

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Influência da Variabilidade Genética Sobre Biomarcadores de Dano Oxidativo e Não Oxidativo em Pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)**

**Clara Forrer Charlier**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientação Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques**

**Porto Alegre, junho 2012**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Teve como agências financiadoras a Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **Agradecimentos**

Acredito que “Agradecimentos” foi uma das seções mais difíceis de fazer desse trabalho. Tantas coisas aconteceram, boas e ruins, no decorrer do projeto e tantas pessoas doaram suas mãos, tempo e conhecimentos que eu hesito na hora de tentar citar todos, já que certamente estou fadada a esquecer alguém. Mas é um esforço que deve ser feito. A todos aqueles que eu esqueci, por favor, não se sintam diminuídos! Esse foi um projeto imenso e que contou com a ajuda de inúmeros amigos.

Seguindo certa ordem cronológica, eu gostaria de começar agradecendo à Dinara J. Moura, que é uma das principais responsáveis por me motivar a ingressar no PPGBCM. Muito obrigada por me apresentar o Prof. Henriques! De certa forma, sem essa tua intervenção, esse trabalho não existiria.

Agradeço também ao Prof. Henriques que me deu um grande voto de confiança aceitando me orientar sem ter convivido comigo e que sempre encontrou um tempo na sua agenda para me ouvir, responder minhas perguntas e acalmar minhas inquietações. Obrigada por acreditar em mim e neste trabalho!

De forma alguma eu poderia esquecer a Andréa Gonçalves, minha colega de projeto, professora da UNISC e doutoranda do PPGBCM, que me introduziu à problemática da DPOC e é uma das idealizadoras do projeto guarda-chuva que deu origem a esta dissertação. A Andréa é peça central ao redor da qual o projeto gira, sem ela não teríamos os pacientes, bolsistas e muitas outras coisas mais. Sem ela também não teríamos como provar as maravilhosas cucas de Santa Cruz aqui em Porto Alegre. Andréa, este trabalho é tão meu filho quanto teu!

Não há como agradecer à Andréa sem lembrar os bolsistas que trabalharam com tanto afinco para gerar os dados que analisamos aqui. Infelizmente não tive contato com os que entraram no projeto após minha saída de Santa Cruz do Sul. A esses, minhas desculpas sinceras e meu agradecimento por um trabalho bem feito! As meninas com as quais convivi: Fernanda Zenkner e Manuela Gomes, vocês foram as pioneiras! Desbravaram técnicas que para nós pareciam vindas de algum misterioso manual arcano. Sorriram e sofreram junto conosco e tornaram a labuta infinitamente mais divertida e recompensante. Vocês ganharam uma vaga muito especial no meu coração!

E, é claro, a Helen, que a essa altura deve estar pensando que a esqueci. Realizaste o grande feito de terminar esse projeto conosco, Helen. Foi uma experiência incrível testemunhar tua dedicação e teu amadurecimento ao longo desses anos. Mesmo frente a todas as adversidades que encontramos tu persististe e te tornaste alguém ainda melhor que eras. Obrigada por todas as horas (incontáveis) de empenho para que esse projeto pudesse vir a acontecer. Muito obrigada por todas as gostosuras que ganhei, pelas piadas quando as coisas pareciam mais sombrias do que eram. Fizeste minha vida mais leve. Fico feliz em te contar entre meus amigos!

Muito obrigada à Prof<sup>ª</sup>. Mirian Salvador de Caxias do Sul e sua equipe, que colaboraram conosco nas análises de peroxidação lipídica e carbonilação proteica. Obrigada, Mirian, por me receber com tanta atenção e solicitude quando precisei da tua ajuda para entender os resultados.

Muito obrigada a Temenouga Guecheva, a nossa Nusha, por ser sempre tão acessível e tão disposta a responder minhas perguntas e as da Andréa, por mais tolas que fossem, com uma paciência que às vezes parecia infinita.

Muito obrigada ao Joel H. Ellwanger, por ler a dissertação num sábado à noite e me devolver no domingo, cheia de comentários muito pertinentes e bem humorados. Obrigada pelo apoio, carinho, sarcasmo, café, companhia, e infinitas outras coisas. Obrigada por ser meu melhor amigo!

Um obrigada muito especial ao Alexandre Rieger. Não caberia em um parágrafo tudo o que já fizeste por mim desde que começamos a trabalhar juntos, na graduação. Obrigada por incentivar sempre minha curiosidade científica e por, além de ser o melhor mestre que já tive, ser a pessoa mais generosa e íntegra que já passou pela minha vida. É uma honra poder ser tua amiga!

E finalmente, sem medo de soar piegas, obrigada à minha mãe. Mãe, tu és a minha motivação, meu exemplo, meu porto seguro, fonte inesgotável de carinho e de uma amizade que é muito maior do que esta vida. Morrerei feliz se um dia for a metade da mulher que és. Obrigada por estar sempre ao meu lado!

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 DEFINIÇÃO.....	12
1.2 EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO SOCIAL.....	14
1.3 ALTERAÇÕES PULMONARES .....	17
1.4 ASPECTOS MOLECULARES .....	18
1.5 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO NA DPOC.....	20
1.6 ANÁLISE DE BIOMARCADORES .....	22
1.6.1 <i>Biomarcadores de Efeito</i> .....	22
1.6.2 <i>Biomarcadores de Susceptibilidade: Alterações Genéticas</i> .....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1 GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	33
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>34</b>
3.1 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES DO PROJETO.....	34
3.2 ENSAIO COMETA.....	35
3.2.1 <i>Amostras de Sangue</i> .....	35
3.2.2 <i>Ensaio Cometa Versão Alcalina</i> .....	35
3.2.3 <i>Ensaio Cometa para Detecção de Lesões Oxidativas</i> .....	37
3.3 BIOMARCADORES DE EFEITO .....	37
3.3.1 <i>Peroxidação Lipídica</i> .....	37
3.3.2 <i>Proteínas carboniladas</i> .....	38
3.3.3 <i>Micronúcleos da Mucosa Oral</i> .....	39
3.4 BIOMARCADORES DE SUSCETIBILIDADE: .....	40
3.4.1 <i>Detecção dos Genótipos por PCR/ RFLP</i> .....	40
3.5 ANÁLISE DE DADOS E PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.....	42
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 PERFIL DA POPULAÇÃO: DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E HÁBITOS TABÁGICOS: .....	43
4.2 BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE.....	47
4.2.1 <i>Análise das Frequências de Polimorfismos de Genes de Enzimas de Metabolismo da Fase I, II e Antioxidantes</i> .....	47
4.3 BIOMARCADORES DE EFEITO: .....	51
4.3.1 <i>Índices de Dano do Ensaio Cometa</i> .....	51
4.3.2 <i>Peroxidação Lipídica e Carbonilação Proteica</i> .....	53
4.3.3 <i>Micronúcleos de Mucosa Oral</i> .....	54
4.4 INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE COM BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E EFEITO.....	55
4.4.1 <i>Polimorfismos e Ensaio Cometa</i> .....	55

4.4.2	<i>Polimorfismos e Micronúcleos do Esfoliado de Mucosa Oral</i> .....	70
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>72</b>
5.1	PERFIL DEMOGRÁFICO E CLÍNICO DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	72
5.2	ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL GENÉTICO .....	74
5.3	ENSAIO COMETA.....	75
5.4	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E CARBONILAÇÃO PROTEICA.....	77
5.5	INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE E BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E EFEITO.....	79
5.5.1	<i>Polimorfismos e Ensaio Cometa: Enzimas da Fase I</i> .....	79
5.5.2	<i>Polimorfismos e Ensaio Cometa: Enzimas da Fase II</i> .....	80
5.5.3	<i>Polimorfismos e Ensaio Cometa: Enzimas Antioxidantes</i> .....	83
5.6	MICRONÚCLEOS DA MUCOSA ORAL .....	84
5.6.1	<i>Polimorfismos e Micronúcleos de Mucosa</i> .....	85
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>87</b>
6.1	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	87
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>108</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

BPDE – Benzo[a]pireno diol epóxido.

DE2 – (±)-B[a]P-r-7,t-8-dihidrodiol-t-9,10-epóxido.

DNPH – *2,4-Dinitrophenylhydrazine*, 2,4-dinitrofenil-hidrazina.

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Endo III – Endonuclease III (*E. coli*).

ERO- Espécies Reativas de Oxigênio.

Fpg – Formamido pirimidina DNA glicosilase (*E. coli*).

GOLD – *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*.

HAPs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos.

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica.

ID – Índice de Dano.

MDA – malondialdeído.

MN – micronúcleo.

PC – *Protein Carbonylation*, carbonilação proteica.

TBARS – *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

TCA – *trichloroacetic acid*, ácido tricloroacético.

## LISTA DE TABELAS

---

TABELA 1: VIAS, GENES E RESPECTIVOS POLIMORFISMOS, <i>PRIMERS</i> ESTUDADOS NESTE TRABALHO.....	41
TABELA 2: CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, HISTÓRIA TABÁGICA E OR PARA O DESENVOLVIMENTO DE DPOC.....	44
TABELA 3: FUNÇÃO PULMONAR E HISTÓRIA CLÍNICA DOS SUJEITOS. ....	45
TABELA 4: DISTRIBUIÇÃO DO USO DE CORTICOSTEROIDES CONFORME ESTADIAMENTO DA DPOC.....	46
TABELA 5: FREQUÊNCIAS GÊNICAS E GENOTÍPICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS.....	47
TABELA 6: COMPARAÇÃO ENTRE FREQUÊNCIAS GÊNICAS DE DIFERENTES TRABALHOS. ....	49
TABELA 14: BIOMARCADORES DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS) E CARBONILAÇÃO PROTEICA (DNPH)*.....	53
TABELA 7: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>CYP1A1 C2453A</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	56
TABELA 8: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>CYP2E1 C-1053T</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	58
TABELA 9: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>GSTM1 NULL</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA. ....	60
TABELA 10: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>GSTT1 NULL</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA. ....	62
TABELA 11: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>GSTP1 ILE105VAL</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	64
TABELA 12: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>CAT C-262T</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	66
TABELA 13: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>GPx1 Pro198Leu</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	68
TABELA 15: FREQUÊNCIA DA OCORRÊNCIA DE MICRÓNÚCLEOS EM CÉLULAS DE ESFOLIADO BUCAL E A INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS SOBRE SEUS VALORES. ....	70
TABELA 16: RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS SOBRE A MODULAÇÃO DOS POLIMORFISMOS INVESTIGADOS SOBRE OS ÍNDICES DE DANO DO ENSAIO COMETA. ....	115

---



## LISTA DE FIGURAS

---

FIGURA 1: DIAGRAMA DO DECLÍNIO NO VOLUME EXPIRATÓRIO FORÇADO NO PRIMEIRO SEGUNDO DE UM GRUPO DE HOMENS NO OESTE DE LONDRES EM UM PERÍODO DE 6 ANOS .....	13
FIGURA 2: COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS EM UM INDIVÍDUO SAUDÁVEL E UM PACIENTE COM DPOC.....	17
FIGURA 3: VIA DE METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS.....	26
FIGURA 4: PRINCIPAIS ENZIMAS RESPONSÁVEIS PELO METABOLISMO DE DROGAS COMERCIALIZADAS ATUALMENTE:.....	27
FIGURA 5: REAÇÕES CATALISADAS PELAS GSTS.....	29
FIGURA 6: CLASSIFICAÇÃO VISUAL DO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA. ....	36
FIGURA 7: COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE DANO DO ENSAIO COMETA DE CONTROLES E PACIENTES COM DPOC.....	51
FIGURA 15: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE CARBONILAÇÃO PROTEICA E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	53
FIGURA 16: FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS A CADA 1000 CÉLULAS DE ESFOLIADO BUCAL EM CONTROLES E PACIENTES COM DPOC.....	54
FIGURA 8: REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DAS ANÁLISES DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>CYP1A1 C2453A</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	57
FIGURA 9: REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DAS ANÁLISES DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>CYP2E1 C-1053A</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	59
FIGURA 10: REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DAS ANÁLISES DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>GSTM1 NULL</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	61
FIGURA 11: REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DAS ANÁLISES DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>GSTT1 NULL</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	63
FIGURA 12: REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DAS ANÁLISES DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>GSTT1 NULL</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	65
FIGURA 13: REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DAS ANÁLISES DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>CAT C-262T</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	67
FIGURA 14: REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DAS ANÁLISES DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO <i>GPX1 Pro198Leu</i> NO ÍNDICE DE DANO DO ENSAIO COMETA.....	69

---

## RESUMO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma condição lentamente progressiva de pobre reversibilidade que se caracteriza pela limitação do fluxo aéreo associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões. Seu desenvolvimento e progressão estão relacionados ao incremento do estresse oxidativo, sendo este um importante componente patogênico da inflamação das vias aéreas nesta doença. Sendo assim, este estudo caso-controle teve por objetivo avaliar e quantificar danos no DNA (pelo do ensaio cometa alcalino simples e modificado com as endonucleases Fpg e Endo III e pelo teste de micronúcleos de esfoliado da mucosa oral) em lipídios (pelo ensaio de TBARS) e proteínas (pelo ensaio com DNPH), bem como avaliar a influência dos polimorfismos de genes envolvidos na Fase I do metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1 C2453A* e *CYP2E1 C-1053T*), Fase II (*GSTM1<sub>null</sub>*, *GSTT1<sub>null</sub>* e *GSTP1 Ile105Val*), e na neutralização de espécies reativas de oxigênio (*CAT C-262T* e *GPx1 Pro198Leu*) sobre os biomarcadores. A população estudada compreendeu 51 indivíduos de função pulmonar saudável e 51 pacientes com DPOC da região do Vale do Rio Pardo, RS, Brasil. Os pacientes apresentaram índices de dano superiores no cometa alcalino e modificado com Fpg e Endo III ( $P < 0,001$ ;  $P = 0,023$  e  $P = 0,021$ , respectivamente). Não houve diferença na formação de MN entre os grupos ( $P = 0,651$ ). Os pacientes que não participavam de um programa de reabilitação pulmonar apresentaram índices de peroxidação lipídica superiores aos controles e àqueles que participavam dos exercícios ( $P < 0,001$ ). Adicionalmente, foi encontrada uma tendência a uma maior carbonilação proteica nos pacientes não aderentes ao programa. Todos os polimorfismos investigados apresentaram diferentes efeitos modulatórios nos índices de dano do ensaio cometa, nos controles, pacientes, ou ambos, mas não na formação de micronúcleos. Além de ressaltar os efeitos da inflamação sistêmica típica da DPOC, esse estudo evidencia a influência da variabilidade genética individual sobre o dano não clastogênico no DNA destes pacientes.

## ABSTRACT

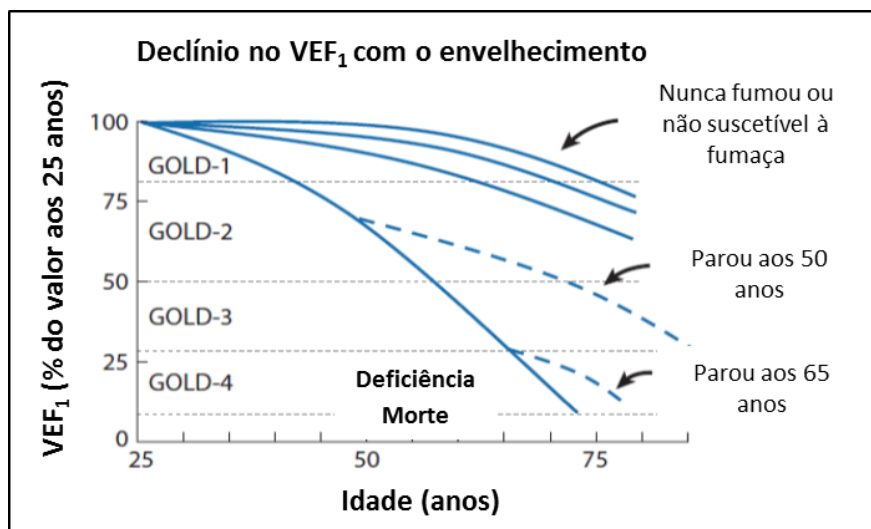
Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a slowly progressive condition of poor reversibility that is characterized by airflow limitation associated with an abnormal inflammatory response of the lungs. Its development and progression are related to increased oxidative stress, which is an important pathogenic component of airway inflammation in this disease. Thus, this case-control study, aimed to evaluate and quantify DNA (using the alkaline and endonuclease-modified comet assay and micronucleus test in exfoliated oral mucosal), lipid (TBARS) and protein (DNPH assay) damage, and to evaluate the influence of genetic polymorphisms of genes involved in Phase I metabolism of xenobiotics (*CYP1A1 C2453A*, *CYP2E1 C-1053T*), Phase II (*GSTM1<sub>null</sub>*, *GSTT1<sub>null</sub>*, *GSTP1 Ile105Val*), and neutralization of ROS (*CAT C-262T* and *GPx1 Pro198Leu*) on these biomarkers. The target population comprised 51 individuals with healthy pulmonary function and 51 patients with COPD from the Rio Pardo Valley, RS, Brazil. The patients had higher Damage Index (DI) in the alkaline, Fpg and Endo III-modified comet, ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.023$  and  $P = 0.021$ , respectively). There was no difference in the formation of MN between the groups ( $P = 0.651$ ). Patients who had not participated in a pulmonary rehabilitation program showed higher levels of lipid peroxidation than the controls and those who participated in the exercises ( $P < 0.001$ ). Additionally, it was found a trend towards a higher protein carbonylation in these non-adherent patients. All investigated polymorphisms had distinct modulatory effects in the comet assay's DI in controls, patients, or both, but not in the micronucleus formation. Aside from highlighting the effects of the COPD's typical systemic inflammation, this study stresses the influence of individual genetic variability on non-clastogenic damage in these patients' DNA.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Definição

Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) não é uma doença de etiologia única, mas sim um grupo heterogêneo que agrupa diversas doenças de manifestação similar e inclui processos patológicos díspares e que podem se sobrepor como: bronquite crônica, enfisema, bronquiectasia e bronquiolite (Stockley, R. A. *et al.*, 2009).

O critério diagnóstico mais utilizado atualmente é a taxa do volume expiratório forçado no primeiro segundo pós-aplicação de broncodilatador pela capacidade expiratória forçada (também conhecido como Índice de Tiffeneau)  $< 0,7$  conforme ditado pela *Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonar Disease* (Gold, 2011). Tendo em vista que a capacidade pulmonar decresce naturalmente com a idade (Figura 1) são recomendados uma série de outros critérios para auxílio do diagnóstico, como exposição a fatores de risco (tabagismo passivo ou ativo), poluição ambiental, queima de biomassa, doenças respiratórias recorrentes na infância, bem como presença de dispnéia aos esforços, sibilos tosse recorrente, produtiva ou não, entre outros (De Boer, W. I., 2002; Gold, 2011).



**Figura 1:** Diagrama do declínio no Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo de um grupo de homens no oeste de Londres em um período de 6 anos (Hogg, J. C., 2004). As linhas pontilhadas horizontais representam o estadiamento da doença conforme estabelecido pela GOLD.

