individuais em processos patológicos (SIEMIATYCKI *et al.*, 2004; DUSINSKA & COLLINS, 2008). Os biomarcadores são classificados em três categorias, ou seja, biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de susceptibilidade (REPETTO & KUHN

REPETTO, 2009).

#### 1.4.1 Biomarcador de Exposição

Os biomarcadores de exposição são ferramentas importantes para medir a quantidade de substâncias químicas e/ou metabólitos em fluídos biológicos e medir uma alteração bioquímica precoce e reversível no organismo, podendo assim, indicar se houve ou não exposição e qual o seu grau. O ensaio cometa é um biomarcador de exposição que mostra uma medida de quebras de DNA reparáveis (LYNCH *et al.*, 2011).

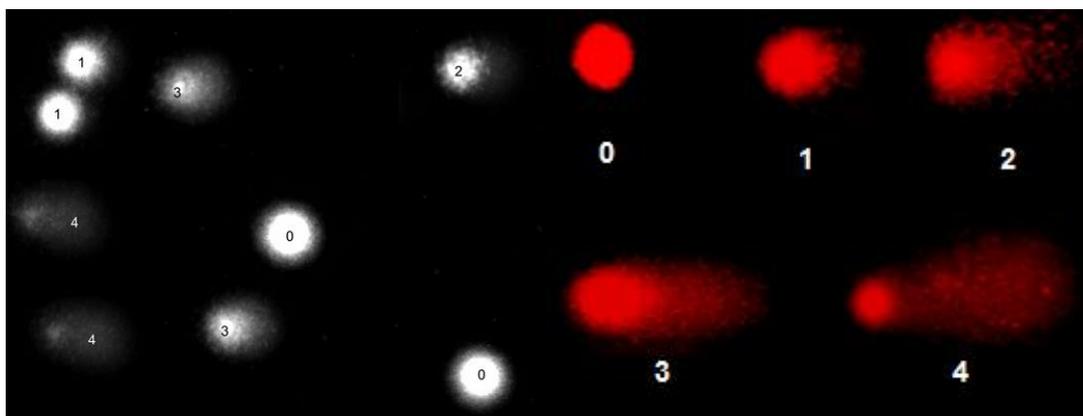
O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese de célula única em gel (SGCE), tornou-se uma ferramenta importante em estudos de biomonitoramento para avaliar a presença de danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes durante a exposição a xenobióticos. Como biomarcador, o ensaio cometa foi originalmente desenvolvido como uma técnica para determinar a presença de quebras simples na fita do DNA, sendo posteriormente adaptado para mensurar outros tipos de quebras e eventos (quebras duplas no DNA, sítios alcalilábeis, pontes entre as moléculas de DNA, entre proteínas e DNA e entre DNA e xenobióticos bem como eventos de reparo por excisão incompleta) (WU & JONES, 2012). É um teste que pode ser desenvolvido *in vitro* e apresenta como vantagem a sensibilidade, a rapidez, a simplicidade e o baixo custo, além de ser uma poderosa ferramenta para estudar fatores mutagênicos e carcinogênicos (COLLINS, 2004; COLLINS *et al.*, 2008).

Ao mesmo tempo, devido a sua simplicidade e sensibilidade na detecção de danos no DNA, o ensaio cometa tem sido muito utilizado em estudos de toxicogenética (NADIN *et al.*, 2001; WU & JONES, 2012). Esse ensaio ganhou rapidamente importância nos campos da genética toxicológica e biomonitoramento humano para quantificar danos no DNA, assim como capacidade de reparação de DNA de qualquer célula eucariótica (COLLINS *et al.*, 2008; DUSINSKA & COLLINS, 2008). Ressalta-se que embora seja possível detectar o dano, não é possível identificar com certeza qual o evento responsável pela lesão (COLLINS, 2004; COLLINS *et al.*, 2008; SAMOSHKIN *et al.*, 2012).

Dois protocolos estão disponíveis para a realização do teste, sendo que a principal diferença entre os dois é o tipo de lesão que é detectada. A versão alcalina é a mais utilizada, sendo que a eletroforese é feita em  $\text{pH} \geq 13$ , desnaturando o DNA, dessa forma podendo detectar quebras em fita simples, dupla, sítios alcalilábeis, *crosslinks*, sítios de reparação por excisão incompleta e

ligações cruzadas (DUSINSKA & COLLINS, 2008). Na versão neutra do teste, devido ao pH neutro, a molécula de DNA não é desnaturada completamente, preservando assim a estrutura em dupla fita, permitindo a detecção apenas de quebras duplas no DNA (COLLINS *et al.*, 2008).

Apesar da versão alcalina do teste ser mais ampla, ou seja, marcando diversos tipos de lesão, a versão neutra mostra-se mais específica e sensível tanto para quebras em fita dupla ou simples. Em ambas as versões, o ensaio cometa continua a ser altamente versátil e adaptável, sendo capaz de dar informação sobre os diferentes tipos de danos no DNA de uma célula e também sobre a capacidade da célula de reparar esse dano. O dano presente no DNA é medido pela extensão da migração de seus fragmentos, que forma uma cauda, daí o nome “cometa” (COLLINS *et al.*, 2008). A maneira pela qual os cometas são analisados não é crítica e tanto a análise visual (Figura 5) quanto à análise baseada em imagem computadorizada (Figura 6) dão resultados comparáveis.



**Figura 5. Escore Visual do Ensaio Cometa.** Exemplos dos escores visuais em linfócitos humanos. Os números nos cometas indicam tipo de dano no DNA avaliado visualmente (COLLINS *et al.*, 2008).

**Figura 6. Escore Computadorizado do Ensaio Cometa.** Exemplos dos escores computadorizados. Os números nos cometas indicam tipo de dano no DNA avaliado por programa computadorizado.

Os danos no DNA são avaliados conforme o tamanho da cauda, cujas classes variam de 0 (nenhum dano) a 4 (dano máximo), e o índice de dano é calculado de acordo com a equação:

$$\text{Índice de Dano no DNA} = [(n^\circ \text{ de cometas classe } 1 \times 1) + (n^\circ \text{ de cometas classe } 2 \times 2) + (n^\circ \text{ de cometas classe } 3 \times 3) + (n^\circ \text{ de cometas classe } 4 \times 4)]$$

Os ensaios de reparação de DNA foram recentemente aplicados para estudos de exposição a agentes ambientais e ocupacionais, podendo também ser aplicado para avaliar o mecanismo de reparação em diversas situações e trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de

lesão reparada. Os danos gerados no DNA quando não são corretamente reparados podem iniciar e promover a carcinogênese (COLLINS & AZQUETA, 2012).

Usando o teste do cometa, é possível mensurar dano induzido no DNA, em intervalos de tempos regulares e, assim, estudar a cinética de reparação do DNA (COLLINS & AZQUETA, 2012). Dentre os agentes utilizados para a indução de dano exógeno, estão o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o metilmetano sulfonato (MMS), ambos muito conhecidos e bem descritos na literatura (COLLINS *et al.*, 2008; DUSINSKA & COLLINS, 2008). O  $H_2O_2$  é um típico agente indutor de dano oxidativo no DNA, onde pela reação de Fenton gera radical hidroxila  $OH^\bullet$  levando a formação da 8-oxoguanina (BENHUSEIN *et al.*, 2010). O MMS é um agente alquilante do DNA, altamente tóxico, capaz de gerar quebras no DNA, quebras cromossômicas, formação de micronúcleos e morte celular (LEE *et al.*, 2007). O principal efeito do MMS é a metilação de bases no DNA, criando 7-desoxoguanina e 3-metil adenina, capaz de causar bases mal emparelhadas e o bloqueio da replicação do DNA (SILVA, ERDTMANN & HENRIQUES, 2003; LUNDIN *et al.*, 2005). Os danos no DNA causados por agente alquilante são predominantemente reparados por BER e quando estas vias de reparação estão comprometidas, a sensibilidade das células para o MMS aumenta significativamente (LUNDIN *et al.*, 2005; COLLINS & AZQUETA, 2012).

#### 1.4.2 Biomarcadores de Efeito

Biomarcadores de efeito podem ser caracterizados de forma simplificada como parâmetros de monitoramento biológico que refletem o impacto da interação com fatores ambientais danosos, risco para desenvolvimento e progressão de uma doença (CEBULSKA-WASILEWSKA, 2003). Dentre os exemplos de biomarcadores de efeito amplamente utilizados estão a detecção de micronúcleos (MN) de mucosa oral e peroxidação lipídica, foco desta revisão.

##### 1.4.2.1 Teste de Micronúcleos de Mucosa Oral

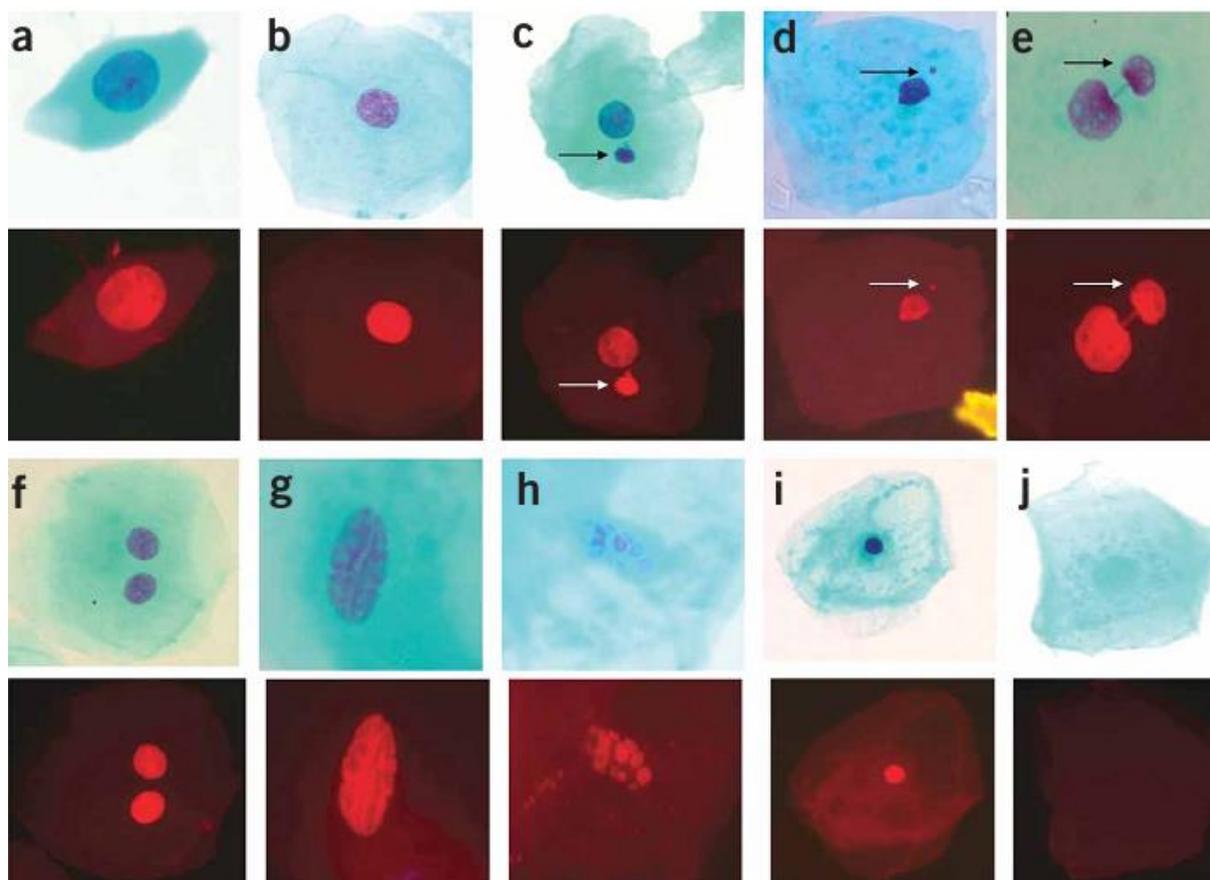
Devido a quebras sucessivas no DNA e/ou deficiências dos mecanismos de reparação podem ser gerados acúmulo de danos na molécula no DNA, do tipo quebra e/ou perda cromossômica (THOMAS *et al.*, 2011). Esses danos, chamados de micronúcleos, são formados durante a mitose, e aparecem nas células filhas em decorrência de danos induzidos na célula

parental. Dessa forma, os micronúcleos são pequenos núcleos que representam o material genético perdido pelo núcleo principal como consequência de um dano genético (Figura 7c). Ele pode ser causado por agentes químicos, físicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam introduzir a perda de material genético, sejam eles cromossomos inteiros ou fragmentos (FENECH, 2006; THOMAS *et al.*, 2009).

Os micronúcleos podem ser utilizados para monitorar ambientes através de testes em roedores, plantas, moluscos e peixes, sendo identificados em qualquer tipo de célula, tais como de medula óssea e de células epiteliais da boca (VILLELA *et al.*, 2003). O uso de células epiteliais da boca tem algumas vantagens de investigação, tais como analisar os mecanismos de regulação, as vias de sinalização e de modulação genética antes, durante e após uma terapia para um mesmo paciente. Com isso, análise não invasiva das células bucais oferece oportunidade clínica para o diagnóstico precoce e proporciona um modelo único para a pesquisa de mutação, a qual permite correlacionar às alterações genéticas com as alterações histopatológicas bem como investigar novas drogas farmacológicas (ALMEIDA *et al.*, 2012)

O teste de Micronúcleos (MN) de células de cavidade bucal apresenta várias vantagens: é simples, rápido, sensível, preciso, não invasivo, não necessita de células em metáfase, é confiável mesmo em células que tenham concluído apenas uma divisão celular e requer apenas equipamentos básicos. É considerado um biomarcador confiável e validado em estudos citogenéticos entre a população exposta ocupacionalmente, podendo ser também um preditivo de risco de câncer em populações humanas (CAVALLO *et al.*, 2005; FENECH, 2006; NERSESYAN *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2009; ROHR *et al.*, 2013).

Diferentes colorações podem ser utilizadas no teste de micronúcleos e as mesmas permitem a identificação de micronúcleos e outras anomalias celulares. A técnica de coloração de *Feulgen*, onde o DNA é corado em rosa, é a mais comumente empregada nos testes de micronúcleos. Essa coloração pode ainda ser associada à contra-coloração com *fast green* (GATTAS *et al.*, 2001; THOMAS *et al.*, 2009) o que aumenta o contraste entre o núcleo e o citoplasma (Figura7).



**Figura 7.** Imagem dos Tipos de Células Diferenciadas do BMCyt Ensaio, coradas com *Feulgen* e *Fast Green*. (a) Célula Basal; (b) Célula Diferenciada; (c) Célula Diferenciada precocemente com MN; (d) Célula Diferenciada tardiamente com MN; (e) Célula Diferenciada com Broto Nuclear; (f) Célula Binucleada; (g) Célula com Cromatina Condensada; (h) Célula Cariorrética; (i) Célula Picnótica; (j) Célula Cariolítica. No painel superior imagem de microscopia óptica e painel inferior microscopia de fluorescência (Adaptado de THOMAS *et al.*, 2009).

Anomalias nucleares e inter-relações possíveis entre os vários tipos de células, observadas e marcadas no teste de micronúcleos- ensaio de citoma de mucosa oral (BMCyt), proporciona uma oportunidade única para estudar a capacidade de regeneração do tecido epitelial (MIGLIORE *et al.*, 2011). O ensaio BMCyt pode ser usado como biomarcador para medir danos no DNA (MN e/ou brotos nucleares), defeitos na citocinese (células binucleadas), potencial de proliferação (a frequência de células basais) ou morte celular (cromatina condensada, cariorréticas, picnóticas e células cariolíticas) (HOLLAND *et al.*, 2011; MIGLIORE *et al.*, 2011). O BMCyt também mostra diferenças entre o envelhecimento normal (pró citocinese) em relação aquele em que o envelhecimento clínico é prematuro. Isso destaca o valor do potencial diagnóstico da abordagem do citoma para determinar eventos de instabilidade do genoma e do potencial regenerativo

(THOMAS *et al.*, 2009).

#### 1.4.2.2 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é um marcador de estresse oxidativo bastante conhecido e amplamente utilizado. Derivados da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, os hidroperóxidos lipídicos são extremamente instáveis, decompondo-se para formar uma série de compostos carbonílicos altamente reativos, dentre eles o malondialdeído (FRITZ & PETERSEN, 2011). O MDA é capaz de formar adutos na proporção de 1:2 com o ácido tiobarbitúrico, formando as chamadas espécies reativas de ácido tiobarbitúrico, que podem ser mensuradas tanto por espectrometria e fluorimetria, quanto por métodos cromatográficos (LYKKESFELDT, 2007). Embora apresente alguns problemas de especificidade, a avaliação da peroxidação lipídica através da quantificação dos produtos capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e malondealdeído (MDA), expressos na forma de TBARS, ainda é um método amplamente empregado. A diferença entre o estresse oxidativo fisiológico e patológico é frequentemente a ocorrência da peroxidação lipídica e de seus produtos tóxicos (GASPAROVIC *et al.*, 2013).

A peroxidação lipídica resulta em degradação oxidativa da membrana celular, com consequente alteração na estrutura e permeabilidade desta membrana. Sob condições patológicas, as proteínas estão sujeitas a uma variedade de modificações produzidas por ERO. Essas modificações oxidativas podem inativar as funções enzimáticas e causar a degeneração estrutural das proteínas ou ativar os fatores de transcrição e sistemas proteolíticos. Marcadores de estresse oxidativo e de danos no DNA são significativamente maiores em pacientes com DPOC, especialmente naqueles cujo fator causal é o tabagismo (CAVALCANTE & DE BRUIN, 2009; STANOJKOVIC *et al.*, 2011).

Como discutido, o estresse oxidativo tem papel central na patogênese da DPOC através de danos diretos no tracto respiratório, bem como através de exacerbação dos outros mecanismos envolvidos. Além disso, portadores de DPOC apresentam uma alta incidência de câncer de pulmão, e modificações induzidas no DNA por ERO pode ser o elo entre essas duas condições (NEOFYTOU *et al.*, 2012).

#### 1.4.3 Biomarcadores de Susceptibilidade

Um biomarcador de susceptibilidade, seja ela herdada ou induzida, é um indicador que um indivíduo é especialmente sensível ao efeito de um xenobiótico. A susceptibilidade individual a xenobióticos é modulada por diferenças na capacidade de metabolização/detoxificação e também pela eficiência nos diferentes sistemas de reparação do DNA. Estudos de polimorfismos genéticos envolvidos na cascata de eventos genotóxicos e/ou carcinogênicos podem fornecer informações úteis quanto ao papel da susceptibilidade genética individual e a sua relação com a exposição ambiental/ocupacional a xenobióticos (ROHR, 2008).

Os polimorfismos também são responsáveis pela diversidade humana (MORAES *et al.*, 2012). De outro modo, eles podem influenciar diretamente sobre fatores de risco associados a doenças comuns, como descritos em estudos envolvendo a estrutura genética das proteínas (ROCHA *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2009). É importante salientar que as frequências dos polimorfismos sofrem grande variação conforme a origem étnica da população estudada, por isso as comparações discutidas foram feitas apenas com a porção euro-descendente dos estudos.

Técnicas de biologia molecular tais como a Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR/RFLP), são utilizadas para investigar polimorfismos genéticos em associação com várias doenças (ROELOFS *et al.*, 2003; KAMIYA *et al.*, 2004; ZAHA *et al.*, 2012). É uma técnica simples, pela qual a molécula de DNA é amplificada milhares ou milhões de vezes, de uma forma bastante rápida. A PCR agregou uma melhoria significativa no diagnóstico e avaliação de susceptibilidade de várias doenças por ser uma técnica muito sensível, possibilitando a amplificação de DNA a partir de uma quantidade mínima de amostra (KAMIYA *et al.*, 2004; ALFONSO *et al.*, 2012; ZAHA *et al.*, 2012).

A análise do tamanho do fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism- RFLP*) do produto de PCR é uma técnica que explora variações de sequências homólogas de DNA, sendo utilizada em muitos laboratórios de diagnóstico por tratar-se de uma técnica simples e rápida (TROST *et al.*, 2004). É considerada uma ferramenta útil no mapeamento do genoma, na localização de polimorfismos para doenças genéticas, na determinação de risco para a doença e testes de paternidade (SOUSA *et al.*, 2003; ZAHA *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos utilizando os biomarcadores de susceptibilidade revelam que 90% da DPOC são de origem tabágica, mas, somente entre 15 e 20% dos fumantes é que desenvolvem a doença. Isso acontece porque há considerável variabilidade na susceptibilidade de fumantes desenvolverem a doença (HEGAB *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2009; YOUNG *et al.*, 2011). A

DPOC, apesar de ser uma clássica doença de interação entre fatores genéticos e ambientais, os fatores de risco genético para o seu desenvolvimento ainda são pouco conhecidos. Entretanto, vários polimorfismos genéticos em genes de estresse oxidativo e de resposta inflamatória têm sido reportados como sendo associados à DPOC (MINEMATSU *et al.* 2003; GRESNER *et al.*, 2007; VIBHUTI *et al.*, 2010; CHO *et al.*, 2012). Na última década, polimorfismos em genes que codificam proteínas pertencentes à maquinaria de reparação, tais como *XRCC1* (Arg194Trp), *XRCC1* (Arg399Gln), *XRCC3* (Thr241Met), *XRCC4* (Ile401Thr), *XPB* (Ile199Met e Asp312Asn), *OGG1* (Ser326Cys) e *RAD51* (Gly135Cys), também tem sido alvo de estudos relativos à DPOC e câncer de pulmão (WU *et al.*, 2002; YIN *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2009).

Estudar a reparação do DNA e suas respectivas vias como forma de biomonitoramento em humanos estão em crescente popularidade. Isto reflete o emprego relativamente recente do entendimento das vias de reparação do DNA na manutenção da integridade genômica e prevenção de carcinogênese (COLLINS & FERGUSON, 2012).

## **OBJETIVOS**

## 2. Objetivo Geral

Estudar a população com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica-DPOC pela avaliação e quantificação de danos oxidativos e capacidade de reparação de DNA, bem como a relevância e o papel de polimorfismos genéticos em genes de reparação do DNA sobre o nível de dano no DNA.

### 2.1 Objetivos Específicos:

- Quantificar em sangue periférico dos portadores de DPOC e sujeitos controles os danos recentes no DNA;
- Avaliar a susceptibilidade ao dano e capacidade de reparação do DNA, após tratamento com agente alquilante metilmetano sulfonato (MMS), dos portadores de DPOC e sujeitos controles;
- Quantificar danos permanentes no DNA em células de mucosa oral dos portadores de DPOC e sujeitos controles;
- Quantificar os níveis de dano lipídico em membrana celular dos portadores de DPOC e controles;
- Identificar a presença de polimorfismos em genes de reparação de dano no DNA [Reparo por Excisão de Bases- *XRCC1*(Arg399Gln) e *OGG1*(Ser326Cys); Recombinação Homóloga- *XRCC3*(Thr241Met); Recombinação Não-Homóloga- *XRCC4*(Ile401Thr)] nos portadores de DPOC e sujeitos controles;
- Avaliar a influência de polimorfismos genéticos em genes de reparação *XRCC1* (Arg399Gln), *OGG1* (Ser326Cys), *XRCC3* (Thr241Met) e *XRCC4* (Ile401Thr) na modulação dos níveis de dano no DNA e evolução da doença nos portadores de DPOC.

## **CAPÍTULO I**

DNA damage and oxidative stress in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

Submitted in: The Open Biomarkers Journal.

## DNA damage and oxidative stress in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

### Short Title: DNA damage in COPD

Andréa Lúcia G da Silva<sup>a,b\*</sup>, Helen T da Rosa<sup>c</sup>, Clara F Charlier<sup>b</sup>, Miriam Salvador<sup>d</sup>, Dinara J Moura<sup>e,f</sup>, Andreia R de Moura Valim<sup>e</sup>, Temenouga N Guecheva<sup>b,g</sup> and João Antônio Pegas Henriques<sup>b,d,g</sup>

<sup>a</sup> Department of Health and Physical Education, University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brazil;

<sup>b</sup> Cellular and Molecular Biology Program, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil;

<sup>c</sup> Scientific Initiation of University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brazil;

<sup>d</sup> Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul/RS, Brazil;

<sup>e</sup> Department of Biology and Pharmacy, University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brazil;

<sup>f</sup> Laboratory of Genetic Toxicology – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre - UFCSPA, Porto Alegre/RS, Brazil;

<sup>g</sup> Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil.

\*Corresponding author. Phone.: +55 51 37177374; fax: +55 51 37171855.

E-mail address: andrea@unisc.br (**Andréa Lúcia G da Silva**).

Address: Avenida Independência, 2293, Bloco 42, Bairro Universitário, Santa Cruz do Sul/RS-Brasil.

**Background:** We aimed to assess the level of DNA damage and susceptibility to exogenous mutagens in peripheral blood cells of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) patients and healthy individuals by comet assay. Oxidative stress was also evaluated by means of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in blood plasma. **Methods:** Case-control study enrolling 51 COPD patients and 51 controls. Peripheral blood was used to perform the alkaline (pH>13) and neutral (pH=8.5) comet assay. For the assessment of susceptibility to exogenous DNA damage, the cells were treated with methylmethane sulfonate (MMS) for 1-hour or 3-hour at 37° C. The percentage of residual DNA damage after 3-h MMS treatment was calculated using the value of 1-h MMS treatment for each subject as 100%. Lipid peroxidation was evaluated by measuring TBARS in blood plasma. **Results:** DNA damage in patients was significantly higher than in controls as measured by the neutral and alkaline comet assay. Residual DNA damage detected after MMS treatment increased in patients, in contrast to controls, indicating higher susceptibility to alkylation damage and/or repair inhibition. High susceptibility to exogenous DNA damage in COPD patients correlates with high amount of TBARS and low forced vital capacity and expiratory volume. **Conclusion:** The positive correlation between increased susceptibility to exogenous DNA damage and TBARS levels in COPD patients suggests the possible involvement of oxidative stress in damage induction and/or repair inhibition.

**Keywords:** COPD, DNA damage, repair, comet assay, lipid peroxidation.

**Support:** PRONEX-FAPERGS/CNPq number 10/0044-3, Santa Cruz Hospital and Research Group Health Rehabilitation and its Interfaces, University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS.

## 1. Introduction

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a major cause of morbidity and mortality in countries with different levels of economic development, with smoking being recognized as the most important causative factor [1,2]. According to the World Health Organization (WHO) estimation, 80 million people in the world have moderate to severe COPD. It is estimated that in 2020 COPD will become the third leading cause of death worldwide [2].

COPD is currently defined as a disease preventable and treatable disease characterized by airflow limitation, resulting from an abnormal inflammatory reaction to inhaled particles (smoking) and associated with co-morbidities [2]. The pathology of COPD is multifactorial and results in significant systemic consequences, often including systemic inflammation and oxidative stress [3,4]. The formation of reactive oxygen species (ROS) by the cigarette smoke and inflammatory cells, generated in the pulmonary epithelial tissue, has been associated with slowly progressive and irreversible decrease in forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>), loss of muscle mass and muscle dysfunction [4,5]. The abnormal inflammatory response that causes these patterns of injury has already to be fully characterized, and it is likely that there are multiple pathways leading to impaired lung function [5]. Cigarette smoking provides the initial stimulus, which recruits inflammatory cells into the lung parenchyma increasing the inflammatory process and probably modulating some of the systemic effects of COPD [5,6,7]. Additionally, there is some evidence suggesting that the DNA damage/repair imbalance may contribute to increased risk of lung carcinoma in COPD [8,9].

Some of the many different compounds in cigarette smoke can react directly with cellular components to form radicals, while other procarcinogen substances must be activated to produce single- and double strand breaks into DNA [7,10]. However, only a small number of smokers are diagnosed with clinically relevant COPD, suggesting that COPD is the result of host-environmental interaction, most probably genetically predetermined [11]. Some studies have reported markedly increased DNA damage levels in COPD patients that correlate with the smoking status [9,12,13]. The cellular processes of DNA damage induction and repair are fundamental for the maintenance of genome integrity, and the modulation of these processes can dramatically increase individual susceptibility to cancer [14]. The cellular and molecular mechanisms that facilitate the progression toward the disease or its evasion are unknown [11].

Comet assay has been used in various studies to investigate the effect of ROS on DNA because it is a rapid, simple and sensitive technique for measuring DNA breaks and repair in single cells in connection with various diseases [15,16,17]. The present study was therefore designed to assess the level of DNA damage and the susceptibility to exogenous mutagens in peripheral blood cells of COPD patients and healthy individuals, evaluated by comet assay. The oxidative stress was also evaluated by means of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in blood plasma.

## 2. Materials and methods

Fifty-one COPD patients, with a mean age of 65.33±8.91 years, treated at Santa Cruz Hospital by the Research Group for Health Rehabilitation, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil were included in this study. COPD was diagnosed according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease guidelines-GOLD [2], using clinical history, physical examination, and presence of airflow obstruction, defined as a ratio of forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>) to forced vital capacity (FVC) less than 70% of predicted value. The patients were grouped in relation to COPD stage as mild (8), moderate (16), severe (16) or very severe (11) and pharmacologic therapy [2]. The COPD patients were matched by gender, age and body mass index

(BMI) with 51 control individuals without pulmonary disease. The study protocol was approved by the Ethics Committee of UNISC, protocol number 2011/08. All individuals answered the personal health questionnaire and signed informed consent before the interview. Peripheral blood samples were collected from patients and control individuals at rest early in the morning.

### 2.1 Obtaining sample

The peripheral blood (10mL) samples were collected early in the morning from fasted COPD patients and controls into two tubes with EDTA, being one aliquot for the comet assay and the other aliquot to obtain blood plasma.

### 2.2 DNA damage evaluation by comet assay

The comet assay was performed under alkaline and neutral conditions according to the procedure of Singh and coworkers [18,19]. Aliquots of 10  $\mu$ l freshly collected whole blood were mixed with 90  $\mu$ l low melting (LMP) agarose (0.7% in PBS) and added to microscope slides pre-coated with 1.5% agarose. The slides were then incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 20 mM NaOH, pH 10.2, 1% Triton X-100 and 10% DMSO). After 24 h at 4°C, the slides were removed from the lysis solution and placed in an electrophoresis unit filled with fresh electrophoresis buffer at 4°C. In the alkaline version of Comet assay (10 M NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13), 20 min of denaturation and 15 min electrophoresis time were used. For the neutral condition (3 M sodium acetate, 1 M Tris, pH=8.5), the denaturation time of 1 h and electrophoresis time of 1 h were used. In both versions of the comet assay, after electrophoresis, the slides were neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5) and washed in water. The samples were subjected to electrophoresis at the different batches and reference standards (positive/negative controls with known levels of damage) were included in each electrophoresis run. The slides were left to dry overnight at room temperature, then fixed and stained with silver nitrate in accordance to Nadin et al. [20]. For DNA damage evaluation, 100 cells per individual (50 cells from two coded slides) were analyzed blindly under optical microscopy at 100  $\times$  magnification. The cells were visually scored by measuring the DNA migration length and the amount of DNA in the tail into five classes, from undamaged – 0, to maximally damaged – 4, and a damage index (DI) value, which is an arbitrary score, was calculated for each sample [21]. International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method [22,23]. Damage index thus ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells  $\times$  0) to 400 (with maximum damage: 100 cells  $\times$  4).

### 2.3 Comet assay to assess the susceptibility to exogenous DNA damage

For the assessment of susceptibility to exogenous DNA damage, whole blood cells were treated with methylmethane sulfonate (MMS;  $8 \times 10^{-5}$  M) for 1 h or 3 h at 37°C prior to slide preparation, and proceeded up the steps of the alkaline comet assay as described above. The percentage of residual DNA damage after 3-h MMS treatment was calculated using the value of 1-h MMS treatment for each subject as 100%.