A doença é classificada em quatro níveis de acordo com a sua gravidade, baseado em uma série de parâmetros como Volume Expiratório Forçado e Saturação de Oxigênio (Pereira, C.A.C. *et al.*, 2007). O diagnóstico da doença baseia-se em elementos obtidos na história clínica, exame físico e exames complementares. Um relato importante é o tabagismo, assim como exposição a pós, fumos e a fumaça de combustão de lenha (Moerloose, K. B. *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos (Doll, R. *et al.*, 2004; Camp, P. G. *et al.*, 2009; Gold, 2011) citam o hábito de fumar como principal agente causador da DPOC e associam a sua gravidade com a quantidade de cigarros fumados por dia, efeito danoso que apresenta impacto desigual entre os gêneros (Vineis, P. *et al.*, 2005). Contudo, existem diversos outros fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da DPOC, entre eles: exposição ocupacional a vapores provenientes da combustão do diesel (Hart, J. E. *et al.*, 2009), pesticidas (Chakraborty, S. *et al.*, 2009), combustão de biomassa e poeiras como cimento e sílica (Dement, J. M. *et al.*, 2010), entre outros.

Apesar de ser o maior fator de risco para o desenvolvimento da DPOC, um dado interessante é que nem todos os tabagistas desenvolvem a doença, bem como

nem todos os pacientes com DPOC foram fumantes, sugerindo que fatores genéticos podem modificar o risco individual. Desta forma, é possível observar a existência de casos onde fumantes passivos desenvolvem a doença, enquanto fumantes pesados, não (Godoy, D. V. D. *et al.*, 2001; Araújo, A. J. D. *et al.*, 2004).

A fase inicial da doença é de difícil reconhecimento, devido à obstrução de pequenas vias aéreas que passa de forma assintomática nos métodos de investigação mais rotineiros. Sendo assim, o reconhecimento da bronquite e do enfisema normalmente ocorre quando essas injúrias já se apresentam em estado mais avançado, com sua clínica bem caracterizada (Wedzicha, J. A., 2002; Chronic Obstructive Pulmonary Disease., 2004).

Segundo Campos (2003), o prognóstico da doença é grave, a sobrevivência 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. 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 dos parâmetros respiratórios, sendo este um dos aspectos mais marcantes da doença (Man, W. D. *et al.*, 2004; Ram, F. S. *et al.*, 2004).

Além de tolher o afetado com exacerbações limitantes ou até incapacitantes como a dispnéia, a doença é predisponente para desenvolvimento de diversas outras doenças crônicas, como câncer de pulmão, depressão, osteoporose, infecções bacterianas (Decramer, M. *et al.*, 2008) e infarto do miocárdio (Macnee, W., 2005a).

## **1.2 Epidemiologia e Impacto Social**

A DPOC é uma das principais causas de morte em todo o mundo, representando um custo econômico e social significativo. 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. Na área do Sistema de Saúde, é motivo de atendimentos repetidos em prontos-socorros, ambulatórios e causa frequente de hospitalizações, levando a despesas elevadas para governos e sociedades (Campos, H.S, 2003).

Segundo a estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorreram 2,74 milhões de mortes por DPOC no ano de 2000 em todo o mundo, sendo hoje considerada a 4ª causa de morte na população mundial (Decramer, M. *et al.*, 2012)b. A prevalência da DPOC tem aumentado em todo o planeta, devido a permanente exposição das pessoas aos fatores de risco já conhecidos: tabagismo, exposição ocupacional ao cádmio e a sílica e índices maiores de poluição em lugares abertos e fechados. Esses fatores, associados à maior expectativa de vida da população, fizeram com que a OMS considerasse a DPOC uma epidemia, prevendo a sua eclosão no ano de 2030, quando poderá então se tornar a 3ª maior causa de mortalidade e a 5ª doença em prevalência (Rufino, R. *et al.*, 2006; WHO,2008).

Conforme Mannino e Braman (2007) as estimativas da prevalência da DPOC, definidas utilizando como critério portadores da doença em estágio II ou mais avançado, variam de 3% a 23% da população em diferentes países.

O Ministério da Saúde estima a prevalência de 7,5 milhões de portadores de DPOC. A rede hospitalar previdenciária contabilizou cerca de 190.000 internações devidas à DPOC em 1983, ou 2,5% do total das mesmas. Ainda em 1983, foram concedidas mais de 3.000 aposentadorias precoces devidas à invalidez secundária à DPOC (Godoy, D. V. D. *et al.*, 2001).

Em países desenvolvidos, onde as políticas públicas de cessação do tabagismo e diminuição de poluentes são muito intensas, vê-se uma estabilização da prevalência e até mesmo declínio, enquanto nos países em desenvolvimento existe a tendência contrária, acompanhando as taxas crescentes de tabagismo e a diminuição da mortalidade por doenças infecciosas (Decramer, M. *et al.*, 2012). O Brasil vem investindo pesadamente nas campanhas antitabágicas, iniciativa que tem dado bons resultados, traduzidos no declínio do percentual de fumantes para 14,8% em 2011,

embora em certas capitais, como Porto Alegre, os índices ainda estejam na marca dos 23% (Brasil, Ministério da Saúde, 2012).

O impacto socioeconômico ainda é mais acentuado quando se leva em conta o suporte prestado pelo Estado aos acometidos. Miravittles (2004) realizou uma avaliação econômica da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e de suas agudizações na América Latina. Segundo o autor, a DPOC 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 mil e dez mil dólares anuais, segundo a gravidade da doença e os preços de cada país. Esse custo ainda pode ser multiplicado pelas internações e/ou exacerbações causadas pela doença.

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 maiores taxas de mortalidade encontram-se no grupo etário de maiores de 65 anos. Elas são, em média, 4 vezes maiores que entre aqueles com 55-64 anos (Campos, H.S, 2003).

Na distribuição das mortes por região geográfica, observa-se que as regiões Sul (principalmente no Rio Grande do Sul) e Sudeste apresentam coeficientes superiores à média nacional. Em 1998, foram notificadas 23,68 mortes por DPOC entre cada 100.000 homens e 14,47 em cada 100.000 mulheres. 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 Maranhão apresentou as menores taxas: 0,48/100.000 em 1980 e 2,41/100.000 em 1998, com incremento de 400% no período (Campos, H.S, 2003).

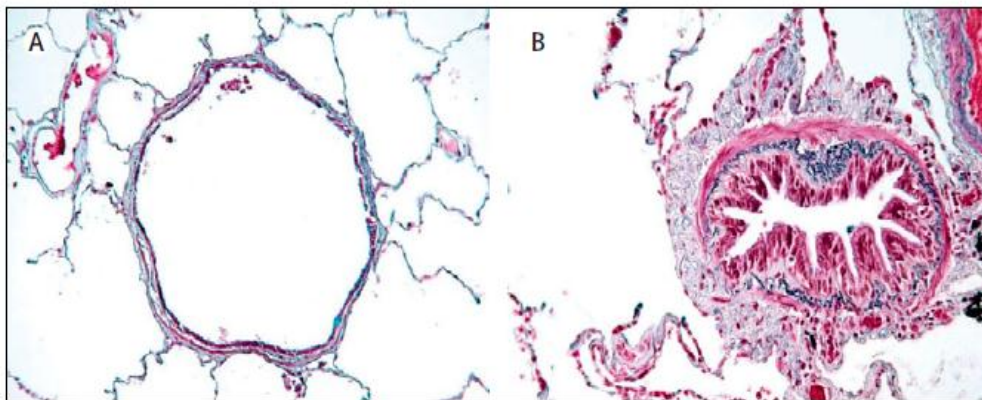
A atividade que mais poupa recursos é o diagnóstico precoce da doença em fase leve, o que justifica a implantação de programas de detecção de casos e de



abandono do tabagismo. Entre os pacientes diagnosticados, a fatia do custo direto mais importante é a derivada das internações hospitalares, a maioria delas devida as agudizações. O custo médio de uma agudização é de cerca de US\$ 160 dólares, mas quando o tratamento inicial fracassa, passa para em média US\$ 477,5 dólares (Miravittles, M., 2004).

### 1.3 Alterações Pulmonares

A DPOC é uma doença inflamatória caracterizada pela obstrução ou limitação crônica ao fluxo aéreo, de caráter lento e progressivo. A limitação ao fluxo aéreo ocorre principalmente pela perda da retração elástica do pulmão, associada à perda dos pontos de fixação das vias aéreas terminais aos alvéolos, ocasionando colapso expiratório (Oliveira, J.C.A, *et al.*, 2001). A espessura dos componentes estruturais das vias aéreas (epitélio, lâmina própria, músculo liso e adventícia) aumenta com o agravamento da doença, como podemos ver na Figura 2 (Halpin, D. M. *et al.*, 2009).



**Figura 2:** Comparação das características em um indivíduo saudável e um paciente com DPOC. (A) via aérea normal; (B) via aérea estreitada pela infiltração de células inflamatórias, hiperplasia mucosa e deposição de tecido conjuntivo no espaço peribronquiolar. Adaptado de: Decramer, M. *et al.*, (2012).

A origem das alterações na mecânica pulmonar é devida à obstrução brônquica que leva a um deslocamento do ponto de igual pressão para as vias aéreas que não possuem cartilagens, favorecendo o aprisionamento de ar. Este processo

fisiopatológico tende a levar a hiperinsulflação pulmonar crônica, o que reduzirá a capacidade física nos grandes esforços e, até mesmo no repouso (Paulin, E. *et al.*, 2003; Reid, P. T. *et al.*, 2003).

Essa hiperinsulflação pulmonar gera uma remodelação da musculatura inspiratória, especialmente do diafragma que tende a se retificar, diminuindo a zona de oposição e conseqüentemente, restringindo sua excursão, da maneira fisiológica. Existem evidências de que esse fenômeno resulta em adaptações estruturais dos músculos da caixa torácica (Paulin, E. *et al.*, 2003). Além de acarretar prejuízos à mecânica pulmonar, também afeta toda musculatura periférica

De maneira geral, quatro mecanismos principais são responsáveis pelas alterações observadas na DPOC: a inflamação, o desequilíbrio do sistema protease-antiprotease, a apoptose e o estresse oxidativo (Macnee, W., 2005b). A relevância da contribuição de cada um destes fatores varia de caso para caso, explicando a multiplicidade das formas em que a doença se manifesta.

#### **1.4 Aspectos Moleculares**

Apesar das mudanças marcantes induzidas nas vias aéreas, o mecanismo de ação da doença ainda não é bem compreendido. Eis o motivo pelo qual as pesquisas mais recentes estão explorando novos horizontes fisiopatogênicos. Quando antes levava-se em conta apenas as manifestações pulmonares, agora tem se buscado entender as alterações no nível celular e bioquímico causados pela doença (Gontijo, A. e Tice .R., 2003).

A exposição a agentes nocivos ocasiona inflamação em toda a árvore traqueobrônquica. Ocorrem alterações dos componentes celulares do pulmão, com recrutamento de macrófagos, neutrófilos e linfócitos CD8<sup>+</sup>, sendo que o número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> parece estar diretamente correlacionado com a severidade da limitação do fluxo aéreo, sugerindo uma contribuição na patofisiologia da doença (Wouters, E. F. *et al.*, 2009). Esses linfócitos são recrutados pelas quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 que, por sua vez são induzidas pelo IFN- $\gamma$  (interferon-gama).

Levando em consideração que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são os principais produtores IFN- $\gamma$ , pode-se observar que é estabelecido um sistema de retroalimentação positiva que só faz agravar o estado inflamatório (Costa, C. *et al.*, 2008). Esse mecanismo inflamatório gera excesso de produtos oxidativos e facilita a colonização por microrganismos, que interagem entre si recrutando mais células pró-inflamatórias (Rufino, R. e Silva, J. R. L. E., 2006; Gold, 2011) e ainda acarretam estresse oxidativo gerando uma cascata de consequências danosas para o organismo.

Os macrófagos apresentam importante pleomorfismo no pulmão, o menor com intensa capacidade de fagocitose e os maiores com grande atividade bioquímica. Nos tabagistas, a liberação de lisossomas é até 5 vezes maior que nos não fumantes, e secretando uma variedade de substâncias tais como: metabólicos do ácido araquidônico (tromboxano A2, prostaglandina E2, D2 e F2a, leucotrieno B4, 5-HETE), citocinas (IL1, IL6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , 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 (metalproteinases e elastases) e óxido nítrico (Rufino, R. e Silva, J. R. L. E., 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 (Andrade Júnior, D. R. D. *et al.*, 2005).

Investigações clínicas e experimentais sugerem que oxidantes desempenham um papel importante na patogênese da DPOC, implicando em efeitos locais e sistêmicos indiretos de oxidantes. Localmente, maiores níveis de oxidantes foram encontrados na respiração exalada condensada, escarro, 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 na monitoração de pacientes com DPOC exacerbada (Ciencewicky, J. *et al.*, 2008).

Agravando o quadro inflamatório do doente, as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) acarretam hipersecreção de muco (obstruindo ainda mais as vias aéreas já danificadas), diminuem ou até cessam a movimentação dos cílios celulares,

remodelam o tecido pulmonar através do aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, facilitando o acesso das proteases para o interstício pulmonar (Macnee, W., 2005b). Desta forma, inicia-se um círculo vicioso que promove resposta inflamatória anormal, na qual oxidantes promovem a inflamação por meio da ativação do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), estimulando a transcrição de múltiplos genes inflamatórios (Araújo, A. J. D. *et al.*, 2004).

Ciente da relevância do estresse oxidativo na fisiopatogenia da DPOC, é interessante que seja abordado de forma mais detalhada os mecanismos de formação das ERO.

### 1.5 Radicais Livres e Estresse Oxidativo na DPOC

A superfície respiratória representa a maior área do corpo em contato com o ambiente externo, tendo, aproximadamente, de 70 a 80 m<sup>2</sup>. Devido a este fato, os pulmões não ventilam somente o oxigênio, mas também, outras substâncias presentes no ar atmosférico, sendo muitas dessas patogênicas. Assim, são expostas continuamente a diversas substâncias tóxicas exógenas. Entretanto é um erro pensar que o estresse oxidativo é gerado apenas externamente. Oxidantes endógenos são produzidos continuamente por fagócitos e outros tipos celulares. Adicionalmente, as ERO são subprodutos de diversas reações metabólicas e dentre elas destaca-se a transferência de elétrons pela cadeia respiratória a fim de obter energia química (Repine, J. *et al.*, 1997).

O estresse oxidativo tem participação muito importante na fisiopatogenia da DPOC. O excesso de oxidantes ou a capacidade antioxidante reduzida do organismo são os principais geradores do estresse (Dahl, M. *et al.*, 2008). O estresse oxidativo se estabelece com desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, nas quais a velocidade de formação das espécies reativas está aumentada e/ou as defesas antioxidantes do organismo estão diminuídas (Kanazawa, H. *et al.*, 2005)

Para proteção contra estes radicais livres e manutenção da integridade celular, os organismos possuem sistemas de defesa antioxidante, que envolvem três etapas: a prevenção (evitar a formação de ERO), interceptação (neutralização de ERO geradas) e reparação de danos ocasionados por ERO.

A prevenção contra a formação de ERO é representada, por exemplo, pelos sistemas de homeostase metálica na prevenção ao estresse oxidativo. A interceptação pode ser representada pelos sistemas enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) ou não enzimáticos (glutathione, vitaminas, minerais e compostos fenólicos), que impedem a continuação das reações em cadeia. Por último, quando o dano já estiver ocorrido, existem sistemas capazes de repará-lo.

O efeito prejudicial das ERO ocorre quando elas estão em quantidade excessiva, ultrapassando a capacidade do organismo de neutralizá-las com os seus sistemas naturais. O efeito sistêmico do estresse oxidativo em pacientes com DPOC é explicado pela expansão deste para fora da corrente sanguínea, reflexo da queda da capacidade antioxidante no sangue desses indivíduos (Ceylan, E. *et al.*, 2006).

O desequilíbrio redox resulta em sérias consequências a diferentes componentes celulares, tais como peroxidação de lipídeos de membrana, oxidação de proteínas e danos no DNA, que quando não são corretamente reparados, podem iniciar e promover a carcinogênese. Além disso, tem sido demonstrado que a DPOC é um predisponente para o desenvolvimento de câncer de pulmão através de vários mecanismos, incluindo estresse oxidativo e processos mediados por ele, como inflamação e alteração da integridade genômica (Ceylan, E. *et al.*, 2006).

Como dito anteriormente, os radicais livres promovem reações com substratos biológicos, podendo ocasionar danos às biomoléculas, entre elas o DNA. Danos no DNA que podem ser causados pelas ERO incluem deleção, substituição ou adição de bases, quebras simples e duplas na estrutura, entre outras. Estes danos podem resultar em mutação desta molécula e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese (Barreiros, A. L. B. S. *et al.*, 2006).

Existem fortes indicações que o estresse oxidativo desempenha um papel central na patogênese da DPOC, pois além do dano direto ao trato respiratório que este acarreta, também atua iniciando e reforçando os processos de inflamação e apoptose (Macnee, W., 2007).

## **1.6 Análise de Biomarcadores**

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 (Dusinska, M. *et al.*, 2008).

Nesta Introdução, serão abordados os biomarcadores de efeito e susceptibilidade, que fizeram parte dessa investigação.

### **1.6.1 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 ou a progressão de uma patologia. Dentre os exemplos de biomarcadores amplamente utilizados estão troca de cromátides irmãs (TCI), detecção de formação de adutos e micronúcleos (MN) de citocinese bloqueada (CBMN) e mucosa oral, entre outros.

#### **1.6.1.1 Ensaio Cometa**

De forma bastante resumida, o ensaio cometa é um método sensível para aferição de quebras no DNA em um pequeno número de células (tipicamente células sanguíneas). As células são embebidas em uma camada fina de agarose em uma lâmina de microscopia e então mergulhadas em uma solução de lise que contém detergentes e alta concentração salina. Assim, as membranas e os constituintes solúveis da célula, bem como as histonas, são removidos deixando o DNA

superrenovado e preso à matriz nuclear. Com a adição de uma etapa de incubação alcalina, e subsequente eletroforese, as fitas que contêm quebras e sítios álcali-lábeis (sítios apurínicos/apirimídicos) movem-se em direção ao ânodo, assumindo uma forma que lembra um cometa (Dusinska, M. e Collins, A. R., 2008). A proporção de DNA na cauda indica a quantidade de quebras e/ou sítios álcali-lábeis.

Outra modificação muito informativa da técnica é a adição de um passo onde as células em suspensão sofrem digestão com endonucleases específicas, como Fpg e Endo III, que detectam lesões específicas como dano oxidativo em purinas e pirimidinas.

### **1.6.1.2 Peroxidação Lipídica e Carbonilação Proteica**

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, K. S. *et al.*, 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, J., 2007). Embora apresente alguns problemas de especificidade, ainda é o método mais amplamente empregado para esse fim (Armstrong, D. *et al.*, 1994).

Não obstante, o fenômeno da carbonilação proteica pode ocorrer quando metais catiônicos como  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  ligam-se às proteínas em locais específicos e, com o auxílio de espécies reativas de oxigênio, promovem um ataque que pode transformar a cadeia lateral de diversos aminoácidos (como lisina, arginina e histidina) em grupos carbonila (Dalle-Donne, I. *et al.*, 2003). Entretanto, essa reação pode também ser catalisada na presença de aldeídos e pelo ataque dos compostos oxidantes presentes na fumaça do cigarro (Reznick, A. Z. *et al.*, 1992). O teste mais comum para a detecção de carbonilação proteica baseia-se na reação dos grupamentos carbonila com a 2,4-dinitrofenil-hidrazina, onde é formada uma base de

Schiff que por sua vez forma sua respectiva hidrazona, e esta pode ser medida espectrofotometricamente (Levine, R. L. *et al.*, 1990).

### 1.6.1.3 Micronúcleos de Mucosa Bucal

O teste de micronúcleos é um dos mais utilizados para biomonitoramento em diversos organismos. Sua presença pode indicar instabilidade genética, genotoxicidade e mutagênese. Os micronúcleos podem se originar de cromossomos ou cromátides acêntricas ou até mesmo cromossomos inteiros que não segregaram-se corretamente durante a divisão celular (Fenech, M. *et al.*, 2011).

Existem dois métodos principais pelos quais pode-se avaliar a presença de micronúcleos. O primeiro, chamado de CBMN (do inglês *Cytokinesis-Blocked Micronucleus*) consiste no isolamento e cultura dos micronúcleos, seguido por incubação com um agente bloqueador da citocinese, usualmente citocalasina B (Titenko-Holland, N. *et al.*, 1997). O segundo método (o escolhido para este trabalho) dispensa cultivo celular. Consiste em uma técnica mais recente, menos invasiva, que se utiliza de um esfoliado de células bucais (um tecido de alta proliferação) fixadas e coradas com reativo de Schiff, que pode ser analisado em microscopia óptica convencional ou fluorescência (Thomas, P. *et al.*, 2009).

## 1.6.2 Biomarcadores de Susceptibilidade: Alterações Genéticas

O dano no DNA, juntamente com as respostas celulares decorrentes deste, pode resultar em instabilidade genômica através de muitas vias. 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 (Gontijo, A. e Tice, R., 2003).

Há dois fatores de risco principais em relação ao desenvolvimento de DPOC: o primeiro é o tabagismo e o segundo é o chamado enfisema genético, caracterizado pela deficiência de  $\alpha$ -1 antitripsina (AAT) por mutação no gene que a codifica



(Janciauskiene, S. M. *et al.*, 2011). Segundo Camelier (2008), 2% dos acometidos pela DPOC o são por fatores hereditários, na qual se destaca a deficiência desta proteína.

A AAT é uma glicoproteína cuja função central é inibir uma série de enzimas, como a tripsina e a protease-3, mas principalmente a elastase neutrofílica. Em condições normais, existe um excesso de AAT nos pulmões, o que garante proteção contra proteases neutrofílicas que podem destruir uma proteína pulmonar estrutural, a elastina pulmonar (Camelier, A. A. *et al.*, 2008). Enquanto a sua deficiência causa maior suscetibilidade a danos nas estruturas pulmonares.

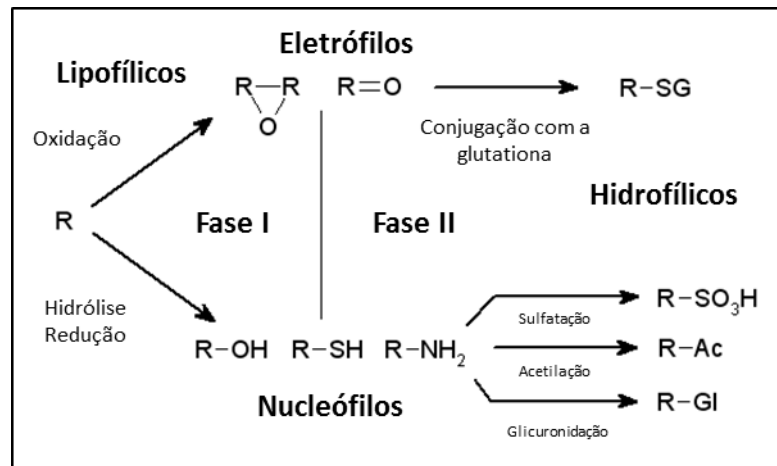
A lesão pulmonar pode ser consequência do aumento dos fatores agressores, como o tabagismo, infecções e fatores ocupacionais, como também da redução dos mecanismos protetores dos pulmões (deficiência de AAT). Através de estudos do Projeto Latino-Americano de Investigação em Obstrução Pulmonar - PLATINO (Menezes, A. M. B. *et al.*, 2005), descobriu-se que 15,8% dos indivíduos participantes do estudo com 40 anos ou mais eram portadores de DPOC e que 12,5% desses indivíduos nunca haviam sido expostos ao tabaco. Sugere-se então que fatores genéticos podem desempenhar um papel relevante no desenvolvimento da DPOC.

#### **1.6.2.1 Polimorfismos Genéticos: Metabolismo de Xenobióticos**

Não obstante, nem sempre a influência de fatores genéticos é tão direta como no caso da deficiência de AAT. A variabilidade genética pode contribuir de forma mais insidiosa para agravar a doença. Polimorfismos em genes que codificam as enzimas com função antioxidante e de biotransformação de xenobióticos como *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CAT* e *GPx1* podem resultar em proteínas com capacidade enzimática menor, o que propicia o desenvolvimento de doenças em função das ERO e outras substâncias que não são neutralizadas ou metabolizadas.

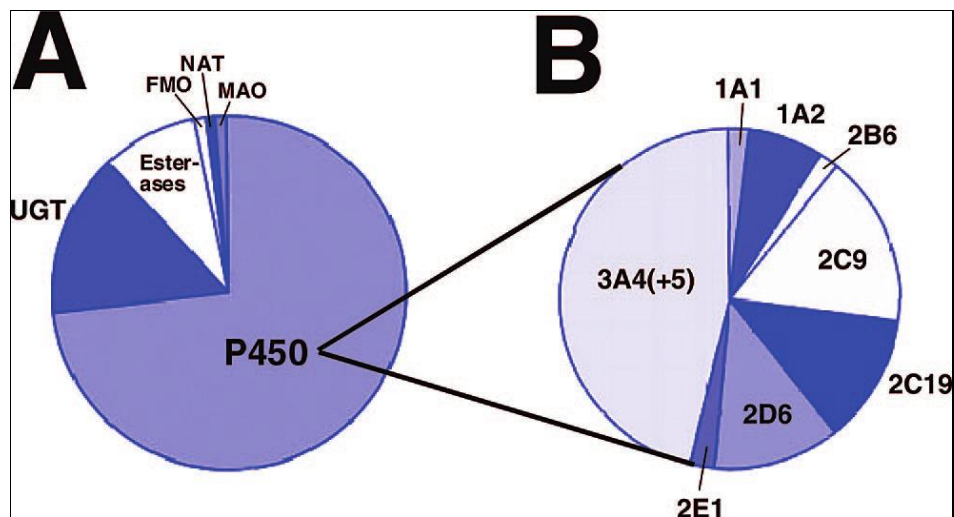
O metabolismo de xenobióticos se divide basicamente em duas fases (Figura 3). Na Fase I ocorrem reações de funcionalização, catalisadas por enzimas capazes de desidrogenação/hidrogenação, oxidação, hidrólise, redução e mono-oxigenação. Na Fase II, reações de conjugação tornam a molécula mais solúvel e menos reativa,

tornando possível sua excreção (Sommer, A. *et al.*, 2011; Guecheva, T.N. e Henriques, J.A.P., 2003).



**Figura 3:** Via de metabolismo de xenobióticos. Adaptado de: Sommer, A. *et al.* (2011).

As mais importantes enzimas participantes desta primeira fase do metabolismo são as integrantes da superfamília do Citocromo P450 (CYPs). Esta superfamília compreende em torno de 57 genes, que codificam enzimas possuidoras de uma ampla gama de substratos como esteroides, eicosanoides, ácidos graxos, vitaminas e xenobióticos e são responsáveis por 75% do metabolismo das drogas atualmente comercializadas (Guengerich, F. P., 2008). Destes 75% apenas cinco CYPs são responsáveis por 95% do metabolismo destas drogas, como pode ser visto na Figura 4. Sua reação geral segue o seguinte esquema:  $NADPH + H^+ + O_2 + R \rightarrow NADP^+ + H_2O + RO$ , embora haja exceções (Guengerich, F. P., 2001). Frequentemente esse passo de ativação gera compostos altamente reativos, com grande potencial tóxico para célula. Assim, fica evidente a necessidade de uma rigorosa coordenação espaço-temporal das enzimas da Fase I e II, de modo que seus níveis de indução e atividade específica não possam sobrepujar os da fase seguinte, criando um acúmulo de subprodutos tóxicos.



**Figura 4:** (A) Principais enzimas responsáveis pelo metabolismo de drogas comercializadas atualmente: UGT - glicoronil transferase, FMO - flavina monooxigenase, NAT - *N*-acetil-transferase, MAO - monoamino oxidase, (B) Contribuição relativa de cada um dos integrantes da superfamília CYP450 neste metabolismo. Adaptado de: Guengerich, F. P. (2008).

Um dos eventos que pode vir a prejudicar esse equilíbrio frágil é a ocorrência de polimorfismos que tenham influência sobre a atividade enzimática dos CYPs. Tendo em vista o papel central dos citocromos e a sensibilidade do sistema de detoxificação foram selecionados dois polimorfismos que, segundo relatos (Cascorbi, I. *et al.*, 1996; Colombo, J. *et al.*, 2004) apresentam influencia nos níveis e/ou responsividade das enzimas: *CYP1A1 C2453A* (rs 1799814) e *CYP2E1 C-1053T* (rs 2031920), possivelmente perturbando as proporções entre as enzimas da Fase I e II.

A transcrição do gene *CYP1A1* é induzida quando poluentes como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) ligam-se aos fatores de transcrição chamados receptores aril-hidrocarboneto (*AhR*). Os *AhR* encontram-se no citosol em sua forma inativa em um complexo multiproteico com hsp90, XAP2 e p23. Quando o ligante o ativa, esse complexo é translocado para o núcleo e lá o ligante:*AhR* é liberado do complexo, ligando-se ao translocador nuclear do *AhR* (*ARNT*), que aumenta a afinidade de *AhR* ao DNA, em especial a um motivo chamado Elemento de Resposta a Xenobióticos (XRE ou DRE, no inglês) levando à ativação transcricional de diversos genes, dentre eles *CYP1A1* (Denison, M. S. *et al.*, 2003).

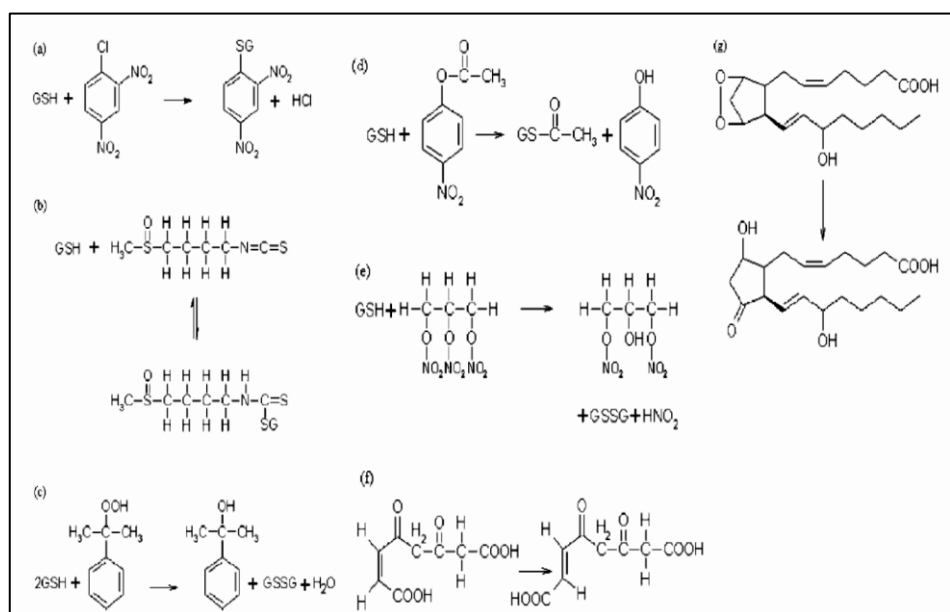
*CYP1A1* é um gene altamente polimórfico. Até o presente momento, conforme o site *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database* (Disponível em: <http://www.cypalleles.ki.se/>, acessado em março de 2012) existem 11 alelos cujos haplótipos já foram determinados, dois dos quais apresentam uma troca de aminoácido próxima ao seu sítio ativo: o polimorfismo *CYP1A1\*2B* (rs1048943) que acarreta na mudança de uma isoleucina para uma valina na posição 462 e *CYP1A1\*4* (rs1799814), no qual uma treonina é substituída por uma asparagina na posição 462 (Schwarz, D. *et al.*, 2001).

Neste trabalho, foi investigado *CYP1A1\*4*, que consiste em uma transversão de C→A no nucleotídeo 4887, no códon 461 (Cascorbi, I. *et al.*, 1996). Existem divergências quando aos efeitos desta substituição. Alguns estudos relatam associações com doenças como câncer de mama (Krajinovic, M. *et al.*, 2001), pulmão (San Jose, C. *et al.*, 2010) e com aumento de metabólitos de benzo[a]pireno (B[a]P) na urina (Abnet, C. C. *et al.*, 2007), enquanto outros trabalhos não encontram qualquer relação com o desenvolvimento de doenças crônicas (Mcgrath, M. *et al.*, 2007; Early, D. S. *et al.*, 2010; Wright, C. M. *et al.*, 2010)

Já *CYP2E1*, como *CYP1A1*, está envolvido no metabolismo de xenobióticos. É responsável pela ativação de compostos como o benzeno, estireno, acetonitrila, e de especial relevância para este trabalho, nitrosaminas específicas do cigarro como a 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) e N'-nitrosonornicotina (NNN), entre outras (Montellano, P. R. O., 2005). O polimorfismo *CYP2E1 C-1053T* foi selecionado para esta investigação com base nas evidências que a modificação apresenta impacto funcional no gene, podendo alterar seus níveis de transcrição, causar um aumento a concentração de proteína e alterar sua atividade, o que poderia acarretar um desequilíbrio pelos motivos já mencionados anteriormente (Arif, E. *et al.*, 2007).

Depois de passarem pelas modificações da Fase I, os compostos passam para a Fase II, onde são conjugadas com substâncias como ácido glicurônico, glicina, sulfatos e glutatona (Jakoby, W. B. *et al.*, 1990). A superfamília de enzimas mais relevante envolvida neste processo é a das glutatonas transferases (GSTs) citosólicas, enzimas

que catalisam o ataque nucleofílico da glutatona reduzida (GSH) a compostos apolares que contém átomos eletrofílicos de carbono, nitrogênio ou enxofre (Hayes, J. D. *et al.*, 2005). Essas enzimas têm atividades exclusivas deste grupo (Figura 5). Até então, foram caracterizadas oito classes de GSTs (em mamíferos), a saber:  $\alpha$  (GSTA),  $\mu$  (GSTM),  $\pi$  (GSTP),  $\theta$  (GSTT),  $\sigma$ ,  $\kappa$ ,  $\omega$ ,  $\zeta$  (Strange, R. C. *et al.*, 2001).



**Figura 5:** Reações catalisadas pelas GSTs. Exemplos de conjugação, tiólise e isomerização em diferentes substratos. (a) CNDB; (b) sulfurafano; (c) CuOOH; (d) 4-nitrofenil acetato; (e) trinitroglicerina; (f) maleil-acetoacetato; (g) PGH<sub>2</sub> (conversão para PGD<sub>2</sub>). Modificado de: Hayes, J. D. *et al.* (2005).

Os genes das GSTs citosólicas são altamente polimórficos. Dentre outros, *GSTM1* e *GSTT1* podem apresentar uma deleção (chamado de *GSTM1*<sub>nulo</sub> *GSTT1*<sub>nulo</sub>) que incapacita os indivíduos portadores de produzir as respectivas enzimas (Strange, R. C. *et al.*, 2001). Esses polimorfismos têm sido associados com uma diversidade de efeitos deletérios, como suscetibilidade a doenças inflamatórias (Karam, R. A. *et al.*, 2012), aumento da formação de adutos no DNA (Lee, M.-S. *et al.*, 2010) e maior susceptibilidade a alguns agentes tóxicos (Olvera-Bello, A. E. *et al.*, 2010), fatos associados à ausência da enzima.

*GSTP1* também apresenta um polimorfismo (dentre outros) que aparenta ter um impacto fenotípico. O alelo variante de *GSTP1 Ile105Val* (rs1695) supostamente apresenta uma atividade menor que sua contraparte, sendo associado com neoplasias (Ihsan, R. *et al.*, 2011; Koh, W. P. *et al.*, 2011) e declínio acelerado da função pulmonar (Lakhdar, R. *et al.*, 2011).

### 1.6.2.2 Polimorfismos Genéticos: Enzimas Antioxidantes.

Como já mencionado, o organismo desenvolveu mecanismos para lidar com o influxo e geração interna de espécies reativas. A etapa de interceptação dessas espécies (por enzimas como catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) é vital pra evitar a geração de danos em membranas, outras proteínas e até mesmo DNA. Esse fato é ainda mais verdadeiro quando pensa-se em indivíduos acometidos pela DPOC. A carga oxidativa proveniente do processo inflamatório e de outros aspectos da doença torna essa via ainda mais fundamental de modo que qualquer alteração na eficiência das enzimas pode vir a prejudicar muito o paciente.

A catalase, por exemplo, é uma enzima presente em todas as células aeróbicas, embora seja mais abundante no fígado, rins e eritrócitos. É responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (Rhee, S. G. *et al.*, 2005). A reação necessita de duas moléculas de peróxido de hidrogênio e, portanto, apresenta uma alta taxa de conversão. De fato essa enzima é portadora de um dos *turnovers* mais altos dentre as moléculas: cada molécula de catalase é capaz de converter milhões de moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por segundo (Goodsell, D., acessado em 14 de março de 2012).

Existem em torno de 245 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) identificados no gene da catalase embora a maioria dos estudos se concentre no rs1001179, que consiste na substituição de citosina por uma timina, na posição -262 (Crawford, A. *et al.*, 2012). Este polimorfismo influencia a afinidade de fatores de transcrição ao gene aumentando a estabilidade de sua ligação, além de estar associada ao aumento dos níveis da enzima em eritrócitos (Forsberg, L. *et al.*, 2001). Alguns estudos afirmam

que o alelo variante apresenta efeito protetor ou atenuante em certas doenças (Zotova, E. V. *et al.*, 2004; Mak, J. C. *et al.*, 2006) ou predisponente em outros casos (Choi, J. Y. *et al.*, 2007).