### 2.4 Lipid peroxidation

Lipid damages were monitored by the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction, which has been widely adopted as a sensitive method for measuring lipid peroxidation. First, 1000  $\mu$ L of 5% trichloroacetic acid were added to 250  $\mu$ L of supernatants and centrifuged at 7000 g for 10 min. Then 1000  $\mu$ L of sulfuric acid (3M) were mixed with 1000  $\mu$ L of thiobarbituric acid solution. The reaction mixture was incubated in a boiling water bath for 15 minutes and cooled to room temperature. Then 3500  $\mu$ L of n-butanol

was added and centrifuged at 7000 g for 5 minutes. The absorbance was read at 532 nm [24]. Results were expressed as nmol/g of protein. Total protein levels were evaluated using the Biureto Total Proteins kit from Labtest (Labtest Diagnostica S.A., Brazil).

### 2.5 Statistical analysis

The statistical analyses were performed using the Statistical Package SPSS 17.0 and  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant. The data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Categorical variables were compared using  $\chi^2$  tests. Differences between values for control individuals and COPD patients were assessed using Mann-Whitney Test. The comparison among multiple groups was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey's multiple comparison tests. The correlations between the parameters studied were evaluated by Spearman's test.

### 3. Results

The general characteristics of COPD patients and control group are shown in Table 1. The COPD patients and matched controls were similar in terms of age, gender, ethnicity, BMI and comorbidities, but differed regarding smoking status, number of cigarettes smoked per year and smoking duration was higher in COPD patients.

**Table 1 General and clinical characteristic in the COPD patients and control group.**

	COPD (n)	Control (n)	p value for Mann-Whitney test
Subjects	51	51	-
Age (years) <sup>a</sup>	65.33 $\pm$ 8.91	63.61 $\pm$ 9.40	>0.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	25.75 $\pm$ 5.71	26.82 $\pm$ 3.89	>0.05
Gender (male)	30	28	>0.05
Ethnicity (white)	45	50	>0.05
Smoking Status			
Never/ Former/ Current	5/ 34/ 12	22/ 25/ 4	$\chi^2$ 0.000
Cigarettes-year <sup>b</sup>			
Current smoking	8059 (3650-14600)	7026 (3650-10950)	>0.05
Former smoking	10490 (1095-25550)	5621 (1095- 14600)	0.003
Smoking Duration			
>30 years	36	9	$\chi^2$ 0.000
Comorbidities			
SAH	14	11	-
Heart disease	9	2	-
Diabetes	7	1	-
COPD Status <sup>c</sup>			
Mild	8	-	-
Moderate	16	-	-
Severe	16	-	-
Very Severe	11	-	-
Pharmacologic Therapy			
Bronchodilators	48	-	-
Inhaled Corticosteroids	32	-	-
Oral Cortiscoteroids	3	-	-

Combination Therapy<sup>d</sup> 35

n, sample number; <sup>a</sup>Data are presented as mean  $\pm$  SD; <sup>b</sup>Median (minimum-maximum); BMI, Body Mass Index; SAH, Systemic Arterial Hypertension; <sup>c</sup> COPD Status by GOLD [2]; <sup>d</sup> Combination Therapy: Inhaled Corticosteriodes + Bronchodilators drugs.

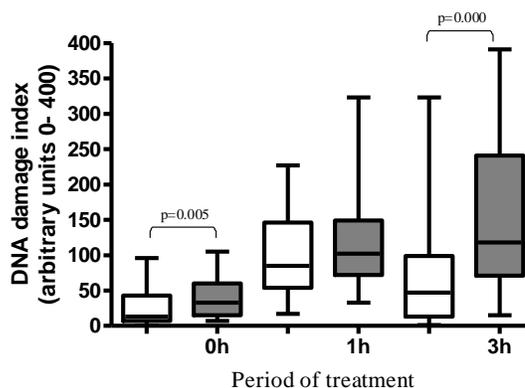
The pulmonary function and comet assay results are shown in Table 2. The damage index (DI) in the alkaline comet assay (detects single- and double-DNA strand breaks and alkali-labile sites) and in the neutral comet assay (detects double breaks) was significantly elevated in COPD patients in relation to the control group.

**Table 2 Pulmonary function, biochemical parameters and comet assay results in the COPD patients and control group.**

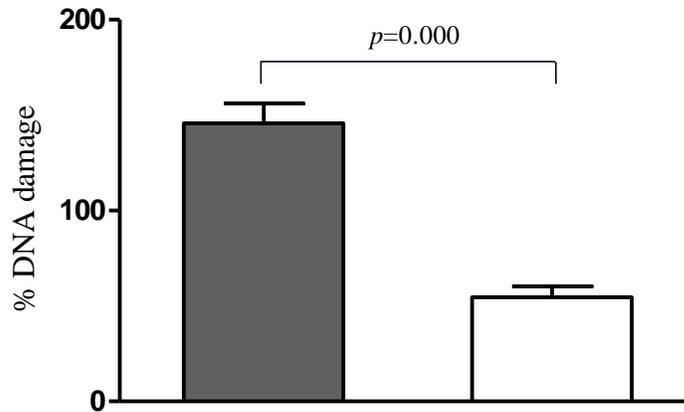
Characteristics	COPD (n=51)	Control (n=51)	<i>p</i> Mann-Whitney
FEV <sub>1</sub> (% predicted)	42.90 $\pm$ 19.03	86.14 $\pm$ 11.72	0.000
FVC (% predicted)	62.20 $\pm$ 18.28	90.75 $\pm$ 13.67	0.000
FEV <sub>1</sub> /FVC (% predicted)	67.92 $\pm$ 19.58	105.24 $\pm$ 70.28	0.000
TBARS (nmol/mg of protein) <sup>a</sup>	10.41 $\pm$ 5.01	9.16 $\pm$ 4.26	<i>p</i> >0.05
Damage Index - Alkaline Comet Assay	36.71 $\pm$ 25.41	26.65 $\pm$ 27.96	0.005
Damage Index - Neutral Comet Assay	47.53 $\pm$ 32.45	37.49 $\pm$ 38.05	0.047

Data are presented as mean  $\pm$  SD; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; <sup>a</sup> Data for 49 COPD patients and 50 controls.

The susceptibility to MMS-induced ( $8 \times 10^{-5}$  M) DNA damage was measured after 1-h or 3-h of treatment. As shown in Fig. 1, the DNA damage index in the control group increased after 1 h of MMS treatment, and slightly decreased after 3 h, whereas DNA damage in COPD patients remained elevated following 3-h MMS treatment. To investigate these differences, we calculated the changes in DI after 3-h treatment in relation to the 1-h DI value for each person. This parameter, called residual DNA damage, showed that the DNA damage detected after 3-h treatment in controls decreased in relation to the 1-h value (Fig. 2), which could indicate repair process initiation. In contrast, the residual DNA damage in patients further increased, indicating higher susceptibility to alkylation damage.

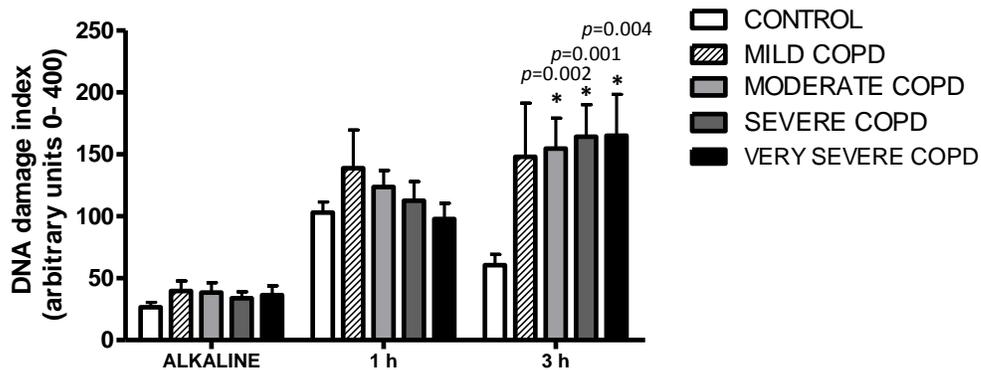


**Fig.1.** Susceptibility to DNA damage after 1-h and 3-h of MMS ( $8 \times 10^{-5}$  M) treatment in blood of COPD patients and healthy controls. Baseline damage (0h) in blood samples was estimated by means of alkaline comet assay without MMS. Data are presented as mean  $\pm$  SD, controls—white bars, patients—gray bars. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.



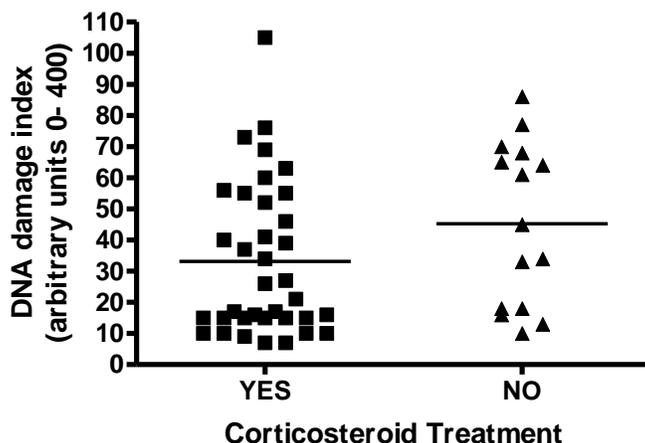
**Fig. 2.** Residual DNA damage in blood cells of COPD patients and healthy controls following 3-h MMS treatment. The percentage of residual DNA damage after 3-h MMS treatment was calculated taking the value of 1-h MMS treatment for each subject as 100%. Data are presented as mean  $\pm$  SD; controls—white bars, patients—black bars. Statistical analysis was performed by Mann–Whitney U-test.

The DNA damage index was compared between patients grouped according to the COPD severity as defined by GOLD [2] (Fig. 3) and corticosteroids drugs currently (Fig. 4). The values of DNA damage after 3-h MMS treatment for patients with moderate, severe and very severe COPD were significantly higher than in the control group. However, no difference was observed between the different groups of patients with COPD.



**Fig. 3.** DNA damage index in alkaline Comet assay after 1-h or 3-h MMS treatment in patients grouped according to the COPD severity. Data are presented as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

The mean DI in patients treated with corticosteroids, which decrease the inflammation process, was also slightly lower (Fig. 4).



**Fig.4.** Damage Index in alkaline Comet assay in blood of COPD patients treated or not with corticosteroids. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney Test,  $p=0.077$ .

Table 3 shows the correlations between the parameters studied in patients and controls. In COPD patients, the basal DNA damage in comet assay correlated negatively with TBARS and the percentage of residual damage, in contrast to the control individuals that presented a positive correlation. Disease indicators  $FEV_1$  and FVC correlated negatively with the percentage of residual DNA damage, suggesting that patients with more severe COPD presented higher increment in DNA damage following 3-h MMS treatment. The basal DI in the alkaline and neutral comet assay in COPD patients correlated positively with FVC, suggesting that patients with severe and very severe COPD presented lower basal damage. Moreover, the DI after 3-h MMS treatment in patients correlated positively with TBARS, indicating that the enhanced susceptibility and/or repair inhibition could be related to oxidative stress.

**Table 3 Correlations between the parameters analyzed in patients and controls.**

Parameters	COPD		CONTROLS	
	Spearman's rho	<i>p</i> value	Spearman's rho	<i>p</i> value
FVC- basal DI in neutral comet assay	0.283	0.045		
FVC- basal DI in alkaline comet assay	0.386	0.005		
DI following 3h MMS treatment – TBARS	0.329	0.021		
TBARS- basal DI in alkaline comet assay	-0.356	0.012		
% Residual damage- basal DI in alkaline comet assay	-0.324	0.020		
% Residual damage- FEV <sub>1</sub>	-0.279	0.047		
% Residual damage- FVC	-0.301	0.032		
FEV <sub>1</sub> - basal DI in neutral comet assay			-0.296	0.035
FEV <sub>1</sub> - basal DI in alkaline comet assay			-0.305	0.030
DI following 1h MMS treatment – smoking cigarettes-year			0.472	0.010
TBARS- basal DI in neutral comet assay			0.292	0.039
% Residual damage- basal DI in alkaline comet assay			0.413	0.003
% Residual damage- smoking cessation time			-0.405	0.045

FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; DI – damage index; % Residual damage - calculated for DI after 3h MMS treatment for each subject taking the value of DI after 1h MMS treatment as 100%.

In the control group, FEV<sub>1</sub> correlated negatively with DI (alkaline and neutral Comet assay) and the susceptibility to DNA damage induction (1-h MMS treatment) correlated positively with smoking (cigarettes-year). Moreover, the percentage of residual damage correlated negatively with the smoking cessation time.

#### 4. Discussion

Oxidative damage to DNA can have a great impact on human health, considering the growing recognition that such damage may both initiate and promote carcinogenesis. The pathogenesis of COPD leads to an increase in the oxidative burst in lungs and evidence suggests that this increase is implicated in pathogenic processes, such as damage to pulmonary cells, mucus hypersecretion, antiprotease inactivation and exacerbation of lung inflammation [2]. Recently, it has been suggested that the oxidative stress may extend beyond the lung to generate the systemic manifestation of COPD [13]. Our results, detecting increased DNA damage in COPD patients (Table 2), are in agreement with those by Ceylan et al. [12], who observed through the alkaline comet assay markedly increased levels of oxidative stress and DNA damage in peripheral blood cells of such patients. The authors have also found that the increase in DNA damage correlates with the use of biomass fuel for cooking and the smoking status. However, in our study, correlation between DNA damage with number of cigarettes smoked per year and smoking cessation time was observed only in the control group (Table 3). The studies about

smoker-induced DNA damage are contradictory and show that there is no difference between smokers and nonsmokers [25,26]. Others studies report unexpected negative results [27] and sometime smokers present lower DNA damage than non- smokers [28]. A few cigarettes per day may stimulate an adaptive response and a continued exposure to mutagens/carcinogens may induce resistance to further DNA damage [29]. More important is the cumulative smoking exposure [25] so we stratified our sample in heavy smokers (i.e  $\geq 30$  cigarettes per day) e light smokers (i.e  $< 30$  cigarettes per day) e non-smokers. Our results were equal to literature no significant difference was found among heavy smokers, only between non-smokers and light smokers (i.e COPD showed higher DNA damage).

The relatively high basal DNA damage detected in our study for both patients and controls, which can be attributed to advanced age, presence of comorbidities in both groups, and current use of antihypertensive drugs. The high standard deviations for the DNA damage values in the comet assay found could reflect the great genetic heterogeneity of the groups. It is a critical aspect in human biomonitoring studies associated to physiological state and life style [13]. DNA damage and DNA repair seem to be closely associated with aging as a result of endogenous factors, lifestyle, occupational or environmental exposure [30]. Some atherosclerosis-related diseases, whose pathogenesis involves both inflammation and oxidative stress, lead to DNA-damage induction [31] and could explain the higher basal DNA damage found in our study in patients and in matched controls [32].

In our study, an enhanced susceptibility to the alkylating agent MMS that induced DNA damage was observed in COPD patients (Figure 1), especially in moderate, severe and very severe COPD (Figure3). The residual DNA damage caused by MMS treatment further increased in COPD patients, indicating the induction of persistent DNA damage, which could reflect DNA repair inhibition (Figure 2). In the control group the induced DNA damage was transient probably due to induction of DNA repair mechanism.

Furthermore, the DI after 3-h MMS treatment positively correlates with the amount of TBARS in COPD patients, indicating that increased oxidative damage could be responsible for the elevated susceptibility to exogenous DNA damage. On the other hand, the increased DI could result from DNA damage accumulation as a result of delayed DNA repair process. Moreover, the observed negative correlation between the percentage of residual damage and basal DNA damage in patients (i.e. higher susceptibility to exogenous DNA damage, correlated with lower basal damage), which contrasts with the positive one observed in controls, could be attributed to DNA metabolism inhibition at toxic conditions. As the comet assay, in addition to the direct strand breaks in DNA, also detects strand breaks formed as intermediates during the DNA repair process, low basal DNA damage could indicate cell toxicity (i.e. chronic oxidative stress), leading to decrease in genotoxicity. Such a decrease in basal DNA damage in lymphocytes of patients with breast cancer (lower than in controls) was associated with repair inhibition and possible elimination of highly damaged cells by apoptosis [14]. It is important to point out that an increased apoptosis in COPD patients has been reported, which persists even after smoking cessation [33,34,35]. The reduced repair capacity among cancer patients and their relatives shows that such capacity can be genetically determined [36,37]. Moreover, cancer patients treated with irradiation only those with DNA repair defect developing secondary thyroid tumors [38]. Alternatively, DNA repair inhibition can be attributed to modulated repair signaling and/or inactivation of repair enzymes as a result of altered intracellular redox status by persistent inflammatory processes [9,14].

Inhaled corticosteroids are frequently used in moderate to severe COPD, in order to interrupt the inflammatory pathways and have shown to decrease the number of exacerbations and improve quality of life [2,39]. Glucocorticosteroids may have direct effects on oxidative

stress by decreasing the number and/or activity of cells involved in ROS production such as the number of neutrophils in COPD [40]. On the other hand, it has been shown that the administration of inhaled or intravenous corticosteroids in stable COPD patient can suppress the ROS generation during treatment and decrease the DNA damage [41,42]. Our results also showed a decrease, although not significant, in the basal DNA damage in patients treated with corticosteroids (Fig. 4).

In conclusion, our results showed that COPD patients presented significantly elevated basal DNA damage in peripheral blood cells, as detected by the comet assay, in relation to the control group. COPD patients were also more susceptible to exogenous DNA damage induction by MMS treatment. Moreover, the increased susceptibility in these patients positively correlated with the amount of TBARS suggesting the involvement of altered redox balance in the DNA damage accumulation, and probably in the etiology and pathogenesis of COPD. The evaluation of susceptibility to exogenous genotoxic agents in COPD patients, as detected by comet assay, could be useful as biomarker of the disease progression, considering the correlation found between this parameter and FVC and FEV<sub>1</sub>.

### Acknowledgments

The authors would like to thank all volunteers who participated in this study and the Biotechnology and Genetics Laboratory - UNISC. This work was supported by the Brazilian Agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- [1] Laniado-Laborín R. Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Parallel Epidemics of the 21st Century. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009; 6: 209-224.
- [2] Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2010.
- [3] Tzortzaki EG. Dimakou K. Neofytou E. *et al.* Oxidative DNA Damage and Somatic Mutations. *Chest* 2012; 141(5):1243-1250.
- [4] Verhage TL. Heijdra YF. Molema J. Daudey L. Dekhuijzen R. Vercoulen JH. Adequate Patient Characterization in COPD: Reasons to Go Beyond GOLD Classification. *Open Respir Med J.*, 2009; 3:1-9.
- [5] Gladysheva ES. Malhotra A. Owens RL. Influencing the decline of lung function in COPD: use of pharmacotherapy. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2010; 5:153-164.
- [6] Chung KF. Marwick JA. Molecular mechanisms of oxidative stress in airways and lungs with reference to asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1203:85-91.
- [7] Hoffmann H. Isner C. Högel J. Speit G. Genetic polymorphisms and the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutagenesis* 2005; 5:359-364.
- [8] Caramori G. Adcock IM. Casolari P. Unbalanced oxidant-induced DNA damage and repair in COPD: a link towards lung cancer. *Thorax* 2011 ; 66:521-7.
- [9] Repine JE. Bast A. Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 341-57.
- [10] Koshiol J. Rotunno M. Consonni D. *et al.* Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Altered Risk of Lung Cancer in a Population-Based Case-Control Study. *PLoS ONE* 2009;

- 4:7380.
- [11] Tonello A. Poli G. Rethinking chronic obstructive pulmonary disease. *Med Hypotheses* 2011; 76:358–360.
- [12] Ceylan E. Kocyigit A. Gencer M. Aksoy N. Selek S. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respir Med* 2006; 100:1270–1276.
- [13] Maluf SW. Mergener M. Dalcanale L. *et al.* DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutat Res* 2007; 626:180–184.
- [14] Agnoletto, MH. Guecheva TN. Dondé F. *et al.* Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. *Clin Biochem* 2007; 40:1252–1258.
- [15] Collins AR. Harrington V. Repair of oxidative DNA damage: assessing its contribution to cancer prevention. *Mutagenesis* 2002; 17:489–93.
- [16] Blasiak J. Arabski M. Krupa R. *et al.* Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat Res* 2004; 554:39–148.
- [17] Mutlu-Türkođlu Ü. Akalýn Z. Ýlhan E. *et al.* Increased plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 2005; 38:1059–65.
- [18] Singh NP. McCoy T. Tice RR. Schneider EL. A simple technique for of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175:184–91.
- [19] McKenna DJ. McKeown SR. McKelwey-Martin VJ. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis* 2008; 3: 183–190.
- [20] Nadin, SB. Vargas-Roig. LM. Ciocca, D. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 2001; 49:1183–1186.
- [21] Maluf SW. Erdtmann B. Follow-up study of genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 2000; 471:21–27.
- [22] Tice RR. Agurell E. Anderson, D. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35:206–221.
- [23] Collins AR. Oscoz AA. Brunborg G. *et al.* The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008; 23(3):143-151.
- [24] Wills ED. Mechanism of lipid peroxidation formation in animal tissues. *Biochem. J* 1966; 3:667-676.
- [25] Casella M. Miniati M. Monti S. Minichilli F. Bianchi F. Simi S. No evidence of chromosome damage in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutagenesis* 2006 21(2):167-171.
- [26] DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res* 2004 567(2-3):447-474.
- [27] Speit G. Witton-Davies T. Heepchantree W. *et al.* Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat Res* 2003 542(1-2):33-42.
- [28] Barale R. Chelotti L. Davini T. *et al.* Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen* 1998 31(3):228-242.
- [29] Bonassi S. Neri M. Lando C. *et al.* Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res* 2003 543(2):155-166.
- [30] Mergener M. Martins MR. Antunes MV. *et al.* Oxidative stress and DNA damage in older adults that do exercises regularly. *Clin Biochem* 2009; 42:1648–1653.

- [31] Zhou F. Onizawa S. Nagai A. Aoshiha K. Epithelial cell senescence impairs repair process and exacerbates inflammation after airway injury. *Resp Res* 2011; 12:78.
- [32] Subash, P. Premagurumurthy K. Sarasabharathi A. Cherian KM. Total antioxidant status and oxidative DNA damage in South Indian population of essential hypertensives. *J Hum Hypertens* 2010; 24:475-482.
- [33] Demedts IK. Demoor T. Bracke KR. Joos GF. Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res* 2006; 7-53.
- [34] Adcock IM. Caramori G. Barnes PJ. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: New Molecular Insights. *Respiration* 2011; 81: 265–284.
- [35] Rennard SI. Togo S. Holz O. Cigarette Smoke Inhibits Alveolar Repair A Mechanism for the Development of Emphysema. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 703–708.
- [36] Rajaei-Behbahani N. Schmezer P. Risch A. *et al.* Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2001; 95:86–91.
- [37] Gackowski D. Kowalewski J. Siomek A. Olinski R. Oxidative DNA damage and antioxidant vitamin level: comparison among lung cancer patients, healthy smokers and nonsmokers. *Int J Cancer* 2005; 114:153-6.
- [38] Leprat F. Alapetite C. Rosselli F. *et al.* Impaired DNA repair as assessed by the comet assay in patients with thyroid tumors after a history of radiation therapy: a preliminary study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998 40(5):1019-1026.
- [39] Tonello A. Poli G. Rethinking chronic obstructive pulmonary disease. *Med Hypotheses* 2011; 76:358–360.
- [40] Sadowska AM. Klebe B. Germonpré P. Backer WA. Glucocorticosteroids as antioxidants in treatment of asthma and COPD New application for an old medication? *Steroids* 2007;72: 1–6.
- [41] Antoniu SA. Effects of inhaled therapy on biomarkers of systemic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers* 2010; 15:97-103.
- [42] Stolarek R. Bialasiewicz P. Krol M. Nowak D. Breath analysis of hydrogen peroxide as a diagnostic tool. *Clin Chim Acta* 2010;14:1849-61.

## **CAPÍTULO II**

Effect of physical exercise on the level of DNA damage in Chronic Obstructive Pulmonary  
Disease patients.

Accepted in 2013-01-04(In Press): ISRN Pulmonology Journal

## Effect of physical exercise on the level of DNA damage in Chronic Obstructive Pulmonary Disease patients

\* Andréa Lúcia G da Silva<sup>a,b</sup>, Helen T da Rosa<sup>c</sup>, Eduarda Bender<sup>c</sup>, Paulo Ricardo da Rosa<sup>c</sup>, Mirian Salvador<sup>d</sup>, Clara F Charlier<sup>b</sup>, Dinara de Moura<sup>e,f</sup>, Andréia R de Moura Valim<sup>e</sup>, Temenouga N Guecheva<sup>b,g</sup> and João Antônio Pegas Henriques<sup>b,d,g</sup>

<sup>a</sup> Department of Health and Physical Education, University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brazil;

<sup>b</sup> Cellular and Molecular Biology Program, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil;

<sup>c</sup> Scientific Initiation of University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brazil;

<sup>d</sup> Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul/RS, Brazil;

<sup>e</sup> Department of Biology and Pharmacy, University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brazil;

<sup>f</sup> Laboratory of Genetic Toxicology – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre - UFCSPA, Porto Alegre/RS, Brazil;

<sup>g</sup> Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil.

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 37177374; fax: +55 51 37171855.

E-mail address: andreag@unisc.br (**Andréa Lúcia G da Silva**).

Address: Avenida Independência, 2293, Bloco 42, Bairro Universitário, Santa Cruz do Sul/RS-Brasil.

### Abstract

*Background:* This study aimed to assess the chronic effects of physical exercise on the level of DNA damage and the susceptibility to exogenous mutagens in peripheral blood cells of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) patients. *Methods:* Case-control study enrolling 51 COPD patients separated in two groups [group of physical exercise (PE-COPD; n=15); group of non-physical exercise (COPD; n=36)] and 51 controls. Peripheral blood was used to evaluate DNA damage by comet assay and lipid peroxidation by measurement of thiobarbituric acid reactive species (TBARS). The cytogenetic damage was evaluated by the buccal micronucleus cytome assay. *Results:* The residual DNA damage (induced by methyl methanesulphonate alkylating agent) in PE-COPD was similar to the controls in contrast to COPD patients where it was significantly elevated. TBARS values were significantly lower in PE-COPD than in COPD patients. COPD group showed elevated frequency of Nuclear Buds (BUD) and condensed chromatin (CC) in relation to PE-COPD and control group, which could indicate a deficiency in DNA repair and early apoptosis of the damaged cells. *Conclusion:* The physical exercise for COPD patients leads to significant decrease of lipid peroxidation in blood plasma, decrease of susceptibility to exogenous mutagenic treatment and decrease of BUD and CC formation.

**Keywords:** COPD; DNA damage; oxidative stress; exercise.

## Introduction

The Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a major cause of morbidity and mortality in countries with different levels of economic development and it is estimated that in 2020 the COPD will become the third leading cause of death all over the world [1,2]. COPD is currently defined as a preventable and treatable disease characterized by airflow limitation, resulting from an abnormal inflammatory reaction to inhaled particles from cigarette smoking and associated with co-morbidities [2]. The COPD is multifactorial and its pathology often includes systemic inflammation and oxidative stress [3,4].

The formation of reactive oxygen species (ROS) by cigarette smoke and inflammatory cells, generated in the pulmonary epithelium, has been associated with slowly progressive and irreversible decrease in forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>), loss of muscle mass and muscle dysfunction [3-5] and probably modulates some of the systemic effects of COPD (i.e. skeletal muscles atrophy, osteoporosis, anemia and cachexia [5,6]. Some of the many different compounds in cigarette smoke can react directly with cellular components to form ROS while other carcinogens must be activated to produce single and double strand breaks into DNA [7,8].

Additionally, evidence about the effect of exercise-induced systemic oxidative stress in COPD patients is still lacking especially about possible differential effects of exercise at different intensities [9]. Endurance physical training is a principal constituent of the pulmonary rehabilitation programs yielding clear beneficial effects on skeletal muscles and on relevant clinical outcomes. Improved skeletal muscle bioenergetics after training has been associated with decreased inflammation in healthy subjects and in other chronic conditions, but data in COPD patients remain controversial [9, 10]. This is a relevant aspect since the intensity and duration of the general exercise training are key factors that may predict outcomes such as muscle oxidative capacity adaptations as well as the potential development of oxidative stress [10].

Moreover, no studies are currently available that have evaluated the effect of exercise on oxidative stress and DNA damage in COPD patients. The cellular processes of DNA damage induction and repair are fundamental for the maintenance of genome integrity, and the modulation of these processes can dramatically increase individual susceptibility to cancer [11,12]. Comet assay has been used in various studies to investigate the DNA damage in connection with various diseases because it is a rapid, simple and sensitive technique for measuring DNA breaks and repair in single cells [13-15]. The cytogenetic damage evaluated by buccal micronucleus cytome assay (BMCyt) is a sensitive biomarker that is widely accepted for chromosome damage evaluation [16]. The buccal epithelial cells are the first barrier for the inhalation or ingestion route that can metabolize proximate carcinogens to reactive products. About 90% of the human cancers originate from epithelial cells. Therefore, oral epithelial cells represent a preferred target site for early genotoxic events induced by carcinogenic agents entering the body.

We aimed to investigate if regular physical exercise can have some influence on the damage induction and DNA repair in COPD patients. The present study was therefore designed to assess the chronic effects of endurance physical exercise on the level of micronucleus formation in buccal mucosa and DNA damage in peripheral blood cells of COPD patients and controls, evaluated by comet assay. The oxidative stress was also evaluated by means of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in blood plasma.

## Materials and methods

Fifty one COPD patients were included in this study, with average age of 65.33±8.91 years, treated at the Santa Cruz Hospital by Research Group for Health Rehabilitation, south Brazil.

COPD was diagnosed according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease guidelines-GOLD [2], using clinical history, physical examination, and presence of airflow obstruction, defined as a ratio of forced expiratory volume in one second to forced vital capacity ( $FEV_1/FVC$ ) less than 70% of predicted value. The COPD patients were allocated into two groups: group of physical exercise (PE-COPD; n=15 e.g. pulmonary rehabilitation program) and group of COPD patients (COPD; n=36 e.g. only ambulatory care). At the beginning of the study, all participants of PE-COPD underwent pulmonary rehabilitation 2 times per week for 8 weeks (i.e. endurance physical training and education about the disease) [2]. The COPD patients were matched by gender and age with 51 control individuals (e.g. general population) without previous pulmonary disease and with no evidence of airflow obstruction ( $FEV_1/FVC > 70\%$  and  $FEV_1 > 80\%$  predicted) [2]. The study protocol was approved by the Ethics Committee of UNISC, number 2011/08. All individuals answered the personal health questionnaire and signed informed consent before the interview.

#### *Blood collection*

Peripheral blood samples were collected at different time points from patients and control individuals, at rest, early in the morning, into two tubes with anticoagulant. One aliquot was used for the comet assay and the other aliquot to obtain blood plasma for the remaining analysis. The samples of all patients in the PE-COPD group were collected after at least 72-h without exercise to avoid the acute effect of exercise.

#### *DNA damage evaluation by comet assay*

The comet assay was performed under alkaline and neutral conditions [17,18]. Aliquots of 10  $\mu$ l freshly collected whole blood were mixed with 90  $\mu$ l low melting point agarose (0.7% in phosphate buffer) and added to microscope slides pre-coated with 1.5% agarose. The slides were then incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 20 mM NaOH, pH 10.2, 1% TritonX-100 and 10% DMSO). After 24h at 4°C, the slides were removed from the lysis solution and placed in an electrophoresis unit filled with fresh electrophoresis buffer at 4°C. In the alkaline version of comet assay (10 M NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13), 20 minutes of denaturation and 15 minutes electrophoresis time were used. For the neutral version of comet assay (3 M sodium acetate, 1 M Tris, pH=8.5), the denaturation time of 1-h and electrophoresis time of 1-h were used. In both versions of comet assay, after electrophoresis, the slides were neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5) and washed in water. Slides were dried overnight at room temperature, then fixed and stained with silver nitrate [19]. For DNA damage evaluation, 100 cells per sample were analyzed by optical microscopy at 100 $\times$  magnification. The cells were visually scored by measuring the DNA migration length and the amount of DNA in the tail into five classes, from undamaged – 0, to maximally damaged – 4, and a damage index (DI) value was calculated for each sample [19]. Damage index thus ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells  $\times$  0) to 400 (with maximum damage: 100 cells  $\times$  4).