Outras enzimas proeminentes na defesa antioxidante é a família das glutatonas peroxidases (GPx), cuja função é reduzir o peróxido de hidrogênio à água, frequentemente com o auxílio de GSH como co-substrato (Lubos, E. *et al.*, 2011). Nesta família, a forma mais abundante de glutatona peroxidase é a GPx-1, presente em todas as células, em compartimentos como peroxissomas, mitocôndrias e citosol. GPx-1 é também capaz de reduzir hidroperóxidos lipídicos e outros hidroperóxidos solúveis depois de sua liberação da membrana celular e de agir como uma peroxinitrito-redutase (Lubos, E. *et al.*, 2011).

Até o momento, sabe-se de 4 polimorfismos que ocorrem no gene da *GPx1*, mas foi selecionado para essa investigação o *GPx1 Pro198Leu* (rs1050450), o mais bem descrito dentre os 4. Esse polimorfismo consiste em uma transição de C→T que resulta na substituição de uma prolina por uma leucina na posição 198 (Suzen, H. S. *et al.*, 2010). Embora ainda não esteja perfeitamente claro e possa depender de diversos fatores ambientais, esse polimorfismo parece diminuir a resposta da enzima ao selênio, que em condições fisiológicas estimula a expressão do gene (Hu, Y. J. *et al.*, 2003). A presença do alelo variante já foi associada predisposição a diversos tipos de cânceres tais como mama e pulmão, (Hu, Y. J. e Diamond, A. M., 2003; Ichimura, Y. *et al.*, 2004; Raaschou-Nielsen, O. *et al.*, 2007), doenças como cardiomiopatia (Lei, C. *et al.*, 2009) e complicações advindas do diabetes tipo 2 (Hamanishi, T. *et al.*, 2004).

Desta forma, os mecanismos que compõem a patologia da DPOC e do desenvolvimento da limitação da função respiratória ainda não estão totalmente esclarecidos (Laizo, A., 2009). Envolvem uma série de fatores agressores e genéticos que promovem recrutamento de células inflamatórias e originam uma resposta alterada das células estruturais do pulmão, com desequilíbrio do balanço proteases-antiproteases e do balanço oxidantes/antioxidantes. As variações genéticas que permitem que alguns indivíduos sejam suscetíveis aos agentes agressores devem ser investigadas, e a descoberta dos vários polimorfismos dos genes mediadores da

inflamação e dos genes antioxidantes irá possibilitar a identificação dos doentes em risco, uma melhor prevenção e arsenal terapêutico mais eficaz, de forma a contrariar as graves alterações da função respiratória que advêm desta doença.

Levando em conta a natureza plurietiológica da DPOC, percebe-se a importância de uma abordagem metodológica que nos permita traçar um perfil mais acurado de suas manifestações, permitindo, assim, abordagens preventivas e/ou terapêuticas mais eficazes.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar o perfil oxidativo e a influência da variabilidade genética sobre marcadores de dano oxidativo e não oxidativo no DNA em uma população de pacientes com DPOC da região do Vale do Rio Pardo, RS, Brasil

### 2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar danos no DNA pelo ensaio cometa alcalino simples (para detecção de quebras simples, duplas e sítios álcali-lábeis) e modificado com as enzimas Fpg e Endo III, para detecção de purinas e pirimidinas oxidadas, respectivamente;
- Verificar a presença de danos clastogênicos e vxa aneugênicos pelo ensaio de micronúcleos de células esfoliadas da mucosa bucal;
- Quantificar os níveis de peroxidação lipídica (MDA) pela técnica de TBARS e carbonilação proteica pela reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH).
- Avaliar a influência de polimorfismos em genes de metabolismo de xenobióticos da Fase I (*CYP1A1 C2453A* e *CYP2E1 C-1053T*), Fase II (*GSTM1<sub>null</sub>*, *GSTT1<sub>null</sub>* e *GSTP1 Ile105Val*) e neutralização de espécies reativas de oxigênio (*CAT C-262T* e *GPx1 Pro198Leu*), avaliando sua influência sobre marcadores de dano oxidativo e não oxidativo no DNA.

### 3 METODOLOGIA

Esta pesquisa caracteriza-se como estudo de caso-controle e foi constituída por 02 grupos: o grupo de casos (portadores de DPOC) e grupo controle, de sujeitos de função pulmonar hígida, emparelhados em sexo, idade e índice de massa corporal (IMC). Para garantir os resultados o estudo foi conduzido de modo unicego para minimizar possibilidade de viés de aferição.

#### 3.1 Seleção dos Participantes do Projeto

Os critérios de inclusão para o grupo dos pacientes eram a ausência de histórico de neoplasias malignas e diagnóstico de DPOC, conforme critérios estabelecidos pela GOLD (*Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease*, 2011). Para inclusão no grupo controle, era necessária ausência de histórico de neoplasia maligna e função pulmonar normal, confirmado por dados espirométricos. Participaram desta pesquisa um total de 102 indivíduos, 51 controles e 51 casos. A fim de apresentar consistência quanto à descendência e condições de vida, os indivíduos foram todos recrutados na região do Vale do Rio Pardo, RS, Brasil. Os indivíduos do grupo de pacientes são todos provenientes do Hospital Santa Cruz, sediado em Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. Todos os envolvidos no projeto assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A), responderam a um questionário de saúde pessoal, contendo informações demográficas, exposição a radiações e medicamentos, hábitos tabágicos, entre outros (Anexo B) e foram submetidos à espirometria. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, protocolo n. 2011/08.

## 3.2 Ensaio Cometa

A técnica do teste cometa consiste em obter uma suspensão celular, a partir da qual as células são misturadas com agarose, lisadas, submetidas à eletroforese e coradas com nitrato de prata. Os núcleos com DNA intacto são observados com a forma circular na microscopia óptica convencional, enquanto que os núcleos que possuem o DNA fragmentado formam uma “cauda”, correspondente a estes fragmentos, que se expande durante a eletroforese. A extensão da cauda que migrou está correlacionada com a quantidade de danos ocorridos no DNA (FAIRBAIRN, 1995).

### 3.2.1 Amostras de Sangue

As amostras de sangue periférico de ambos os grupos foram obtidas pela manhã em repouso. Os pacientes não fizeram atividades físicas pelo menos 72h anteriores à coleta.

### 3.2.2 Ensaio Cometa Versão Alcalina

Para analisar o dano basal no DNA foi seguido o protocolo publicado por Singh e colaboradores, em 1988. Alíquotas de 5 µL de sangue total foram misturadas a 95 µL de agarose de baixo ponto de fusão e espalhada sobre uma lâmina de microscopia pré-coberta com agarose 1,5% (Invitrogen, Burlington, Canadá). A seguir as células foram lisadas por pelo menos 1 h a 4°C em tampão contendo 2,5 M de NaCl<sub>2</sub>, 100 mM de EDTA, 1% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) de Triton X-100 (Sigma-Aldrich do Brasil LTDA, São Paulo) e 10 mM de tampão tris, pH 10,0 (Invitrogen, Burlington, Canadá) para remoção de membranas e proteínas celulares. Após a lise das células, as lâminas foram incubadas em um aparato de eletroforese horizontal com tampão alcalino [300 mM NaOH (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e 1 mM EDTA, pH >13 por 20 min a 4°C], para permitir o desenovelamento do DNA e a exposição de sítios alcali-lábeis da molécula. Uma corrente elétrica de 25 V e 300Ma (0,90 V/cm) foi

aplicada por 20 minutos para que ocorresse a migração do DNA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com tampão tris (0,4 M, pH 7,5), coradas com nitrato de prata (Sigma-Aldrich do Brasil LTDA, São Paulo) como descrito por Nadin *et al.* (2001) e analisadas em microscopia óptica convencional, com o microscópio ótico Nikon Eclipse E200. Foram analisadas 100 células por amostra (50 de cada lâmina em duplicata), sendo essas classificadas visualmente em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda: sem danos, classe 0, até dano máximo, classe 4 (Figura 6). Uma vez obtidos os dados, foi calculado o índice de danos multiplicando-se o número de células observadas em cada classe de dano pelo seu nível de dano, que pode variar entre 0 (100 células observadas da classe 0) e 400 (100 células observadas da classe 4).

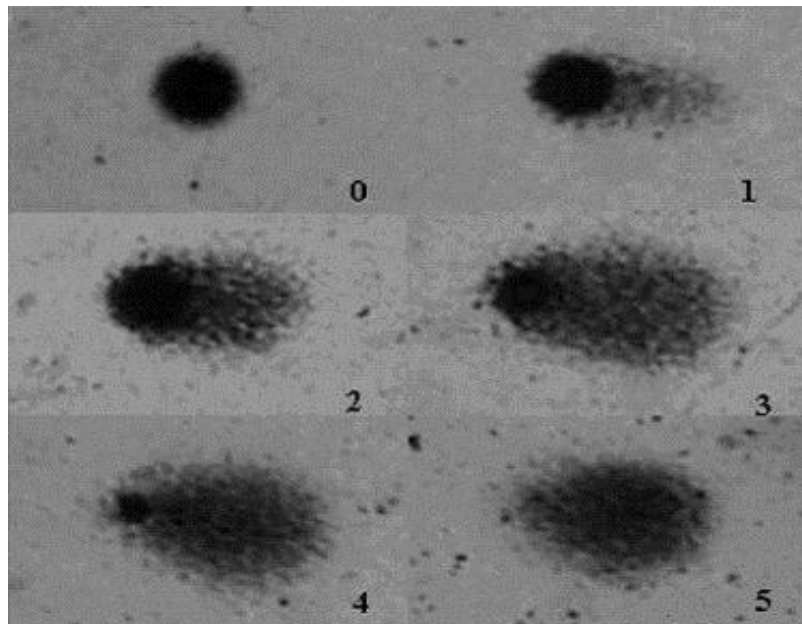


Figura 6: Classificação visual do índice de dano do ensaio cometa. (0) Dano 0; (1) Dano 1; (2) Dano 2; (3) Dano 3; (4) Dano 4. Modificado de (Santos, M. C. *et al.*, 2004).

### 3.2.3 Ensaio Cometa para Detecção de Lesões Oxidativas

Para a avaliação dos danos oxidativos presentes no DNA, foi utilizada uma versão modificada do teste cometa com uso de enzimas específicas de reconhecimento de danos oxidativos, a formamidopirimidina DNA-glicosilase (Fpg) e endonuclease III (Endo III). Após a lise celular, conforme descrito no cometa alcalino (Item 3.2.1), as lâminas foram lavadas três vezes com solução tampão [40 mM HEPES (Sigma-Aldrich do Brasil LTDA, São Paulo), 100 mM KCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), albumina sérica bovina, pH 8.0 (Sigma-Aldrich do Brasil LTDA, São Paulo)] e incubadas com 60 µL de Fpg (New England Biolabs, Ipswich, EUA) para detecção de purinas oxidadas, por 30 minutos e Endo III (New England Biolabs, Ipswich, EUA), para detecção de pirimidinas oxidadas, por 45 minutos (Miorelli et al, 2007; Da Costa Medina et al, 2008), ambas a 37°C. Após a incubação com as enzimas as lâminas foram imersas na solução de eletroforese, seguindo-se os mesmos procedimentos do teste cometa versão alcalina não modificada, conforme descrito acima.

## 3.3 Biomarcadores de Efeito

### 3.3.1 Peroxidação Lipídica

Estresse oxidativo no ambiente celular resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos altamente instáveis. A decomposição de peróxidos instáveis derivada de ácidos graxos poli-insaturados resulta na formação de malondialdeído (MDA), que pode, por sua vez, ser quantificado colorimetricamente através de sua reação com o ácido tiobarbitúrico (Yagi, K., 1998).

O teste foi realizado de acordo com Salgo e Pryor (1996), com algumas modificações. As amostras de plasma foram incubadas previamente em banho-maria, a 37°C por 1h. Após esse período, foi transferido um total de 205 µL de plasma e

adicionado 1 mL de ácido tricloroacético 5% (Sigma-Aldrich do Brasil LTDA, São Paulo). A mistura foi centrifugada a 3000rpm em uma centrífuga Sorvall Legend Mach 1.6R por 10 minutos e teve o sobrenadante descartado. Ao precipitado foi adicionado 1mL de ácido sulfúrico (Synth, Labsynth Produtos para Lab. LTDA, São Paulo) e 1mL de reagente de cor [ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich do Brasil LTDA, São Paulo), sulfato de sódio e bicarbonato de sódio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)] e incubado novamente em banho-maria a 90°C, por quinze minutos. Depois de esfriar à temperatura ambiente, foi acrescentado álcool n-butílico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Então o sobrenadante foi transferido para cubeta e teve sua absorbância lida no comprimento de onda de 530 nm num espectrofotômetro Femto 600 PLUS. O resultado foi normalizado conforme o conteúdo de proteínas totais da amostra, obtido com o kit Labtest Proteínas Totais, conforme indicações do fabricante (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais).

### 3.3.2 Proteínas carboniladas

O procedimento para análise da carbonilação proteica foi realizado conforme descrito por Levine e colaboradores em 1990, com algumas modificações (Levine, R. L. *et al.*, 1990). As amostras tiveram o conteúdo de proteínas totais aferido e foram diluídas (quando necessário), e foi separada uma alíquota de 1mg/mL. Logo em seguida, foi acrescentado ácido tricloroacético (TCA) 20% (Sigma-Aldrich do Brasil LTDA, São Paulo) na proporção de 1:1 com a amostra e homogeneizado em vórtex por 10s (Quimis Aparelhos Científicos, São Paulo). Após uma pausa de 15 minutos, o conteúdo foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos (centrífuga Sorvall Legend Mach 1.6R) e teve o sobrenadante descartado. Então adicionou-se ao precipitado 500 µL de dinitrofenilhidrazina (DNPH, Sigma-Aldrich do Brasil LTDA, São Paulo) e a solução ficou em repouso abrigada da luz por 1 hora. Logo após acrescentou-se 500µL de TCA 20% e centrifugou-se novamente a 4000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol:acetato de etila (1:1) (Synth, Labsynth Materiais para Laboratório, São Paulo) e deixado em repouso por 10 min. Após o período de repouso, a mistura foi novamente centrifugada a 4000 rpm/8min e

teve o sobrenadante descartado. O processo de lavagem foi repetido mais duas vezes. Depois do descarte final do sobrenadante, o precipitado foi incubado com solução de guanidina 6M (Synth, Labsynth Materiais para Laboratório, São Paulo) e fosfato de potássio monobásico 20mM (pH 2,3; Synth, Labsynth Materiais para Laboratório, São Paulo) por 15 min 37°C. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min e a absorbância da amostra foi lida em espectrofotômetro Femto 600 PLUS, a 365 nm.

### 3.3.3 Micronúcleos da Mucosa Oral

A técnica de micronúcleos consiste na identificação do aumento na frequência de mutação em células. O micronúcleo é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado durante a divisão celular por cromossomos ou fragmentos destes que atrasam-se em relação aos demais. Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentalmente induzidas, ou ainda, de falhas no fuso celular, sendo excluído do novo núcleo, formado na telófase. Pode-se utilizar diversas abordagens para a observação desse fenômeno, dentre as quais se destaca a abordagem mais tradicional, que envolve a cultura de células de sangue periférico seguida do bloqueio da citocinese (Fenech, M., 1993) e a utilização de um esfoliado de células da mucosa oral (Thomas, P. *et al.*, 2009), método rápido e não invasivo escolhido para este trabalho.

As células da mucosa foram coletadas com o auxílio de uma escova citológica e armazenadas no tampão de mucosa oral [1,6g Tris-HCl (Invitrogen, Burlington, Canadá), 1,2g EDTA e 37,2g de cloreto de sódio em um litro, pH 7 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)] e centrifugado a 581g por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado, deixando-se 1 mL da suspensão celular, adicionando-se 5 mL de tampão de mucosa oral. O processo de lavagem foi repetido quantas vezes necessárias para obter melhores resultados. O material foi então aspirado com o auxílio de uma seringa com agulha para facilitar a desagregação das células, centrifugado novamente a 581g por 10 minutos e eliminou-se o sobrenadante, adicionando-se a seguir 1mL de tampão à solução. Esse material foi fixado com uma mistura de etanol:ácido acético

glacial (Synth, Labsynth Materiais para Laboratório, São Paulo), na proporção de 3:1. Dessa suspensão retirou-se 120-150µL que foram pingados em lâminas de microscopia, secas à temperatura ambiente. Depois de secas, as lâminas foram coradas conforme a técnica de Feulgen [hidrólise em ácido clorídrico 1 M (Synth, Labsynth Materiais para Laboratório, São Paulo), seguido de coloração com o reativo de Schiff (Sigma-Aldrich do Brasil LTDA, São Paulo)]. Foram analisadas 2000 células diferenciadas, que foram analisadas conforme a presença de micronúcleos.

### **3.4 Biomarcadores de Suscetibilidade:**

#### **3.4.1 Detecção dos Genótipos por PCR/ RFLP.**

Os sistemas polimórficos foram analisados pela técnica de PCR/RFLP. Os *primers* específicos, condições da reação de PCR, bem como as enzimas de restrição específicas, foram utilizadas com base na literatura citada na Tabela 1.



**Tabela 1:** Vias, genes e respectivos polimorfismos, *primers* estudados neste trabalho.

Via de Metabolismo	Gene	Polimorfismo (denominações)	Primers		Referência
			Direto	Reverso	
Fase I	<i>CYP1A1</i>	<i>C2453A</i>			
		<i>Thr461Asp</i>	GGCTGAACCTT	GAAGTGCCACTTCA	(Cascorbi, I. <i>et al.</i> , 1996)
		<i>CYP1A1*4</i>	AGACCACATA	GCTGTCT	
		<i>rs1799814</i>	CCA GTC	GAG	
Fase II	<i>CYP2E1</i>	<i>C-1053T</i>	TCT ACA TTG	CCCTCTTCCACCTT	(Colombo, J. <i>et al.</i> , 2004)
		<i>rs2031920</i>	TCA	CTAT GAA	
		<i>GSTM1</i>	<i>Presença/ausência</i>	GAAGCTAAGC	
Neutralização de ERO	<i>GSTP1</i>	<i>Presença/ausência</i>	TTCCTTACTGGTTCACCGGATCAGGC	CAGCA	(Colombo, J. <i>et al.</i> , 2004)
		<i>Ile105Val</i>	ACCCCAGGGCTC	TGAGGGCACAAGA	(Antognelli, C. <i>et al.</i> , 2009)
		<i>rs1695</i>	TATGGGAA	AGCCCCT	
Neutralização de ERO	<i>GPX1</i>	<i>Pro198Leu</i>	CTGTCTCAAGG	CTGTCTCAAGGGCT	(Suzen, H. S. <i>et al.</i> , 2010)
		<i>rs1050450</i>	GCCCAGCTGTGC	CAGCTGTGCCT	
Neutralização de ERO	<i>CAT1</i>	<i>C-262T</i>	GGCCTGAAGGA	CTCTGGCCCAGCAA	(Suzen, H. S. <i>et al.</i> , 2010)
		<i>rs1001179</i>	TGCTGATAACC	TTGGA	

A genotipagem dos fragmentos resultantes foi feita através de eletroforese em gel de agarose em concentrações apropriadas para cada fragmento, corado com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. Todos os reagentes utilizados para a reação de PCR eram da marca Fermentas (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Canadá). As reações foram conduzidas no termociclador PCR Express Thermo Hybaid (Thermo Scientific, Canadá).