#### *Detection of oxidized bases*

We performed the modified comet assay using specific enzymes to expose oxidative damage. The enzyme Formamidopyrimidine DNA Glycosylase (FPG) recognizes the common oxidized purine 8-oxo-7,8-dihydroguanine and ring-opened purines [20], whereas Endonuclease III (ENDO III) converts oxidized pyrimidines to strand breaks [21]. After lysis, the slides were washed for 5 minutes each in enzyme buffer (40 mM HEPES-KOH, 1 M KCl, 5 mM EDTA, 2.5mg/mL bovine serum albumin fraction V-BSA, pH 8.0). The suspension was added to the slide, covered with coverslip and incubated for 45 (ENDO III) and 30 minutes (FPG) at 37°C.

Subsequent steps were the same as in the alkaline version of comet assay.

#### *Susceptibility to DNA damage*

For the assessment of susceptibility to exogenous DNA damage, whole blood cells were treated with the alkylating agent methyl methanesulphonate - MMS ( $8 \times 10^{-5}$  M) for 1-h or 3-h at 37°C prior to slides preparation. The percentage of residual DNA damage after 3-h MMS treatment was calculated using the value of 1-h MMS treatment for each subject as 100%. MMS is direct DNA alkylation agent widely used as positive control in genotoxicity testing.

#### *Measurement of lipid peroxidation*

Lipid peroxidation was monitored by the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction, which has been widely adopted as a sensitive method for measuring lipid peroxidation. First, 1000  $\mu$ L of 5% trichloroacetic acid were added to 250  $\mu$ L of supernatants and centrifuged at 7000 $\times$ g for 10 min. Then 1000  $\mu$ L of sulfuric acid (3M) were mixed with 1000  $\mu$ L of thiobarbituric acid solution. The reaction mixture was incubated in a boiling water bath for 15 minutes and cooled to room temperature. Then 3500  $\mu$ L of *n*-Butanol were added and centrifuged at 7000 $\times$ g for 5 minutes. The absorbance was read at 532 nm [22]. Results were expressed as nmol/g of protein. Total protein levels were evaluated using the Biuret Total Proteins kit from Labtest (Labtest Diagnostica S.A., Brazil).

#### *Buccal micronucleus cytome assay (BMCyt)*

Buccal cell samples were collected and processed in accordance with Thomas et al. [23]. For each subject were prepared two tube containers for left cheek (LC) and right cheek (RC) cells, each containing 1000  $\mu$ L of methanol. The cells were collected rotating a cytobrush 20 times in a circular and spiral motion against the inner surface of the cheek wall. The head of cytobrush was placed into the respective buffer, thereby producing a cloudy suspension of buccal cells. The cell suspensions were stored at 4°C, until processing. Afterwards, the cells were centrifuged for 3 minutes at 315 $\times$ g at room temperature. The supernatant was aspirate leaving approximately 300  $\mu$ L of cell suspension and replaced with 500  $\mu$ L of buccal cell fixation buffer. The cells were briefly vortexed and centrifuged again for 3 min at 315 $\times$ g at room temperature. The supernatant was aspirated and the cells resuspended in another 500  $\mu$ L of buccal cell fixation buffer. To further cellular disaggregation and slide preparations 5  $\mu$ L of DMSO was added to each 100  $\mu$ L of cell suspension. The fixed cells were hydrolyzed in HCl and stained according *Feulgen* method [23]. The scoring criteria for the distinct cell types and nuclear anomalies in the BMCyt assay were intended for classifying buccal cells into categories that distinguish between 'normal' cells (Basal cell) and cells that are considered 'abnormal' on the basis of cytological and nuclear features, which are indicative of DNA damage (Micronucleated-MN; Nuclear Bud-BUD), cytokinesis failure (Binucleated-BI) or cell death (Condensed chromatin-CC; Karyorrhectic-KR; Pyknotic-PY; Karyolytic- KL). The 2,000 cells per sample were scored to determine the frequency of these cell types [23].

#### *Statistical analysis*

The statistical analyses were performed using the Statistical Package SPSS 18.0 and  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Categorical variables were compared using  $\chi^2$  test. The comparison among multiple groups was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey's multiple comparison test and Kruskal-Wallis test with post hoc Dunn's Multiple Comparison test. The correlations between the parameters studied were evaluated by Sperman's test.

## Results

The general characteristics of the COPD, PE-COPD and control groups are shown in Table I. The COPD patients and matched controls were similar in terms of age, gender, race and comorbidities but differed in relation to body mass index (BMI), smoking status, cigarettes smoked per year and smoking duration. The smoking-related variables were higher in the COPD patients.

**Table I.** General and clinical characteristic in the COPD patients and control group.

Characteristic	COPD (n=36)	PE-COPD (n=15)	Control (n= 51)	*p value
Sex				
Male, n(%)	21(58)	9(60)	28(55)	NS
Females, n(%)	15(42)	6(40)	23(45)	NS
White Ethnicity, n(%)	32(89)	13(87)	50(98)	NS
Age (years) <sup>a</sup>	65.36 ± 9.48	65.27 ± 7.65	63.61 ± 9.39	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	26.88 ± 5.61	23.01 ± 5.14*	26.81 ± 3.88	0.025
Smoking Habit				
Cigarettes-year <sup>b</sup>	10698 (1095-25550) <sup>#</sup>	7924 (1095-21900)	5814 (1095-14600)	NS
Smoking Status				
Never/ Former/ Current	4/ 21/11 <sup>#</sup>	1/ 13/1	22/ 25/ 4	NS
Smoking Duration				
>30 years, n(%)	27(84) <sup>#</sup>	9(64)	9(31)	NS
Medications				
COPD Drugs, n(%)	33(92)	15(100)	-	NS
Corticosteroid, n(%)	16(66)	20(74)	-	NS
Antihypertensive, n(%)	22(61)	5(32)	27(53)	NS
Oxygen therapy, n(%)	7(20)	5(34)	-	NS
Comorbidities				
SAH, n(%)	26(71)	19(70)	38(74)	NS
Heart disease, n(%)	10	8	11	NS
Diabetes, n(%)	5	5	2	-
	4	4	1	-
COPD Status				
Mild, n(%)	7(20)	1(6)	-	NS
Moderate, n(%)	10(28)	6(40)	-	NS
Severe, n(%)	12(33)	4(27)	-	NS
Very Severe, n(%)	7(19)	4(27)	-	NS

<sup>a</sup>Data are presented as mean ± SD; <sup>b</sup>Median (minimum-maximum); BMI- Body Mass Index; SAH, Systemic Arterial Hypertension; \* p<0.05, COPD compared with the PE-COPD; <sup>#</sup>p<0.05, COPD or PE-COPD compared with the control group.

The pulmonary function and comet assay results are shown in Table II. The basal DI in the alkaline comet assay (detects single and double DNA strand breaks and alkali-labile sites) and in the neutral comet assay (detects DNA double strand breaks) was significantly elevated in PE-COPD in relation to the COPD patients. Also, modified - comet assay (with FPG and ENDO III enzymes) showed significantly higher damage index in PE-COPD than in COPD and control group.

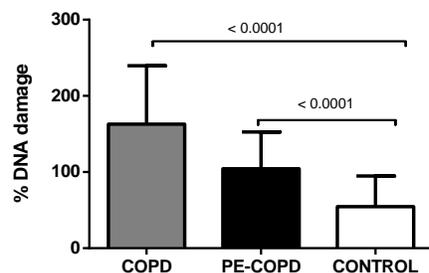
**Table II.** Pulmonary function and comet assay results in the COPD, PE-COPD patients and control group.

Characteristics	COPD (n=36)	PE-COPD (n=15)	Control (n=51)	*p value
FEV <sub>1</sub> (% predicted)	41.78±18.60 <sup>#</sup>	45.60±20.42 <sup>#</sup>	86.14±11.72	NS
FVC (% predicted)	60.28±19.34 <sup>#</sup>	66.80±15.04 <sup>#</sup>	90.75±13.67	NS
FEV <sub>1</sub> /FVC (% predicted)	69.11±20.23 <sup>#</sup>	65.07±18.17 <sup>#</sup>	105.24±70.28	NS
Damage Index - Alkaline Comet Assay	32.28±24.96	47.33±24.03 <sup>#</sup>	26.65±27.96	NS
Damage Index - 1-h of MMS Treatment	131.67±64.54	81.80±23.19*	103.12±60.38	0.019
Damage Index - 3-h of MMS Treatment	190.47±105.17 <sup>#</sup>	83.13±43.58*	60.61±61.45	0.000
Damage Index - Neutral Comet Assay	38.47±32.59	68.27±19.70*	37.49±38.05	0.001
Damage Index - FPG Comet Assay	37.78±26.05	71.60±23.61* <sup>#</sup>	39.78±23.60	0.001
Damage Index - ENDOIII Comet Assay	38.94±26.70	70.67±16.72* <sup>#</sup>	40.15±34.04	0.002

Data are presented as mean ± SD; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; \* p<0.05, COPD compared with the PE-COPD; <sup>#</sup> p<0.05, COPD or PE-COPD compared with the control group.

The DNA damage index after 3-h MMS treatment decreased in relation to the 1-h MMS treatment value in the control group (Table II). In contrast, the damage index at 3-h MMS treatment remained constant in PE-COPD and increased in COPD group in relation to the 1h value. To investigate these differences, the changes in DI after 3-h treatment in relation to the 1-h DI value were calculated for each person. This parameter, denominated residual DNA damage, showed that the DNA damage detected after 3-h treatment in PE-COPD does not increase in relation to the 1h value (considered as 100%) as observed in COPD patients (Figure 1). The residual DNA damage values were lower in control and PE-COPD group than in COPD group.

Fig.1

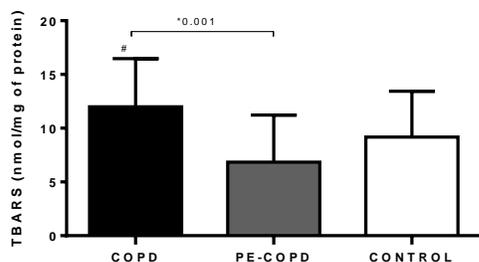


**Fig. 1.** Residual DNA damage in blood cells of patients and healthy controls following 3-h MMS treatment. The percentage of residual DNA damage after 3-h MMS treatment was calculated considering the value of 1-h MMS treatment for each subject as 100%. Data are presented as mean±SD, COPD patients—gray bars, PE-COPD patients—black bars and controls—white bars. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test with post hoc Dunn's Multiple Comparison test.

As observed in the Figure 2, the PE-COPD group showed a significant decrease of TBARS

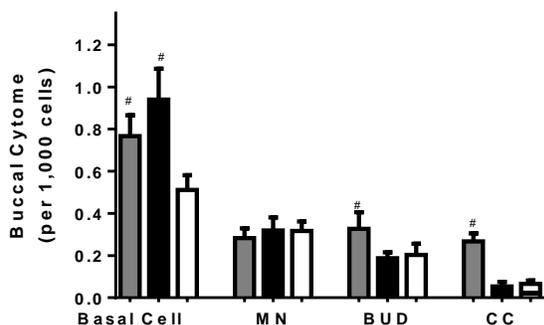
compared to COPD patients. Mean frequencies of basal buccal cells, cells with micronuclei (MN), Nuclear Buds (BUD) and condensed chromatin (CC) in patients and controls are shown in Figure 3. No difference was found for the frequency of MN, BUD and CC in PE-COPD group in relation to the control group, whereas increased BUD and CC formation was observed in COPD patients. Both COPD and PE-COPD groups showed increment of basal cells in relation to the control group, which is more pronounced in the physical exercise group.

Fig.2



**Fig. 2.** Concentration of TBARS in blood plasma of patients and healthy controls. Data are presented as mean±SD, COPD patients—gray bars, PE-COPD patients—black bars and controls—white bars. \*p<0.001; COPD compared with the PE-COPD; # p<0.05, COPD and PE-COPD compared with the control group. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test with post hoc Dunn's Multiple Comparison test.

Fig.3



**Fig. 3.** Frequency of buccal cell types scored in the BMCyt assay of patients and healthy controls. Data are presented as mean±SD, COPD patients—gray bars, PE-COPD patients—black and controls—white bars. MN: Micronuclei; BUD: Nuclear Buds; CC: Condensed chromatin cells. # p<0.05, COPD and PE-COPD compared with the control group. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test with post hoc Dunn's Multiple Comparison test.

The results of the comet assay and TBARS in the COPD groups stratified by disease status (Table III) do not show different pattern of the respective group before stratification. No significant difference was found in BMCyt analysis for COPD patients stratified by disease status, probably due to the small sample size.

**Table III.** DNA Damage and TBARS in the COPD and PE-COPD by Status diseases.

DISEASE STATUS	GROUP	DAMAGE INDEX- COMET ASSAY					TBARS <sup>a</sup>
		NEUTRAL	ALKALINE	FPG	ENDOIII	RESIDUAL DAMEGE	
<b>Mild and Moderated</b>	<b>COPD</b> (n=17)	24.80±24.69	24.20±19.14	11.53±12.68	13.33±13.82	160.53±90.23	11.41±4.10
	<b>PE-COPD</b> (n=07)	72.14±25.47	58.43±27.59	26,57±15.89	34.14±25.02	94.71±26.76	6.35±4.24
	<b>p value</b>	<b>0.024</b>	<b>0.028</b>	<b>0.022</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>0.007</b>
<b>Severe</b>	<b>COPD</b> (n=12)	31.50±29.07	27.25±22.67	6.36±7.65	17.50±21.36	160.25±70.36	13.43±3.64
	<b>PE-COPD</b> (n=04)	59.00±17.20	39.25±18.02	28.50±19.74	37.25±7.58	120.75±86.06	6.05±4.01
	<b>p value</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>0,004</b>	<b>0.049</b>	<b>NS</b>	<b>0.031</b>
<b>Very Severe</b>	<b>COPD</b> (n=07)	55.50±24.88	40.17±31.30	28.50±27.07	13.00±16.22	196.00±68.02	10.85±4.98
	<b>PE-COPD</b> (n=04)	74.50±4.50	36.00±17.32	45.25±31.71	39.50±27.76	104.75±38.42	8.47±5.69
	<b>p value</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>0,027</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>

Data are presented as mean ± SD; <sup>a</sup> nmol/mg of protein; n, sample numbers; NS, not significant.

The Table IV shows the correlations between the parameters studied in patients and controls.

**Table IV.** Correlations between the parameters analyzed in patients and controls.

Parameters	COPD		PE-COPD	
	Spearman's rho	p value	Spearman's rho	p value
FEV <sub>1</sub> /FVC – BUD	-0.385	<b>0.027</b>	-0.385	0.210
FEV <sub>1</sub> /FVC – KR	-0.399	<b>0.021</b>	-0.611	<b>0.016</b>
FEV <sub>1</sub> – KR	-0.277	0.119	0.527	<b>0.043</b>
Basal DI in neutral comet assay- BUD	0.360	<b>0.039</b>	0.524	<b>0.045</b>
DI following 3-h MMS treatment – KL	-0.551	<b>0.001</b>	0.172	0.539
% Residual damage- KR	0.528	<b>0.002</b>	0.183	0.514

FEV<sub>1</sub>/FVC, Ratio of forced expiratory volume in one second to forced vital capacity; BUD, Nuclear Buds; KR, Karyorrhectic cells; KL, Karyolytic cells; DI, damage index; MMS, methyl methanesulphonate; % Residual damage, calculated for DI after 3-h MMS treatment for each subject taking the value of DI after 1-h MMS treatment as 100%.

Disease indicators FEV<sub>1</sub> and FEV<sub>1</sub>/FVC correlate negatively with the frequency of Karyorrhectic cells (apoptosis cells) in PE-COPD and COPD patients and with the frequency of BUD in COPD patients suggesting that patients with more severe COPD present an increment in cytogenetic damage and early cell death by apoptosis. The basal DI in the neutral comet assay

(detecting double-strand breaks) in COPD and PE-COPD patients correlates positively with BUD induction, suggesting that the kind of DNA damage occurred could progress to permanent DNA damage. Also, in COPD group the percentage of residual damage correlates positively with the frequency of KR cells reinforcing the induction of apoptosis in the pathogenesis of COPD.

## Discussion

The pathogenesis of COPD leads to an increase in the oxidative burst in lungs and evidence suggest that this increase is implicated in pathogenic processes such as damage to pulmonary cells, mucus hypersecretion, antiprotease inactivation and exacerbation of lung inflammation [2]. Recently, it has been suggested that the oxidative stress may extend beyond the lung to generate the systemic manifestation of COPD [10]. Regular physical exercise, which has been proven to increase mean life span, could also serve as a stimulating stressor [24]. However, mounting epidemiological data have proven that exercise decreases the incidence of oxidative stress associated diseases [24]. Previous study showed that muscle oxidative stress levels would be increased in severe COPD only in the initial phase of adaptation to training (first 2 or 3 weeks), probably in the context of a transient antioxidant insufficiency. Indeed, abnormal adaptations to keeping redox balance have been reported in other series of COPD patients [10]. This argument is also consistent with existing literature data showing that long term exercise training programs facilitate physiological changes, decreasing the impact on systemic oxidative stress [10].

Our results showed increased DNA damage in PE-COPD patients (Table II), which disagree with the data reported by Mercken et al. [9]. These authors observed decrease in ROS-induced DNA damage after sub-maximal exercise test following pulmonary rehabilitation. The phenomenon was attributed to an improved training status of the patients with COPD that increased exercise capacity and physical activity level after pulmonary rehabilitation [9]. Another study reported that the extent of DNA damage was dependent on the training status of the healthy participants, as trained participants had less DNA damage after exercise compared with untrained participants [25].

Also, has been reported an exercise-induced DNA damage in athletes after exhaustive treadmill running or a marathon race, whereas no enhanced DNA damage was found in healthy control subjects after moderate exercise, not exceeding the anaerobic threshold [9]. Regarding to this aspect has been suggested that DNA damage after physical activity can only be detected in exercise protocols exceeding the proband's anaerobic threshold [26], and the intensity of physical activity may determine unwanted metabolic changes. Light to moderate physical activity has been described as an inducer of transient redox unbalance [27]. In our study, PE-COPD practiced submaximal aerobic exercise in ergometer for lower limbs, 02 times per week, i.e. light to moderate physical activity.

In the present study, the MMS-induced DNA damage was transient in control group, probably due to induction of DNA repair process. Interestingly, PE-COPD group showed decreased susceptibility to 1-h MMS treatment compared to COPD and control group. Moreover, the DNA damage in PE-COPD patients remains constant after 3-h MMS treatment suggesting that the observed low susceptibility may result from previously activated repair process. The residual damage caused by MMS treatment in the control group was also lower than in COPD patients, which could indicate ongoing repair process (Figure 1). For COPD group, the residual DNA damage further increased indicating the induction of persistent DNA damage that could reflect DNA repair inhibition. This DNA damage may be transient and repaired later [27] or the damaged cells could be eliminated by apoptosis. The high standard deviations for the DNA damage values in comet assay found in our study could be attributed to the great genetic heterogeneity, which is a critical aspect in human biomonitoring studies [28].

The values of TBARS were significantly lower in PE-COPD than in COPD group indicating an adaptive cellular response to exercise-induced oxidative stress (Figure 2). These data are in agreement with Radak et al. [24] showing that regular exercise-induced adaptation attenuates the age-associated increase in the levels of 8-OHdG in muscle cells and increases the activity of DNA repair as well as a resistance against oxidative stress. Our results also showed decrease in residual damage and TBARS induction in PE-COPD in all disease stages in relation to COPD (Table III), suggesting an adaptive response induced by the physical exercise. In this context, the increased strand break formation, detected in all modalities of Comet assay in PE-COPD in relation to COPD, could reflect DNA strand breaks formed as intermediates of increased repair activity in the PE-COPD.

On the other hand, has been suggested that DNA damage detected in COPD patients is possibly not directly induced by reactive oxygen species but is mediated by a secondary factors [26]. This effect can be attributed to the differences in pulmonary ventilation between the maximal and sub-maximal exercise test [9]. As the ventilatory demands increase more during the maximal than sub-maximal exercise test, COPD patients tend to take more shallow breaths and to breathe with higher frequency, resulting in dynamic lung hyperinflation. This results in increased physiologic dead space ventilation with an attendant drop in alveolar oxygen partial pressure, causing hypoxia and DNA damage [9].

For the first time, our study showed that the supervised physical exercise during pulmonary rehabilitation for COPD patients decreased the susceptibility to exogenous mutagens and systemic exercise-induced oxidative stress. The observed improvement could be attributed to exercise-induced adaptive responses involving a more efficient oxidative metabolism, an increased capacity of endogenous antioxidative systems, interference with the oxidative damage repair/eliminating systems, and modulation of redox-sensitive gene expression and protein assembly [9,24]. The ROS formation during exercise evokes specific adaptation, such as increased antioxidant capacity/oxidative damage-repairing enzyme activity, increased resistance to oxidative stress, and lower levels of oxidative damage. This specific adaptation seems to be systemic [24]. The effects of exercise could modulate the regulation of the DNA repair process. The adaptive mechanism is initiated by transcription factors, resulting in increased level of antioxidant enzymes, more effective repair and proteasome degradation of damaged proteins. The molecular adaptation then leads to an improved physiological function and enhanced resistance to oxidative stress [24].

The alteration of repair efficiency has already been reported in breast and lung cancers [29-31]. In some cases, low basal DNA damage in comet assay could indicate toxic condition to the cells (i.e. chronic oxidative stress) leading to decrease in genotoxicity [29]. Such decrease in basal DNA damage in lymphocytes (lower than in controls) was associated with repair inhibition and possible elimination of highly damaged cells by apoptosis [29].

The hypothesis of apoptosis induction is supported by the results obtained in this study in BMCyt assay (Figure 3) that showed higher frequency of BUD and CC in buccal cells of COPD patients, which could indicate a deficiency in DNA repair and early apoptosis of damaged cells. The presence of BUD cells suggests elimination of amplified DNA or DNA repair complexes from the nucleus, whereas CC cells are indicative of early stage of apoptosis [23]. Altered repair capacity in COPD patients is also evidenced by the enhanced susceptibility to MMS-induced DNA damage detected in our study by comet assay.

The correlations observed between the comet assay and BMCyt assay data (Table IV) confirmed that the deterioration of pulmonary function correlates with increased frequency of Karyolytic cells (indicating death cell) and formation of cells with BUD (indicating less efficient DNA repair). Moreover, the BUD frequency in COPD patients correlates positively with the DI

in neutral comet assay, indicating the involvement of DNA double-strand breaks formation in this process. In conditions of repair inhibition the cells with DNA damaged could be eliminated by apoptosis. An increased apoptosis in COPD patients has been detected to persists even after smoking cessation [32] and disturbed balance between apoptosis and structural regeneration in lung cells contributes to the pathogenesis of COPD[33,34].

In conclusion, our results showed that PE-COPD patients presented significantly elevated basal DNA damage in peripheral blood cells, as detected by the comet assay, in relation to the COPD and control group. However, PE-COPD patients were less susceptible to exogenous DNA damage induction by MMS treatment and did not presented elevated frequency of BUD and CC cells as noted in COPD patients. Furthermore, it is possible to conclude that physical exercise for COPD leads to a significant decrease of lipid peroxidation in blood plasma, decreased formation of BUD and CC buccal cells and more effective DNA repair.

### **Funding**

This research was supported by Brazilian Agencies Foundation for Research Support of Rio Grande do Sul and National Counsel of Technological and Scientific Development [PRONEX/FAPERGS/CNPq 10/0044-3]; Santa Cruz Hospital; Research Group Health Rehabilitation and its Interfaces by University of Santa Cruz do Sul – UNISC; Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS.

### **Acknowledgments**

The authors thank to all volunteers who participated in this study and to the Biotechnology and Genetics Laboratory - University of Santa Cruz do Sul.

### **References**

- [1] R. Laniado-Laborín, Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), Parallel Epidemics of the 21st Century. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 6 (2009) 209-224.
- [2] Global Strategy for the Diagnosis (Update 2011.) Management and prevention of COPD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD).
- [3] J.E. Repine, A. Bast, I. Lankhorst, The oxidative stress study group: oxidative stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156 (1997) 341–357.
- [4] T.L. Verhage, Y.F. Heijdra, J. Molema, L. Daudey, R. Dekhuijzen, R. J.H. Vercoulen, Adequate patient characterization in COPD: reasons to go beyond GOLD classification. *Open Respir. Med. J.* 3 (2009) 1-9.
- [5] E.S. Gladysheva, A. Malhotra, R.L. Owens, Influencing the decline of lung function in COPD: use of pharmacotherapy. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 5 (2010) 153–164.
- [6] K.F. Chung, J.A. Marwick, Molecular mechanisms of oxidative stress in airways and lungs with reference to asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1203 (2010) 85–91.
- [7] H. Hoffmann, C. Isner, J. Högel, G. Speit, Genetic polymorphisms and the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutagenesis* 5 (2005) 359–364.
- [8] J. Koshiol, M. Rotunno, D. Consonni, A.C. Pesatori, S. Matteis, A.M. Goldstein, A.K. Chaturvedi, S. Wacholder, M.T. Landi, J.H. Lubin, N.E. Caporaso, Chronic Obstructive Pulmonary Disease and altered risk of lung cancer in a population-based case-control study. *PLoS ONE* 4 (2009) e7380.
- [9] E.M. Mercken, G.J. Hageman, A.M. Schols, M.A. Akkermans, A. Bast, E.F. Wouters, Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172 (2005) 994–1001.

- [10] D.A. Rodriguez, S. Kalko, E. Puig-Vilanova, M. Perez-Olabarría, F. Falciani, J. Gea, M. Cascante, E. Barreiro, J. Roca, Muscle and blood redox status after exercise training in severe COPD patients. *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 88–94.
- [11] E.G. Tzortzaki, K. Dimakou, E. Neofytou, K. Tsikritsaki, K. Samara, M. Avgousti, V. Amargianitakis, A. Gousiou, S. Menikou, N.M. Siafakas, Oxidative DNA damage and somatic mutations: a link to the molecular pathogenesis of chronic inflammatory airway diseases. *Chest* 141 (2012) 1243–1250.
- [12] G. Caramori, I.M. Adcock, P. Casolari, Unbalanced oxidant-induced DNA damage and repair in COPD: a link towards lung cancer. *Thorax* 66 (2011) 521–527.
- [13] A.R. Collins, V. Harrington, Repair of oxidative DNA damage: assessing its contribution to cancer prevention. *Mutagenesis* 17 (2002) 489–493.
- [14] J. Blasiak, M. Arabski, R. Krupa, K. Wozniak, J. Rykala, A. Kolacinska, Z. Morawiec, J. Drzewoski, M. Zadrozny, Basal oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat. Res.* 554 (2004) 39–148.
- [15] Ü. Mutlu-Türkođlu, Z. Akalýn, E. Ýlhan, E. Yýlmaz, A. Bilge, Y.A. Nıpancý, M. Uysal, Increased plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin. Biochem.* 38 (2005) 1059–1065.
- [16] M. Casella, M. Miniati, S. Monti, F. Minichilli, F. Bianchi, S. Simi, No evidence of chromosome damage in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Mutagenesis* 21 (2006) 167–171.
- [17] N.P. Singh, T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [18] P.L. Olive, J.P. Banáth, Radiation-induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay. *Radiat. Res.* 142 (1995) 144–152.
- [19] S.B. Nadin, L.M. Vargas-Roig, D. Ciocca, A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem Cytochem.* 49-9 (2001) 1183–1186.
- [20] M. Dusinska, A.R. Collins, The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis* 23-3 (2008) 191–205.
- [21] A.R. Collins, A.G. Ma, S.J. Duthie, The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.* 336 (1995) 69–77.
- [22] E.D. Wills, Mechanism of lipid peroxidation formation in animal tissues. *Biochem. J.* 3 (1966) 667–676.
- [23] P. Thomas, N. Holland, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller, M. Fenech, Buccal micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 4-6 (2009) 825–837.
- [24] Z. Radak, H.Y. Chung, S. Goto, Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 153 – 159.
- [25] A.M. Niess, A. Hartmann, M. Grünert-Fuchs, B. Poch, G. Speit, DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int. J. Sports Med.* 17 (1996) 397–403.
- [26] A. Hartmann, A.M. Niess, F. Grünert-Fuchs, B. Poch, G. Speit, Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutat. Res.* 346 (1995) 195–202.
- [27] M. Mergener, M.R. Martins, M.V. Antunes, C.C. da Silva, C. Lazzaretti, T.O. Fontanive, E.S. Suyenaga, P.G. Ardenghi, S.W. Maluf, G.D. Gamaro, Oxidative stress and DNA damage in older adults that do exercises regularly. *Clin. Biochem.* 42 (2009) 1648–1653.

- [28] S.W. Maluf, M. Mergener, L. Dalcanale, C.C. Costa, T. Pollo, M. Kayser, L.B. da Silva, D. Pra, Z. Teixeira, DNA damage in peripheral blood of patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Mutat. Res.* 626 (2007) 180–184.
- [29] M.H. Agnoletto, T.N. Guecheva, F. Dondé, A.F. de Oliveira, F. Franke, C. Cassini, M. Salvador, J.A.P. Henriques, J. Saffi, Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. *Clin. Biochem.* 40 (2007) 1252–1258.
- [30] N. Rajae-Behbahani, P. Schmezer, A. Risch, W. Rittgen, K.W. Kayser, H. Dienemann, V. Schulz, P. Drings, S. Thiel, H. Bartsch, Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 95 (2001) 86–91.
- [31] M. Schena, S. Guarrera, L. Buffoni, A. Salvadori, F. Voglino, A. Allione, G. Pecorari, E. Ruffini, P. Garzino-Demo, S. Bustreo, L. Consito, P. Bironzo, G. Matullo, DNA repair gene expression level in peripheral blood and tumour tissue from non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell cancer patients. *DNA Repair* 11 (2012) 374–380.
- [32] I.K. Demedts, T. Demoor, K.R. Bracke, G.F. Joos, G.G. Brusselle, Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir. Res.* (2006) 7-53.
- [33] I.M. Adcock, G. Caramori, P.J. Barnes, Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: New Molecular Insights. *Respiration* 81 (2011) 265–284.
- [34] S.I. Rennard, S. Togo, O. Holz, Cigarette smoke inhibits alveolar repair a mechanism for the development of emphysema. *Proc Am. Thorac. Soc.* 3 (2006) 703–708.

## **CAPÍTULO III**

Evaluation of DNA damage in COPD patients and its correlation with polymorphisms in repair genes.

Submitted in: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Journal.

## EVALUATION OF DNA DAMAGE IN COPD PATIENTS AND ITS CORRELATION WITH POLYMORPHISMS IN REPAIR GENES: A CASE CONTROL STUDY

\* Andréa Lúcia G da Silva<sup>a,b</sup>, Helen T da Rosa<sup>c</sup>, Thaís E Karnopp<sup>c</sup>, Clara F Charlier<sup>b</sup>, Joel H Ellwanger<sup>d</sup>, Dinara J Moura<sup>d,e</sup>, Lia Gonçalves Possuelo<sup>d</sup>, Andréia R de Moura Valim<sup>d</sup>, Temenouga N Guecheva<sup>b,f</sup> and João Antônio Pegas Henriques<sup>b,f,g</sup>

<sup>a</sup> Department of Health and Physical Education, University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brazil;

<sup>b</sup> Cellular and Molecular Biology Program, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil;

<sup>c</sup> Scientific Initiation of University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brazil;

<sup>d</sup> Department of Biology and Pharmacy, University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brazil;

<sup>e</sup> Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre - UFCSPA, Porto Alegre/RS, Brazil;

<sup>f</sup> Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil;

<sup>g</sup> Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul/RS, Brazil.

\* Corresponding author. Tel.: +55(51)37177374; fax: +55(51)37171855.

E-mail address: andreag@unisc.br (**Andréa Lúcia G da Silva**).

Address: Avenida Independência, 2293, Bloco 42, Bairro Universitário, Santa Cruz do Sul/RS, 96815-900, Brazil.

## Abstract

**Background:** We investigated a potential link between genetic polymorphisms in genes *XRCC1* (Arg399Gln), *OGG1* (Ser326Cys), *XRCC3* (Thr241Met), and *XRCC4* (Ile401Thr) with the level of DNA damage and repair, accessed by comet and micronucleus test, in 51 COPD patients and 51 controls. **Methods:** Peripheral blood was used to perform the alkaline and neutral comet assay; and genetic polymorphisms by PCR/RFLP. To assess the susceptibility to exogenous DNA damage, the cells were treated with methyl methanesulphonate for 1-h or 3-h. After 3-h treatment the % residual damage was calculated assuming the value of 1-h treatment as 100%. The cytogenetic damage was evaluated by buccal micronucleus cytome assay (BMCyt). **Results:** COPD patients with the risk allele *XRCC1* (Arg399Gln) and *XRCC3* (Thr241Met) showed higher DNA damage by comet assay. The residual damage was higher for COPD with risk allele in the four genes. In COPD patients was showed negative correlation between BMCyt (binucleated, nuclear bud, condensed chromatin and karyorrhexic cells) with pulmonary function and some variant genotypes. **Conclusion:** The variant genotypes in *XRCC1* (Arg399Gln), *OGG1* (Ser326Cys), *XRCC3* (Thr241Met), and *XRCC4* (Ile401Thr) modulate DNA damage and progression of COPD.

**Keywords:** COPD; DNA damage, DNA repair; genetic polymorphisms.

## 1. Introduction

Recently genetic association studies on chronic obstructive pulmonary disease (COPD) risk have focused on identifying effects of single nucleotide polymorphisms/haplotypes in candidate genes, among which DNA repair genes are increasingly studied because of their critical role in maintaining genome integrity [1]. Assays that measure DNA repair capacity suggest that it can vary widely among individuals. Previous investigations reported lower DNA repair capacity in COPD patients [1-2]. The finding supports the hypothesis that variants in DNA repair genes could affect COPD susceptibility. In general, functional studies are needed to elucidate the mechanisms by which genes are involved in the development of COPD, lung cancer, or both as well as to understand of damage recognition and mechanism of DNA repair.[2-3].

The DNA repair system consists of several distinct pathways, including the base excision repair (BER) pathway and double-strand break (DSB) repair process [4]. BER pathway is a DNA repair process which operates on small lesions such as oxidized or reduced bases, fragmented or non-bulky adducts, or those produced by methylating agents and still acting on bases deamination injury induced by environmental carcinogens or endogenous sources [1-2][5]. The genes encoding three key enzymes in this repair pathway are: 8-oxoguanine DNA glycosylase (*OGG1*), apurinic/apyrimidinic endonuclease (*APE1/APEX1*), and the X-ray repair cross complementing group 1 (*XRCC1*). *Ogg1* and *Xrcc1* play a central role in the BER pathway. *OGG1* catalyzes the removal of 8-hydrodeoxyguanine (8-OHdG), which has been considered as a key biomarker of oxidative DNA damage. The substitution of cysteine for serine at codon 326 (Ser326Cys) is associated with a significant reduction in the repair capacity [5]. Evidence has emerged to support that BER deficiency is an important contributing factor to cancer susceptibility, as shown in both animal models and human studies [1-2]. Hence, *OGG1* and *XRCC1* are suggested to exert combined effect on the development of COPD, and *XRCC1* coordinates and stimulates the *OGG1* activity [5].

Double-stranded breaks are repaired by two pathways: homologous recombination (HR) and non-homologous DNA end joining (NHEJ)[6]. NHEJ is an intrinsically error-prone pathway while HR results in an free error repair[7]. HR and NHEJ pathways may have overlapping functions to maintain chromosomal integrity in eukaryotes [8]. X-ray repair cross

complementing-3 (*XRCC3*) is involved in the homologous recombination pathway of DNA DSB-repair [9] and the role *XRCC3* gene have been most extensively studied due to their influences in the individual sensitivity to radiation exposure and induction of DNA damage. The X-ray repair cross complementing-4 (*XRCC4*) gene functions in the repair of DNA double-strand is important too [10] and the *XRCC4* inactivation is related to programmed cell death or apoptosis [4].

We aimed to investigate a potential genetic effects between genetic polymorphisms in genes *XRCC1* (Arg399Gln), *OGG1* (Ser326Cys), *XRCC3* (Thr241Met), and *XRCC4* (Ile401Thr) with their relation to the level of DNA damage and repair in COPD patients and controls. Accordingly, we intend to understand the role of genetic polymorphisms in the modulation of DNA damage and progression of COPD.

## 2. Method

Fifty-one COPD patients, treated at Santa Cruz Hospital by the Research Group for Health Rehabilitation, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil were included in this study. COPD was diagnosed according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease guidelines (GOLD) [11] using clinical history, physical examination, and presence of airflow obstruction, defined as a ratio of forced expiratory volume in one second ( $FEV_1$ ) to forced vital capacity (FVC) less than 70% of predicted value. The patients were grouped in according to COPD stage as mild, moderate, severe or very severe [12]. The COPD patients were matched by gender, age and body mass index (BMI) with 51 control individuals without pulmonary disease. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Santa Cruz do Sul, protocol number 2011/08. All individuals answered the personal health questionnaire and signed informed consent before the interview.

### 2.1 Obtaining sample

The peripheral blood (10 mL) samples were collected early in the morning from fasted COPD patients and controls into tubes with EDTA, and used to comet assay and genetic polymorphisms identification. Buccal cell samples were collected and processed in accordance with Thomas et al. [13]. For each subject were prepared two tubes for left cheek (LC) and right cheek (RC) cells, each containing methanol. The cells were collected rotating a cytobrush 20 times in a spiral motion against the inner surface of the cheek wall. The head of cytobrush was placed into the tube respective with methanol.

### 2.2 DNA damage evaluation by comet assay

The comet assay was performed under alkaline (detects single- and double-DNA strand breaks and alkali-labile sites) and neutral (detects double breaks) conditions according to the procedure of Singh et al. [14] with the modifications by Tice et al. [15]. Aliquots of 10  $\mu$ l freshly collected whole blood were embedded in 90  $\mu$ l of 0.75% low melting agarose, and after agarose solidified slides were placed in lyses buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris; 10% DMSO; pH 10.0-10.5) containing freshly added 1% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) dimethyl sulphoxide for maximum of 2 weeks. After treatment with lyses buffer slides and placed fresh prepared alkaline buffer solution (200 mM NaOH and 1 mM EDTA; pH > 13), for 20 min, and DNA submitted of denaturation and 15 min electrophoresis time were used (0.90 V/cm and 300mA). For the neutral condition (3 M sodium acetate and 1 M Tris; pH=8.5), the denaturation time of 1-h and electrophoresis time of 1-h were used (0.5 V/cm and 12 mA) [16]. In both versions of the comet assay, after electrophoresis, the slides were neutralized with 0.4 M Tris (pH

7.5) and the DNA fixed and stained with silver nitrate in accordance to Nadin et al. [17]. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed for each individual using a conventional microscope. Two parameters were evaluated according Heuser et al. [18]. International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method [15, 19]. Damage index thus ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells  $\times$  0) to 400 (with maximum damage: 100 cells  $\times$  4).

### 2.3 Comet assay to assess the susceptibility to exogenous DNA damage

For the assessment of susceptibility to exogenous DNA damage, whole blood cells were treated with methylmethane sulfonate (MMS; 80  $\mu$ M) for 1-h or 3-h at 37°C prior to slide preparation, and proceeded up the steps of the alkaline comet assay as described above. The percentage of residual DNA damage after 3-h MMS treatment was calculated using the value of 1-h MMS treatment for each subject as 100%.

### 2.4 Buccal micronucleus cytome assay (BMCyt)

The cell suspensions were stored at 4°C, until processing. Afterwards, the cells were centrifuged and the supernatant was aspirated and added if more buccal cell fixation buffer. To further cellular disaggregation 5% of DMSO was added to each of cell suspension. The fixed cells were hydrolyzed in HCl and stained according Feulgen method [13]. The scoring criteria for the distinct cell types and nuclear anomalies in the BMCyt assay were intended for classifying buccal cells into categories that distinguish between ‘normal’ cells (Basal cell) and cells that are considered ‘abnormal’ on the basis of cytological and nuclear features, indicative of DNA damage (Micronucleated-MN; Nuclear Bud- BUD), cytokinesis failure (Binucleated-BI) or cell death (Condensed chromatin-CC; Karyorrhectic-KR; Pyknotic-PY; Karyolytic- KL). Two thousand cells per sample were scored to determine the frequency of these cell types [13].

### 2.5 DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood by the salting out method [20]. Four polymorphic markers were investigated by genotyping using the polymerase chain reaction (PCR) – restriction fragment length polymorphism (RFLP) method. In the Table I were show the primers pairs used, annealing temperature, fragment size and restriction enzyme of the genes studied [21-24]. All digestion were conducted with a total volume of 15  $\mu$ L for 18 h at 37 °C and subsequently analyzed on a 3% agarose gel with ethidium bromide staining.

**Table I. Amplification conditions, restriction enzymes annealing temperature and fragment size of the studied genes.**

Gene	Primer sequence	SNP	AT (°C)	Restriction Enzyme	Fragment sizes (bp)	Reference
<i>OGG1</i>	3'GTGGATTCTCATCGGTTTCG 5' 5'CTGTTGCTGTCGAGAATGC 3'	Ser326Cys	58	Fnu4HI	672	[21]
<i>XRCC1</i>	3'CAAGTACAGCCAGGTCCTAG 5' 5'CCTTCCCTCATCTGGAGTAC 3'	Arg399Gln	58	BcnI	268	[22]
<i>XRCC3</i>	3'GCCTGGTGGTCATCGACTC 5' 5'ACAGGGCTCTGGACAGCTCACGTCAC 3'	Thr241Met	67	NcoI	552	[23]
<i>XRCC4</i>	3'CTCAGAAGAAATTGTGTATGCT 5' 5'ACCACAAGCAAAGTGTGTACAC 3'	Ile401Thr	52	BseMI	277	[24]

SNP, single-nucleotide polymorphism; AT, annealing temperature in degrees Celsius; bp, bases pairs.

## 2.6 Statistical analysis

The statistical analyses were performed using the Statistical Package SPSS 18.0. A statistically significant value was considered when  $p \leq 0.05$ . Demographic data were presented as mean  $\pm$  standard deviation. The Mann-Whitney U test was used to compare the means and the chi-square test to compare the proportions of categorical variables in the patients and controls. The distributions of genotypes for each polymorphic site were tested to match the Hardy-Weinberg heredity equilibrium by the chi-square test. The comparison among multiple groups was performed using the nonparametric two-tailed Kruskal-Wallis test with the Dunn correction for multiple comparisons.

## 3. Results

The general characteristics of COPD patients and control group are shown in Table II. The COPD patients and matched controls were similar in terms of age, gender, ethnicity and BMI, but differed regarding pulmonary function (lower among COPD patients), smoking status, number of cigarettes smoked per year and smoking duration (higher among COPD patients).

**Table II. General and clinical characteristic in the COPD patients and control group.**

	COPD n=51	Control n=51	p value for Mann-Whitney test
Gender (male)	30	28	>0.05
Ethnicity (white)	45	50	>0.05
Age (years) <sup>a</sup>	65.33 $\pm$ 8.91	63.61 $\pm$ 9.40	>0.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	25.75 $\pm$ 5.71	26.82 $\pm$ 3.89	>0.05
FEV <sub>1</sub> (% predicted)	42.90 $\pm$ 19.03	86.14 $\pm$ 11.72	0.000
FEV <sub>1</sub> /FVC (% predicted)	67.92 $\pm$ 19.58	105.24 $\pm$ 70.28	0.000
Smoking Status			
Never/ Former/ Current	5/ 34/ 12	22/ 25/ 4	$\chi^2$ 0.000
Cigarettes-year <sup>b</sup>			
Current smoking	8059 (3650-14600)	7026 (3650-10950)	>0.05
Former smoking	10490 (1095-25550)	5621 (1095- 14600)	0.003
Smoking Duration			
>30 years	36	9	$\chi^2$ 0.000
COPD Status <sup>c</sup>			
Mild	8	-	-
Moderate	16	-	-
Severe	16	-	-
Very Severe	11	-	-

n, sample number; <sup>a</sup>Data are presented as mean  $\pm$  SD; <sup>b</sup>Median (minimum-maximum); <sup>c</sup> COPD status by GOLD [11]; BMI, body mass index;  $\chi^2$ , chi-square test.

The damage index in the alkaline comet assay (COPD 36.71 $\pm$ 25.41 vs Control 26.65 $\pm$ 27.96,  $p=0.005$ ) and in the neutral comet assay (COPD 47.53 $\pm$ 32.45 vs Control 37.49 $\pm$ 38.05,  $p=0.047$ ) were significantly elevated in COPD patients. In the same lines, the percentage of residual DNA damage after 3-h MMS treatment was significantly higher in COPD compared to controls (COPD 145.69 $\pm$ 74.11 vs Control 54.63 $\pm$ 40.32,  $p=0.000$ ). No statistically significant difference was measured between groups for BMCyt.

No statistical difference was observed between COPD and control group for allelic frequency of the homozygous 399Gln *XRCC1* (0.343 vs 0.314), 326Cys *OGG1* (0.166 vs 0.200), 241Met *XRCC3* (0.461 vs 0.500), and 401Thr *XRCC4* (0.132 vs 0.098) genotype. The

distribution of allelic frequencies in patients and controls was similar to that found in other population studies in relation to *XRCC1* (Arg399Gln) [5, 25-26], *XRCC3* (Thr241Met) [25], and *XRCC4* (Ile401Thr) [27], but lower for *OGG1* (Ser326Cys) [5]. Then, we evaluated the combination of variant genotypes according to the presence of the risk allele. The results are shown in the Table III. This table shows the effect of risk alleles of the repair genes in BER, HR and NHEJ on the level of different comet assay in COPD and control group.

**Table III. Comet assay effects in COPD and controls stratified by genetic polymorphisms in base excision repair (BER), homologous recombination (HR) and nonhomologous DNA end joining (NHEJ) repair genes.**

	COPD	CONTROL	<i>p</i> *
<b>BER</b>			
Subjects	n= 28	n=26	
<b><i>XRCC1-Arg399Gln</i></b>	Heterozygous + homozygous risk allele (ArgGln+GlnGln)	Heterozygous + homozygous risk allele (ArgGln+GlnGln)	
COMET ASSAY			
DI Alkaline	37.29±27.84	21.04±24.45	0.005
DI Neutral	46.50±41.42	29.00±34.46	0.049
DI Residual	150.89±87.99	51.88±44.20	0.000
Subjects	n= 13	n=15	
<b><i>OGG1- Ser326Cys</i></b>	Heterozygous + homozygous risk allele (SerCys+CysCys)	Heterozygous + homozygous risk allele (SerCys+CysCys)	
COMET ASSAY			
DI Alkaline	45.54±30.36	41.60±35.05	NS
DI Neutral	60.54±31.63	55.27±47.68	NS
DI Residual	142.38±92.56	56.00±34.98	0.001
<b>HR and NHEJ</b>			
Subjects	n= 36	n=36	
<b><i>XRCC 3-Thr241Met</i></b>	Heterozygous + homozygous risk allele (ThrMet+MetMet)	Heterozygous + homozygous risk allele (ThrMet+MetMet)	
COMET ASSAY			
DI Alkaline	36.56±24.67	22.50±23.49	0.009
DI Neutral	48.50±30.55	34.53±37.79	0.039
DI Residual	134.75±77.16	54.06±42.88	0.000
Subjects	n= 11	n=07	
<b><i>XRCC 4-Ile401Thr</i></b>	Heterozygous + homozygous risk allele (IleThr+ThrThr)	Heterozygous + homozygous risk allele (IleThr+ThrThr)	
COMET ASSAY			
DI Alkaline	36.64±23.80	22.36±24.10	NS
DI Neutral	47.36±28.15	36.43±37.30	NS
DI Residual	134.50±80.74	49.02±36.07	0.013

Data are presented as mean ± SD; DI, damage index; NS, nonsignificant; \* Kruskal- Wallis Test

The DNA damage and residual damage were significantly higher in COPD patients presenting the variant genetic polymorphism in *XRCC1* (Arg399Gln) and *XRCC3* (Thr241Met) than in control group, as viewed by comet assay. The *XRCC4* (Ile401Thr) and *OGG1* (ser326Cys) risk alleles seem to influence only the COPD patient's residual damage induced by MMS alkylating agent.

No significant difference was observed between groups regarding the frequency of micronuclei and nuclear anomalies by BMCyt assay. So, in order to understand the influence of

these genetic polymorphisms in the modulation of DNA damage and progression of COPD, we established a correlation between comet assay and BM<sub>Cyt</sub> assay and pulmonary function in those carrying the risk allele (Table IV).

**Table IV. Correlations between polymorphisms in DNA repair genes, comet assay and BM<sub>Cyt</sub> assay in COPD patients.**

Parameters	XRCC1		OGG1		XRCC3	
	Risk allele		Risk allele		Risk allele	
	(ArgGln+GlnGln)		(SerCys+CysCys)		(ThrMet+MetMet)	
	Spearman's rho	p value	Spearman's rho	p value	Spearman's rho	p value
% Residual damage- basal DI in alkaline comet assay	-0.497	0.007	-	-	-	-
% Residual damage- basal DI in neutral comet assay	-0.495	0.007	-	-	-	-
% Residual damage- BI	-	-	-	-	0.350	0.036
% Residual damage- KR	-	-	-	-	0.444	0.007
FEV <sub>1</sub> - basal DI in alkaline comet assay	-	-	-	-	0.336	0.045
FEV <sub>1</sub> - CC	-0.404	0.029	-	-	-	-
FEV <sub>1</sub> - KR	-0.398	0.044	-	-	-	-
FEV <sub>1</sub> / FVC- KR	-0.441	0.024	-	-	-0.408	0.013
FEV <sub>1</sub> / FVC- BUD	-	-	-	-	-0.357	0.032
FEV <sub>1</sub> / FVC- BI	-	-	-	-	-0.328	0.051
FVC- CC	-0.428	0.029	-0.645	0.024	-0.343	0.041
FVC- basal DI in alkaline comet assay	-	-	-	-	0.423	0.010
PY- basal DI in neutral comet assay	-	-	-0.643	0.024	-	-
PY- basal DI in alkaline comet assay	-	-	-0.616	0.033	-	-
Basal cell- CC	0.442	0.032	-	-	-	-
Basal cell- MN	-	-	-	-	0.381	0.022
Basal cell- BUD	-	-	-	-	0.467	0.004
Basal cell- KL	-	-	-0.666	0.018	-0.359	0.032

FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; DI, damage index; % Residual damage - calculated for DI after 3h MMS treatment for each subject taking the value of DI after 1h MMS treatment as 100%; BI, Binucleated cells; KR, Karyorrhectic cells; CC, Condensed chromatin cells; BUD, Nuclear Buds cells; PY, Pyknotic cells; MN, Micronuclei; KL, Karyolytic cells. Statistical analysis was performed by Spearman Correlation test.

The alkaline basal damage index in COPD patients correlated positively with CVF and VEF<sub>1</sub>. In contrast, negative correlation was found between the basal DNA damage and % residual damage for deficient in *XRCC1* (Arg399Gln) repair. Disease indicators FEV<sub>1</sub> and FVC correlated negatively with the nuclear anomalies (BUD nuclear, Binucleated, Condensed chromatin and Karyorrhectic cells) for both deficiencies in *XRCC1* (Arg399Gln) and *XRCC3*(Thr241Met) repair.

### 3. Discussion

Our results, detected increased basal DNA damage in COPD patients with genetic polymorphisms *XRCC1* (Arg399Gln) and *XRCC3* (Thr241Met) (Table III). This data are in accordance with previous studies [4-5, 9]. The presence of the variant 399Gln in *XRCC1* has been shown to be associated with higher levels of DNA adducts and higher sister chromatid exchange

frequencies [5] as well as measurable reduced DNA repair capacity and increased risk of several types of cancers [4]. An association between the irradiation-specific DNA repair rate and the polymorphism in *XRCC1* (Arg399Gln) has been reported in European population [28]. Genetic polymorphism *XRCC3*, which participates in DNA double-strand break repair by homologous recombination pathway, presents a Thr241Met substitution in exon 7, which was found to be associated with an increase in chromosome deletions using an *in vitro* cytogenetic challenge assay [4]. DNA strand breaks measured by the comet assay are non-specific indicators of transient DNA damage, reflecting equilibrium between damage formation and removal at the particular sampling time [9]. Thus, genetic differences in DNA repair genes, which modify the DNA repair capacity, may directly influence the level of DNA damage [9]. In contrast to our results, Vodicka [29] found no association between comet assay damage index and the *XRCC1* (Arg399Gln) and *XRCC3* (Thr241Met) polymorphisms probably due *XRCC1* (Arg399Gln) contribute partially to DNA repair capacity and the polymorphisms of other genes could play a role in detecting COPD risk (e.g. *XRCC4* genetic polymorphisms which repairs DNA double-strand breaks by non-homologous end joining [NHEJ] and the completion of recombination events) [10]. Also, *XRCC1* (Arg399Gln) and *OGG1* (Ser326Cys) are suggested to exert combined effect on the development of COPD (i.e. among current/light smokers), and *XRCC1* coordinates and stimulates the *OGG1* activity [5]. Results concerning different repair rates between nonsmokers and smokers are inconsistent and the influence of polymorphisms in repair gene has not been established yet [30-31].

DNA effects in the comet assay do not only measure DNA damage but also indicate the DNA repair capacity of the subjects studied. In our study an influence of *XRCC1* (Arg399Gln), *OGG1* (Ser326Cys), *XRCC3* (Thr241Met), and *XRCC4* (Ile401Thr) genetic polymorphisms on DNA repair was found in COPD patients compared to controls, as shown by residual damage (Table III). These results are in agreement with Hanssen-Bauer [32], which reported that polymorphic variants showed significant and reproducible differences in the pattern of % tail DNA compared to the *XRCC1* Arg/Arg after MMS treatment; initially lower tail. The differences in the repair profiles of the *XRCC1* variants after MMS treatment could be explained by reduced recruitment of these *XRCC1* and interacting proteins to sites of DNA damage, reduced ability to make complexes or interact with DNA glycosylases, and/or reduced efficiency of excision of damaged bases or resolution of strand break intermediates [32]. *XRCC1* and *XRCC4* proteins are physically bound in mammalian cells with DNA Ligase III and DNA Ligase IV, respectively [33]; *XRCC2* and *XRCC3* genes, members of an emerging family of Rad51-related proteins, have been shown to play an essential role in maintaining chromosome stability in mammalian cells [33]. The *XRCC3* gene is a family member of Rad51-related genes involved in HR and has been associated with a higher incidence of DNA damage [34].

The correlations found in our study showed that the disease progress characterized by higher frequency of cell abnormalities indicative of cytokinesis defect and/or DNA repair and apoptotic cell death (i.e. Bi, BUD, CC, KR cells) (Table IV). This is the first study to investigate the differences in cellular and nuclear morphology aiming identify potential biomarkers associated with DNA damage, chromosomal instability, cell death, and regenerative potential in COPD patients. Previous studies showed the persistent inflammation in COPD patients leads to higher acetylation of histone resulting in increased transcription of proinflammatory genes, steroid resistance, DNA damage, genomic instability and premature aging [35-36]. Possibly, chromosomal aberrations that directly reflect inappropriate repair of (induced) DNA damage are better suited than comet assay effects for the determination of repair capacities in our study. The higher frequency of condensed chromatin, karyorrhectic, pyknotic and karyolytic cells are indicative of cell death [13]. The apoptosis acts as a surveillance mechanism, eliminating the

buccal cells with genetic damage [13]. Similar results were found in studies with subjects exposed to pesticides indicating chromosomal rearrangement [27]. Other study has demonstrated a relationship between genetic susceptibility and biomarkers in occupationally exposed populations [37]. Oxidative stress also damages the DNA repair pathways, such as double-strand break, base excision repair, and nucleotide excision repair, which further cause DNA damage. The cellular senescence and inflammation will form a positive feedback to compromise normal cellular homeostasis [36].

With our results, it is possible to assume an increase in the cancer risk analyzing the correlations that we found between pulmonary function and BMCyt because elevated binucleated cell ratio may be an indicative of higher aneuploidy rate which, in turn, is associated with an increased risk of cancer. The mechanism triggering nuclear bud formation is unknown but may be related to the elimination of amplified DNA or DNA repair complexes [13, 38-39]. So, in this time, the BMCyt could be used as a biomarker of monitoring in COPD patients.

However, there are some factors that should be taken into consideration, as the limited database. The sample size may not have been large enough to detect certain differences and there are other genetic polymorphisms that could also influence the repair capacity and consequently the risk for COPD and other repair pathways could also influence repair efficiency. Finally, this investigation suggests that basal DNA damage increases, analyzed by Comet and BMCyt assays, in COPD patients with variant genotypes in *XRCC1* (Arg399Gln) and *XRCC3* (Thr241Met). In addition, the induced DNA damage by MMS increases in COPD patients with variant genotypes in *XRCC1* (Arg399Gln), *OGG1* (Ser326Cys), *XRCC3* (Thr241Met) and *XRCC4* (Ile401Thr) showing impairment of DNA repair in modulating the damage. Some variant genotypes seem to be related to an increase in Bi, BUD, CC, KR cells, suggesting their possible influence on the background levels of this cytogenetic biomarker and progression of COPD.

### **Competing Interests**

“The author(s) declare that they have no competing interests”.

### **Funding**

This research was supported by Brazilian Agencies Foundation for Research Support of Rio Grande do Sul and National Counsel of Technological and Scientific Development [PRONEX/FAPERGS/CNPq 10/0044-3]; Santa Cruz Hospital; Research Group Health Rehabilitation and its Interfaces by University of Santa Cruz do Sul – UNISC; Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS.

### **Authors' contributions**

Andréa Lúcia G da Silva, Dinara J Moura, Andréia R de Moura Valim and João Antônio Pegas Henriques prepared the draft of the manuscript. All the authors collected the data and contributed to the interpretation of results and to the revision of the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgments**

The authors thank to all volunteers who participated of this study and to the Biotechnology and Genetics Laboratory - UNISC.

### **Reference**

1. Yin, J., et al., *The DNA repair gene XRCC1 and genetic susceptibility of lung cancer in a northeastern Chinese population*. Lung Cancer, 2007. **56**(2): p. 153-60.
2. Hang, B., *Formation and repair of tobacco carcinogen-derived bulky DNA adducts*. J Nucleic Acids, 2010. **2010**: p. 709521.
3. de Andrade, M., et al., *Genetic variants associated with the risk of chronic obstructive pulmonary disease with and without lung cancer*. Cancer Prev Res (Phila), 2012. **5**(3): p. 365-73.
4. Andreassi, M.G., et al., *Genetic polymorphisms in XRCC1, OGG1, APE1 and XRCC3 DNA repair genes, ionizing radiation exposure and chromosomal DNA damage in interventional cardiologists*. Mutat Res, 2009. **666**(1-2): p. 57-63.
5. Yang, S.F., et al., *hOGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg399Gln polymorphisms associated with chronic obstructive pulmonary disease*. Chin Med J (Engl), 2009. **122**(8): p. 960-6.
6. Mao, Z., et al., *DNA repair by homologous recombination, but not by nonhomologous end joining, is elevated in breast cancer cells*. Neoplasia, 2009. **11**(7): p. 683-91.
7. Mao, Z., et al., *DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells*. Cell Cycle, 2008. **7**(18): p. 2902-6.
8. Lieber, M.R., *The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes*. Genes Cells, 1999. **4**(2): p. 77-85.
9. Hoffmann, H., et al., *Genetic polymorphisms and the effect of cigarette smoking in the comet assay*. Mutagenesis, 2005. **20**(5): p. 359-64.
10. Wang, Y., et al., *Polymorphisms of XRCC4 are involved in reduced colorectal cancer risk in Chinese schizophrenia patients*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 523.
11. *[Guideline for diagnosis and treatment of COPD (chronic obstructive pulmonary disease). The Third Edition: diagnosis]*. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi, 2009. **Suppl Copd**: p. 32-67.
12. *[Guideline for diagnosis and treatment of COPD (chronic obstructive pulmonary disease). The Third Edition: definition, epidemiology, risk factors, pathology and etiology]*. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi, 2009. **Suppl Copd**: p. 2-29.
13. Thomas, P., et al., *Buccal micronucleus cytome assay*. Nat Protoc, 2009. **4**(6): p. 825-37.
14. Singh, N.P., et al., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp Cell Res, 1988. **175**(1): p. 184-91.
15. Tice, R.R., et al., *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. Environ Mol Mutagen, 2000. **35**(3): p. 206-21.
16. Wojewodzka, M., I. Buraczewska, and M. Kruszewski, *A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody*. Mutat Res, 2002. **518**(1): p. 9-20.
17. Nadin, S.B., L.M. Vargas-Roig, and D.R. Ciocca, *A silver staining method for single-cell gel assay*. J Histochem Cytochem, 2001. **49**(9): p. 1183-6.
18. Heuser, V.D., et al., *Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility*. Toxicology, 2007. **232**(3): p. 235-47.
19. Collins, A.R., et al., *The comet assay: topical issues*. Mutagenesis, 2008. **23**(3): p. 143-51.
20. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1215.
21. De Ruyck, K., et al., *Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **62**(4): p. 1140-9.

22. Chiyomaru, K., T. Nagano, and C. Nishigori, *XRCC1 Arg194Trp polymorphism, risk of nonmelanoma skin cancer and extramammary Paget's disease in a Japanese population*. Arch Dermatol Res, 2012. **304**(5): p. 363-70.
23. Krupa, R., et al., *Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer*. Exp Mol Pathol, 2009. **87**(1): p. 32-5.
24. Relton, C.L., et al., *DNA repair gene polymorphisms, pre-natal factors and the frequency of somatic mutations in the glycophorin-A gene among healthy newborns*. Mutat Res, 2004. **545**(1-2): p. 49-57.
25. Duarte, M.C., et al., *Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(42): p. 6593-600.
26. Rossit, A.R., et al., *Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians*. Cancer Lett, 2002. **180**(2): p. 173-82.
27. Da Silva, F.R., et al., *Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: Biomarkers of exposure, of early biological effects and of susceptibility*. J Hazard Mater, 2012. **225-226**: p. 81-90.
28. Vodicka, P., et al., *Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA*. Carcinogenesis, 2004. **25**(5): p. 757-63.
29. Vodicka, P., et al., *Markers of individual susceptibility and DNA repair rate in workers exposed to xenobiotics in a tire plant*. Environ Mol Mutagen, 2004. **44**(4): p. 283-92.
30. Popanda, O., et al., *Specific combinations of DNA repair gene variants and increased risk for non-small cell lung cancer*. Carcinogenesis, 2004. **25**(12): p. 2433-41.
31. Vineis, P., *Individual susceptibility to carcinogens*. Oncogene, 2004. **23**(38): p. 6477-83.
32. Hanssen-Bauer, A., et al., *The region of XRCC1 which harbours the three most common nonsynonymous polymorphic variants, is essential for the scaffolding function of XRCC1*. DNA Repair (Amst), 2012. **11**(4): p. 357-66.
33. Yen, C.Y., et al., *Combinational polymorphisms of four DNA repair genes XRCC1, XRCC2, XRCC3, and XRCC4 and their association with oral cancer in Taiwan*. J Oral Pathol Med, 2008. **37**(5): p. 271-7.
34. Bassi, C., et al., *Efficiency of the DNA repair and polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XRCC4 DNA repair genes in systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2008. **17**(11): p. 988-95.
35. Yao, H. and I. Rahman, *Role of histone deacetylase 2 in epigenetics and cellular senescence: implications in lung inflammaging and COPD*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **303**(7): p. L557-66.
36. Rahman, I., et al., *SIRT1 as a therapeutic target in inflammaging of the pulmonary disease*. Prev Med, 2012. **54 Suppl**: p. S20-8.
37. Da Silva, F.R., et al., *Application of the buccal micronucleus cytome assay and analysis of PON1Gln192Arg and CYP2A6\*9(-48T>G) polymorphisms in tobacco farmers*. Environ Mol Mutagen, 2012. **53**(7): p. 525-34.
38. Bonassi, S., et al., *The Human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol*. Mutat Res, 2011. **728**(3): p. 88-97.
39. Migliore, L., et al., *Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): p. 85-92.