### 3.5 Análise de Dados e Procedimentos Estatísticos

Os dados coletados foram analisados com o auxílio do pacote estatístico SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e GraphPad Prism versão 5.01 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Os resultados serão apresentados de forma descritiva representadas por média aritmética com seu respectivo desvio padrão ( $\bar{x} \pm dp$ ) ou expressos em frequência. Outras análises estatísticas serão realizadas, para avaliar as variáveis categóricas (Qui-quadrado), para comparação entre os grupos (*U de Mann-Whitney* e *Kruskall-Wallis*), para demonstrar a associação entre as variáveis quantitativas e informar a fração da variabilidade de uma característica em relação a outra (coeficiente de correlação de *Spearman*), para determinar a causa-efeito entre variáveis quantitativas (Regressão Logística Bivariada) Para todos os testes assume-se um risco  $\alpha < 5\%$  ( $p < 0,005$ ) e seu respectivo Intervalo de Confiança de 95% (IC 95%).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Perfil da População: Dados Demográficos, Clínicos e Hábitos Tabágicos:

A amostragem populacional foi concebida com o objetivo de emparelhar o grupo controle e o grupo de pacientes acometidos pela DPOC. Idade, sexo, etnia e IMC apresentaram consistência entre os dois grupos (Tabela 2). Quando os dados demográficos foram submetidos a uma regressão logística bivariada para correção de variáveis de confusão, observou-se que o sexo e etnia não apresentaram relevância estatística associada ao desenvolvimento da doença, mas que a idade parece ser um fator que acrescenta uma pequena probabilidade de contrair DPOC ( $P=0,02$ ; IC 95%=1,10 [1,01 – 1,20]).

Contudo, existem diferenças marcantes (e estatisticamente significantes) entre os hábitos tabágicos de ambos os grupos: uma porção superior dos pacientes fuma atualmente ou já fumou (84% dos pacientes contra 54% dos controles), por períodos superiores de tempo (59% fumou por períodos superiores a 30 anos contra 10% dos controles) e em maior quantidade ( $27,16 \pm 16,63$  contra  $13,96 \pm 10,9$  cigarros por dia). Corroborando este achado, foram encontradas correlações entre o hábito de fumar (estatus tabágico) com o desfecho DPOC ( $r^2=0,406$ ;  $P \leq 0,001$ ) e nos pacientes, o hábito tabágico correlacionou-se com sexo masculino ( $r^2=0,305$ ;  $P=0,043$ ) e este com uma quantidade maior de cigarros fumados ( $r^2=0,420$ ;  $P=0,004$ ). E, embora o tabagismo em si não se apresente como um fator de risco [ $P=0,72$ ; IC 95% 1,42 (0,21 – 9,62)], a quantidade de cigarros fumados [ $P=0,01$ ; IC 95% 1,11 (1,02 - 1,20)] e o tempo de tabagismo [ $P=0,04$ ; IC 95% 1,06 (1,00-1,21)] contribuem com uma probabilidade discreta para o desenvolvimento da doença.

A duração do tabagismo correlacionou-se não só com a presença de DPOC ( $r^2=0,332$ ;  $P=0,010$ ), mas também com a quantidade de cigarros fumados por dia em controles ( $r^2=0,473$ ;  $P=0,048$ ) e em pacientes ( $r^2=0,313$ ;  $P=0,043$ ).

Assim como o hábito de fumar e o tempo de tabagismo, a quantidade de cigarros fumada parece apresentar uma relação ainda mais estreita com a

presença de DPOC ( $r^2= 0,406$ ;  $P\leq 0,001$ ). Como esperado, a quantidade de cigarros fumados também se relaciona com o decréscimo das funções pulmonares ( $VEF_1:r^2= -0,595$ ;  $P=0,009$ ;  $CVF: r^2= -0,495$ ;  $P=0,037$ ).

**Tabela 2:** Características demográficas, história tabágica e OR para o desenvolvimento de DPOC.

Características	Controle (n=48)	DPOC (n=51)	P	OR (IC 95%)
<b>Idade (anos)</b>	63,35±9,37	65,33±8,91	<b>0,02</b>	1,10 (1,01 - 1,20)
<b>Sexo</b>				
Masculino	25	30	0,81	0,84 (0,20 - 3,63)
Feminino	23	21		Referência
<b>Etnia</b>				
Euro-descendente	47	45		Referência
Afro-descendente	1	6	0,12	0,06 (0,00 - 2,04)
<b>IMC (kg/m2)</b>	26,51 ± 3,73	25,75 ± 5,72	-	-
<b>Status Tabagismo*</b>				
Não-fumante	22	8		Referência
Fuma/Ex-fumante	3/23	12/31* <sup>1</sup>	0,72	1,42 (0,21 - 9,62)
<b>Duração Tabagismo</b>	5	30* <sup>2</sup>	<b>0,04</b>	1,06 (1,00-1,21)
<b>Cigarros/dia</b>	13,96±10,9	27,6±16,63* <sup>3</sup>	<b>0,01</b>	1,11 (1,02 - 1,20)

Dados apresentados em média±desvio padrão \*<sup>1</sup> $P=0,004$ ; \*<sup>2</sup> $P=0,006$ ; \*<sup>3</sup> $P=0,001$  (Mann-Whitney). OR e IC: Regressão Logística Bivariada.

Na Tabela 3, são apresentados os dados de função pulmonar. Na legenda da tabela encontram-se os resultados da análise das diferenças entre os dois grupos (*U de Mann-Whitney*), enquanto nas colunas *P* e *OR* encontram-se os resultados da regressão logística bivariada, aplicada para averiguar a possibilidade das variáveis acrescentarem alguma probabilidade do desenvolvimento da DPOC.

Conforme esperado, os pacientes apresentam aproximadamente a metade da média de  $VEF_1$  dos controles de função pulmonar normal. A mesma tendência está presente nos valores de  $CVF$  e, conseqüentemente na relação  $VEF_1/CVF$  (Índice de Tiffeneau), em torno de 68 e 71% menores, respectivamente. Todos os parâmetros de função pulmonar apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos

( $P < 0,001$ ). Nos casos, existe uma correlação discreta entre o declínio da CVF e a idade ( $r^2 = -0,284$ ;  $P = 0,043$ ).

Em relação ao estadiamento da doença (Tabela 3) 16% (8 indivíduos) dos casos está na fase inicial da doença (Leve), 31% apresentam-se na fase Moderada e Severa (16 indivíduos) e 22% estão na classe mais grave, intitulada Muito Severa.

Uma minoria entre os dois grupos apresentou doenças respiratórias na infância, 10 indivíduos nos controles e 12 nos portadores. Assim como o acometimento por doenças respiratórias na infância, o número de pessoas que apresentam comorbidades foi bastante semelhante nos dois grupos.

O uso de anti-hipertensivos foi bastante semelhante entre os dois grupos. Aparentemente existe uma discreta correlação de sua utilização com a idade nos controles ( $r^2 = 0,311$ ;  $P = 0,032$ ) e com seu IMC ( $r^2 = 0,295$ ;  $P = 0,032$ ).

**Tabela 3:** Função Pulmonar e História Clínica dos Sujeitos.

	Controle (n=48)	DPOC (n=51)
VEF <sub>1</sub> (% predito)	86±11,59	42,90±19,03*
CVF (%predito)	90,81±14,02	62,20±18,28*
VEF <sub>1</sub> /CVF(%predito)	95,58±11,53	68±19,65*
Tempo de Doença (anos)	-	7,25±7,75
Estadiamento da Doença <sup>#</sup>	-	8/16/16/11
Doença Respiratória na Infância (sim/não)	10/38	12/39
Comorbidades (sim/não)	36/12	36/15
HAS	27	21
Cardiopatia	2	9
Outras	8	15
Uso Anti-Hipertensivo (sim/não)	25/23	27/24

VEF<sub>1</sub>, CVF, VEF<sub>1</sub>/CVF e Tempo de Doença apresentados como média±desvio padrão, os demais dados são apresentados como números absolutos de representantes de cada classe; VEF<sub>1</sub>: Volume Expiratório Forçado em 1 s; CVF: Capacidade Vital Forçada; <sup>#</sup>Leve/Moderado/Severo/Muito Severo (GOLD, 2009); \* $P < 0,001$  (Mann-Whitney).

A distribuição do uso das terapias mais utilizadas na DPOC pode ser vista na Tabela 4. O uso de corticosteroides pelos pacientes se distribui de forma bastante homogênea e, embora exista um número um pouco maior de indivíduos de classificação muito severa usuários dessa terapia, essa diferença não é relevante

estatisticamente. A utilização de oxigenoterapia para correção de hipoxemia ocorre a partir dos casos DPOC Moderada, sendo utilizada em todos os estádios em proporções muito semelhantes.

**Tabela 4:** Distribuição do uso de corticosteroides conforme estadiamento da DPOC.

	<b>Leve (n=8)</b>	<b>Moderada (n=16)</b>	<b>Severa (n=16)</b>	<b>Muito Severa (n=11)</b>
Corticosteroides	6	7	6	9
Oxigenoterapia	0	4	3	5

Dados apresentados como número absoluto de representantes de cada classe.

## 4.2 Biomarcadores de Susceptibilidade.

### 4.2.1 Análise das Frequências de Polimorfismos de Genes de Enzimas de Metabolismo da Fase I, II e Antioxidantes.

As frequências gênicas e genotípicas obtidas por PCR-RFLP para controles e pacientes encontram-se na Tabela 5. Não foi observada nenhuma diferença estatística entre as distribuições gênicas e genotípicas entre os grupos. Todos os polimorfismos encontram-se em conformidade com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto *GPx1 Pro198Leu* no grupo controle, que apresenta um favorecimento do número dos heterozigotos em detrimento de ambas as classes de homozigotos.

**Tabela 5:** Frequências gênicas e genotípicas dos grupos estudados.

Função	Genótipos	Controles (%) n=48	DPOC (%) n=51	População Total n=99
Enzimas da Fase I	<b><i>CYP1A1 C2453A</i></b>			
	C/C	43 (90)	38 (74,51)	81 (81,81)
	C/A	5 (10)	12 (23,53)	17 (17,17)
	A/A	-	1 (1,96)	1 (1,01)
	<b><i>CYP1A1 4887A</i></b>	<b>5,21</b>	<b>13,73</b>	<b>9,6</b>
	<b><i>CYP2E1 A-1053G</i></b>			
	A/A	42 (87,5)	46 (90,2)	88 (88,89)
	A/G	6(12,5)	5 (9,8)	11 (11,11)
	G/G	-	-	-
	<b><i>CYP2E1 -1053G</i></b>	<b>6,25</b>	<b>4,90</b>	<b>5,6</b>
Enzimas da Fase II	<b><i>GSTM1 Nulo</i></b>			
	Presente	21(43,75)	31(60,78)	52 (52,53)
	Ausente	27(56,25)	20(39,22)	47 (47,47)
	<b><i>GSTM1 Nulo</i></b>	<b>56,25</b>	<b>39,2</b>	<b>47</b>
	<b><i>GSTT1 Nulo</i></b>			
	Presente	38(79,17)	36(70,59)	74 (74,75)
	Ausente	10(20,83)	15(29,41)	25 (25,25)
	<b><i>GSTT1 Nulo</i></b>	<b>20,83</b>	<b>29,41</b>	<b>25</b>
	<b><i>GSTP1 Ile105Val</i></b>			
	Ile/Ile	19(39,58)	26(50,98)	45 (45,45)
Ile/Val	21(43,75)	22(43,14)	43 (43,43)	
Val/Val	8(16,67)	3(5,88)	11 (11,11)	

Função	Genótipos	Controles (%) n=48	DPOC (%) n=51	População Total n=99
	<b><i>GSTP1 105Val</i></b>	<b>38,54</b>	<b>27,45</b>	<b>30,45</b>
	<b><i>CAT C-262T</i></b>			
	C/C	34(70,83)	26(50,98)	60 (60,61)
	C/T	11(22,92)	21(41,18)	32 (32,32)
	T/T	3(6,25)	4 (7,84)	7 (7,07)
<b>Defesa</b>	<b><i>CAT -262T</i></b>	<b>17,71</b>	<b>28,43</b>	<b>23,23</b>
<b>Antioxidante</b>	<b><i>GPx1 Pro198Leu</i></b>			
	Pro/Pro	5(10,42)*	10(19,61)	15 (15,15)
	Pro/Leu	32(66,67)*	28(54,90)	60 (60,61)
	Leu/Leu	11(22,92)*	13(25,49)	24 (24,24)
	<b><i>GPx1 198Leu</i></b>	<b>56,25</b>	<b>52,94</b>	<b>54,55</b>

\* Não está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Quando as frequências obtidas na população investigada foram confrontadas com os polimorfismos obtidos em outros estudos (Tabela 6), pôde-se observar que existe uma coerência das distribuições na maioria dos casos. Entretanto, na mesma tabela também pode-se observar certas discrepâncias. A frequência de 0,137 de *CYP1A1 2453A* (o alelo variante) dentre os pacientes difere ( $P=0,001$ ) de todas outras populações estudadas cujas frequências giram em torno de 0,5-0,6. Não obstante, embora existam, as diferenças entre os acometidos pela doença e controles não são significativas ( $P=0,076$ ).

Quando consideramos o *GSTT1 null*, as diferenças residem unicamente entre a população de pacientes com DPOC deste trabalho (freq. 0,29) e os pacientes de DPOC avaliados no trabalho de Gaspar *et al.* (2004), cuja frequência totalizava 0,40. Esta frequência encontrada por ele também foi diferente da população controle de seu trabalho, que era 0,21.

Em *GSTP1 Ile105Val* a ocorrência do alelo variante é superior nos controles caucasianos às populações caucasianas da região relatadas em outros levantamentos: 0,385 contra 0,28 – 0,3. Ainda assim, quando são agrupados casos e controles obtêm-se uma frequência de 0,304, e a significância estatística da diferença entre as diferentes populações revisadas se desfaz.



O caso das diferenças mais marcantes entre os valores que foram obtidos e os de outras investigações é o do polimorfismo *GPx1 Pro198Leu*. A ocorrência do alelo variante foi mais comum entre os controles e pacientes (0,562 e 0,529, respectivamente) do que nos estudos revisados (0,32 – 0,33).

**Tabela 6:** comparação entre frequências gênicas de diferentes trabalhos.

Gene	Polimorfismo	População Estudada	Freq. (%)	Referência
<i>CYP1A1</i>	<i>C2453A</i>	Brasileiros cauc.	5	(Amorim, L. M. F. <i>et al.</i> , 2004)
		Caucasianos (Austrália)	5,8	(Wright, C. M. <i>et al.</i> , 2010)
		<b>Euro-brasileiros</b>	<b>5,21</b>	<b>Presente trabalho</b>
		<b>DPOC</b>	<b>13,73*1</b>	<b>Presente trabalho</b>
<i>CYP2E1</i>	<i>C-1053T</i>	Euro-brasileiros (Serra Gaúcha)	3,11	(Da Silva, J. <i>et al.</i> , 2008)
		Brasileiros pred. cauc. (S. Paulo)	5,5	(Nishimoto, I. N. <i>et al.</i> , 2000)
		<b>Euro-brasileiros</b>	<b>6,25</b>	<b>Presente trabalho</b>
		<b>DPOC</b>	<b>4,90</b>	<b>Presente trabalho</b>
<i>GSTM1</i>	<i>Genótipo nulo</i>	Euro-brasileiros (Porto Alegre)	50	(Gaspar, P. <i>et al.</i> , 2004)
		Euro-brasileiros (Serra Gaúcha)	49,70	
		DPOC (brasileiros)	37,3	(Gaspar, P. <i>et al.</i> , 2004)
		<b>Euro-brasileiros</b>	<b>56,25</b>	<b>Presente trabalho</b>
<i>GSTT1</i>	<i>Genótipo nulo</i>	<b>DPOC</b>	<b>39,2</b>	<b>Presente trabalho</b>
		<b>Pop. total</b>	<b>47</b>	<b>Presente trabalho</b>
		Euro-brasileiros	21,1	(Gaspar, P. <i>et al.</i> , 2004)
		Euro-brasileiros (Serra Gaúcha)	22,98	
<i>GSTP1</i>	<i>Ile105Val</i>	DPOC (brasileiros)	40	(Gaspar, P. <i>et al.</i> , 2004)
		<b>Euro-brasileiros</b>	<b>20,83</b>	<b>Presente trabalho</b>
		<b>DPOC</b>	<b>29,41*2</b>	<b>Presente trabalho</b>
		<b>Pop. total</b>	<b>25</b>	<b>Presente trabalho</b>
<i>CAT</i>	<i>C-262T</i>	Euro-brasileiros	27,8	(Gaspar, P. <i>et al.</i> , 2004)
		Euro-brasileiros	26,32	(Da Silva, J. <i>et al.</i> , 2008)
		DPOC (brasileiros)	30	(Gaspar, P. <i>et al.</i> , 2004)
		<b>Euro-brasileiros</b>	<b>38,54*3</b>	<b>Presente trabalho</b>
<i>GPx1</i>	<i>Pro198Leu</i>	<b>DPOC</b>	<b>27,45</b>	<b>Presente trabalho</b>
		<b>Pop. total</b>	<b>30,45</b>	<b>Presente trabalho</b>
		Franceses	23,21	(Nadif, R. <i>et al.</i> , 2005)
		Americanos (cauc.)	22,34	(Lightfoot, T. <i>et al.</i> , 2006)
		<b>Euro-brasileiros</b>	<b>17,71</b>	<b>Presente trabalho</b>
		<b>DPOC</b>	<b>28,43</b>	<b>Presente trabalho</b>
		<b>Pop. total</b>	<b>23,23</b>	<b>Presente trabalho</b>
		Brasileiros	33	(De Oliveira Hiragi, C. <i>et</i>