## **DISCUSSÃO**

Na condição de síndrome, a DPOC tem uma etiologia complexa com inúmeros fatores de riscos genéticos e ambientais tais como o tabagismo, as doenças respiratórias recorrentes na infância, a exposição à biomassa, a etnia e o gênero. Ainda assim, nenhum desses fatores demográficos pareceu relevante quando analisados em nosso contexto (Tabela I, CAPÍTULO I), com exceção do *status* e carga tabágica que foi significativamente maior nos portadores de DPOC.

Encontrar o tabagismo como pivô central na patogênese da DPOC não é surpresa. O fumo ainda é o fator de risco mais importante em todo o mundo para o desenvolvimento da DPOC (MANNINO & BUIST, 2007; FISCHER *et al.*, 2011), especialmente em países onde a população não se utiliza de queima de biomassa em seu dia-a-dia. A fumaça do cigarro contém aproximadamente 4.700 compostos altamente reativos, perfazendo em torno de  $10^{15-17}$  moléculas oxidantes (RAHMAN, 2011).

Nesse sentido, a fumaça do cigarro tem efeitos contrastantes sobre o epitélio pulmonar, atuando como agente pró-inflamatório e danoso, além de ser imunossupressora. Ao mesmo tempo, os componentes particulados do condensado estimulam a fagocitose (pelos macrófagos e das células ciliadas), que por sua vez liberam quimiocinas capazes de recrutar outras células com linfócitos e neutrófilos (constituindo o componente pró-inflamatório). Entretanto, deve-se reassaltar que esse efeito aparentemente benéfico nada mais é do que uma resposta imunitária para a defesa do tecido pulmonar contra uma potencial lesão e não deve ser interpretada como um benefício do ato de fumar. Em indivíduos saudáveis, se o agente agressor (nesse caso os componentes da fumaça do cigarro) não estivesse presente, esse recrutamento de células inflamatórias não ocorreria. Os componentes da fumaça do cigarro também podem inibir a proliferação celular, bem como modificar quimicamente componentes da cascata de sinalização, afetando sobrevivência, resposta e diferenciação celular, e diminuindo a eficiência de diversos efetores constituindo o componente imunossupressor (STAMPFLI & ANDESON, 2009).

No quesito caracterização populacional, uma diferença fundamental destacou-se nos hábitos tabágicos e sua ligação com o desenvolvimento da DPOC em nosso estudo: a duração do tabagismo superior a 30 anos comparada ao perfil dos controles (Tabela I, CAPÍTULO I). Resultados semelhantes foram observados no estudo realizado em São Paulo, como parte do projeto Platino onde, ao invés de indicar o hábito de fumar em si como fator de risco, o tempo de tabagismo e a quantidade de cigarros fumados pareceram ser mais relevantes à probabilidade do desenvolvimento da doença (SOUSA *et al.*, 2011).

Embora o tabagismo desencadeie uma resposta inflamatória nos pulmões dos fumantes, esta resposta não é interrompida mesmo diante da cessação do ato tabágico naqueles que desenvolvem a DPOC. Isso sugere que em fumantes onde a DPOC se desenvolvem exista uma regulação anormal da resposta inflamatória nos pulmões (MACNEE & TUDER, 2009). Independente disso, a cessação do tabagismo, ainda que seja intermitente, é muito importante para reduzir o declínio da função pulmonar e diminuir o risco de exacerbações antes que o dano irreversível já instalado se agrave (EKLUND *et al.*, 2012).

Quanto à idade, ainda existem controvérsias se o envelhecimento é um fator de risco independente para o desenvolvimento da DPOC. A idade média dos portadores de DPOC do nosso estudo ( $65.33 \pm 8.91$  anos, Tabela I, CAPÍTULO I) vem ao encontro da literatura onde se observa uma maior prevalência da doença nos sujeitos com idade entre 60 e 70 anos. Ainda não está claro se esse aumento da prevalência é devido ao declínio natural da capacidade pulmonar, ou se reflete simplesmente um período maior de exposição a outros fatores de risco (GOLD, 2011). O que se sabe é que qualquer indivíduo acima de 40 anos apresenta risco de desenvolver a DPOC, sendo que os sujeitos com idade avançada têm maior risco de complicações e aumento da morbidade por essa doença. Além disso, a DPOC em pessoas idosas está associada com o estado de saúde deficiente, que não pode ser previsto pelo teste de função pulmonar (CAZZOLAA *et al.*, 2008).

O gênero como fator de risco é outro alvo de discussão. Enquanto muitos estudos ainda relatam uma probabilidade superior de desenvolver DPOC associada com o gênero masculino, especialmente na Europa (AFONSO *et al.*, 2011), o que tem se visto nos países emergentes e nos Estados Unidos é que o gênero feminino tem suplantado o masculino como fator de risco (SIN *et al.*, 2007). Esse fato não pode ser explicado unicamente pelo aumento do tabagismo entre as mulheres fumantes tendo em vista que em termos populacionais, a contribuição do tabagismo para o desenvolvimento da DPOC foi estimado em 70% a 80% para homens e 70% para mulheres (TORRES & GODOY, 2004). Embora a DPOC seja subdiagnosticada, observa-se que o diagnóstico da doença é ainda mais frequente em homens do que em mulheres (STEPHENS & YEW, 2008; SOUSA *et al.*, 2011). Contudo, embora a tendência de risco aumentado associado com o gênero masculino ainda seja a regra no Brasil, o presente estudo não mostrou diferenças entre a distribuição de ambos os gêneros entre as classes (casos e controles, CAPÍTULO I).

O mesmo ocorre com a etnia na amostra avaliada, que parece não influenciar o desfecho DPOC deste estudo. Considerada por muito tempo uma doença de homens caucasianos velhos,

nos EUA a mortalidade da DPOC está subindo muito rapidamente entre as mulheres e entre os Africano-Americanos (CAZZOLAA *et al.*, 2008). Os caucasianos têm apresentado menor perda de função pulmonar, por maço fumado/ ano, sugerindo que mulheres de origem Africano-Americano são realmente mais suscetíveis aos efeitos nocivos do fumo em comparação para outros grupos de homens e mulheres. (CAZZOLAA *et al.*, 2008). Embora uma das maiores investigações sobre prevalência da DPOC na América Latina, associe afro-descendência à DPOC, outros alegam que essa associação é simplesmente um reflexo da segregação socioeconômica à qual essa etnia minoritária é submetida em muitos países (especialmente aqueles com histórico colonial) a um maior consumo de tabaco (SCHMIDT *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2011). Ainda assim, é importante ressaltar que os afro-descendentes são sub-representados nesta amostragem.

Os portadores de DPOC deste estudo apresentaram um índice de massa corporal (IMC) entre eutrófico e sobrepeso (Tabela I, CAPÍTULO I), uma vez que o estado nutricional é considerado adequado se o valor calculado do IMC situar-se entre dois pontos de corte: 18,5 e 25 kg/m<sup>2</sup> (II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC, 2004). A associação entre o IMC e a mortalidade em pacientes que sofrem de DPOC tem sido um assunto de interesse por décadas. Recentemente mostrou-se que os pacientes com excesso de peso ou obesidade apresentaram um efeito protetor contra a mortalidade por DPOC, sendo que a justificativa para esta relação é pouco esclarecida até o momento. O que se tem evidência na literatura é a relação de risco entre o baixo IMC com a baixa sobrevida nos portadores de DPOC, decorrente de várias razões, tais como fraqueza muscular diafragmática, diminuição da função pulmonar e inflamação sistêmica (CAO *et al.*, 2012).

A distribuição dos parâmetros de função pulmonar é bastante típica, retratando o efeito devastador da DPOC sobre a capacidade respiratória dos pacientes estudados. Fica claro que os pacientes apresentam em média valores de VEF<sub>1</sub> bem inferiores quando comparado aos controles, classificando 84% dos pacientes entre os estadiamentos moderado e muito severo. Isso significa que os portadores de DPOC estudados são doentes sintomáticos e clinicamente limitados pela doença. Esse fenômeno se deve à dificuldade de fazer o diagnóstico na fase inicial da doença que frequentemente é assintomática, causando uma sub-representação das fases iniciais da DPOC dentre os pacientes estudados (GOLD, 2011). A DPOC é uma doença subdiagnosticada, porém obter o seu diagnóstico é importante, uma vez que foi demonstrado que a cessação do tabagismo é mais comum entre os pacientes com diagnóstico (EKLUND *et al.*, 2012).

Pode-se ver também no CAPÍTULO I que a presença de comorbidades foi bastante semelhante em ambos os grupos nesta investigação, ainda que os pacientes com DPOC sejam mais propensos a elas. É preciso ressaltar que a DPOC não é apenas uma doença dos pulmões, ela apresenta manifestações sistêmicas relevantes e tratar as comorbidades também é muito importante (GOLD, 2011; DECRAMER *et al.*, 2012). As manifestações sistêmicas da DPOC incluem alterações osteomusculares, psicológicas e nutricionais, além daquelas sociais. Outras comorbidades da DPOC incluem complicações cardiovasculares, hipertensão pulmonar, apnéia obstrutiva do sono e câncer de pulmão (TACK, 2009; GOLD, 2011). Sabemos que a DPOC e doença cardiovascular (DCV) muitas vezes podem coexistir, bem como a DCV (dentre elas a hipertensão arterial sistêmica-HAS) pode estar presente em até 69% dos pacientes com DPOC, aumentando a sua mortalidade (TACK, 2009; FORD *et al.*, 2012).

Conforme esperávamos, presença de comorbidades somada à severidade da obstrução das vias aéreas dos portadores de DPOC deste estudo foi determinante para o uso corrente de medicação. O baixo índice de VEF<sub>1</sub> é um guia usual para determinados tratamentos, convencional ou não, cuja terapêutica é determinada predominantemente pelos sintomas e alterações clínicas (GOLD, 2011). A terapia farmacológica apropriada pode reduzir os sintomas da DPOC, diminuir a frequência e severidade das exacerbações, incrementar o status de saúde e tolerância aos exercícios físicos. Até o momento, não existem medicações que consigam, efetivamente, modificar o tempo de declínio da função pulmonar. Cada regime de tratamento farmacológico precisa ser aplicado de forma específica e individualizado ao paciente, guiado pela severidade dos sintomas, risco de exacerbações, disponibilidade da droga e principalmente resposta do paciente (GOLD, 2011).

A terapia combinada, broncodilatadores (94% dos sujeitos) e corticosteróides (69% dos sujeitos), foi eleita para os pacientes deste estudo. Broncodilatadores e corticosteróides, principalmente os inalados, são tratamento padrão amplamente utilizado no manejo dos pacientes com DPOC (SADOWSKA *et al.*, 2007). A influência dos esteróides sobre processos inflamatórios tem sido estabelecida, entretanto a sua eficácia na DPOC permanece controversa (TONELLO & POLI, 2011). Os possíveis mecanismos de modulação da inflamação pelos corticosteróides não foram completamente elucidados. Algumas hipóteses são defendidas tais como: efeito inibidor direto sobre a produção de ERO; diminuição dos produtos de peroxidação lipídica e consequente diminuição da carga oxidante; aumento da atividade da glutatona peroxidase, superóxido dismutase e da catalase. A questão está em saber a dose correta para

desempenhar um papel na modulação da resposta ao estresse oxidativo decorrente da inflamação excessiva e crônica do DPOC (SADOWSKA *et al.*, 2007; TONELLO & POLI, 2011).

ERO podem danificar todos os tipos de biomoléculas e o dano oxidativo a proteínas, lipídios e DNA pode ser concomitante. O alvo primário do estresse oxidativo depende do tipo celular, natureza do estresse (radicalar ou não), o local de sua geração (intra ou extracelular), a proximidade com a fonte geradora e a severidade do estresse (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). A geração de ERO próxima de membranas ricas em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) inicia a peroxidação lipídica (FRITZ & PETERSEN, 2011). Essas ERO tem uma meia vida mais longa e podem difundir-se para outras áreas mais distantes causando danos em outros lipídios, DNA e proteínas.

Os processos de inflamação exacerbada, agravado pelo do tabagismo, levam à formação de um ambiente propício para a peroxidação lipídica e carbonilação proteica. Diversos trabalhos identificaram um aumento de peroxidação e carbonilação proteica em pacientes com DPOC e fumantes, nível ainda mais elevado nas exacerbações (NADEEM *et al.*, 2005; HANTA *et al.*, 2006; VIBHUTI *et al.*, 2007; GUMRAL *et al.*, 2009; VIBHUTI *et al.*, 2010), enquanto outros não foram tão conclusivos (CIENCEWICKI *et al.*, 2008; MESIA-VELA *et al.*, 2008; SKYBA *et al.*, 2009; TORRES-RAMOS *et al.*, 2009). A princípio, os resultados desta tese foram mais condizentes com os trabalhos não conclusivos. Os níveis de peroxidação lipídica encontrados neste trabalho foram bem semelhantes entre DPOC e controles, mesmo quando estratificados por idade, estadiamento da doença, hábitos tabágicos e sexo (dados não apresentados no CAPÍTULO I).

A literatura reporta que indivíduos com idade entre 45 e 59 anos apresentam uma concentração média de TBARS de 4,72 nmol/MI (JUNQUEIRA *et al.*, 2004; ANDREAZZA *et al.*, 2005). Entretanto, portadores de DPOC, devido às alterações decorrentes do processo inflamatório e do estresse oxidativo, apresentam exposição crônica dessas proteínas às ERO (MERCKEN *et al.*, 2005; TORRES-RAMOS *et al.*, 2009). A ativação de células imunitárias por citocinas pró-inflamatórias levam à superprodução de ERO, o que conduz a um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e provoca a perda de fluidez da membrana biológica (TANRIKULU *et al.*, 2011). Trata-se de danos à circulação de proteínas concomitante com o estresse oxidativo intracelular (TORRES-RAMOS *et al.*, 2009).

Quando os resultados desta pesquisa foram estratificados levando em consideração a prática de exercício físico (Figura 2, CAPÍTULO II), foi possível observar uma diminuição dos

níveis de TBARS no grupo DPOC que praticava exercício, comparado aos portadores de DPOC sedentários e controles. Curiosamente, a literatura indica que o exercício normalmente causa um aumento destes marcadores, principalmente o exercício físico intenso e prolongado (POWERS & JACKSON, 2008; FOGARTY *et al.*, 2011). De fato, embora esse seja um fato bem conhecido, não se aplica para todo o tipo de exercício. O exercício físico regular proporciona ao indivíduo uma melhora no equilíbrio redox, pois estimula a transcrição de enzimas de defesa antioxidante primária (como CAT e SOD) e enzimas de reparação, criando assim um saldo positivo para o paciente (MERCKEN *et al.*, 2005; SIU *et al.*, 2011).

Outra questão importante fundamenta-se nas alterações oriundas do exercício físico regular que podem servir como um estímulo estressor e dessa forma provocar respostas adaptativas com consequente diminuição do estresse oxidativo (RADAK *et al.*, 2008). O processo de adaptação envolve a ativação do sistema antioxidante, incremento da atividade enzimática do sistema de reparo oxidativo, resistência aumentada para o estresse oxidativo e baixos níveis de dano no DNA. Isso cria um sistema que se assemelha a Hormese: fenômeno caracterizado por uma “baixa dose de estímulo” e uma “alta dose de resposta”. Ressalta-se ainda que essas alterações acontecem de forma sistêmica e respondem muito diferentemente a suplementação de oxigênio durante o exercício físico (RADAK *et al.*, 2008).

Outra observação importante, e que poderiam contribuir para a diminuição dos marcadores de peroxidação lipídica, é que este subgrupo que pratica exercício físico frequenta um programa reabilitação pulmonar regularmente, dessa forma, recebe acompanhamento médico, nutricional e fisioterapêutico mais cuidadoso, tendo a oportunidade de controlar melhor a sua doença e as comorbidades associadas.

Nossos resultados oriundos do ensaio cometa versão alcalina e neutra (Tabela II, CAPÍTULO I) revelam que os portadores de DPOC apresentam elevado dano basal no DNA, comparados aos controles, bem como a ocorrência de maior dano do tipo quebra em fita dupla no DNA. Especulando-se sobre a etiologia destes danos, dois fatores precisam ser levados em consideração, ou seja, os hábitos tabágicos destes pacientes e as próprias manifestações da DPOC. Estudos sobre o dano no DNA induzido pelo tabagismo apresentam resultados contraditórios e revelam que não existe diferença entre fumantes e não fumantes (MARINI, 2004; CASELLA *et al.*, 2006). Outros estudos reportam resultados negativos, tais como fumantes apresentam baixo dano no DNA quando comparados aos não fumantes (BARALE *et al.*, 1998; SPEIT *et al.*, 2003).

Indivíduos que fumam poucos cigarros/dia, e tem uma exposição contumaz parasubstâncias mutagênicas/carcinogênicas do cigarro, podem ter uma resposta adaptativa de resistência ao dano induzido no DNA (BONASSI *et al.*, 2003). Então, o mais importante poderia ser a exposição cumulativa ao tabagismo e não quantidade de cigarros fumados (CASELLA *et al.*, 2006). Nesse sentido, nós estratificamos os nossos resultados do ensaio cometa, para portadores de DPOC e controles, em fumantes pesados ( $\geq 30$  cigarros/dia), fumantes leves ( $< 30$  cigarros/dia) e não fumantes. Nenhuma diferença foi vista no índice de dano, estratificado para fumantes pesados, nos pacientes DPOC e nos sujeitos controles, desta tese. Em contrapartida, os portadores de DPOC do subgrupo fumantes leves e não fumantes apresentaram maior dano no DNA quando comparados aos subgrupos da mesma categoria dos sujeitos controles (CAPÍTULO I).

De qualquer forma, o hábito de fumar pode alterar a frequência de danos e mutações no DNA, para além dos danos ocorridos, como consequência do metabolismo basal (KIM *et al.* 2004; HOEIJMAKERS, 2009). Vale ressaltar ainda que a faixa etária dos sujeitos deste estudo enquadra-se como adulta avançada e o envelhecimento, por si só, é capaz de aumentar o dano no DNA, seja pelo acúmulo de dano não reparado ou pela falha dos sistemas de reparação do organismo (HOEIJMAKERS, 2009).

Estudos prévios que utilizaram o ensaio cometa para detecção de dano no DNA em portadores de DPOC revelaram diferentes valores de índice de dano (CEYLAN *et al.*, 2006; MALUF *et al.*, 2007). No estudo de Ceylan *et al.* (2006), o dano no DNA foi significativamente maior em portadores de DPOC de origem tabágica (ID=  $120,50 \pm 59,48$ ) comparados a DPOC por inalação de biomassa (ID=  $97,71 \pm 45,88$ ) e controles (ID=  $60,55 \pm 37,34$ ). Maluf *et al.* (2007) também detectaram um maior índice de dano no DNA dos portadores de DPOC (ID=  $26,84 \pm 19,61$ ) da região metropolitana de Porto Alegre, comparado aos controles (ID=  $7,25 \pm 7,57$ ). Na presente tese, os valores médios do índice de dano no DNA, versão alcalina e neutra (Tabela II, CAPÍTULO I), variaram bastante quando comparado aos estudos acima citados. Neste aspecto, os estudos foram semelhantes, ou seja, é possível observar altos valores de desvio padrão para os resultados dos ensaios cometa, o que pode ser atribuído à alta variação interindividual dos sujeitos, característicos dos estudos de biomonitoramento em humanos.

Nossos resultados também revelam que na DPOC o dano do tipo quebra em fita dupla do DNA é mais frequente (Tabela II, CAPÍTULO I). A base do dano oxidativo e quebras do tipo simples no DNA são os mais frequentes tipos de danos causados por ERO, podendo ocasionar morte celular e instabilidade genômica. O acúmulo de dano oxidativo e quebras em fita simples

podem ser a maior causa para a produção de quebras do tipo em fita dupla do DNA (LAN *et al.*, 2004). Recentemente, Aoshiba *et al.* (2012) constataram a ocorrência de dano no DNA em portadores de DPOC em decorrência da presença de quebras duplas e 8-OHdG nesses indivíduos.

Dois achados importantes desta pesquisa são referentes aos fatores que podem modular o índice de dano no DNA na DPOC: o uso de corticosteroides (Figura 4, CAPÍTULO I) e a prática de exercício físico regular (Tabela II, CAPÍTULO II). A média do índice de dano no DNA, avaliado pelo ensaio cometa alcalino, dos pacientes com DPOC e tratados com corticosteroides foi sensivelmente mais baixa do que a identificada nos pacientes que não faziam uso desse fármaco. O tratamento com esteroides inalatórios ou intravenoso diminuem a função e/ou até levam a supressão de uma variedade de células inflamatórias, incluindo aquelas capazes de gerar ERO. Neste sentido, o uso corrente destas medicações leva a uma diminuição na liberação de ERO como já foi observado em exalado respiratório de portadores de DPOC (STOLAREK *et al.*, 2010).

No que se refere à prática de exercício físico e seu efeito sobre o nível de dano no DNA, nos portadores de DPOC que praticavam exercício físico foi detectado elevado índice de dano no DNA, conforme mensurado nesta investigação pelo ensaio cometa, versões alcalina, neutra, modificada com enzimas específicas de reconhecimento de dano oxidativo FGP e ENDOIII (Tabela II, CAPÍTULO II), quando comparados aos DPOC sedentários e controles. Este tópico já foi discutido anteriormente quando nos reportamos à resposta adaptativa das células frente às demandas e alterações oriundas do exercício físico regular como o que é realizado pelos sujeitos em questão (MERCKEN *et al.*, 2005; POWERS & JACKSON, 2008; RADAK *et al.*, 2008; FOGARTY *et al.*, 2011; SIU *et al.*, 2011).

O exercício físico regular poderia servir como estímulo estressor capaz de reduzir o estresse oxidativo dos DPOC, entretanto, adaptações anormais têm sido reportadas nestes pacientes em decorrência do *status* de treinamento a que são submetidos os sujeitos *versus* a demanda ventilatória (NIESS *et al.*, 1996; MERCKEN *et al.*, 2005, RADAK *et al.*, 2008; MERGENER *et al.*, RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Para o DPOC, o aumento da demanda ventilatória durante a prática de exercício físico é limitado pela obstrução das vias aéreas, com consequente piora da hiperinsuflação pulmonar e hipoxemia. A hipóxia alveolar por sua vez induz a um incremento na produção de superóxido, aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e desencadeia a vasoconstrição pulmonar hipóxica (STOLAREK *et al.*, 2010). Diante de tal situação, é bastante frequente a suplementação do oxigênio durante o exercício físico em pacientes que dessaturam abaixo de 90% (GOLD,

2011). O uso corrente de oxigênio suplementar, como forma terapêutica, não é livre de risco e quando administrado em dose suprafisiológica pode gerar mais estresse oxidativo, agravando a inflamação das vias aéreas, podendo contribuir para dano tecidual e no DNA bem como a progressão da doença (WU *et al.*, 2002; KENT *et al.*, 2011). Esses fatores associados podem ser o agente causal do elevado índice de dano no DNA no subgrupo de portadores de DPOC que praticam exercício físico observados nesta pesquisa.

Os resultados deste estudo que se refere ao dano induzido por agente alquilante MMS e a cinética de reparação do DNA após tratamento em 1 e 3 horas, interpretados como % de dano residual, revelaram maior susceptibilidade ao dano no DNA e provável deficiência e/ou inibição da reparação nos portadores de DPOC comparados aos controles (Figuras 1 e 2, CAPÍTULO I). Resultado semelhante foi observado em um estudo com pacientes portadores de câncer de mama. Nesse estudo, os pacientes apresentaram um dano continuado no DNA após 3 horas de indução de dano com indução com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MMS, enquanto os sujeitos controles revelaram diminuição do dano (AGNOLETTO *et al.*, 2007). Nesse contexto, entendeu-se que a susceptibilidade ao dano e/ou a capacidade de reparação dos pacientes com câncer de mama estava alterada. A resposta das células a danos no DNA e sua capacidade de reparação do DNA para manutenção da estabilidade genômica são a chave molecular para eventos de iniciação e progressão do câncer de pulmão e outras doenças pulmonares (TAKABATAKE *et al.*, 2009).

A capacidade do ensaio cometa para identificar fenótipos associados com disfunção da reparação de lesões induzidas no DNA por agente mutagênico, bem como para identificar pessoas e pacientes em risco de desenvolvimento de câncer está estabelecida (AGNOLETO *et al.*, 2007; COLLINS & AZQUETA, 2012; HASPLOVÁ *et al.*, 2012). Em condições de inibição de reparação, células com DNA danificado pode sobreviver ao dano persistente ou ser eliminadas pela via da apoptose (TORRES-RAMOS *et al.*, 2009). O aumento da apoptose já foi identificado previamente como patogênese da DPOC, bem como já foi reportada a persistência da apoptose após a cessação do tabagismo nos doentes (DEMEDTS *et al.*, 2006; RENNARD *et al.*, 2006; ADCOCK *et al.*, 2011). A partir dessas informações, essa resposta (apoptose) poderia ser interpretada como um fator etiológico causado por um mecanismo de defesa exacerbado, uma vez que a apoptose não pode ser considerada patológica, mas fisiológica. Porém, até que ponto e estágio da doença o organismo responde as agressões da DPOC através da apoptose? Sabe-se, que necrose é o verdadeiro evento de morte celular patológica, podendo ser investigada e diferenciada da apoptose facilmente a partir de análises histológicas, por exemplo.

No CAPÍTULO II (Tabela II e Figura 1) desta tese nós observamos um efeito positivo do exercício físico regular sobre o dano residual nos portadores de DPOC, indicando melhor eficiência da reparação do DNA neste subgrupo. Contraditoriamente, portadores de DPOC sedentários apresentaram maior dano residual, maior número de anomalias celulares identificadas pelo BM Cyt, tais como, broto nuclear (defeito citocinético) e cromatina condensada (morte celular precoce por apoptose). Esses achados ratificam que portadores de DPOC sedentários apresentam deficiência na reparação das células danificadas que por sua vez estão sendo eliminadas pela via da apoptose como mecanismo de defesa secundário.

A decisão das células de encaminhamento para apoptose, frente a um dano não reparado, ainda não é bem elucidada. Entretanto, acredita-se que a reparação ineficiente do DNA seja o responsável pelo encaminhamento das células danificadas para morte por apoptose (BASSI, 2008). O incremento da apoptose celular em portadores de DPOC ocasiona um rápido declínio da função pulmonar, principalmente em pacientes mais velhos e com DPOC em estágio avançado (DEMEDTS *et al.*, 2006). Embora os mecanismos de reparação celular sejam extremamente eficientes, a sensibilidade da estrutura cromossômica permite a atuação de agentes mutagênicos o que pode provocar alterações irreversíveis e levar à formação de uma neoplasia (CARRARD *et al.*, 2007; RAMIREZ & SALDANHA, 2002).

Neste trabalho, nenhuma diferença foi encontrada entre as frequências de micronúcleos para pacientes e controles, nem mesmos no subgrupo de pacientes que praticam exercícios regulares. Uma hipótese provável para a ausência de diferenças na frequência de micronúcleos entre os dois grupos é que as células que foram muito danificadas sofrem apoptose, sendo eliminadas das contagens.

Ainda que o micronúcleo de esfoliado bucal seja um método em crescente aceitação devido ao sua facilidade de execução e por não ser um procedimento invasivo, é escasso o número de estudos que empregam essa técnica. Ainda é difícil encontrar um panorama epidemiológico completo sobre os fatores de risco que podem influenciar a clastogênese que culmina na formação de micronúcleos. Aplicada em um tecido altamente proliferativo como o epitélio bucal, torna-se mais eficiente no biomonitoramento em diversos casos, visto que é o sítio mais precoce de eventos genotóxicos induzidos por elementos carcinogênicos inalados ou ingeridos (HOLLAND *et al.*, 2008). Isso torna sua aplicação neste estudo ainda mais relevante, levando-se em conta a estreita ligação da DPOC com o tabagismo.

Existe uma grande variação interindividual (de até 17 vezes) na ocorrência de micronúcleos

e isso pode ser reflexo de fatores genéticos ou da ação de agentes genotóxicos não identificados (CARRARD *et al.*, 2007). Estudos entre populações humanas expostas a carcinógenos ambientais relataram associações positivas entre o nível de lesões cromossômicas e o risco de câncer (MAJER *et al.*, 2011; VAN LEEUWEN *et al.*, 2011).

Os fumantes, em média, apresentam quase o triplo de frequência de micronúcleos em comparação com não fumantes. No entanto, outras publicações não relatam diferença entre fumantes e não fumantes bem como entre homens e mulheres. Assim, o envolvimento potencial do tabagismo, gênero e idade sobre a frequência de micronúcleos em células bucais merece mais pesquisas. A maioria dos estudos, que descrevem um aumento significativo de micronúcleos, relaciona esse aumento ao risco de câncer de boca e foram realizadas em subgrupos de indivíduos com hábitos de vida específicos (KASHYAP & REDDY, 2012).

Sendo assim, o potencial individual de susceptibilidade para o rápido declínio da função pulmonar em portadores de DPOC pode ser atribuído às variâncias genéticas que podem interferir na reparação do DNA. As lesões ao DNA causadas pela exposição a substâncias exógenas, agentes tóxicos, presença de comorbidades e até mesmo o exercício físico, em geral são reparadas através de vias de reparação específicas e responsáveis pela manutenção e integridade do DNA.

Então, como é regulado o reparo no DNA na DPOC? Uma alta capacidade de reparação do DNA determina um baixo nível de dano no DNA? Qual a influência de polimorfismos genéticos em genes de reparação sobre os níveis de dano no DNA na DPOC?

Algumas respostas para as questões acima foram discutidas no CAPÍTULO III desta tese. Neste momento nós investigamos a potencial ligação entre polimorfismos genéticos em genes de reparação (*XRCC1* Arg399Gln, *OGG1* Ser326Cys, *XRCC3* Thr241Met e *XRCC4* Ile401Thr) e o nível de dano no DNA em portadores de DPOC e controles. A amostragem foi reagrupada conforme a combinação de genótipo variante de acordo com a presença do alelo de risco de cada gene estudado individualmente. Os resultados revelaram que o dano basal do DNA, pelo ensaio cometa alcalino e neutro, foi significativamente mais elevado em pacientes DPOC com genótipo variante polimórfico em *XRCC1* (ArgGln+GlnGln) e *XRCC3* (ThrMet+MetMet). O dano residual, resultante do dano induzido por agente alquilante MMS, também foi significativamente mais elevado nos portadores de DPOC com genótipo variante polimórfico em *XRCC1*(ArgGln+GlnGln), *OGG1* (SerCys+CysCys), *XRCC3* (ThrMet+MetMet) e *XRCC4*(IleThr+ThrThr).

Apesar da influência destes polimorfismos sobre os resultados do ensaio cometa, nenhuma alteração foi observada na frequência de micronúcleos e outras anomalias celulares analisadas pelo BMCyt (CAPÍTULO III). Convém ressaltar que nos resultados do BMCyt, observou-se uma correlação negativa entre os indicadores de progressão da DPOC (FEV<sub>1</sub>e FVC) e as anomalias celulares (broto nuclear, células binucleadas, células com cromatina condensada e cariorréticas) para os sujeitos deficientes em *OGGI* (relativo a cromatina condensada), em *XRCC1* e *XRCC3* (todas as anomalias celulares citadas). Esses achados reforçam a hipótese que na DPOC a deficiência na capacidade de reparação do DNA, decorrente dos polimorfismos genéticos estudados, influencia no erro de replicação do DNA e na morte celular por apoptose com consequente progressão da doença e risco de desenvolvimento de câncer.

A apoptose atua como mecanismo de vigilância e proteção do DNA, mediante a eliminação das células com material genético danificado (THOMAS *et al.*, 2009). Resultados similares foram encontrados em outros estudos, porém com sujeitos expostos ocupacionalmente a pesticidas (DA SILVA *et al.*, 2012a; DA SILVA *et al.*, 2012b).

*OGGI* e *XRCC1* tem papel central na via de reparação por excisão de bases (BER). *OGGI* cataliza a remoção da 8-hidrodesoxoguanina (8-OHdG), a qual tem sido considerada um biomarcador chave de dano oxidativo no DNA. A substituição de uma cisteína por uma serina no códon 326 (Ser326Cys) está associada com uma redução significativa na capacidade de reparação (YANG *et al.*, 2009). A evidência suporta que há um incremento do risco de DPOC entre fumantes correntes leves que possuem polimorfismos em *OGGI*(Ser326Cys) e em *XRCC1* (Arg399Gln) decorrente do decréscimo da atividade de BER. Então, *OGGI* e *XRCC1* parecem ter efeito combinado sobre o desenvolvimento da DPOC, pelo fato de *XRCC1* coordenar e estimular *OGGI* (YANG *et al.*, 2009).

Reparação do DNA é realizada por uma série de proteínas que apresentam várias funções, dependendo do tipo de dano ocorrido no DNA (BASSI, 2008). Quebras em dupla fita do DNA representam uma ameaça particular para a integridade genômica e podem levar para a morte celular. Um processo mais conservador de reparação de quebras duplas é a recombinação homóloga na qual as extremidades são reparadas pela informação da cromátide irmã intacta. O gene *XRCC3* é um dos membros relacionados que participa da recombinação homóloga e o polimorfismo genético em *XRCC3* (Thr241Met) tem sido associado com aumento de dano no DNA (BASSI, 2008). Os nossos resultados relativos ao aumento da frequência de células binucleadas conforme a progressão da doença, nos permitem assumir que os portadores de DPOC

com genótipo variante em *XRCC3* (Thr241Met) tem risco elevado no desenvolvimento de câncer (Tabela IV, CAPÍTULO III).

Apesar da recombinação não homóloga ser a via de reparação mais frequente para quebras duplas no DNA, sua acurácia é menor que a reparação feita por recombinação homóloga e frequentemente ocorre perda de fragmentos (nucleotídeos) do sítio danificado. Para deficiência na recombinação não homóloga dois polimorfismos em *XRCC4* foram reportados, incluindo *XRCC4* (Ile401Thr), porém as consequências funcionais desta variação são pouco esclarecidas (BASSI, 2008). Pouca atenção tem sido voltada para a avaliação de reparação de DNA em portadores de DPOC. Frequentemente a deficiência na reparação do DNA e sua relação com polimorfismos genéticos em genes de reparação têm sido associada ao acúmulo de dano no DNA, em exposição ambiental e outras doenças (BASSI, 2008; DA SILVA *et al.*, 2012a; DA SILVA *et al.*, 2012b).

Mas qual seria então o mecanismo de lesão oxidativa e dano no DNA dos portadores de DPOC em questão? Levando em consideração os resultados obtidos nesta tese e aqueles descritos na literatura, propusemos na Figura 9 um modelo sobre o mecanismo de lesão oxidativa e dano no DNA dos portadores de DPOC estudados.



**Figura 9. Mecanismos lesão oxidativa e dano no DNA dos portadores de DPOC.** (A) O Tabagismo é o pivô central no desenvolvimento da DPOC com efeito local imediato sobre o epitélio pulmonar. Os componentes químicos da fumaça do cigarro estimulam o recrutamento celular pulmonar, acentuando a resposta inflamatória dos pulmões com consequente aumento na produção de ERO e nos níveis de peroxidação lipídica; (B) Em decorrência destes achados, os portadores de DPOC apresentam elevados índices de dano endógeno e exógeno no DNA. O dano endógeno (basal) no DNA pode ser diminuído pelo uso corrente de corticosteroides; (C) O dano exógeno do DNA, aquele induzido por agente alquilante metilmetano sulfonato (MMS), reflete a susceptibilidade ao dano e/ou a capacidade de reparação deste DNA frente a um agente mutagênico. Portadores de DPOC são mais susceptíveis ao dano e/ou apresentam diminuição na eficiência da reparação do DNA, que pode ser modulada pela prática de exercício físico. Portadores de DPOC que praticam exercício físico regularmente apresentam menores níveis de peroxidação lipídica, menor susceptibilidade ao dano induzido e/ou melhor eficiência na reparação do DNA; (D) A presença de variantes genóticas polimórficas de *XRCC1* (ArgGln+GlnGln), *OGG1* (SerCys+CysCys), *XRCC3* (ThrMet+MetMet) e *XRCC4* (IleThr+ThrThr) também exerce influência negativa na reparação do DNA em portadores de DPOC, como consequência estes sujeitos tem elevado dano residual; (E) Devido a presença destes polimorfismos genéticos e o comprometimento de mecanismos de reparação, pode ocorrer erro de replicação do DNA e/ou morte celular programada (apoptose) que farão com que ocorra a progressão da DPOC. Nesse curso, a presença de variante genotípica polimórfica em *XRCC3*

(ThrMet+MetMet), responsável pelo reparo de quebras em fita dupla no DNA, eleva o risco de desenvolvimento de câncer conforme a progressão da doença.

## **CONCLUSÕES**

Os processos de danos bem como respostas a estes danos no DNA em portadores de DPOC são complexos e interagem entre si. O entendimento do mecanismo pelo qual isto acontece é a chave para novos *insights* na prevenção e tratamento da DPOC. Neste sentido, esta tese apresenta as seguintes conclusões:

➤ Portadores de DPOC apresentam elevado dano basal no DNA, conforme detectado pelo ensaio cometa versão alcalina e neutra em células de sangue periférico, quando comparados aos sujeitos controles;

➤ Portadores de DPOC foram mais susceptíveis aos danos exógenos no DNA induzidos pelo agente alquilante MMS e/ou apresentam deficiência da reparação do DNA para dano induzido;

➤ O incremento da susceptibilidade a danos exógenos induzidos por MMS correlacionaram-se positivamente com TBARS sugerindo alteração do balanço redox na acumulação de dano no DNA e provavelmente na etiologia e na patogênese da DPOC;

➤ A avaliação da susceptibilidade para agentes genotóxicos exógenos em portadores de DPOC, como detectado pelo ensaio cometa, poderia ser um biomarcador usável na progressão da doença considerando a correlação vista entre este parâmetro e a função pulmonar (capacidade vital forçada e volume expiratório forçado no 1ºsegundo);

➤ Portadores de DPOC que utilizam de corticosteróides apresentam um decréscimo no dano basal do DNA quando comparado aos DPOC que não utilizam este fármaco, porém sem significância estatística;

➤ A prática de exercício físico regular por portadores de DPOC (EF-DPOC) incrementa significativamente o dano basal no DNA em relação aos controles e DPOC que não praticam exercício físico, como verificado pelo ensaio cometa. Entretanto, estes pacientes (EF-DPOC) apresentaram menor peroxidação lipídica em plasma sanguíneo, menor susceptibilidade e/ou melhor eficiência da reparação do DNA para dano exógeno induzido por agente alquilante MMS, seguido de baixa frequência na formação de anomalias celulares (broto nuclear e cromatina condensada) analisadas pelo ensaio BMCyt;

➤ Portadores de DPOC que não praticam exercício físico regular tem maior dano residual e elevada frequência de células com anomalias do tipo broto nuclear e cromatina condensada, indicando deficiência na reparação do DNA e morte celular precoce por apoptose respectivamente;

➤ O efeito de polimorfismos em genes de reparação sobre o nível de dano no DNA,

avaliado pelo ensaio cometa, mostraram que a presença de variante genotípica *XRCC1* (ArgGln+GlnGln) e *XRCC3* (ThrMet+MetMet) influenciam na elevação do dano basal no DNA, bem como *XRCC1* (ArgGln+GlnGln), *OGG1* (SerCys+CysCys), *XRCC3* (ThrMet+MetMet) e *XRCC4*(IleThr+ThrThr) influenciaram na elevação do dano residual;

➤ Portadores de DPOC que possuem variante genotípica polimórfica *XRCC1* (ArgGln+GlnGln), *OGG1* (SerCys+CysCys), *XRCC3* (ThrMet+MetMet) apresentaram um incremento na frequência de anomalias celulares (cromatina condensada, cariorréticas células, broto nuclear, binucleadas) conforme a progressão da doença, indicando que a deficiência na reparação do DNA leva a morte celular por apoptose, como mecanismo de eliminação das células danificadas;

➤ Portadores de DPOC que possuem variantes genotípicas polimórficas *XRCC3* (ThrMet+MetMet) apresentaram um incremento na frequência de anomalias celulares (células com broto nuclear e binucleadas) conforme a progressão da doença, indicando que a deficiência na reparação do DNA leva ao erro de replicação e instabilidade cromossômica.

## **PERSPECTIVAS**

Outros experimentos serão conduzidos para caracterizar da fisiopatogenia da DPOC, tais como, medida de atividade de enzimas de estresse oxidativo (SOD, CAT, GPx) do material biológico que está congelado, além da avaliação de polimorfismo em outros genes conforme descrito na tabela 1.

**Tabela 1.** Vias, genes, polimorfismos que serão estudados, com *primers* e enzimas de restrição.

Função	Gene	Fragmento	Polimorfismo	Primers		Enzima de restrição
				Foward	Reverse	
BER	<i>OGG1</i>	672pb	Ser326Cys	GTTCCGTGTGAAGGAGGA G	CTTGGAGGTGCTGCCTAT G	Fnu4HI
BER	<i>XRCC1</i>	268pb	Arg399Gln	CAAGTACAGCCAGGTCCT AG	CCTTCCCTCATCTGGAGT AC	<i>BclI</i>
NER	<i>XPD</i>	436pb	Asp312Asn	CCT CTC CCT TTC CTC TGT TC	CAG GTG AGG GGG ACA TCT	<i>StyI</i>
Recombinação Homóloga	<i>XRCC3</i>	552pb	Thr241Met	GCCTGGTGGTCATCGACT C	ACAGGGCTCTGGAAGGCA CTGCTCAGCTCACGCACC	<i>NcoI</i>
Recombinação Não Homóloga	<i>XRCC4</i>	277pb	Ile401Thr	CTCAGAAGAAATTGTGTA TGCT	ACCACAAGCAAACACTGTGT ACAC	<i>BsrDI</i>
Metabolismo de xenobióticos	<i>CYP1A1</i>	204pb	Ile462Val	GGCTGAACCTTAGACCAC ATA	GAAGTGCCACTTCAGCTG TCT	<i>BsaI</i>
Metabolismo de xenobióticos	<i>CYP2E1</i>	495pb	-1053pb ou	CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA	CCC TCT TCC ACC TTC TAT GAA	<i>RsaI</i>
Neutralização de carcinógenos	<i>GSTP1</i>	176pb	Ile105Val	ACCCCAGGGCTCTATGG GAA	TGAGGGCACAAGAAGCC CCT	BsmAI
Neutralização de carcinógenos	<i>GSTM1</i>	215pb	Ausência/ Presença	GAAGTCCCTGAAAAGC TAAGC	GTTGGGGCTCAAATATAC GGTGG	-----
Neutralização de carcinógenos	<i>GSTT1</i>	480pb	Ausência/ Presença	TTCCTTACTGGTCCTCACA TCTC	TCACCGGATCAGGCCAGC A	-----
Neutralização de ERO	<i>GPX1</i>	338pb	Pro198Leu	TGTGCCCTACGGTA CA	CCAAATGACAATGACACG G	<i>ApaI</i>
Neutralização de ERO	<i>CAT1</i>	185pb	C-262T	AGAGCCTCGCCCCGCCG GACCG	TAGAGCTGAGAAAGCAT AGCT	<i>SmaI</i>
Neutralização de ERO	<i>SOD2</i>	110pb	Ala16Val	ACCAGCAGGCAGCTGGCG CCGG	GCGTTGATGTGAGGTTCC AG	<i>HaeIII</i>

Fonte: Laboratório de Imunogenética da UFRGS.

Além disso, os resultados do nosso estudo podem tornar-se mais robusto à medida que incrementarmos o *n* amostral de forma que possamos detectar diferenças entre portadores de

DPOC conforme estadiamento da doença, carga tabágica, uso de fármacos e outros tratamentos adicionais.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADCOCK I. M.; CARAMORI, G. & BARNES, P. J. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: New Molecular Insights. *Respiration*, 81: 265–284, 2011.

AFONSO, A. S. M.; VERHAMME, K. M.; STURKENBOOM, M. C. & BRUSSELLE, G. G. COPD in the general population: Prevalence, incidence and survival. *Respiratory Medicine*, 105(12): 1872-1884, 2011.

AGNOLETTI, M. H.; GUECHEVA, T. N.; DONDE, F.; DE OLIVEIRA, A. F.; FRANKE, F.; CASSINI, C.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. & SAFFI, J. Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. *Clinical Biochemistry*, 40(16-17): 1252-1258, 2007.

AKPINAR, E. E.; AKPINAR, S.; ERTEK, S.; SAYIN, E. & GULHAN, M. Systemic inflammation and metabolic syndrome in stable COPD patients. *Tuberk Toraks*, 60(3): 230-237, 2012.

ALBERTS, B. et al. *Fundamentos de Biologia Celular*. 3ª ed. Porto Alegre, Artmed, 2011.

ALFONSO, Y.; FRAGA, J.; COX, R.; JIMENEZ, N.; CAPO, V.; POMIER, O. FONSECA, C.; BANDERA, F.; DORTA-CONTRERAS, A. J.; CALA, V. & GINORIO, D. Conventional polymerase chain reaction for the diagnosis of neurotoxoplasmosis: comparison of three sets of primers for the B1 gene using CSF samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(2): 150-154, 2012.

ALMEIDA, K. H. & SOBOL R. W. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair*, 6(6): 695-711, 2007.

ALMEIDA, T. C.; STEFANON, E. B.; RECH, V. C.; SAGRILLO, M. R. & BOHRER, P. L. Analysis of oral mucosa of users of crack through micronucleus technique. *Clinical Laboratory*, 58(11-12): 1269-1275, 2012.

ANDREAZZA, A. C.; BORDIN, D. L. & SALVADOR, M. Thiobarbituric acid reactive substances, seric superoxide dismutase and CATalase activities in healthy subjects. *Clínica Chimica Acta*, 362: 192-194, 2005.

AOSHIBA, K.; ZHOU, F.; TSUJI, T. & NAGAI, A. DNA damage as a molecular link in the pathogenesis of COPD in smokers. *European Respiratory Journal*, 39(6): 1368-1376, 2012.

BARALE, R.; CHELOTTI, L.; DAVINI, T.; DEL RY, S.; ANDREASSI, M. G.; BALLARDIN, M.; BULLERI, M.; HE, J.; BALDACCI, S.; DI PEDE, F.; GEMIGNANI, F. & LANDI, S. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31(3): 228–242, 1998.

BARNES, P. J.; SHAPIRO, S. D. & PAUWELS, R.A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *European Respiratory Journal*, 22: 672–688, 2003.

BARR, R. G.; ROWE, B. H. & CAMARGO, C. A. Jr. Methylxantines for exacerbations of

chronic obstructive pulmonary disease: meta-analysis of randomised trials. *British Medical Journal*, 327: 643-648, 2003.

BASSI, C.; XAVIER, D. J.; PALOMINO, G.; NICOLUCCI, P.; SOARES, C.; SAKAMOTO-HOJO, E. & DONADI, E. Efficiency of the DNA repair and polymorphisms of the *XRCC1*, *XRCC3* and *XRCC4* DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 17(11): 988-995, 2008.

BENHUSEIN, G. M.; MUTCH, E.; ABURAWI, S. & WILLIAMS, F. M. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan Journal of Medicine*, 5: 4637, 2010.

BERG, E.; CHRISTENSEN, M. O.; DALLA ROSA, I.; WANNAGAT, E.; JANICKE, R. U.; ROSNER, L. M.; DIRKS, W. G.; BOEGE, F. & MIELKE, C. *XRCC4* controls nuclear import and distribution of Ligase IV and exchanges faster at damaged DNA in complex with Ligase IV. *DNA Repair*, 10(12): 1232-1242, 2011.

BOER, W. I. Cytokines and therapy in COPD: A promising combination? *Chest Journal*, 121: 209-218, 2002.

BOITEUX, S. & GUILLET, M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*. 3: 1-12, 2004.

BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, Y. P.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E. & FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus Project. *Mutation Research*, 543(2): 155-166, 2003.

CAMPOS, H. S. Mortalidade por DPOC no Brasil, 1980-1998. *Pulmão RJ*, 12(4): 217-225, 2003.

CAO, C.; WANG, R.; WANG, J.; BUNJHOO, H.; XU, Y. & XIONG, W. Body mass index and mortality in chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *PLoS One*, 7(8): e43892, 2012.

CARRARD, V. C.; COSTA, C. H.; FERREIRA, L. A.; LAUXEN, I. S. & RADOS, P. V. Teste dos Micronúcleos- Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas de mucosa oral. *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*, 48(1/3): 77-81, 2007.

CASELLA, M.; MINIATI, M.; MONTI, S.; MINICHILLI, F.; BIANCHI, F. & SIMI, S. No evidence of chromosome damage in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutagenesis*, 21(2):167-171, 2006.

CAVALCANTE, A. G. & DE BRUIN, P. F. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 35(12): 1227-1237, 2009.

CAVALLO, D.; URSINI, C. L.; PERNICONI, B.; FRANCESCO, A. D.; GIGLIO, M.; RUBINO, F. M.; MARINACCIO, A. & IAVICOLI, S. Evaluation of genotoxic effects induced

by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated buccal cells of oncology nurses and pharmacy employees. *Mutation Research*, 587(1-2): 45-51, 2005.

CAZZOLA, M.; DONNERB, C. & HANANIAC, N. A. One hundred years of respiratory medicine chronic obstructive pulmonary disease (COPD) - Republished article. *Respiratory Medicine: COPD Update* 4(1): 8-25, 2008.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A. Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology. *Mutation Research*, 544: 289-297, 2003.

CEYLAN, E.; KOCYIGIT, A.; GENCER, M.; AKSOY, N. & SELEK, S. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respiratory Medicine*, 100: 1270-1276, 2006.

CHIYOMARU, K., NAGANO, T. & NISHIGORI, C. XRCC1 Arg194Trppolymorphism, risk of nonmelanoma skin cancer and extramammary Paget's disease in a Japanese population. *Archives of Dermatological Research*, 304(5):363-70, 2012.

CHO, M. H.; CASTALDI, P. J.; WAN, E. S.; SIEDLINSKI, M.; HERSH, C. P.; DEMEO, D. L.; HIMES, B. E.; SYLVIA, J. S.; KLANDERMAN, B. J.; ZINITI, J. P.; LANGE, C.; LITONJUA, A. A.; SPARROW, D.; REGAN, E. A.; MAKE, B. J.; HOKANSON, J. E.; MURRAY, T.; HETMANSKI, J. B.; PILLAI, S. G.; KONG, X.; ANDERSON, W. H.; TAL-SINGER, R.; LOMAS DA; COXSON HO; EDWARDS, L. D.; MACNEE, W.; VESTBO, J.; YATES, J. C.; AGUSTI, A.; CALVERLEY, P. M.; CELLI, B.; CRIM, C.; RENNARD, S.; WOUTERS, E.; BAKKE, P.; GULSVIK, A.; CRAPO, J. D.; BEATY, T. H.; SILVERMAN, E. K.; ICGN INVESTIGATORS; ECLIPSE INVESTIGATORS & COPD GENE INVESTIGATORS. The genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are still largely unknown. A genome-wide association study of COPD identifies a susceptibility locus on chromosome 19q13. *Human Molecular Genetics*, 15;21(4): 947-57, 2012.

CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M. T.; ROOS, W. P. & KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193: 3-34, 2003.

CIENCEWICKI, J.; TRIVEDI, S. & KLEEBERGER, S. R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122: 456-68, 2008.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26(3): 249-261, 2004.

COLLINS, A. R. & AZQUETA, A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutation Research*, 736(1-2): 122-129, 2012.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUSINSKA, M.; KENNEDY, G. & STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183-93, 1997.

COLLINS, A. R. & FERGUSON, L. R. DNA repair as a biomarker. *Mutation Research*, 736(1-2): 2-4, 2012.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVAO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C. & STETINA, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23(3): 143- 151, 2008.

COSTA, C.; RUFINO, R. & LAPA E SILVA J. R.. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 55(3): 347-54, 2009.

DA SILVA, F. R.; DA SILVA, J.; ALLGAYER MDA, C.; SIMON, C. F.; DIAS, J. F.; DOS SANTOS, C. E.; SALVADOR, M.; BRANCO, C.; SCHNEIDER, N. B.; KAHL, V.; ROHR, P. & KVITKO, K. Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: Biomarkers of exposure, of early biological effects and of susceptibility. *Journal of Hazardous Materials*, 225-226: 81-90, 2012a.

DA SILVA, F. R.; DA SILVA, J.; NUNES, E.; BENEDETTI, D.; KAHL, V.; ROHR, P.; ABREU, M. B.; THIESEN, F. V. & KVITKO, K. Application of the buccal micronucleus cytome assay and analysis of PON1Gln192Arg and CYP2A6\*9(-48T>G) polymorphisms in tobacco farmers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53(7): 525-534, 2012b.

DATASUS. Notícias do Portal Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/7358/162/medicamentos-para-doenca-pulmonar-estarao-no-sus.html>>. Acesso em: 06 Set. 2012.

DE RUYCK, K.; VAN EIJKEREN, M.; CLAES, K.; MORTHIER, R.; PAEPE, A.; VRAL, A.; RIDDER, L. & THIERENS, H. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in *XRCC1*, *XRCC3*, and *OGG1* genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *International Journal Radiation Oncology Biology and Physics*, 62(4): 1140-1149, 2005.

DECRAMER, M.; JANSSENS, W. & MIRAVITLLES, M. Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, 379( 9823): 1341-1351, 2012.

DEMEDTS, I. K.; DEMOOR, T.; BRACKE, K. R.; JOOS, G. F. & BRUSSELLE, G. G. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory Research*, 7: 53, 2006.

DUARTE, M. C.; COLOMBO, J.; ROSSIT , A. R. B. & SILVA, A. E. Polymorphisms of the DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3* in a Brazilian population. *Genetic and Molecular Biology*, 28(3): 397-401, 2005.

DUSINSKA, M. & COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23(3): 191-205, 2008.

EKLUND, B. M.; NILSSON, S.; HEDMAN, L. & LINDBERG, I. Why do smokers diagnosed with COPD not quit smoking? A qualitative study. *Tobacco Induced Diseases*, 10(1): 17, 2012.

FALAGAN-LOTSCH, P.; RODRIGUES, M. S.; ESTEVES, V.; VIEIRA, R.; AMENDOLA, L. C.; PAGNONCELLI, D.; PAIXÃO, J. C. & GALLO, C. V. M. *XRCC1* gene polymorphisms in a population sample and in women with a family history of breast cancer from Rio de Janeiro (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*. 32(2): 255-259, 2009.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction e cell death. *Mutation Research*, 600(1-2): 58-66, 2006.

FISCHER, B. M.; PAVLISKO, E. & VOYNOW, J. A. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 6: 413-21, 2011.

FOGARTY, M. C.; HUGHES, C. M.; BURKE, G.; BROWN, J. C.; TRINICK, T. R.; DULY, E.; BAILEY, D. M. & DAVISON, G. W. Exercise-induced lipid peroxidation: Implications for deoxyribonucleic acid damage and systemic free radical generation. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52(1): 35-42, 2011.

FORD, E. S.; WHEATON, A. G.; MANNINO, D. M.; PRESLEY-CANTRELL, L.; LI, C. & CROFT, J. B. Elevated cardiovascular risk among adults with obstructive and restrictive airway functioning in the United States: a cross-sectional study of the National Health and Nutrition Examination Survey from 2007-2010. *Respiratory Research*, 13: 115, 2012.

FRIEDBERG, E.C. A brief history of the DNA repair field. *Cell Research*, 18(1): 3-7, 2008.

FRITZ, K. S. & PETERSEN, D. R. Exploring the Biology of Lipid Peroxidation-Derived Protein Carbonylation. *Chemical Research in Toxicology*, 24(9): 1411-1419, 2011.

GASPAR, P. A. Genes de Suscetibilidade. In SILVA, J.; ERDTMANN, E.; HENRIQUES, J. A. P.(Org.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

GASPAROVIC, A. C.; JAGANJAC, M.; MIHALJEVIC, B.; SUNJIC, S. B. & ZARKOVIC, N. Assays for the measurement of lipid peroxidation. *Methods in Molecular Biology*, 965: 283-296, 2013.

GATTAS, G. J.; CARDOSO, L. D. E. A.; MEDRADO-FARIA, M. D. E. A. & SALDANHA, P. H. Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. *Occupational Medicine*, 51(2): 107-113, 2001.

GODOY, D. V.; DAL ZOTTO, C.; BELLICANTA, J.; WESCHENFELDER, R. F. & NACIF, S. B. Doenças respiratórias como causa de internações hospitalares de pacientes do Sistema Único de Saúde num serviço terciário de clínica médica na região nordeste do Rio Grande do Sul. *Jornal de Pneumologia*, 27(4): 193-198, 2001.

GOLD- GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE. *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease*. Updated 2011. National Institutes of Health and National Heart, Lung and Blood Institute. <http://www.goldcopd.org>

GRESNER, P.; GROMADZINSKA, J. & WASOWICZ, W. Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. *Lung Cancer*, 57: 1-25, 2007.

GUMRAL, N.; NAZIROGLU, M.; ONGEL, K.; BEYDILLI, E. D.; OZGUNER, F.; SUTCU, R.; CALISKAN, S. & AKKAYA, A. Antioxidant enzymes and melatonin levels in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease during stable and exacerbation periods. *Cellular Biochemistry and Function*, 27: 276–283, 2009.

HANG B. For mation and repair of tobacco carcinogen-derived bulk y dna adducts. *Journal of Nucleic Acids*, 10: 1-29, 2010.

HANSSEN-BAUER, A.; SOLVANG-GARTEN, K.; SUNDHEIM, O.; PENA-DIAZ, J.; ANDERSEN, S.; SLUPPHAUG, G.; KROKAN, H. E.; WILSON, D. M., AKBARI, M. & OTTERLEI, M. XRCC1 coordinates disparate responses and multiprotein repair complexes depending on the nature and context of the DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52(8): 623-635, 2011.

HANTA, I.; KOCABAS, A.; CANACANKATAN, N.; KULECI, S. & SEYDAOGLU, G. Oxidant–antioxidant balance in patients with COPD. *Lung*, 184(2): 51-55, 2006.

HASPLOVÁ, K.; HUDECOVA, A.; MAGDOLENOVA, Z.; BJORAS, M.; GALOVA, E.; MIADOKOVA, E. & DUSINSKA, M. DNA alkylation lesions and their repair in human cells: modification of the comet assay with 3-methyladenine DNA glycosylase (AlkD). *Toxicology Letters*, 208(1): 76–81, 2012

HEGAB, A. E.; SAKAMOTO, T.; UCHIDA, Y.; NOMURA, A.; ISHII, Y.; MORISHIMA, Y.; MOCHIZUKI, M.; KIMURA, T.; SAITOH, W.; KIWAMOTO, T.; IIZUKA, T.; MASSOUD, H. H.; MASSOUD, H. M.; HASSANEIN, K. M. & SEKIZAWA, K. Association analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase2 gene polymorphisms with COPD in Egyptians. *Respiratory Medicine*, (99): 107–110, 2005.

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

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, aging, and cancer. *The New England Journal of Medicine*. 361: 15, 2009.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S. & FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, 659(1–2): 93-108, 2008.

HOLLAND, N.; FUCIC, A.; MERLO, D. F.; SRAM, R. & KIRSCH-VOLDERS, M. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis*, 26(1): 51-6, 2011.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>o</sup> ed., New York: Oxford University Press, 2007.

IGLESIAS, R.; JHA, P.; PINTO, M.; DA COSTA E SILVA, V. L. & GODINHO J. Health,

Nutrition and Population- The World Bank\_Controle Tabagismo no Brasil. Agosto 2007. Disponível em: <<http://www.who.in>>. Acesso em: 15 Jul. 2012.

ITO, K.; COLLEY, T. & MERCADO, N. Geroprotectors as a novel therapeutic strategy for COPD, an accelerating aging disease. *International Journal Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 7: 641-652, 2012.

JEMAL, A., WARD, E., HAO, Y. & THUN, M.. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *The Journal of the American Medical Association*, 294(10): 1255-1259, 2005.

JÚNIOR ANDRADE, D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A. & ANDRADE, D. R. Oxygen free radicals and pulmonary disease. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 31(1): 60-8, 2005.

JUNQUEIRA, V. B.C.; BARROS, S. B. M.; CHAN, S. S.; RODRIGUES, L.; GIAVAROTTI, L.; ABUD, A. R. L. & DEUCHER, G. P. Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(1-2): 5-16, 2004.

KAMIYA, A.; KIKUCHI, A.; TOMITA, Y. & KANBE, T. PCR and PCR—RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *Journal of Dermatological Science*, 34: 35-48, 2004.

KASHYAP, B. & REDDY, P. S. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 8(2): 184-191, 2012.

KENT, B. D.; MITCHELL, P. D. & MCNICHOLAS, W. T. Hypoxemia in patients with COPD: cause, effects, and disease progression. *International Journal of COPD*, 6: 199–208, 2011.

KIM, H.; LIU, X.; KOBAYASHI, T.; CONNER, H.; KOHYAMA, T.; WEN, F.Q.; FANG, Q.; ABE, S.; BITTERMAN, P. & RENNARD, S. I. Reversible Cigarette Smoke Extract–Induced DNA Damage in Human Lung Fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31: 483–490, 2004.

KREMER, T. M.; RINNE, M. L.; XU, Y.; CHEN, X. M. & KELLEY, M. R. Protection of pulmonary epithelial cells from oxidative stress by hMYH adenine glycosylase. *Respiratory Research*, 5: 16, 2004.

KRUPA, R.; SYNOWIEC, E.; PAWLOWSKA, E.; MORAWIEC, Z.; SOBCZUK, A.; ZADROZNY, M.; WOZNIAK, K. & BLASIAK, J. Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 87:32–35, 2009.

LAKHDAR, R.; DENDEN, S.; KASSAB, A.; LEBAN, N.; KNANI, J.; LEFRANC, G.; MILED, A.; CHIBANI, J. B. & KHELIL, A. H. Update in chronic obstructive pulmonary disease: role of antioxidant and metabolizing gene polymorphisms. *Experimental Lung Research* [online], 1–12, 2011.

LAN, L.; NAKAJIMA, S.; OOHATA, Y.; TAKAO, M.; OKANO, S.; MASUTANI, M.; WILSON, S. H. & YASUI, A. In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(38): 13738–13743, 2004.

LANDMESSER, U. & HARRISON, D. G. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension. *Coronary Artery Disease*, 12(1): 455-461, 2001.

LANIADO-LABORÍN, R. Review Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Parallel Epidemics of the 21st Century, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6: 209-224, 2009.