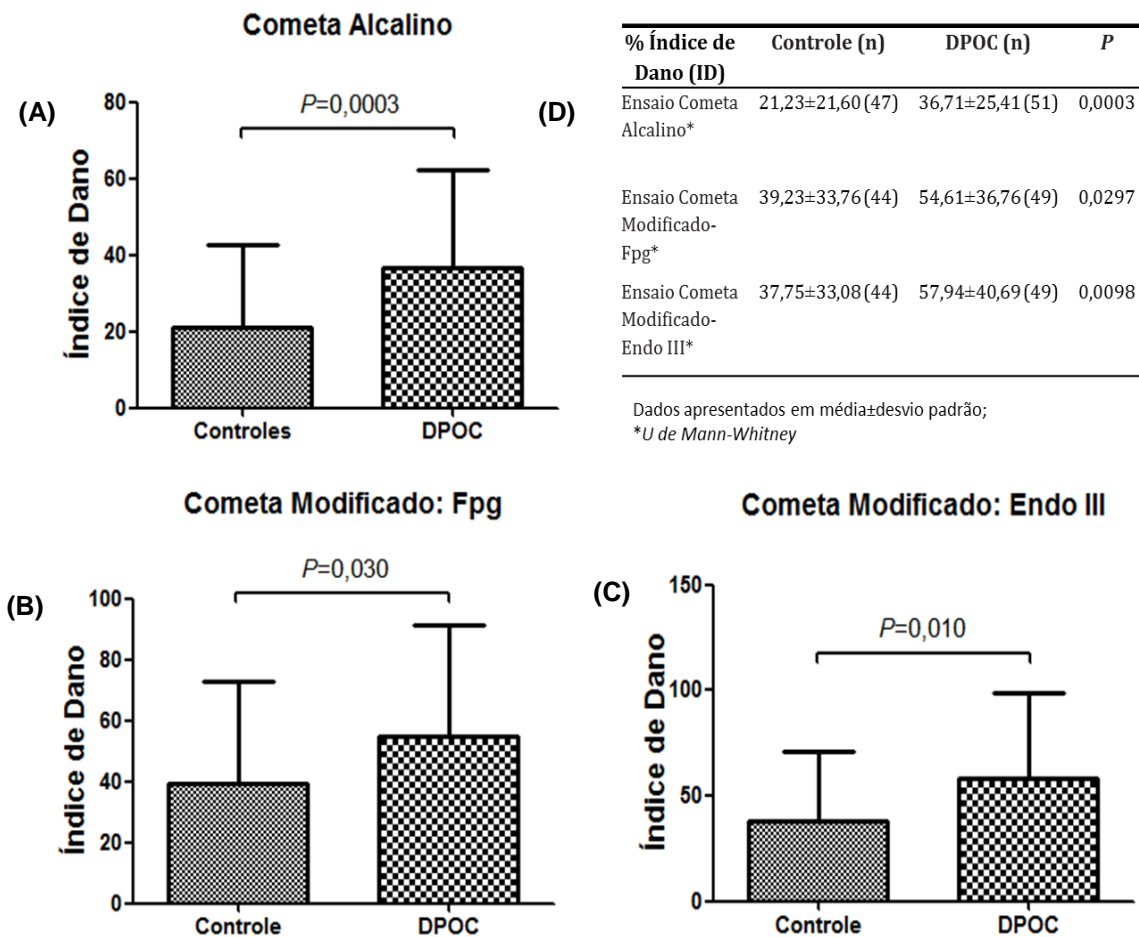
Gene	Polimorfismo	População Estudada	Freq. (%)	Referência
		Brasileiros (etnias mistas)	32	<i>al.</i> , 2011) (Miranda-Vilela, A. L. <i>et al.</i> , 2010)
		<b>Euro-brasileiros</b>	<b>56,25*<sup>4</sup></b>	<b>Presente trabalho</b>
		<b>DPOC</b>	<b>52,94*<sup>4</sup></b>	<b>Presente trabalho</b>
		<b>Pop. total</b>	<b>54,55</b>	<b>Presente trabalho</b>

\*diferencia-se das populações citadas ( $P=0,002$ ). \*<sup>2</sup>  $P= 0,001$  entre o grupo DPOC deste grupo e do trabalho de Gaspar e cols. (2004). \*<sup>3</sup> $P=0,005$  entre as todas as populações citadas. \*<sup>4</sup> $P<0,001$  entre as todas as populações citadas.

### 4.3 Biomarcadores de Efeito:

#### 4.3.1 Índices de Dano do Ensaio Cometa.

Da amostragem total de 51 indivíduos do grupo controle, 4 foram excluídos por apresentarem incongruências em relação ao resto dos sujeitos, contra 51 indivíduos portadores de DPOC. Nas modalidades de cometa modificado, totalizaram-se 44 pacientes do grupo controle e 49 pacientes de DPOC devido a razões metodológicas. Em todas as modalidades de ensaio cometa os pacientes apresentaram índices de dano superiores aos controles (Figura 7).



**Figura 7:** Comparação dos Índices de Dano do ensaio cometa de controles e pacientes com DPOC (U de Mann-Whitney). (A) Ensaio cometa alcalino; (B) Ensaio cometa modificado com Fpg; (C) Ensaio cometa modificado com Endo III; (D) Média dos índices de dano das diferentes modalidades de cometa.

Não foi evidente nenhuma diferença significativa nos índices de dano (ID) quando a amostra foi estratificada por fumo, quantidade de cigarros por dia, gênero, uso de terapia baseada em corticosteroides ou anti-hipertensivos e estadiamento da DPOC (dados não apresentados).

Ainda assim, o ID do cometa alcalino apresentou correlação negativa nos pacientes com o  $VEF_1$  ( $r^2=-0,386$   $P=0,005$ ). A relação da perda de função pulmonar e aumento dos índices de dano parecem ainda mais amplas: o ID alcalino correlaciona-se negativamente com o  $VEF_1$  ( $r^2= -0,386$ ,  $P=0,005$ ), ambos os ID do cometa modificado com FPG e Endo III correlacionam-se com a CVF ( $r^2= -0,321$ ,  $P=0,021$ ;  $r^2=-0.292$ ,  $P=0,042$ , respectivamente).

Nos controles, os dados de correlação indicaram que, à medida que os controles perdem sua saúde respiratória como um todo (Índice de Tiffeneau), seu índices de dano oxidativo aumentam (Fpg:  $r^2= -0,396$ ,  $P=0,005$ ; Endo III:  $r^2= -0,485$ ,  $P=0,001$ ).

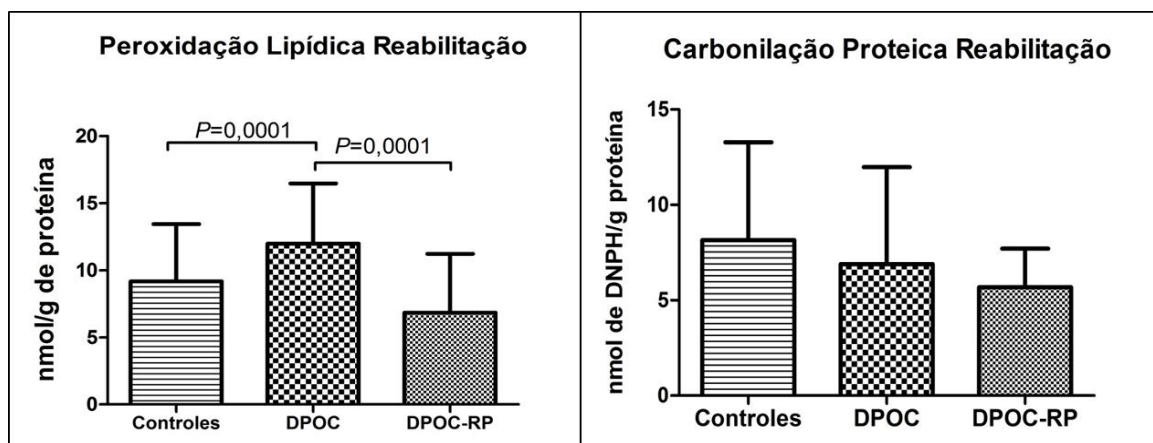
### 4.3.2 Peroxidação Lipídica e Carbonilação Proteica.

Em um primeiro momento, quando os marcadores de peroxidação lipídica (TBARS) e carbonilação proteica (DNPH) foram analisados, não foram encontradas diferenças entre seus níveis nos controles e pacientes. Entretanto, quando o grupo dos pacientes foi estratificado em portadores de DPOC que praticam exercícios físicos submáximos regularmente (DPOC RP) ou não (DPOC) junto aos programas de reabilitação pulmonar por um período superior a oito semanas, fica claro que esses indivíduos gozam de uma diminuição em ambos os parâmetros (vide Tabela 7 e Figura 8), embora somente para o marcador de peroxidação lipídica essa diferença é significativa estatisticamente ( $P=0,0001$ ).

**Tabela 7:** Biomarcadores de Peroxidação Lipídica (TBARS) e Carbonilação Proteica (DNPH)\*.

Biomarcadores	Controle (n=50)	DPOC (n=34)	DPOC RP (n=15)	P
Peroxidação Lipídica	9,17±4,27	11,99±4,48	6,84±4,38	<b>0,0001</b>
Carbonilação Proteica	8,15±5,13	6,89±5,08	5,68±2,03	0,3315

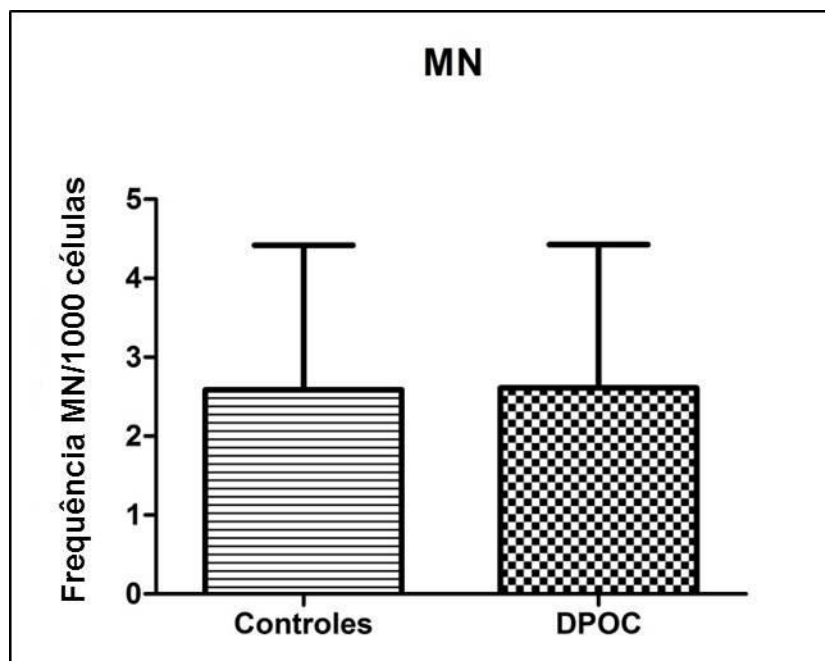
\*Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Valor de P obtido pelo Teste *Kruskal-Wallis*



**Figura 8:** Representação gráfica da avaliação dos biomarcadores de carbonilação proteica e peroxidação lipídica.

### 4.3.3 Micronúcleos de Mucosa Oral

A investigação dos micronúcleos em esfoliado de mucosa oral totalizou 98 indivíduos dos 102 participantes do estudo, dos quais 51 eram do grupo controle e 47 dos pacientes de DPOC. A ocorrência de micronúcleos foi extremamente semelhante em ambas as classes, com a média da frequência (MN/1000 células) de  $2,58 \pm 1,83$  para os controles de função pulmonar preservada e de  $2,61 \pm 1,82$  para os pacientes de DPOC, conforme demonstrado na primeira linha da Tabela 15 e na Figura 9.



**Figura 9:** Frequência de micronúcleos a cada 1000 células de esfoliado bucal em controles e pacientes com DPOC.

#### **4.4 Investigação da Influência dos Biomarcadores de Susceptibilidade com Biomarcadores de Exposição e Efeito.**

##### **4.4.1 Polimorfismos e Ensaio Cometa**

Os indivíduos foram estratificados conforme seus genótipos e classes (controles ou DPOC) e foram comparados com base nos índices de dano dos ensaios cometa.

Os genótipos foram agrupados conforme a presença do alelo mais raro de modo que os indivíduos foram classificados entre não portadores do alelo mais raro ou portadores de uma cópia ou mais do mesmo (modelo de influência recessiva). Os índices de dano foram comparados entre os genótipos da mesma classe e entre classes.

##### **4.4.1.1 *CYP1A1 C2453A*.**

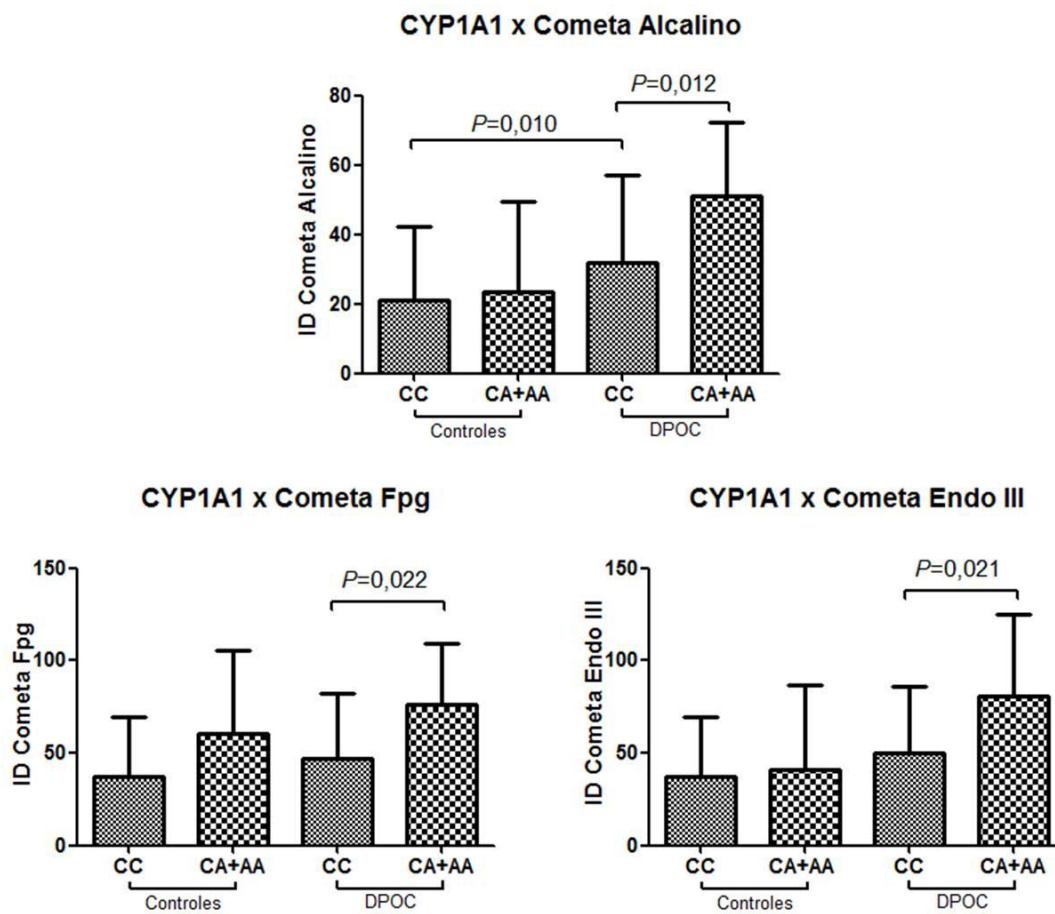
Embora as comparações entre genótipos não tenham evidenciado diferenças no grupo controle ou entre o controle e os pacientes (Tabela 8 e Figura 10), quando foram comparados os diferentes genótipos do grupo DPOC, pôde-se observar que os portadores do alelo *2453 A/-* apresentaram um aumento significativo do índice de dano dos cometas alcalino simples e modificados com Fpg e Endo III. Como esperado, existe uma correlação positiva entre o alelo menos frequente e os índices de dano dos cometas alcalino ( $r^2=0,350$ ,  $P=0,012$ ) modificado com Fpg ( $r^2=0,340$ ,  $P=0,015$ ) e Endo III ( $r^2=0,335$ ,  $P=0,019$ ).

**Tabela 8:** Análise da influência do polimorfismo *CYP1A1 C2453A* no índice de dano do ensaio cometa.

Genótipo	Índice de Dano (0 - 400)		P
	Controle (n)	DPOC (n)	
<b>Ensaio Cometa Alcalino (tot.)</b>	<b>21,23±21,6 (47)</b>	<b>36,71±25,41 (51)</b>	<b>0,000</b>
<i>CYP1A1 C/C</i>	20,98±21,38(42)	31,82±25,13 (38)	0,010
<i>CYP1A1 C/A + A/A</i>	23,40±25,95 (5)	51,00±21,13 (13)	0,061
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	<b>0,822</b>	<b>0,012</b>	
<b>Ensaio Cometa Mod, Fpg (tot.)</b>	<b>39,23±33,76 (44)</b>	<b>54,61±36,76 (49)</b>	<b>0,030</b>
<i>CYP1A1 C/C</i>	37,08±32,43(40)	46,92±35,21 (36)	0,144
<i>CYP1A1 C/A + A/A</i>	60,75±44,55 (4)	75,92±33,44 (13)	0,396
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	<b>0,307</b>	<b>0,023</b>	
<b>Ensaio Cometa Mod, Endo III (tot.)</b>	<b>37,75±33,08 (44)</b>	<b>57,94±40,69 (49)</b>	<b>0,010</b>
<i>CYP1A1 C/C</i>	37,43±32,28 (40)	49,72± 36,42 (36)	0,108
<i>CYP1A1 C/A + A/A</i>	41,00± 46,03(4)	80,69± 44,61 (13)	0,101
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	<b>0,610</b>	<b>0,021</b>	

*P<sup>a</sup>* Valor de P obtido pelo teste U de Mann-Whitney.





**Figura 10:** Representações gráficas das análises da influência do polimorfismo *CYP1A1 C2453A* no índice de dano do ensaio cometa.

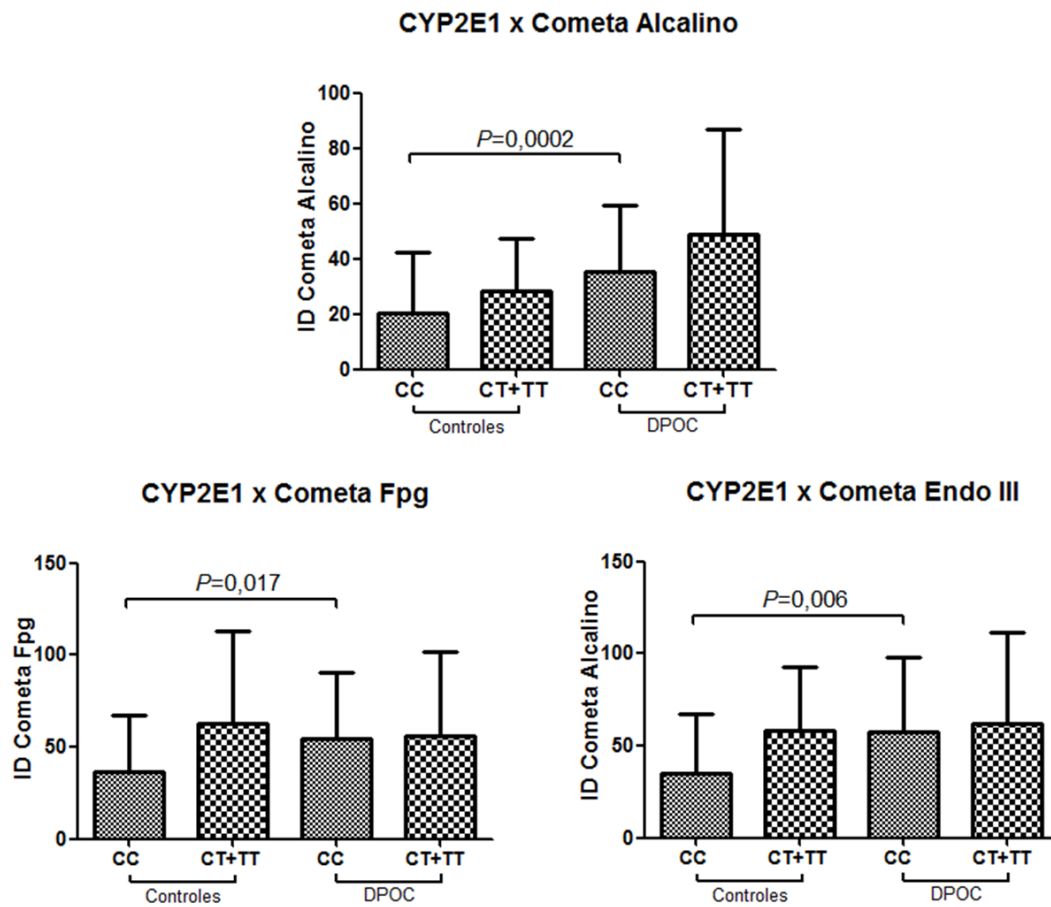
#### 4.4.1.2 CYP2E1 C-1053T.