LEE, J. H.; HANAOKA, M.; KITAGUCHI, Y.; KRASKAUSKAS, D.; SHAPIRO, L.; VOELKEL, N. F. & TARASEVICIENE-STEWART, L. Imbalance of Apoptosis and Cell Proliferation Contributes to the Development and Persistence of Emphysema. *Lung*, 190(1): 69-82, 2011.

LEE, M. Y.; KIM, M. A.; KIM, H. J.; BAE, Y. S.; PARK, J. I.; KWAK, J. Y.; CHUNG, J. H. & YUN, J. Alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) induces a wave of global protein hyperacetylation: implications in cancer cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 360(2): 483-489, 2007.

LIU, N.; GUAN, W.; MENG, H.; CUI, T.; LI, Z.; CHENG, J.; XIAO, J.; WANG, X. & LI, B. Association of XRCC4 polymorphisms and chromosomal damage levels in 1,3-butadiene workers. *Wei Sheng Yan Jiu*, 39(4):407-11, 2010.

LUNDIN, C.; NORTH, M.; ERIXON, K.; WALTERS, K.; JENSSEN, D.; GOLDMAN, A. S. & HELLEDAY, T. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 33(12): 3799-3811, 2005.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*, 380(1–2): 50-58, 2007.

LYNCH, A. M.; SASAKI, J. C.; ELESURU, R.; JACOBSON-KRAM, D.; THYBAUD, V.; DE BOECK, M.; AARDEMA, M. J.; AUBRECHT, J.; BENZ, R. D.; DERTINGER, S. D.; DOUGLAS, G. R.; WHITE, P. A.; ESCOBAR, P. A.; FORNACE, A.; HONMA, M.; NAVEN, R. T.; RUSLING, J. F.; SCHIESTL, R. H.; WALMSLEY, R. M.; YAMAMURA, E.; VAN BENTHEM, J. & KIM, J. H. New and emerging technologies for genetic toxicity testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52(3): 205-223, 2011.

MACNEE, W. & TUDER, R. M. New Paradigms in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease I. *American Thoracic Society*, 6: 527–531, 2009.

MAJER, B. J.; LAKY, B.; KNASMÜLLER, S. & KASSIE, F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research*, 489(2-3): 147-72, 2001.

MALUF, S. W. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block

micronucleus method and alkaline single- cell gel eletrophoresis. *Clínica Chimica Acta*, 347: 15-24, 2004.

MALUF, S. W.; MERGENER, M.; DALCANALE, L.; COSTA, C. C.; POLLO, T.; KAYSER, M.; SILVA, L. B.; PRA, D. & TEIXEIRA, P. J. Z. DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutation Research*, 626: 180-184, 2007.

MAN, W. D. C.; POLKEY, M. I.; DONALDSON, N; GRAY, B. J & MOXHAM, J. Community pulmonary rehabilitation after hospitalisation for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: randomised controlled study. *British Medical Journal*, 329: 1209, 2004.

MANNINO, D. M. & BUIST, A. S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *The Lancet*, 370(9589): 765-773, 2007.

MARINI, D. M. IARC *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans* Vol. 83. IARC, Lyon, France, 2004.

MERCKEN, E. M.; HAGEMAN, G. J.; SCHOLS, A. M.; AKKERMANS, M. A.; BAST, A. & WOUTERS, E. F. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172(8): 994-1001, 2005.

MERGENER, M.; MARTINS, M. R.; ANTUNES, M. V.; DA SILVA, C. C.; LAZZARETTI, C.; FONTANIVE, T. O.; SUYENAGA, E. S.; ARDENGHI, P. G.; MALUF, S. W. & GAMARO, G. D. Oxidative stress and DNA damage in older adults that do exercises regularly. *Clinical Biochemistry*, 42: 1648–1653, 2009.

MESIA-VELA, S.; YEH, C. C.; AUSTIN, J. H.; DOUNEL, M.; POWELL, C. A.; REEVES, A.; SANTELLA, R. M.; STEVENSON, L.; YANKELEVITZ, D. & BARR, R. G. Plasma carbonyls do not correlate with lung function or computed tomography measures of lung density in older smokers. *Biomarkers*, 13(4): 422-34, 2008.

MIGLIORE, L.; COPPEDE, F.; FENECH, M. & THOMAS, P. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. *Mutagenesis*, 26(1): 85-92, 2011.

MINEMATSU, N.; NAKAMURA, H.; IWATA, M.; TATENO, H.; NAKAJIMA, T.; TAKAHASHI, S.; FUJISHIMA, S. & YAMAGUCHI, K. Association of CYP2A6 deletion polymorphism with smoking habit and development pulmonary emphysema. *Thorax* 58: 623-628, 2003.

MISTELI, T. & SOUTOGLU, E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10: 243-254, 2009.

MIRAVITLLES, M. Avaliação econômica da doença pulmonar obstrutiva crônica e de suas agudizações: aplicação na América Latina. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 30(3): 274-285, 2004.

MLADENOV, E. & ILIAKIS, G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research*, 711(1-2): 61-72, 2011.

MORAES, M. C. S.; NETO, J. B. C. & MENCK, C. F. M. DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience*, 17: 1362-1388, 2012.

MORRISON, D.; RAHMAM, I.; LANNAN, S. & MACNEE, W. Epithelial permeability, inflammation and oxidative stress in the air spaces of smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159: 473-479, 1999.

MOUSSALLE, L. D. Análise do dano de DNA em sangue periférico com medida de desfecho de um programa de reabilitação pulmonar. Dissertação de Mestrado, Programa de pós-graduação em ciências pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

NADEEM, A.; RAJ, H. & CHHABRA, S. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation*, 29(1): 23-32, 2005.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M. & CIOCCA, D. R.. A silver staining method for single-cell gel assay. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 49(9): 1183-6, 2001.

NEOFYTOS, E.; TZORTZAKI, E. G.; CHATZIANTONIOU, A. & SIAFAKAS, N. M. DNA Damage Due to Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12): 16853-16864, 2012.

NERSESYAN, A.; KUNDI, M.; ATEFIE, K.; SCHULTE-HERMANN, R. & KNASMULLER, S. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15(10): 1835-1840, 2006.

NICE – National Institute for Health and Clinical Excellence, Self Management BTS- NICE clinical guideline 101, June 2010. Chronic obstructive pulmonary disease. Management of chronic obstructive pulmonary disease in adults in primary and secondary care.

NISS, A. M.; HARTMANN, A.; GRÜNERT-FUCHS, M.; POCH, B. & SPEIT, G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *International Journal of Sports Medicine*, 17: 397–403, 1996.

OKUR, H. K.; PELIN, Z.; YUKSEL, M. & YOSUNKAYA, S. Lipid peroxidation and paraoxonase activity in nocturnal cyclic and sustained intermittent hypoxia. *Sleep Breath* [online], 2012 Apr 18.

OLIVEIRA, J. C. A.; JARDIM, J. R. B. & RUFINO, R.. I Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 26(supl 1), 2000.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. O mundo da saúde. In:\_\_\_\_. Relatório Mundial de Saúde 1997. São Paulo: ano 21, 21(5), 1997.

PAN, L.; GUO Y. Z.; YAN, J. H.; ZHANG, W. X.; JIAN, S. & LI, B. W. Does upper extremity

exercise improve dyspnea in patients with COPD? A meta-analysis. *Respiratory Medicine*, 20: 1-9, 2012.

PARDO, B.; GÓMEZ-GONZÁLES, B. & AGUILERA, A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cellular and Molecular Life Science*, 66(6): 1039-1056, 2009.

PASTUKH, V. M.; ZHANG, L.; RUCHKO, M. V.; GORODNYA, O.; BARDWELL, G. C.; TUDER, R. M. & GILLESPIE, M. N. Oxidative DNA damage in lung tissue from patients with COPD is clustered in functionally significant sequences. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 6: 209-217, 2011.

PAUWELS, R. A.; BUIST, A. S.; CALVERLEY, P. M. A., JENKINS, C. R. & HURD, S. S. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163: 1256-1276, 2001.

PEREIRA, L. C. & MERCADANTE, E. F. Doença pulmonar obstrutiva crônica no idoso: relato de caso. *Textos Envelhecimento* [online], 7(1): 105-121, 2004.

PETTERSEN, C. A. & ADLER, K. B. Airways Inflammation and COPD: Epithelial-neutrophil interactions. *Chest Journal*, 121: 142-150, 2002.

PILLAI, S. G.; GE, D.; ZHU, G.; KONG, X.; SHIANNAN, K. V.; NEED, A. C.; FENG, S.; HERSH, C. P.; BAKKE, P.; GULSVIK, A.; RUPPERT, A.; LODRUP CARLSEN, K. C.; ROSES, A.; ANDERSON, W.; RENNARD, S. I.; LOMAS, D. A.; SILVERMAN, E. K. & GOLDSTEIN, D. B. A Genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genetics* 5(3): 1000421, 2009.

POWERS, S. K. & JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88(4): 1243-1276, 2008.

PRASAD, R.; BEARD, W. A.; BATRA, V. K.; LIU, Y.; SHOCK, D. D. & WILSON, S. H. A review of recent experiments on step-to-step "hand-off" of the DNA intermediates in mammalian base excision repair pathways. *Molecular Biology*, 45(4): 586-600, 2011.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y. & GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(2): 153-159, 2008.

RAHMAN, I. Pharmacological antioxidant strategies as therapeutic interventions for COPD. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(5): 714-28, 2011.

RAHMAN, I.; KINNULA, V. L.; GORBUNOVA, V. & YAO, H. SIRT1 as a therapeutic target in inflammation of the pulmonary disease. *Preventive Medicine*, (54): S20-8, 2012.

RAM, F. S. F.; WEDZICH, J. A.; WRIGHT, J. & GREENSTONE, M. Hospital at home for patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: systematic review of evidence. *British Medical Journal*, 329(7461): 315, 2004.

RAMIREZ, A. & SALDANHA, P.H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genetics and Molecular Research*, 1(3): 246-260, 2002.

REARDON, J. T.; BESSHO, T.; KUNG, H. C.; BOLTON, P. H. & SANCAR, A. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration of xeroderma pigmentosum patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (94): 9463-9468, 1997.

RELTON, C.; DANIEL, P.; HAMMALB, D. M.; PARKER, L.; TAWNA, J. & BURN, J. DNA repair gene polymorphisms, pre-natal factors and the frequency of somatic mutations in the glycophorin-A gene among healthy newborns. *Mutation Research*, 545(12): 49-57, 2004.

RENNARD, S. I.; TOGO, S. & HOLZ, O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair a mechanism for the development of emphysema. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3: 703-708, 2006.

REPETTO, M. & KUHN REPETTO, G. *Toxicologia Médica*. Ediciones Díaz de Santos, 2009.

ROCHA, A. P.; MAGALHÃES, P. K. R.; MAIA, A. L. & MACIEL, L. M. Z. Polimorfismos genéticos: implicações na patogênese do carcinoma medular de tireóide. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 51(5): 723-730, 2007.

RODRIGUEZ, D. A.; KALKO, S.; PUIG-VILANOVA, E.; PEREZ-OLABARRÍA, M.; FALCIANI, F.; GEA, J.; CASCANTE, M.; BARREIRO, E. & ROCA, J. Muscle and blood redox status after exercise training in severe COPD patients. *Free Radical Biology & Medicine*, 52: 88-94, 2012.

ROELOFS, R. W.; SPRONG, T.; DE KOK, J. B. & SWINKELS, D. W. PCR-restriction fragment length polymorphism method to detect the x/y polymorphism in the promoter site of the mannose-binding lectin gene. *Clinical Chemistry*, 49(9): 1557-1558, 2003.

ROHR, P. Influência de polimorfismos em genes de reparo no risco ocupacional de Viticultores do Rio Grande do Sul. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, vol. Master. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

ROHR, P.; DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. & KVITKO, K. The BER pathway genes and PON1 polymorphism: influence on DNA damage in agriculture-exposed workers. *Theoria*, 15(2): 69-77, 2006.

ROHR, P.; DA SILVA, J.; DA SILVA, F. R.; SARMENTO, M.; PORTO, C.; DEBASTIANI, R.; DOS SANTOS, C. E.; DIAS, J. F. & KVITKO, K. Evaluation of genetic damage in open-cast coal mine workers using the buccal micronucleus cytome assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 54(1): 65-71, 2013.

ROHR, P.; DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; SAFFI, J.; GUECHEVA, T. N.; ANTONIO PEGAS HENRIQUES, J. & KVITKO, K. BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52(1): 20-27, 2011.

RUFINO, R.. & SILVA, J. R. L. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 32(3): 241-8, 2006.

RYTILA, P.; REHN, T.; ILUMETS, H.; ROUHOS, A.; SOVIJÄRVI, A.; MYLLÄRNIEMI, M.; KINNULA, V. L. Increased oxidative stress in asymptomatic current chronic smokers and GOLD stage 0 COPD. *Respiratory Research*, 7: 69, 2006.

SADOWSKA, A. M.; KLEBE, B.; GERMONPRE, P. & DE BACKER, W. A. Glucocorticosteroids as antioxidants in treatment of asthma and COPD. New application for an old medication? *Steroids*, 72(1): 1-6, 2007.

SAMOSHKIN, A.; DULEV, S.; LOUKINOV, D.; JEFFREY, A.; ROSENFELD, D. J. & STRUNNIKOV, A. V. Condensin dysfunction in human cells induces nonrandom chromosomal breaks in anaphase, with distinct patterns for both unique and repeated genomic regions. *Chromosoma*, 121: 91-99, 2012.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; AZEVEDO E SILVA, G.; MENEZES, A. M.; MONTEIRO, C. A.; BARRETO, S. M.; CHOR, D. & MENEZES, P. R. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *The Lancet*, 377(9781): 1949-1961, 2011.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; SILVA, G.A.; MENEZES, A. M.; MONTEIRO, C. A.; BARRETO, S. M. CHOR, D. & MENEZES, P. R. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais in: *The Lancet* [online], 2011 May. [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com).

SEIMETZ, M.; PARAJULI, N.; PICHL, A.; VEIT, F.; KWAPISZEWSKA, G.; WEISEL, F. C.; MILGER, K.; EGEMNAZAROV, B.; TUROWSKA, A.; FUCHS, B.; NIKAM, S.; ROTH, M.; SYDYKOV, A.; MEDEBACH, T.; KLEPETKO, W.; JAKSCH, P.; DUMITRASCU, R.; GARN, H.; VOSWINCKEL, R.; KOSTIN, S.; SEEGER, W.; SCHERMULY, R. T.; GRIMMINGER, F.; GHOFRANI, H. A. & WEISSMANN, N. Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell*, 147: 293-305, 2011.

SHRIVASTAV, M.; DE HARO, L. P. & NICKOLOFF, J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*, 18(1): 134-147, 2008.

SIEMIATYCKI, J.; RICHARDSON, L.; STRAIF, K.; LATREILLE, B.; LAKHANI, R.; CAMBELL, S.; ROUSSEAU, M. C. & BOFFETA, P. Listing occupational carcinogens. *Environmental Health Perspectives*, 112: 1447-1459, 2004.

SILVA, J.; ERDTMANN, B. & HENRIQUES P. J. A. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003.

SIN, D. D.; COHEN, S. B.; DAY, A.; COXSON, H. & PARE, P. D. Understanding the biological differences in susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease between men and women. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 4(8): 671-674, 2007.

SINGH, N. P.; STEPHENS, R. E. & SCHNEIDER, E. L. Modifications of alkaline microgel

electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *International Journal of Radiation Biology*, 66(1): 23-8, 1994.

SIU, P. M.; PEI, X. M.; TENG, B. T.; BENZIE, I. F.; YING, M. & WONG, S. H. Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. *Experimental Physiology*, 96(9): 889-906, 2011.

SKYBA, P.; KLUCHOVA, Z.; JOPPA, P.; PETRASOVA, D. & TKACOVA, R. Nutritional status in relation to respiratory impairment and systemic inflammation in patients with acute exacerbations of COPD. *Medical Science Monitor*, 15(10): 528-533, 2009.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B. & KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 531(1-2): 231-51, 2003.

SOUSA, C. S.; KERR, W. E.; BONETT, A. M.; SOUZA, C. S.; SANTANA, F. A.; GOULART, L. R.; OLIVEIRA, R. C.; VIEIRA, C. U. & VASCONCELOS, S. M. Comparative molecular techniques SSCP, DS-PCR, PCR-RFLP for analysis of mutation detection in mitochondrial gene 16S RRNA in population de *Melipona Rufiventris*. *Bioscience Journal*, 19(01): 65-70, 2003.

SOUSA, C. A. D.; CÉSAR, C. L. G.; BARROS, M. B. A.; CARANDINA, L.; GOLDBAUM, M. & PEREIRA, J. C. R. Doença pulmonar obstrutiva crônica e fatores associados em São Paulo, SP, 2008-2009. *Revista de Saúde Pública*, 45: 887-896, 2011.

SPEIT, G.; WITTON-DAVIES, T.; HEEPCHANTREE, W.; TRENZ, K. & HOFFMANN, H. Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutation Research*, 542 (1-2): 33-42, 2003.

STAMPFLI, M. R. & ANDERSON, G. P. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 9(5): 377-384, 2009.

STANOJKOVIC, I.; KOTUR-STEVLJEVIC, J.; MILENKOVIC, B.; SPASIC, S.; VUJIC, T.; STEFANOVIC, A.; LLIC, A. & IVANISEVIC, J. Pulmonary function, oxidative stress and inflammatory markers in severe COPD exacerbation. *Respiratory Medicine*, 105:S31-37, 2011.

STEPHENS, M. B. & YEW, K. S. Diagnosis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Family Physician*, 78(1): 87-92, 2008.

STOLAREK, R.; BIALASIEWICZ, P.; KROL, M. & NOWAK, D. Breath analysis of hydrogen peroxide as a diagnostic tool. *Clinica Chimica Acta*, 411: 1849-1861, 2010.

SYMINGTON, L. S. & GAUTIER, J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics*, 45: 247-271, 2011.

TACK, G. American Thoracic Society (ATS-2009) Conference Report. *Respiratory medicine: COPD Update 5*: 62-66, 2009.

TAKABATAKE, N. TORIYAMA, S.; IGARASHI, A.; TOKAIRIN, Y.; TAKEISHI, Y.; KONTA, T.; INOUE, S.; ABE, S.; SHIBATA, Y. & KUBOTA, I. A novel polymorphism in CDC6 is associated with the decline in lung function of ex-smokers in COPD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381: 554–559, 2009.

TANRIKULU, A. C.; ABAKAY, A.; EVLIYAOGU, O. & PALANCI, Y. Coenzyme Q10, copper, zinc, and lipid peroxidation levels in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biological Trace Element Research*, 143(2): 659-667, 2011.

THOMAS, P.; HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S. & FENECH, M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4: 825-837, 2009.

THOMAS, P.; WU, J.; DHILLON, V. & FENECH, M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*, 26(1): 69–76, 2011.

TONELLO, A. & POLI, G. Rethinking chronic obstructive pulmonary disease. *Medical Hypotheses*, 76(3): 358-360, 2011.

TORRES, B. S. & GODOY, I. Doenças tabaco-relacionadas. In: Diretrizes para Cessação do Tabagismo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 30(2): 21-31, 2004.

TORRES-RAMOS, Y. D.; GARCÍA-GUILLEN, M. L.; OLIVARES-CORICHI, I. M. & HICKS, J. J. Correlation of plasma protein carbonyls and C-reactive protein with gold stage progression in COPD patients. *The Open Respiratory Medicine Journal*, 3: 61-66, 2009.

TROST, A.; GRAF, B.; EUCKER, J.; SEZER, O.; POSSINGER, K. & GOBEL, U. B. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2): 201-211, 2004.

TZORTZAKI, E. G.; DIMAKOU, K.; NEOFYTOU, E.; TSIKRITSAKI, K.; SAMARA, K.; AVGOUSTI, M.; AMARGIANITAKIS, V.; GOUSIOU, A.; MENIKOU, S. & SIAFAKAS, N. M. Oxidative DNA damage and somatic mutations: a link to the molecular pathogenesis of chronic inflammatory airway diseases. *Chest Journal*, 141(5): 1243-1250, 2012.

VAN LEEUWEN, D. M.; PEDERSEN, M.; KNUDSEN, L. E.; BONASSI, S.; FENECH, M.; KLEINJANS, J. C. & JENNEN, D. G. Transcriptomic network analysis of micronuclei-related genes: a case study. *Mutagenesis*, 26(1): 27-32, 2011.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S. & KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30(5): 1323-1338, 2007.

VASILEVA, Z. Z.; BERSIMBAEV, R. I.; BEKMANOV, B. O. & VOROBTSOVA, I. E. The polymorphism of DNA repair genes *XRCC1*, *XRCC3* and the level of chromosomal aberrations in the Uranium workers. *Radiatsionnaia biologii, radioecologia*, 52(1): 25-30, 2012.

VIBHUTI, A.; ARIF, E.; DEEPAK, D.; SINGH, B. & QADAR PASHA, M. A. Genetic polymorphisms of GSTP1 and mEPHX correlate with oxidative stress markers and lung function in COPD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(1): 136-142, 2007.

VIBHUTI, A.; ARIF, E.; MISHRA, A.; DEEPAK, D.; SINGH, B.; RAHMAN, I.; MOHAMMAD, G. & PASHA, Q. CYP1A1, CYP1A2 and CYBA gene polymorphisms associated with oxidative stress in COPD. *Clinica Chimica Acta*, 411: 474–480, 2010.

VILELLA, I.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; ROLLA, H.; SILVEIRA, J.; SILVA, J.; ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P. *Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental*. In SILVA, J.; ERDTMANN, E. & HENRIQUES, J. A. P.(Org.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

VINEIS, P.; AIROLDI, L.; VEGLIA, F.; OLGATI, L.; PASTORELLI, R.; AUTRUP, H.; DUNNING, A.; GARTE, S.; GORMALLY, E.; HAINAUT, P.; MALAVEILLE, C.; MATULLO, G.; PELUSO, M.; OVERVAD, K.; TJONNELAND, A.; CLAVEL-CHAPELON, F.; BOEING, H.; KROGH, V.; PALLI, D. & PANICO, S. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *British Medical Journal*, 330(7486): 277, 2005.

WANG, C.; ZHANG, Y.; LIANG, J.; SHAN, J.; WANG, Y. & SHI, Q. Impacts of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in testis. *Clinica Chimica Acta*, 370: 82–8, 2006.

WEDZICHA, J. A. Exacerbations: Etiology and Pathophysiologic Mechanisms. *Chest Journal*, 121: 136-141, 2002.

WENG, Z.; LU, Y.; WENG, H. & MORIMOTO, K. Effects of the *XRCC1* gene-environment interactions on DNA damage in healthy Japanese workers, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49: 708–719, 2008.

WILSON III, D. M.; KIM, D.; BERQUIST, B. R. & SIGURDSON, A. J. Variation in Base Excision Repair Capacity. *Mutation Research*, 711(1-2):100-112, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. World Bank/ WHO Global Burden of Diseases Study. Disponível em: <[http://www.who.in/topics/global\\_burden\\_of\\_disease](http://www.who.in/topics/global_burden_of_disease)>. Acesso em: 06 Mar. 2012.

WU, J. H. & JONES, J. Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline comet assay. *Methods in Molecular Biology*, 817: 165-181, 2012.

WU, M.; HE, Y. H.; KOBUNE, M.; XU, Y.; KELLEY, M. R. & MARTIN, W. J. Protection of Human Lung Cells against Hyperoxia Using the DNA Base Excision Repair Genes hOgg1 and Fpg. *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine*, 166: 192–199, 2002.

YANG, S. F.; XU, Y. J.; XIE, J. G. & ZHANG, Z. X. hOGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg399Gln polymorphisms associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Chinese Medical Journal (English Edition)*, 122(8): 960-966, 2009.

YAO, H. & RAHMAN, I. Role of histone deacetylase 2 in epigenetics and cellular senescence: implications in lung inflammaging and COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303(7):L557-66, 2012.

YIN, J.; VOGEL, U.; MA, Y.; QI, R.; SUN, Z. & WANG, H. The DNA repair gene *XRCC1* and genetic susceptibility of lung cancer in a northeastern Chinese population. *Lung Cancer*, 56(2): 153-160, 2007.

YOUNG, R. P.; HOPKINS, R. J.; WHITTINGTON, C. F.; HAY, B. A.; EPTON, M. J. & GAMBLE, G. D. Individual and cumulative effects of GWAS susceptibility loci in lung cancer: associations after sub-phenotyping for COPD. *PLoS One*, 6(2): e16476, 2011.

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B. & PASSAGLIA, L.M.P. *Biologia Molecular Básica*. 4ª ed. Porto Alegre, Artmed, 333-357, 2012.

ZAROWITZ, B. J. & O'SHEA, T. Chronic obstructive pulmonary disease: prevalence, characteristics, and pharmacologic treatment in nursing home residents with cognitive impairment. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 18(8): 598-606, 2012.

ZHANG, J.; WU, L.; QU, J. M.; BAI, C. X.; MERRILEES, M. J. & BLACK, P. N. Pro-inflammatory phenotype of COPD fibroblasts not compatible with repair in COPD lung. *Journal Cellular and Molecular Medicine*, 16(7): 1522-1532, 2012.

ZHENG, J. P.; WEN, F. Q.; BAI, C. X.; WAN, H. Y.; KANG, J.; CHEN, P.; YAO, W. Z.; MA, L.; XIA, J.; GAO, Q. K. & ZHONG, Y. On behalf of the pantheon study committee, N. S. High-dose N-acetylcysteine in the prevention of COPD exacerbations: Rationale and design of the PANTHEON Study." *COPD*, 2012.

ZHOU, F.; ONIZAWA, S.; NAGAI, A. & AOSHIBA, K. Epithelial cell senescence impairs repair process and exacerbates inflammation after airway injury. *Respiratory Research*, 12: 78, 2011.

***CURRICULUM VITAE***

**SILVA, A. L. G.**  
(Nome em citações bibliográficas)

## 1. Dados Pessoais

---

**Nome:** Andréa Lúcia Gonçalves da Silva

**Local e data de nascimento:** Jales/São Paulo, Brasil; 8 de julho de 1969.

---

### **Endereço Profissional**

Universidade de Santa Cruz do Sul, Departamento de Educação Física e Saúde.

Avenida Independência 2293

Universitário

96815-900 - Santa Cruz do Sul, RS - Brasil - Caixa-postal: 188

Telefone: (51) 7171633

Ramal: 7374

Fax: (51) 7171855

email: andreag@unisc.br

---

## Formação acadêmica/titulação

---

### **2008**

Doutorado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6).

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Título: Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da DPOC,

Orientador: João Antonio Pêgas Henriques.

Palavras-chave: dano no DNA; Ensaio Cometa; estresse oxidativo; Polimorfismos genéticos; reparação de DNA; DPOC.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Humana e Médica.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Mutagenese.

Setores de atividade: Saúde e Serviços Sociais.

### **1998 - 2000**

Mestrado em Desenvolvimento Regional (Conceito CAPES 4).

Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, Brasil.

Título: Estudo do Sistema Respiratório dos Trabalhadores das Indústrias do Santa Cruz Sul, Ano de Obtenção: 2000.

Orientador: Rui Krebs.

Bolsista do(a): Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, Brasil.

Palavras-chave: DPOC; complicações respiratórias; Fisioterapia Respiratória; função pulmonar.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Fisioterapia e Terapia Ocupacional / Subárea: Fisioterapia Córdio Respiratória.

Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina.

Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.

Setores de atividade: Saúde e Serviços Sociais.

### **1996 - 1998**

Especialização em Fundamentos Técnico Científico dos Desportos. (Carga Horária: 435h).

Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, Brasil.

### **1987 - 1991**

Graduação em FISIOTERAPIA.

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA.

---

## Atuação Profissional

---

**Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, Brasil.**

### **Vínculo institucional**

#### **1998 - Atual**

Vínculo: , Enquadramento Funcional: Professora Assistente, Carga horária: 40

#### **Outras informações**

Professora Concursada nas Disciplinas: Fundamentos de Fisioterapia; Fisioterapia Pneumofuncional I e II. Ministra as disciplinas de

Fisioterapia em Cirurgia e Terapia Intensiva e Estágio Supervisionado em Fisioterapia I e II-área hospitalar. Coordenadora de projetos de pesquisa. Líder do Grupo de Pesquisa do Cnpq: Reabilitação em Saúde e suas Interfaces".

### Atividades

#### 2008 - Atual

Atividades de Participação em Projeto, Departamento de Educação Física e Saúde,  
Projetos de pesquisa  
Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da DPOC.

#### 03/2007 - Atual

Atividades de Participação em Projeto, Departamento de Educação Física e Saúde,  
Projetos de pesquisa  
Reabilitação Cardiorrespiratória e Metabólica e suas Interfaces

#### 03/2004 - Atual

Pesquisa e desenvolvimento , Departamento de Educação Física e Saúde, .  
Linhas de pesquisa  
Reabilitação cardiorrespiratória e metabólica e as relações com os cuidados interdisciplinares  
Aspectos físico-funcionais do envelhecimento e dos portadores de distúrbios cardiorrespiratórios e metabólicos

#### 03/1998 - Atual

Ensino, Fisioterapia, Nível: Graduação  
Disciplinas ministradas  
Estágio Supervisionado em Fisioterapia I e II  
Fisioterapia em Cirurgia e UTI  
Fundamentos de Fisioterapia

### Hospital de Santa Cruz do Sul, HOSPITAL SANTA C, Brasil.

#### Vínculo institucional

##### 1991 - Atual

Vínculo: Serviços fisioterapêuticos, Enquadramento Funcional: Empresa Prestadora de Serviços Fisioterapeut.

#### Outras informações

Diretora Técnica do Serviço de Fisioterapia Hospitalar CCGS no Hospital Santa Cruz e Hospital Ana Nery.

### Hospital Ana Nery, HAN, Brasil.

#### Vínculo institucional

##### 1991 - Atual

Vínculo: Prestador de Serviços Fisioterapeut., Enquadramento Funcional: Fisioterapia

#### Outras informações

Diretora Técnica do Serviço de Fisioterapia Hospitalar CCGS no Hospital Santa Cruz e Hospital Ana Nery.

## Linhas de pesquisa

### 1.

Estudos na Área da Saúde

Objetivo: Compreende estudos a cerca da saúde em suas múltiplas expressões e seus enfoques de prevenção e reabilitação, num contexto histórico e socialmente determinado, tendo como foco de investigação a construção do conhecimento nas áreas do saber envolvidas..

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Fisioterapia e Terapia Ocupacional.

Setores de atividade: Saúde Humana.

Palavras-chave: doença cardiopulmonar; Fisioterapia Respiratória; função pulmonar; trabalhador; indústria; desenvolvimento regional.

### 2.

Reabilitação cardiorrespiratória e metabólica e as relações com os cuidados interdisciplinares

Objetivo: Avaliar a influência da abordagem interdisciplinar em portadores de doenças crônico-degenerativas e a relação com os aspectos funcionais, nutricionais, psicológicos e farmacológicos; estudar o aumento da morbi-mortalidade decorrente destas doenças, da elevação da expectativa de vida da população; dos estudos científicos demonstrando que as intervenções interdisciplinares podem minimizar ou

controlar os desfechos relacionados aos processos patológicos e trazer benefícios à qualidade de vida. Este grupo se caracteriza pelo desenvolvimento de projetos de pesquisa associados às ações de extensão, cujo enfoque principal é a reabilitação cardiorrespiratória e metabólica. A investigação nesta área de conhecimento é importante, uma vez que se observa o aumento da morbi-mortalidade em decorrência das doenças crônico-degenerativas e a elevação da expectativa de vida da população brasileira e mundial. As intervenções interdisciplinares têm se mostrado eficazes ao controlar os desfechos relacionados a estes processos patológicos e trazem benefícios à qualidade de vida. A abordagem multidisciplinar e interdisciplinar, envolvendo a Educação Física, Farmácia, Fisioterapia, Medicina, Nutrição e Psicologia, visa mapear os problemas dos indivíduos e tratá-los de forma coletiva, com intuito de prevenir, amenizar ou reabilitar estes sujeitos e, dessa forma, melhor inserí-los na sociedade..

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Fisioterapia e Terapia Ocupacional.

Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.

Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina.

Setores de atividade: Cuidado À Saúde das Pessoas; Educação; Políticas, Planejamento e Gestão em Saúde.

Palavras-chave: aptidão física; doença cardiopulmonar; Equipe de assistência ao paciente; pesquisa interdisciplinar; qualidade de vida; Reabilitação.

### 3.

Aspectos físico-funcionais do envelhecimento e dos portadores de distúrbios cardiorrespiratórios e metabólicos

Objetivo: Analisar os efeitos do envelhecimento e dos distúrbios cardiovasculares, respiratórios e metabólicos na aptidão física e na qualidade de vida e as suas relações com os aspectos clínicos, psicológicos e nutricionais destes pacientes..

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Fisioterapia e Terapia Ocupacional.

Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Educação Física.

Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição.

Setores de atividade: Cuidado À Saúde das Pessoas; Nutrição e Alimentação; Políticas, Planejamento e Gestão em Saúde.

Palavras-chave: aptidão física; distúrbio; doença cardiopulmonar; idoso; pesquisa interdisciplinar; qualidade de vida.

## Membro de corpo editorial

### 2012 - Atual

Periódico: Revista Cínergis

### 2011 - Atual

Periódico: Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção

### 2010 - Atual

Periódico: Revista Jovens Pesquisadores

## Prêmios e títulos

### 2012

“Especialista em Terapia Intensiva- Adulto”, expedido pelo Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional- COFFITO.

### 2011

Destaque da Iniciação Científica - UNISC 2011, pela área das Ciências Biológicas e da Saúde, "Reparo de lesões no DNA em Sangue Periférico de Pacientes Portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica", Universidade de Santa Cruz do Sul.

### 2010

Melhor Pôster " Dano Oxidativo e Capacidade de Reparação no DNA em Portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica" na II Jornada de Estudos Farmacêuticos, Departamento de Biologia e Farmácia da UNISC e Conselho Regional de Farmácia-RS.

### 2009

Postêr 2º Lugar " Aplicação do Ensaio Cometa para Avaliação de Lesão no DNA em portadores de Doenças Crônico- Degenetarivas, Universidade de Santa Cruz do Sul.

### 2007

Prêmio de Honra ao Mérito na categoria Iniciação Científica, Universidade de Santa Cruz do Sul., UNISC.

## Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

#### 1.

Jozielle ; Garmatz, E. ; HAMID, A. S. A. A. ; Fleig, T. ; **SILVA, A. L. G.** . Cardiorespiratory response to the aerobic exercise with non invasive ventilation at COPD Carriers. The FIEP Bulletin, v. 82, p. 327-330, 2012.

2.

SCHAEFER, J. ; MACHADO, M. M. ; RECKZIGEL, M. B. ; FLEIG, T. C. M. ; VALIM, A. ; VITIELLO, I. ; **SILVA, A. L. G.** . Aderência dos portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica a um programa de reabilitação pulmonar.. Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, v. 2, p. 55-60, 2012.

3.

da Rosa Silva, H. T. ; **SILVA, A. L. G.** ; BIZARRO, M. ; BENDER, E. ; ROSA, P. R. ; ARAUJO, A. ; Charlier, C.F. ; POSSUELO, L. G. ; MOURA, D. J. ; VALIM, A. R. M. ; Henriques, JAP . AVALIAÇÃO DE DANO NO DNA EM PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA PELO ENSAIO COMETA. Revistas Jovens Pesquisadores, v. 1, p. 18-28, 2012.

4.

RIBEIRO, A. ; WAYHS, J. H. ; MACHADO, M. ; Fleig, T. ; **SILVA, A. L. G.** . Análise da marcha em portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica. Fisioterapia em Movimento (PUCPR. Impresso), v. 24, p. 211-219, 2011.

5.

CRESTANI, G. ; Rutzen, W. ; **SILVA, A. L. G.** ; Fleig, T. ; RODRIGUES, M. T. . Análise do perfil de mortalidade por doença pulmonar obstrutiva crônica no município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. Revista Jovens Pesquisadores, v. 1, p. 10-16, 2010.

6.

**SILVA, A. L. G.** ; Fleig, T. ; Da SILVA ; BOARO . A influência dos exercícios concêntricos e excêntricos de Kabath sobre a função pulmonar inspiratória de indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica. Ciência em Movimento, v. 1, p. 13-20, 2007.

7.

**SILVA, A. L. G.** . Influência do teste prático na aprendizagem do teste de caminhada de seis minutos (TC6). Cinergis (Santa Cruz do Sul), Santa Cruz do Sul, v. 6, n.2, p. 69-76, 2005.

8.

**SILVA, A. L. G.** ; Fleig, T. ; Santos, M.J. ; Albuquerque, I.M. . Fortalecimento da musculatura abdominal como forma de tratamento para o paciente com DPOC. Revista da Saúde (URCAMP), Bagé - RS, v. 7, p. 19-34, 2003.

## Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1.

MONTANHA, M. ; BECKENKAMP ; Fleig, T. ; **SILVA, A. L. G.** . Reabilitação Pulmonar:: Capacidade Funcional e Qualidade de Vida em Portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. In: XIV Seminário de Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade de Santa Cruz do Sul, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Pró-reitoria de Extensão e Relações Comunitárias de Santa Cruz do Sul, 2007, Santa Cruz do Sul. Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade de Santa Cruz do Sul, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Pró-reitoria de Extensão e Relações Comunitárias de Santa Cruz do Sul. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2007. v. 14. p. 1-1.

2.

**SILVA, A. L. G.** ; Fleig, T. ; Da SILVA . Fisioterapia e Reabilitação Pulmonar na DPOC: a importância da intervenção Multidisciplinar. In: XI Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 2006, Santa Cruz do Sul. CD-ROM - XI Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2006.

3.

VALIM, A. ; HELFER, A. P. ; WERNER, V. ; **SILVA, A. L. G.** . O papel do Farmacêutico na atenção ao portador de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. In: XI Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 2006, Santa Cruz do SUL. Cd-Rom - XI Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2006.

## Resumos publicados em anais de congressos

1.

MORSCH, P., SILVA, A. L. G., Henriques, JAP  
Aging and Pulmonary Emphysema: Current issues and Literature review In: 33 Annual Meeting Southern Gerontological Society, 2012, Nashville- Tennessee.  
33 Annual Meeting Southern Gerontological Society. , 2012. v.33. p.595 - 596

2.

BENDER, E., ROSA, H. T., Henriques, JAP, ROSA, P. R., Valim, A. R. M., SILVA, A. L. G.  
DETECÇÃO DE DANOS E DEFICIÊNCIA DE REPARO NO DNA EM PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA In: XVIII Seminário de Iniciação Científica - UNISC, 2012, Santa Cruz do Sul - RS.  
Anais do XVIII Seminário de Iniciação Científica - UNISC. , 2012.

3.

ROSA, H. T., SILVA, A. L. G., BIZARRO, M., BENDER, E., ROSA, P. R., Charlier, C.F., Salvador, S.,  
MOURA, D. J., Valim, A. R. M., Guecheva, T.N., Henriques, JAP  
DNA DAMAGE IN BLOOD OF THE COPD PATIENTS BY COMET ASSAY In: 10th International Congress on Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro - RJ.  
10th International Congress on Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for

Cell Biology. , 2012. v.10.

4.

SCHAEFER, J., HAMID, A. S. A. A., FLEIG, T. C. M., MAYER, V. K., Carvalho, L. L., SILVA, A. L. G. EDUCAÇÃO E AUTOMANEJO PARA A DPOC EM PROGRAMA DE REABILITAÇÃO PULMONAR In: XVIII Seminário de Iniciação Científica - UNISC, 2012, Santa Cruz do Sul - RS.

Anais do XVIII Seminário de Iniciação Científica - UNISC. , 2012.

5.

Bulow, A.L., SCHAEFER, J., SILVA, A. L. G., VITIELLO, I.

EDUCAÇÃO NUTRICIONAL PARA AUTOMANEJO DA DPO In: XVIII Seminário de Iniciação Científica - UNISC, 2012, Santa Cruz do Sul - RS.

Anais do XVIII Seminário de Iniciação Científica - UNISC. , 2012.

6.

SCHENEIDERS, P., HAMID, A. S. A. A., BENDER, E., ROSA, H. T., Valim, A. R. M., SILVA, A. L. G.

HISTÓRIA TABÁGICA DOS PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC) QUE PARTICIPAM DE PESQUISA CLÍNICA. In: XVIII Seminário de Iniciação Científica - UNISC, 2012, Santa Cruz do Sul - RS.

Anais do XVIII Seminário de Iniciação Científica - UNISC. , 2012. v.XVIII.

7.

SILVA, A. L. G., ROSA, H. T., Charlier, C.F., MOURA, D. J., Valim, A. R. M., Guecheva, T.N., Henriques, JAP

Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica In: XIV Reunião Anual do Prog. de Pós Grad. em Biologia Celular e Molecular - CBIOT/UFRGS, 2012, Porto Alegre.

XIV Reunião Anual do Prog. de Pós Grad. em Biologia Celular e Molecular - CBIOT/UFRGS. ,

2012. v.14. p.12 - 12

8.

Dias, L. K., CLASEEN, C., BALDISSERA, G. G., CRUZ, D. F., FLEIG, T. C. M., CARVALHO, T. G., SILVA, A. L. G.

Nintendo Wii therapy in the pulmonary rehabilitation for chronic obstructive pulmonary disease. In: An international multidisciplinary meeting on chronic obstructive pulmonary disease., 2012, Birmingham - UK.

An international multidisciplinary meeting on chronic obstructive pulmonary disease.. ,

2012.

9.

ROSA, H. T., BENDER, E., ROSA, P. R., Henriques, JAP, SILVA, A. L. G., Valim, A. R. M.

REABILITAÇÃO PULMONAR E DANO NO DNA DE PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC). In: XVIII Seminário de Iniciação Científica - UNISC, 2012, Santa Cruz do Sul - RS.

Anais do XVIII Seminário de Iniciação Científica - UNISC. , 2012.

10.

KOCH, B. E., SILVA, A. L. G., RODRIGUES, M. T.

AVALIAÇÃO DA MORBIMORTALIDADE POR DPOC EM SANTA CRUZ DO SUL - RS, CAPITAL NACIONAL DO TABACO In: XVII Seminário de Iniciação Científica, II Salão de Ensino e de Extensão, 2011, Santa Cruz do Sul.

XVII Seminário de Iniciação Científica, II Salão de Ensino e de Extensão. , 2011.

11.

HAMID, A. S. A. A., Garmatz, E., SILVA, A. L. G., Fleig, T.

AVALIAÇÃO FISIOTERAPÊUTICA DE UM PROGRAMA DE REABILITAÇÃO CARDIORRESPIRATÓRIA E METABÓLICA NA CIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL In: XVII Seminário de Iniciação Científica, II Salão de Ensino e de Extensão, 2011, Santa Cruz do Sul.

XVII Seminário de Iniciação Científica, II Salão de Ensino e de Extensão. , 2011.

12.

ROSA, H. T., SILVA, A. L. G., Raabe, S.M., Carvalho, E., Charlier, C.F., MOURA, D. J., Valim, A. R. M., Henriques, JAP

DNA DAMAGE IN BLOOD OF THE COPD PATIENTS BY COMET ASSAY In: X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagenese Carcinogenese e Teratogenese Ambiental, 2011, São Pedro - SP.

Anais de evento do X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagenese Carcinogenese e Teratogenese Ambiental. , 2011.

Carcinogenese e Teratogenese Ambiental. , 2011.

13.

SILVA, A. L. G., da Rosa Silva, H. T., Charlier, C.F., MOURA, D. J., VALIM, A. R. M., Henriques, JAP

Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da DPOC In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre.

Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2011. p.10 - 10

Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2011. p.10 - 10

14.  
Carvalho, L. L., Dias, L. K., CLASEEN, C., BALDISSERA, G. G., CRUZ, D. F., Fleig, T., CARVALHO, T. G., SILVA, A. L. G.  
Nintendo Wii therapy in the pulmonary rehabilitation for chronic obstructive pulmonary disease In: 42nd World Conference on lung Health of the internacional union against tuberculosis and Lung Disease (The Union), 2011, Lille.  
The Internacional Journal of Tuberculosis and Lung Disease. Paris: The Union, 2011. v.15.
15.  
SCHERER, R. B., HAMID, A. S. A. A., da Rosa Silva, H. T., SILVA, A. L. G.  
PERFIL DOS PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC) QUE PARTICIPAM DE PESQUISA CLÍNICA In: XVII Seminário de Iniciação Científica, II Salão de Ensino e de Extensão, 2011, Santa Cruz do Sul.  
XVII Seminário de Iniciação Científica, II Salão de Ensino e de Extensão. , 2011.
16.  
Charlier, C.F., SILVA, A. L. G., da Rosa Silva, H. T., Henriques, JAP  
Perfil Oxidante na Fisiopatogenia da DPOC In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia celular e Molecular, 2011, Porto Alegre.  
XIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia celular e Molecular. Porto Alegre: UFRGS, 2011. p.31 - 31
17.  
da Rosa Silva, H. T., ARAUJO, A. R., Charlier, C.F., ROSA, P. R., VALIM, A., SILVA, A. L. G.  
REPARO DE LESÕES NO DNA EM SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC). In: XVII Seminário de Iniciação Científica, II Salão de Ensino e de Extensão, 2011, Santa Cruz do Sul.  
XVII Seminário de Iniciação Científica, II Salão de Ensino e de Extensão. , 2011.
18.  
da Rosa Silva, H. T., Eduarda Carvalho, Suian, ROSA, P. R., Charlier, C.F., MOURA, D. J., VALIM, A. R. M., SILVA, A. L. G., Henriques, JAP  
Reparo no Dano no DNA em Potadores de Doença Pulmonar Obstrutivas Crônica In: X Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental., 2011, São Pedro.  
X Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental.. , 2011.
19.  
ARAUJO, A. R., Charlier, C.F., da Rosa Silva, H. T., SILVA, A. L. G., VALIM, A. R. M.  
SUSCETIBILIDADE GENÉTICA RELACIONADA À DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA EM SANTA CRUZ DO SUL/RS In: XVII Seminário de Iniciação Científica, II Salão de Ensino e de Extensão, 2011, Santa Cruz do Sul. XVII Seminário de Iniciação Científica, II Salão de Ensino e de Extensão. , 2011.
20.  
Hamid, A. S. A., Garmatz, E., RIBEIRO, A., WAYHS, J. H., MACHADO, M., Fleig, T., SILVA, A. L. G.  
Análise da marcha em portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica In: 15º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2010, Porto Alegre.  
15º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva. , 2010. v.14.
21.  
da Rosa Silva, H. T., SILVA, A. L. G., Charlier, C.F.  
Avaliação da capacidade antioxidante em portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica In: XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC, 2010, Santa Cruz do Sul. XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC. , 2010.
22.  
HEINEN, A. C., SILVA, A. L. G., Fleig, T.  
Avaliação da dor como quinto sinal vital na intervenção fisioterapêutica In: XX Fórum Nacional de Ensino em Fisioterapia, II Congresso Nacional da Fisioterapia na Saúde Coletiva, XIV Encontro de Coordenadores de Curso de Fisioterapia, IV Encontro de Discentes de Fisioterapia da ABENFISIO, II Encontro de Docentes das Áreas de Conhe, 2010, Belo Horizonte.  
Fisioterapia Brasil (Suplemento Especial - setembro/outubro 2010). , 2010. v.11.
23.  
HEINEN, A. C., SILVA, A. L. G., Fleig, T.  
Avaliação da dor como quinto sinal vital na intervenção fisioterapêutica In: XVI Seminário de Iniciação

Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC, 2010, Santa Cruz do Sul. XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC. , 2010.

24.

Charlier, C.F., SILVA, A. L. G., MOURA, D. J., da Rosa Silva, H. T., Gomes, Manuela H., VALIM, A., Henriques, JAP

Avaliação da influência de perfis genéticos na capacidade de reparo de danos oxidativos em portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica In: XII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010, Porto Alegre.

XII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. , 2010.

25.

MACHADO, M., SILVA, A. L. G., Fleig, T.

Avaliação da resposta cronotrópica dos portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica após reabilitação pulmonar In: XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC, 2010, Santa Cruz do Sul.

XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC. , 2010.

26.

PORTZ, C., SILVA, A. L. G., Fleig, T.

Avaliação dos níveis de monóxido de carbono em funcionários de um hospital geral In: XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC, 2010, Santa Cruz do Sul. XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC. , 2010.

27.

Kunzerl, André Luiz, POSTZ, C., SILVA, A. L. G., Fleig, T.

Avaliação dos níveis de monóxido de carbono em funcionários de um hospital geral In: XX Fórum Nacional de Ensino em Fisioterapia, II Congresso Nacional da Fisioterapia na Saúde Coletiva, XIV Encontro de Coordenadores de Curso de Fisioterapia, IV Encontro de Discentes de Fisioterapia da ABENFISIO, II Encontro de Docentes das Áreas de Conhe, 2010, Belo Horizonte.

Fisioterapia Brasil (Suplemento Especial - setembro/outubro 2010). , 2010. v.11.

28.

Garmatz, E., Hamid, A. S. A., MACHADO, M., SILVA, A. L. G., Fleig, T., MAYER, V. K., CAETANO, C., VALIM, A., Dutra, L. G. B., RECKZIEGEL, M.

Educação para a doença pulmonar obstrutiva crônica: uma visão multidisciplinar. In: 15º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2010, Porto Alegre.

15º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva. , 2010. v.14.

29.

Reuter, E. M., Fleig, T., SILVA, A. L. G.

Efeito de um programa de reabilitação pulmonar sobre parâmetros respiratórios, arterial e qualidade de vida em pacientes portadores de DPOC In: XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC, 2010, Santa Cruz do Sul.

XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC. , 2010.

30.

SILVA, A. L. G., VALIM, A., Fleig, T., MAYER, V. K., CAETANO, C., RECKZIEGEL, M.

EXERCISE PRESCRIPTION FOR COPD PATIENT IN A PULMONARY REHABILITATION PROGRAM: PROTOCOL OR USER ORIENTATION In: International Multidisciplinary Conference On Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2010, Birmingham. COPD- Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. London: TAYLOR & FRANCIS INC, 2010.

31.

Rutzen, W., RODRIGUES, M. T., SILVA, A. L. G.

Inflamação e fenótipo em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) In: XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC, 2010, Santa Cruz do Sul. XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC. , 2010.

32.

SILVA, A. L. G., da Rosa Silva, H. T., Charlier, C.F., MOURA, D. J., VALIM, A., Henriques, JAP

Lesão oxidativa e perfis genéticos na fisiopatogenia da doença pulmonar obstrutiva crônica In: XII Reunião

Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010, Porto Alegre. XII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. , 2010.

33.

da Rosa Silva, H. T., SILVA, A. L. G., MOURA, D. J.

Lesão oxidativa na doença pulmonar obstrutiva crônica In: XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC, 2010, Santa Cruz do Sul.

XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC. , 2010.

34.

Bordin, Diogo F., SILVA, A. L. G., Fleig, T.

Nova estratégia de atenção fisioterapêutica na reabilitação pulmonar In: XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC, 2010, Santa Cruz do Sul. XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC. , 2010.

35.

Siqueira S., SILVA, A. L. G., Fleig, T.

Perfil tabágico de pacientes portadores de DPOC participantes de um programa de reabilitação pulmonar In: XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC, 2010, Santa Cruz do Sul. XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC. , 2010.

36.

Garmatz, E., Hamid, A. S. A., Dias, L. K., Rocha, A. D., BAUMHARDT, K., Fleig, T., SILVA, A. L. G., VALIM, A. Prescrição de exercício ao usuário de um programa de reabilitação pulmonar In: 15º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2010, Porto Alegre.

15º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva. , 2010. v.14.

37.

Severo, R. J., Fleig, T., SILVA, A. L. G.

Prescrição de exercício em programa de reabilitação pulmonar: protocolo X orientação In: XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC, 2010, Santa Cruz do Sul. XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC. , 2010.

38.

Hamid, A. S. A., Garmatz, E., MACHADO, M., VALIM, A., Dutra, L. G. B., MAYER, V. K., SILVA, A. L. G.,

Fleig, T. Prescrição de exercícios ao usuário de um programa de reabilitação pulmonar: protocolo X orientação do usuário In: XX Fórum Nacional de Ensino em Fisioterapia, II Congresso Nacional da Fisioterapia na Saúde Coletiva, XIV Encontro de Coordenadores de Curso de Fisioterapia, IV Encontro de Discentes de Fisioterapia da ABENFISIO, II Encontro de Docentes das Áreas de Conhe, 2010, Belo Horizonte.

Fisioterapia Brasil (Suplemento Especial - setembro/outubro 2010). , 2010. v.11.

39.

SILVA, A. L. G., Fleig, T., POSSUELO, L. G., MOURA, D. J., Valim, A. R. M., Henriques, JAP

PROFILE PATHOPHYSIOLOGY OF THE CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE In: International Multidisciplinary Conference On Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2010, Birmingham.

COPD- Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. London: TAYLOR & FRANCIS INC, 2010.

40.

HAMID, A. S. A. A., SILVA, A. L. G., Fleig, T.

Qualidade de vida em portadores de DPOC e estadiamento moderado e severo In: XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC, 2010, Santa Cruz do Sul. XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC. , 2010.

41.

Garmatz, E., Hamid, A. S. A., WEIGEL, A., Fleig, T., SILVA, A. L. G., DIAS, A. S., MONTANHA, M.

Respostas cardiorrespiratórias ao teste de degrau de dois minutos em portadores de DPOC In: 15º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2010, Porto Alegre.

15º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva. , 2010. v.14.

42.

- Hamid, A. S. A., Garmatz, E., Fleig, T., WEIGEL, A., SILVA, A. L. G., MACHADO, M., DIAS, A. S.  
Teste de degrau de dois minutos pré e pós-programa de reabilitação pulmonar In: 15º Simpósio  
Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2010, Porto Alegre.  
15º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia  
Intensiva. , 2010. v.14.  
43.
- Garmatz, E., SILVA, A. L. G., Fleig, T.  
Utilização da determinação de monóxido de carbono no ar exalado em pacientes com DPOC In: XVI  
Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e Cultural da UNISC,  
2010, Santa Cruz do Sul.  
XVI Seminário de Iniciação Científica; I Salão de Ensino e de Extensão e I Mostra Artística e  
Cultural da UNISC. , 2010.  
44.
- HAMID, A. S. A. A., Garmatz, E., VALIM, A., Fleig, T., SILVA, A. L. G.  
Alteração na capacidade funcional após reinserção no programa de reabilitação pulmonar In: XV Seminário  
de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2009, Santa Cruz do Sul.  
XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc.  
Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2009.  
45.
- ZENKNER, F. F., POSSUELO, L. G., Gomes, Manuela H., da Rosa Silva, H. T., MOURA, D. J., SILVA, A. L.  
G., Valim, A. R. M.  
Associação entre polimorfismos em genes de reparo e metabolização e a doença pulmonar obstrutiva crônica  
In: XX Congresso Brasileiro de SBMCTA, 2009, Ouro Preto.  
IX CONGRESSO BRASILEIRO DA SBMCTA - 2009. , 2009.  
46.
- SILVA, A. L. G., MACHADO, V. H., Dutra, L. G. B., Fleig, T.  
Avaliação nutricional em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). In: XV Seminário de  
Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2009, Santa Cruz do Sul.  
XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc.  
Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2009.  
47.
- BARTMANN, G. P., WEIS, L. C., SILVA, A. L. G.  
Eletromiografia e ato respiratório: uma análise nos portadores de DPOC In: XV Seminário de Iniciação  
Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2009, Santa Cruz do Sul.  
XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc.  
Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2009.  
48.
- Gomes, Manuela H., POSSUELO, L. G., Henriques, JAP, VALIM, A., SILVA, A. L. G.  
Identificação de polimorfismo no gene XRCC4 em portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica In: XV  
Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2009, Santa Cruz  
do Sul. XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc.  
Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2009.  
49.
- SILVA, A. L. G., POSSUELO, L. G., MOURA, D. J., VALIM, A., Henriques, JAP  
Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da DPOC In: XI REUNIÃO Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia  
Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre.  
Livro de Resumos PPGBCM. , 2009.  
50.
- ZENKNER, F. F., POSSUELO, L. G., MOURA, D. J., VALIM, A., SILVA, A. L. G.  
Padronização de teste para a identificação de polimorfismo no gene OGG1 em pacientes portadores de  
doença pulmonar obstrutiva crônica In: XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino,  
Pesquisa e Extensão da Unisc, 2009, Santa Cruz do Sul. Anais do XV Seminário d Iniciação Científica e XIV  
Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2009, Santa Cruz do Sul.  
51.
- da Rosa Silva, H. T., POSSUELO, L. G., Fleig, T., SILVA, A. L. G., VALIM, A.  
Polimorfismo no gene CYP1A1 e risco de doença pulmonar obstrutiva crônica In: XV Seminário de Iniciação  
Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2009, Santa Cruz do Sul.  
XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc.  
Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2009.

52.

Dias, L. K., Rocha, A. D., VALIM, A., Fleig, T., SILVA, A. L. G.

Prescrição de exercício ao usuário de um programa de reabilitação pulmonar: protocolo x orientação do usuário In: XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2009, Santa Cruz do Sul. XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2009.

53.

Garmatz, E., Hamid, A. S. A., CAETANO, C., Fleig, T., SILVA, A. L. G.

Qualidade de vida em portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica In: XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2009, Santa Cruz do Sul.

XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2009.

54.

MONTANHA, M., Valim, A. R. M., WEIS, L. C., Fleig, T., SILVA, A. L. G.

Reabilitação Cardiorrespiratória e Metabólica e suas Interfaces na Estratégia de Saúde da Família In: XIX Fórum Nacional de Ensino de Fisioterapia, XIII Encontro Nacional de Coordenadores de Curso de Fisioterapia, XIII Encontro Nacional de Discentes de Fisioterapia, I Encontro de Docente das Áreas de Conhecimento da Fisioterapia, 2009, Salvador. Revista Fisioterapia Brasil – Suplemento Especial outubro-novembro/2009. São Paulo: Atlantica, 2009.

55.

Fleig, T., Hamid, A. S. A., Garmatz, E., WEIGEL, A., SILVA, A. L. G.

Respostas cardiorrespiratórias ao teste de degrau de dois minutos em portadores de DPOC In: XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2009, Santa Cruz do Sul.

XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2009.

56.

Fleig, T., Garmatz, E., Hamid, A. S. A., WEIGEL, A., SILVA, A. L. G.

Teste de degrau de dois minutos pré e pós-programa de reabilitação pulmonar In: XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2009, Santa Cruz do Sul.

XV Seminário de Iniciação Científica e XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2009.

57.

SILVA, A. L. G., WEIGEL, A., Beppler, V., Fleig, T.

Análise das Variáveis Cardiorrespiratórias ao Teste de Caminhada de Dois Minutos em Portadores de DPOC In: XIV Seminário de Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2008, Santa Cruz do Sul. CD-ROM XIV Seminário de Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2008. v.14. p.1 - 1

58.

MONTANHA, M., Garmatz, E., Hamid, A. S. A., Fleig, T., SILVA, A. L. G.

Análise do Teste de Caminhada de Seis Minutos pré e pós programa de Reabilitação Pulmonar In: XIV Seminário de Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2008, Santa Cruz do Sul. Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2008. v.14. p.1 - 1

59.

Fleig, T., SILVA, A. L. G., WEIGEL, A., MONTANHA, M.

Comparação entre o teste de Caminhada e de Degrau de Seis Minutos em portadores de DPOC In: XIV Seminário de Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2008, Santa Cruz do Sul. Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2008. v.14. p.1 - 1

60.

Fleig, T., MONTANHA, M., WEIGEL, A., SIMOES, A. D., SILVA, A. L. G.

Comparação entre o Teste de caminhada e Teste de Degrau de 6 minutos In: 14º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2008, Recife / Olinda.

14º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva. São Carlos - SP: Revista Físio Brasil, 2008. v.12. p.102 - 102

61.

Allgayer, K., WEIGEL, A., SILVA, A. L. G., Fleig, T., MONTANHA, M.

Efeito do Programa de Reabilitação Pulmonar Sobre a Capacidade de Exercício em Portadores de DPOC In: XIV Seminário de Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2008, Santa

Cruz do Sul. Anais do XIV Seminário d Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2008. v.14. p.1 - 1  
62.

ZENKNER, F. F., STRECK, C. C., MOURA, D. J., Henriques, JAP, MONTANHA, M., VALIM, A., SILVA, A. L. G. Implementação do Teste Cometa para avaliação de Dano Oxidativo no DNA In: XIV Seminário d Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2008, Santa Cruz do Sul.

Anais do XIV Seminário d Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2008. v.14. p.1 - 1  
63.

MONTANHA, M., Da SILVA, Fleig, T., VALIM, A., SILVA, A. L. G. Perfil de pacientes aderentes ao Programa de Reabilitação Pulmonar In: XIV Seminário d Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2008, Santa Cruz do Sul.

Anais do XIV Seminário d Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2008. v.14. p.1 - 1  
64.

Da SILVA, MONTANHA, M., SILVA, A. L. G., Fleig, T., VALIM, A. Perfil de pacientes Aderentes portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) In: 14º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2008, Recife.

Revista Brasileira de Fisioterapia. São Paulo: Zeppelini Editorial, 2008. v.12. p.102 - 102  
65.

MONTANHA, M., Ways, J. H., BECKENKAMP, RIBEIRO, A., Fleig, T., SILVA, A. L. G. Reabilitação Pulmonar: Análise da marcha de portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica In: 14º Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2008, Recife / Olinda. Revista Fisioterapia em Movimento. São Paulo: Zeppelini Editorial, 2008. v.12. p.82 - 82  
66.

MONTANHA, M., RIBEIRO, A., Ways, J. H., BECKENKAMP, Fleig, T., SILVA, A. L. G. Reabilitação Pulmonar: Análise Biomecânica da Marcha de Portadores de DPOC In: XIV Seminário de Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc, 2008, Santa Cruz do Sul.

CD-ROM XIV Seminário de Iniciação Científica e XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unisc. Santa Cruz do Sul: edunisc, 2008. v.14. p.1 - 1.

## Iniciação científica

1.

Eduarda Bender. Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da DPOC. 2012. Iniciação Científica. (Graduando em Biologia) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Andréa Lúcia Gonçalves da Silva.

2.

Thais Kanopp. Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da DPOC. 2012. Iniciação Científica. (Graduando em Biologia) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Andréa Lúcia Gonçalves da Silva.

3.

Helen da Rosa. Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da DPOC. 2011. Iniciação Científica. (Graduando em Biologia) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Andréa Lúcia Gonçalves da Silva.

4.

Martiele Bizarro da Silva. Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da DPOC. 2011. Iniciação Científica. (Graduando em Biologia) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Andréa Lúcia Gonçalves da Silva.

5.

Rafaela Bakkar. Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da DPOC. 2011. Iniciação Científica - Universidade de Santa Cruz do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Andréa Lúcia Gonçalves da Silva.

6.

Helen Taís da Rosa. Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da DPOC. 2010. Iniciação Científica. (Graduando em Biologia) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Andréa Lúcia Gonçalves da Silva.

7.

Helen Taís da Rosa. Lesão Oxidativa e Perfis Genéticos na Fisiopatogenia da DPOC. 2009. Iniciação Científica. (Graduando em Biologia) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Andréa Lúcia Gonçalves da Silva.

8.

Mariza Montanha Machado. Reabilitação Cardiorrespiratória e Metabólica e suas Interfaces. 2008. Iniciação Científica. (Graduando em Fisioterapia) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Andréa Lúcia Gonçalves da Silva.