De todas as comparações intragrupo do polimorfismo *CYP2E1 C-1053T*, não observou-se qualquer influência modulatória de diferentes genótipos dentro dos grupos. Contudo, nas comparações intergrupo, os pacientes *C/C* apresentaram uma média de índice de dano superior em todas as modalidades de cometa (Tabela 9 e Figura 11).

**Tabela 9:** Análise da influência do polimorfismo *CYP2E1 C-1053T* no índice de dano do ensaio cometa.

Genótipo	Índice de Dano (0 - 400)		P
	Controle (n)	DPOC (n)	
<b>Ensaio Cometa Alcalino (tot.)</b>	<b>21,23±21,6 (47)</b>	<b>36,71±25,41 (51)</b>	<b>0,000</b>
<i>CYP2E1 C/C</i>	20,20±21,95 (41)	35,37± 23,93 (46)	<b>0,000</b>
<i>CYP2E1 C/T + T/T</i>	28,33±19,24 (6)	49,00± 37,69 (5)	0,409
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	0,213	0,437	
<b>Ensaio Cometa Mod, Fpg (tot.)</b>	<b>39,23±33,76 (44)</b>	<b>54,61±36,76 (49)</b>	<b>0,030</b>
<i>CYP2E1 C/C</i>	36,23±30,73 (39)	54,45± 36,25 (44)	<b>0,017</b>
<i>CYP2E1 C/T + T/T</i>	62,60±50,11 (5)	56,00± 45,67 (5)	1,000
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	0,336	0,908	
<b>Ensaio Cometa Mod, Endo III (tot.)</b>	<b>37,75±33,08 (44)</b>	<b>57,94±40,69 (49)</b>	<b>0,010</b>
<i>CYP2E1 C/C</i>	35,10±32,45(39)	57,50±40,22 (44)	<b>0,006</b>
<i>CYP2E1 C/T + T/T</i>	58,40±33,98 (5)	61,80±49,58 (5)	1,000
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	0,079	0,934	

*P<sup>a</sup>* Valor de P obtido pelo teste U de Mann-Whitney.



**Figura 11:** Representações gráficas das análises da influência do polimorfismo *CYP2E1 C-1053A* no índice de dano do ensaio cometa.

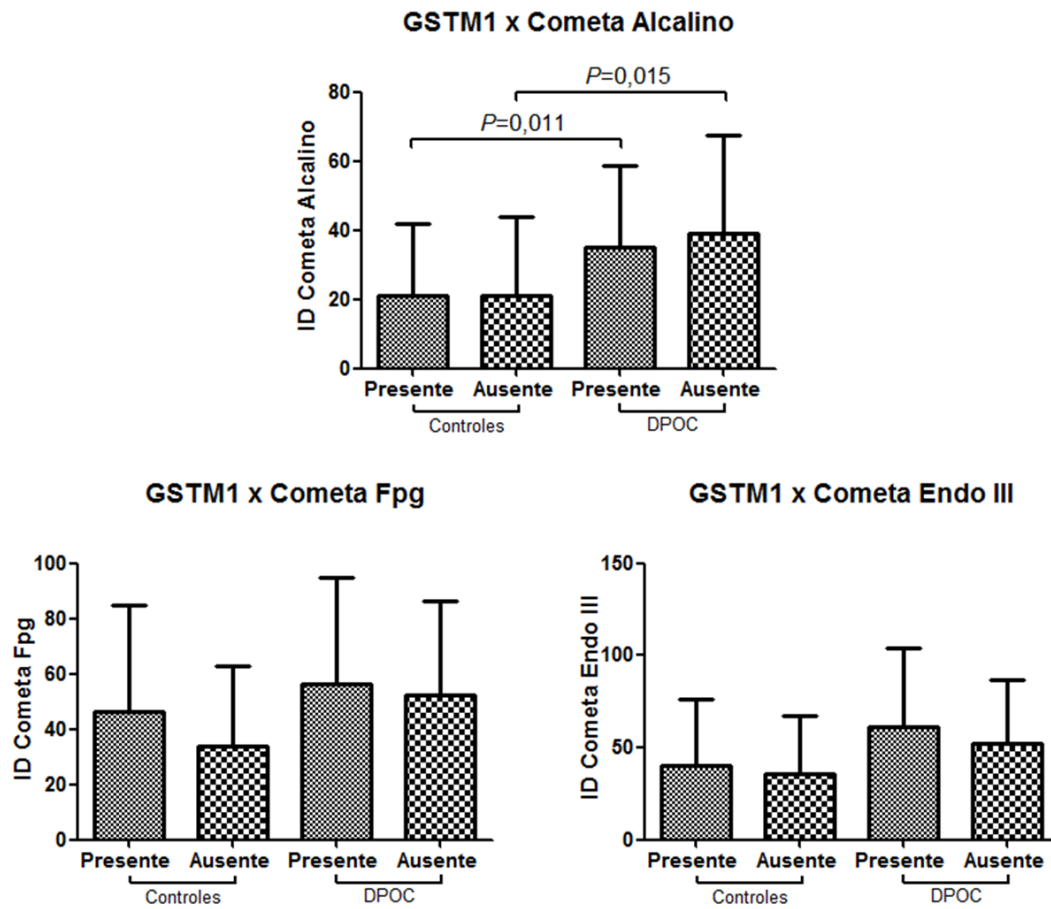
#### 4.4.1.3 *GSTM1* null.

A única diferença constatada quando a amostra foi estratificada conforme genótipos de *GSTM1*, é que tanto os pacientes portadores da deleção quanto aqueles que possuíam o gene íntegro apresentaram índices de dano do cometa alcalino superiores aos controles com os referidos genótipos (Tabela 10 e Figura 12).

**Tabela 10:** Análise da influência do polimorfismo *GSTM1* null no índice de dano do ensaio cometa.

Genótipo		Índice de Dano (0 - 400)		P
		Controle (n)	DPOC (n)	
<b>Ensaio Cometa Alcalino (tot.)</b>		<b>21,23±21,6 (47)</b>	<b>36,71±25,41 (51)</b>	<b>0,000</b>
	<i>GSTM1</i> presente	21,21±20,58 (19)	35,16±23,64 (31)	<b>0,011</b>
	<i>GSTM1</i> ausente	21,25±22,64 (28)	39,10±28,40 (20)	<b>0,015</b>
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>		0,983	0,832	
<b>Ensaio Cometa Mod, Fpg (tot.)</b>		<b>39,23±33,76 (44)</b>	<b>54,61±36,76 (49)</b>	<b>0,030</b>
	<i>GSTM1</i> presente	46,53±38,45 (19)	56,13±38,77 (30)	0,340
	<i>GSTM1</i> ausente	33,68±29,31 (25)	52,21±34,23 (19)	0,059
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>		0,363	0,861	
<b>Ensaio Cometa Mod, Endo III (tot.)</b>		<b>37,75±33,08 (44)</b>	<b>57,94±40,69 (49)</b>	<b>0,010</b>
	<i>GSTM1</i> presente	40,42±35,67 (19)	61,53±42,48 (30)	0,055
	<i>GSTM1</i> ausente	35,72± 37,55 (25)	52,26± 34,23 (19)	0,092
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>		0,722	0,600	

*P<sup>a</sup>* Valor de P obtido pelo teste U de Mann-Whitney.



**Figura 12:** Representações gráficas das análises da influência do polimorfismo *GSTM1 null* no índice de dano do ensaio cometa.

#### 4.4.1.4 *GSTT1 null*.

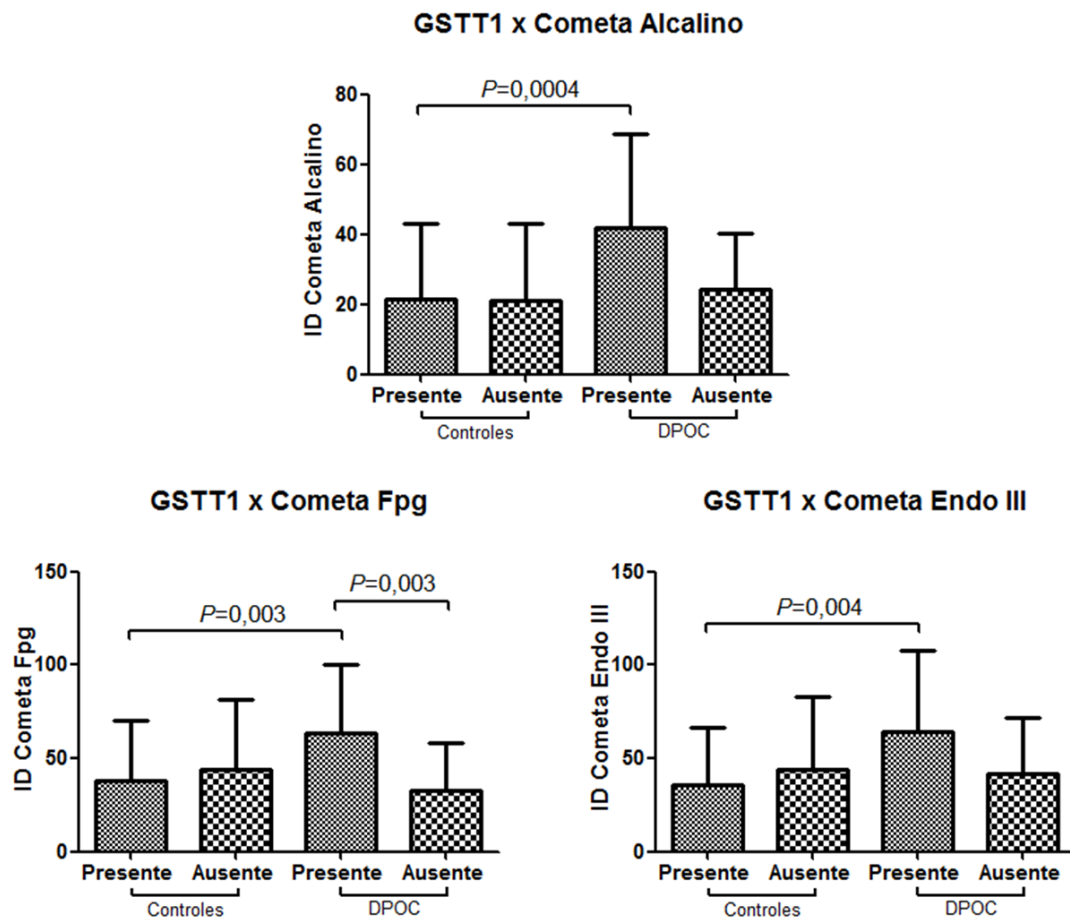
Ainda que se possa identificar uma tendência de dano inferior nos pacientes portadores de *GSTT1 null* em todas as modalidades, apenas o cometa modificado com Fpg, que detecta principalmente guaninas oxidadas, apresentou significância estatística ( $P=0,003$ ).

Não obstante, quando foram efetuadas as comparações intergrupos, pôde-se perceber que os pacientes que apresentam o gene funcional demonstram valores bem superiores de dano aqueles controles da mesma categoria, para as três modalidades de cometa ( $P<0,001$ ; 0,029 e 0,004, Tabela 11 e Figura 13).

**Tabela 11:** Análise da influência do polimorfismo *GSTT1 null* no índice de dano do ensaio cometa.

Genótipo		Índice de Dano (0 - 400)		P
		Controle (n)	DPOC (n)	
<b>Ensaio Cometa Alcalino (tot.)</b>		<b>21,23±21,6 (47)</b>	<b>36,71±25,41 (51)</b>	<b>0,000</b>
	<i>GSTT1 presente</i>	21,27±21,84 (37)	41,92± 26,95 (36)	<b>0,000</b>
	<i>GSTT1 ausente</i>	21,10±21,84 (10)	24,20± 15,90 (15)	0,080
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>		0,795	0,053	
<b>Ensaio Cometa Mod, Fpg (tot.)</b>		<b>39,23±33,76 (44)</b>	<b>54,61±36,76 (49)</b>	<b>0,030</b>
	<i>GSTT1 presente</i>	37,67±32,75 (33)	63,58± 36,37 (36)	<b>0,029</b>
	<i>GSTT1 ausente</i>	43,91±37,90 (11)	30,87± 25,94 (15)	0,701
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>		0,818	<b>0,003</b>	
<b>Ensaio Cometa Mod, Endo III (tot.)</b>		<b>37,75±33,08 (44)</b>	<b>57,94±40,69 (49)</b>	<b>0,010</b>
	<i>GSTT1 presente</i>	44,86± 40,45 (35)	63,49± 36,90 (35)	<b>0,004</b>
	<i>GSTT1 ausente</i>	39,89± 38,16 (9)	32,43± 26,18 (14)	0,891
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>		0,464	0,113	

*P<sup>a</sup>* Valor de P obtido pelo teste U de Mann-Whitney.



**Figura 13:** Representações gráficas das análises da influência do polimorfismo *GSTT1 null* no índice de dano do ensaio cometa.

#### 4.4.1.5 *GSTP1 Ile105Val*.

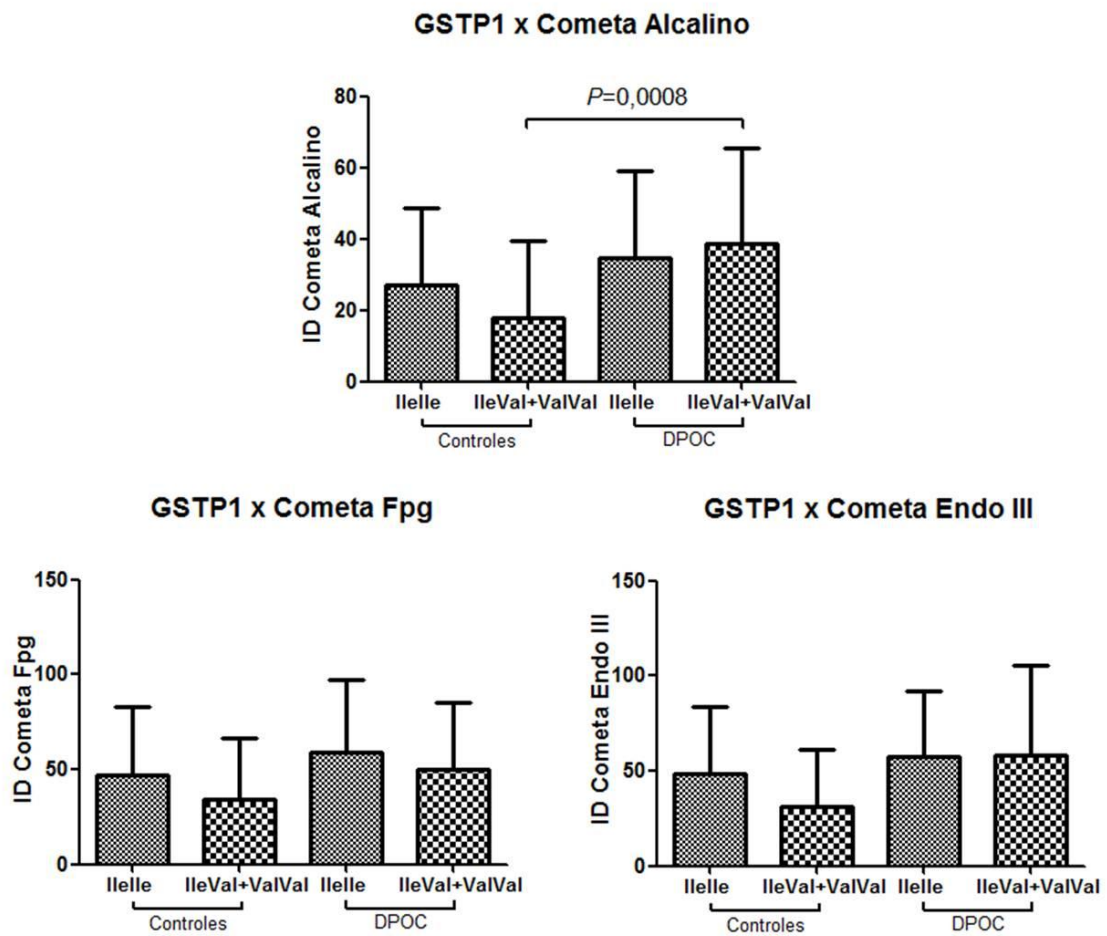
Como pode ser observado na Tabela 12 e Figura 14, a única diferença significativa evidenciada nas comparações entre genótipos de *GSTP1 Ile105Val* foi o dano superior do cometa alcalino ( $18,00 \pm 21,29$  dos pacientes contra  $38,84 \pm 26,55$  dos casos) nos pacientes portadores de pelo menos uma cópia do alelo variante *Val/-*.

**Tabela 12:** Análise da influência do polimorfismo *GSTP1 Ile105Val* no índice de dano do ensaio cometa.

Genótipo	Índice de Dano (0 - 400)		P
	Controle (n)	DPOC (n)	
<b>Ensaio Cometa Alcalino (tot.)</b>	<b>21,23±21,6 (47)</b>	<b>36,71±25,41 (51)</b>	<b>0,000</b>
<i>GSTP1 Ile/Ile</i>	26,94±21,59 (17)	34,65±24,61 (26)	0,291
<i>GSTP1 Ile/Val + Val/Val</i>	18,00± 21,29 (30)	38,84±26,55 (25)	<b>0,000</b>
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	0,159	0,540	
<b>Ensaio Cometa Mod, Fpg (tot.)</b>	<b>39,23±33,76 (44)</b>	<b>54,61±36,76 (49)</b>	<b>0,030</b>
<i>GSTP1 Ile/Ile</i>	46,71±36,52,81 (17)	59,04±38,20 (25)	0,293
<i>GSTP1 Ile/Val + Val/Val</i>	34,52±31,70 (27)	50,00±35,40 (24)	0,104
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	0,273	0,275	
<b>Ensaio Cometa Mod, Endo III (tot.)</b>	<b>37,75±33,08 (44)</b>	<b>57,94±40,69 (49)</b>	<b>0,010</b>
<i>GSTP1 Ile/Ile</i>	48,24±35,20 (17)	57,72±34,44 (25)	0,343
<i>GSTP1 Ile/Val + Val/Val</i>	31,15± 30,28 (27)	58,17±47,09 (24)	0,054
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	0,104	0,582	

*P<sup>a</sup>* Valor de P obtido pelo do teste U de Mann-Whitney.





**Figura 14:** Representações gráficas das análises da influência do polimorfismo *GSTT1 null* no índice de dano do ensaio cometa.

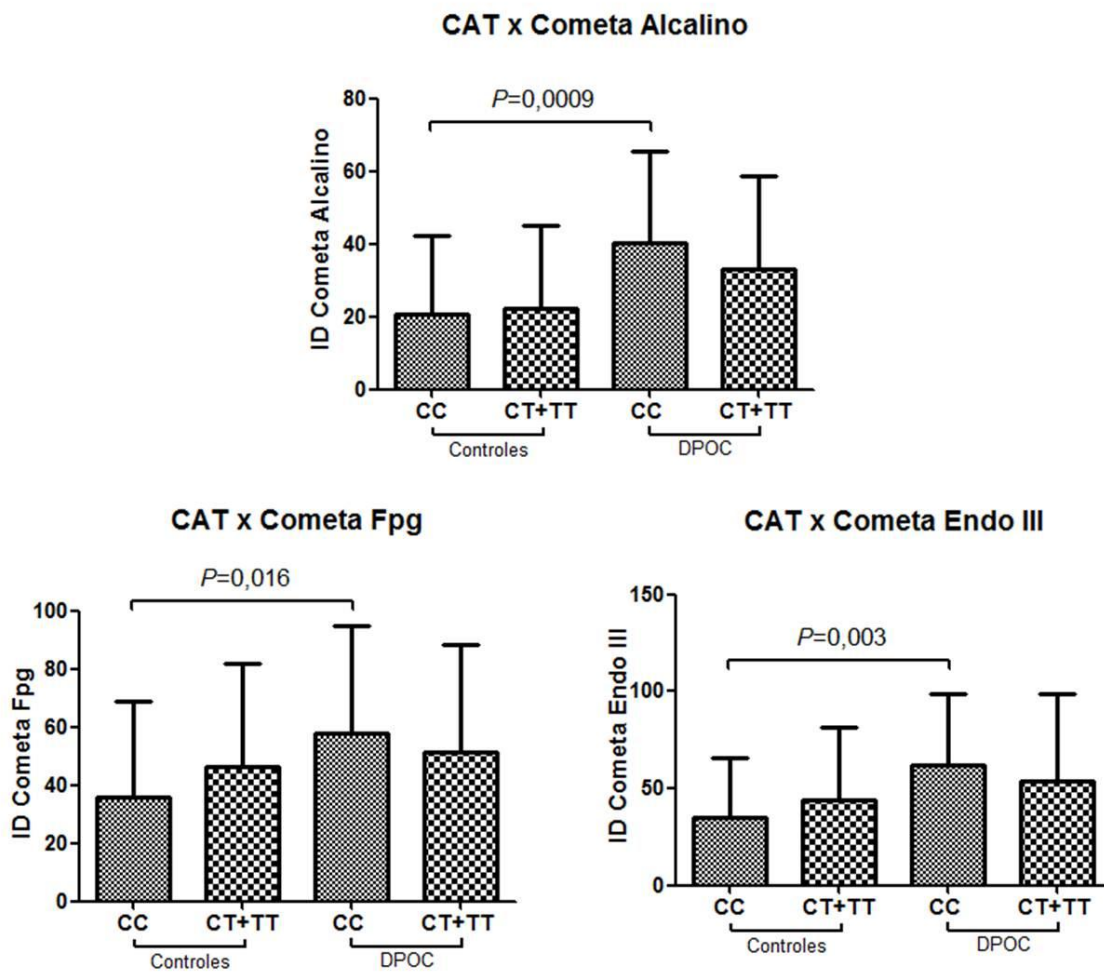
#### 4.4.1.6 CAT C-262T.

Os índices de dano das todas as modalidades (simples e modificadas) dos acometidos pela DPOC exibiram índices maiores ( $P < 0,001$ ,  $P = 0,016$  e  $P = 0,003$ ) de dano em relação a seus iguais do grupo controle. Dentro dos grupos, nenhuma influência dos diferentes genótipos foi detectada (Tabela 13 e Figura 15).

**Tabela 13:** Análise da influência do polimorfismo *CAT C-262T* no índice de dano do ensaio cometa.

Ensaio	Genótipo	Índice de Dano (0 - 400)		P
		Controle (n)	DPOC (n)	
Ensaio Cometa Alcalino (tot.)		<b>21,23±21,6 (47)</b>	<b>36,71±25,41 (51)</b>	<b>0,000</b>
	<i>CAT C/C</i>	20,76±21,49 (34)	40,38±25,11 (26)	<b>0,000</b>
	<i>CAT C/T + T/T</i>	22,46±22,73 (13)	32,88±25,65 (25)	0,065
<b><i>P</i><sup>a</sup> intragrupos</b>		0,739	0,262	
Ensaio Cometa Mod, Fpg (tot.)		<b>39,23±33,76 (44)</b>	<b>54,61±36,76 (49)</b>	<b>0,030</b>
	<i>CAT C/C</i>	35,80±33,15 (30)	57,72±37,06 (25)	<b>0,016</b>
	<i>CAT C/T + T/T</i>	46,57±35,13 (14)	51,38±36,94 (24)	0,844
<b><i>P</i><sup>a</sup> intragrupos</b>		0,267	0,555	
Ensaio Cometa Mod, Endo III (tot.)		<b>37,75±33,08 (44)</b>	<b>57,94±40,69 (49)</b>	<b>0,010</b>
	<i>CAT C/C</i>	34,87±31,04 (30)	62,28±36,50 (25)	<b>0,003</b>
	<i>CAT C/T + T/T</i>	43,93±37,54 (14)	53,42±44,98 (24)	0,576
<b><i>P</i><sup>a</sup> intragrupos</b>		0,579	0,215	

*P*<sup>a</sup> Valor de P obtido pelo do teste U de Mann-Whitney.



**Figura 15:** Representações gráficas das análises da influência do polimorfismo *CAT C-262T* no índice de dano do ensaio cometa.

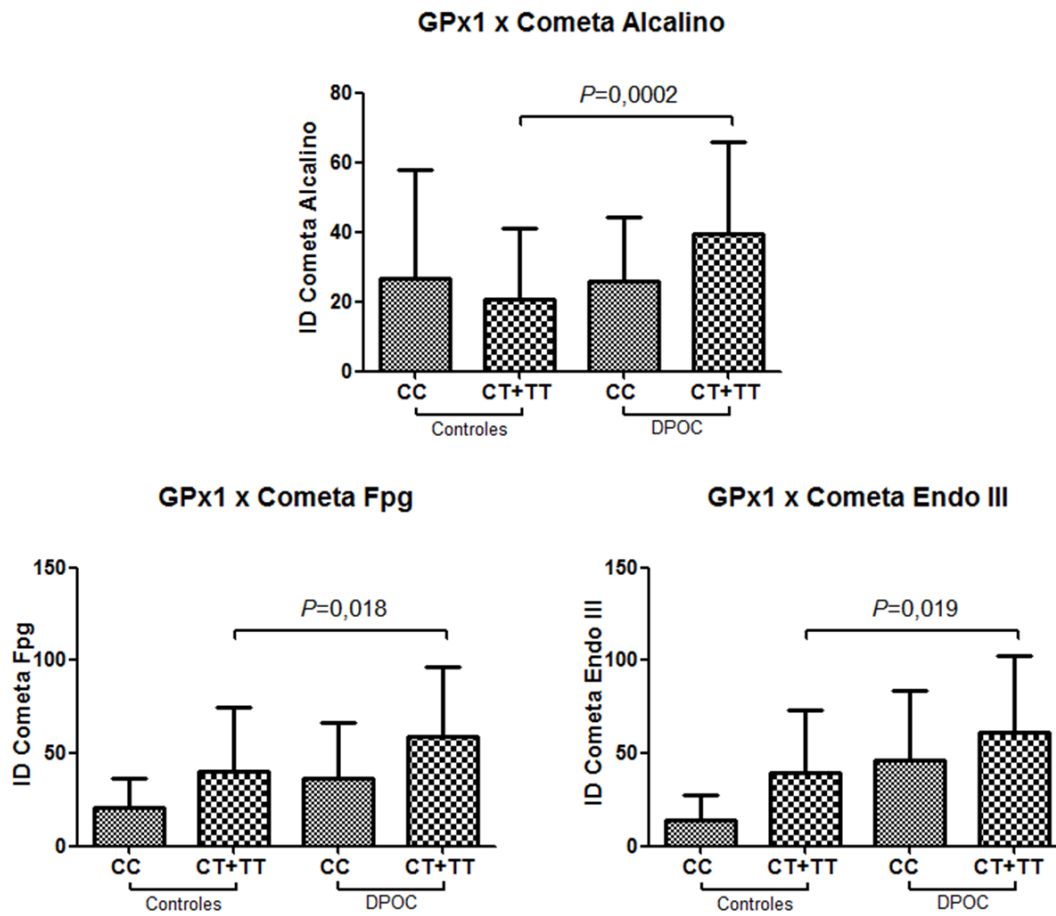
#### 4.4.1.7 GPx1 Pro198Leu.

As comparações intergrupos do polimorfismo *GPx1 Pro198Leu* apontaram para diferenças na resposta frente ao dano (Tabela 14 e Figura 16). Os indivíduos do grupo controle *GPx1 198Leu/-* apresentaram tendência de dano oxidativo inferior aos do mesmo grupo (embora não significativa estatisticamente) e aos do grupo dos pacientes, em todas as modalidades de cometa.

**Tabela 14:** Análise da influência do polimorfismo *GPx1 Pro198Leu* no índice de dano do ensaio cometa.

Genótipo	Índice de Dano (0 - 400)		<i>P<sup>a</sup></i>
	Controle (n)	DPOC (n)	
<b>Ensaio Cometa Alcalino (tot.)</b>	<b>21,23±21,6 (47)</b>	<b>36,71±25,41 (51)</b>	<b>0,000</b>
<i>GPx1 Pro/Pro</i>	26,60±31,33 (5)	25,70±18,49 (10)	0,513
<i>GPx1 Pro/Leu + Leu/Leu</i>	20,60±20,59(42)	39,39±26,31 (41)	<b>0,000</b>
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	0,986	0,141	
<b>Ensaio Cometa Mod, Fpg (tot.)</b>	<b>39,23±33,76 (44)</b>	<b>54,61±36,76 (49)</b>	<b>0,030</b>
<i>GPx1 Pro/Pro</i>	21,00±15,39 (3)	36,40±30,08 (10)	0,573
<i>GPx1 Pro/Leu + Leu/Leu</i>	40,56± 34,45 (41)	58, 24± 37,18 (39)	<b>0,018</b>
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	0,456	0,115	
<b>Ensaio Cometa Mod, Endo III (tot.)</b>	<b>37,75±33,08 (44)</b>	<b>57,94±40,69 (49)</b>	<b>0,010</b>
<i>GPx1 Pro/Pro</i>	14,00±13,45 (3)	46,20± 37,28 (10)	0,090
<i>GPx1 Pro/Leu + Leu/Leu</i>	39,49± 33,49 (41)	60,95± 41,43 (39)	<b>0,019</b>
<b><i>P<sup>a</sup></i> intragrupos</b>	0,177	0,303	

*P<sup>a</sup>* Valor de *P* obtido através do teste *U* de Mann-Whitney.



**Figura 16:** Representações gráficas das análises da influência do polimorfismo *GPx1 Pro198Leu* no índice de dano do ensaio cometa.

#### 4.4.2 Polimorfismos e Micronúcleos do Esfoliado de Mucosa Oral

Quando estratificado pela presença dos diferentes polimorfismos estudados, pode-se perceber que não houve diferença significativa nas frequências de formação de micronúcleos.

**Tabela 15:** Frequência da ocorrência de micronúcleos em células de esfoliado bucal e a influência dos polimorfismos estudados sobre seus valores.

Genótipo	Índice de Dano (0 - 400)		P <sup>a</sup>
	Controle (n)	DPOC (n)	
<b>Micronúcleos de mucosa oral (total)</b>	2,58±1,83 (51)	2,61±1,82 (47)	0,651
<b>CYP1A1 C2453A</b>			
<i>CYP1A1 C/C</i>	2,51±1,78 (44)	2,67± 1,80 (36)	0,462
<i>CYP1A1 C/A + A/A</i>	3,52± 1,62 (5)	2,43± 1,95 (11)	0,278
<b>P<sup>a</sup> intragrupos</b>	0,165	0,303	
<b>CYP2E1 C-1053T</b>			
<i>CYP2E1 C/C</i>	2,66±1,78 (46)	2,56±1,75 (43)	0,934
<i>CYP2E1 C/T + T/T</i>	1,91±2,38 (5)	3,15±2,70 (4)	0,461
<b>P<sup>a</sup> intragrupos</b>	0,199	0,620	
<b>GSTM1 null</b>			
<i>GSTM1 presente</i>	2,32±1,73 (23)	2,79±1,47 (27)	0,090
<i>GSTM1 ausente</i>	2,80±1,92 (28)	2,37±2,22 (20)	0,391
<b>P<sup>a</sup> intragrupos</b>	0,538	0,181	
<b>GSTT1 null</b>			
<i>GSTT1 presente</i>	2,62±1,67 (38)	2,73±1,83 (37)	0,633
<i>GSTT1 ausente</i>	2,47±2,34 (13)	1,83± 1,77 (10)	0,975
<b>P<sup>a</sup> intragrupos</b>	0,393	0,427	
<b>GSTP1 Ile105Val</b>			
<i>GSTP1 Ile/Ile</i>	2,78±1,60 (19)	2,27±1,77 (24)	0,321
<i>GSTP1 Ile/Val + Val/Val</i>	2,47±1,98 (32)	2,97±1,83 (23)	0,101
<b>P<sup>a</sup> intragrupos</b>	0,254	0,201	
<b>CAT C-262T</b>			
<i>CAT C/C</i>	2,46±1,90 (37)	2,48±1,84 (25)	0,846
<i>CAT C/T + T/T</i>	2,91± 1,67 (14)	2,80±1,81 (22)	0,987
<b>P<sup>a</sup> intragrupos</b>	0,232	0,529	

Genótipo	Índice de Dano (0 - 400)		<i>P</i> <sup>a</sup>
	Controle ( <i>n</i> )	DPOC ( <i>n</i> )	
<b><i>GPx1 Pro198Leu</i></b>			
<i>GPx1 Pro/Pro</i>	1,70±1,35 (5)	1,71±1,32 (5)	1,000
<i>GPx1 Pro/Leu + Leu/Leu</i>	2,68±1,87 (46)	2,72±1,85 (42)	0,652
<b><i>P</i><sup>a</sup> intragrupos</b>	0,173	0,240	

## 5 DISCUSSÃO GERAL

### 5.1 Perfil Demográfico e Clínico da População Estudada.

Na condição de síndrome, a DPOC tem uma etiologia complexa com inúmeros fatores de risco, como doenças respiratórias na infância, etnia e sexo. Ainda assim, nenhum desses fatores demográficos pareceu relevante quando analisados em nosso contexto.

Quanto à idade, ainda existem controvérsias se o envelhecimento é um fator de risco independente. Embora a maior prevalência da DPOC seja encontrada entre os 60 e 70 anos (Menezes, A. M. B. *et al.*, 2005), 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 como poluição ambiental (GOLD, 2011). No presente estudo, após correção para fatores de confusão fica claro que a idade atua como um fator de risco independente, aumentando discretamente a probabilidade do desenvolvimento da DPOC.

A questão do sexo como fator de risco é outro alvo de discussão. Enquanto muitos estudos ainda relatam uma probabilidade superior de desenvolver DPOC associada com o sexo masculino, especialmente na Europa (Afonso, A. S. M. *et al.*, 2011), o que tem se visto nos países emergentes e Estados Unidos é que o sexo feminino tem suplantado o masculino como fator de risco, fato que não pode ser explicado unicamente pelo aumento de mulheres fumantes (Sin, D. D. *et al.*, 2007). Contudo, embora a tendência de risco aumentado associado com o sexo masculino ainda seja a regra no Brasil (Sousa, C. a. D. *et al.*, 2011), o presente levantamento não mostrou diferenças entre a distribuição de ambos os gêneros entre as classes (casos e controles), nem um acréscimo de risco associado com o sexo masculino.

O mesmo ocorre com a etnia na amostra avaliada, que parece não influenciar o desfecho DPOC. Embora uma das maiores investigações sobre prevalência da DPOC na América Latina, o PLATINO, associe afro-descendência à DPOC (Sousa, C. a. D. *et al.*, 2011), 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), ocasionando uma maior dificuldade no acesso à saúde, educação e maior consumo de tabaco (Schmidt, M. I. *et al.*, 2011). Ainda assim, é importante ressaltar que os afro-descendentes são sub-representados nesta amostragem.

No quesito caracterização populacional, uma diferença fundamental destacou-se: os hábitos tabágicos e sua ligação com o desenvolvimento da DPOC. Embora tem se dado cada vez mais destaque à influência de outros poluentes que não a fumaça do cigarro (Rabe, K. F. *et al.*, 2007), o tabagismo ainda é um dos mais importantes e mais estudados fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC (Mannino, D. M. *et al.*, 2007; Fischer, B. M. *et al.*, 2011), o que vem bem ao encontro dos achados deste trabalho. Os pacientes apresentaram uma proporção bastante superior de fumantes e ex-fumantes, diferentemente do perfil dos controles ( $P=0,004$ ). Contudo, ao invés de indicar o hábito de fumar em si como fator de risco, o tempo de tabagismo e a quantidade de cigarros fumados parecem ser mais relevantes, ambos acrescentando-se à probabilidade do desenvolvimento da doença, fato também constatado por um estudo realizado em São Paulo, como parte do projeto PLATINO (Sousa, C. a. D. *et al.*, 2011). Evidentemente as três variáveis são intimamente ligadas. Indivíduos que fumam por períodos superiores de tempo (maiores que trinta anos) tendem a consumir uma quantidade também superior de cigarros.

Encontrar o tabagismo como pivô central na patogênese da DPOC não é surpresa. A fumaça do cigarro contém mais de 4.700 compostos altamente reativos, dentre estes os carcinógenos diretos como metilcolantreno, benzo- $\alpha$ -pirenos e acroleínas, toxinas como monóxido de carbono, acetona, amônia, nicotina e hidroquinonas (Smith, C. J. *et al.*, 2000), comprazendo em torno de  $10^{15-17}$  moléculas oxidantes (Irfan, R., 2011). A fumaça do cigarro tem efeitos contrastantes no epitélio do pulmão, assim como atua como agente pró-inflamatório e danoso, além de ser imunossupressora. Ao mesmo tempo em que os componentes particulados do condensado estimulam a fagocitose através de macrófagos e das células ciliadas, que liberam quimiocinas recrutando outras células com linfócitos e neutrófilos (constituindo o componente pró-inflamatório), 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, M. R. *et al.*, 2009).

A distribuição dos parâmetros de função pulmonar é bastante típica, retratando o efeito devastador da DPOC sobre a capacidade pulmonar dos pacientes. Fica claro que os pacientes apresentam valores iguais ou até inferiores à metade da média dos indivíduos saudáveis.

No perfil do estadiamento da doença, verificou-se que existe um predomínio de pacientes nos estágios Moderado e Severo da doença. Esse fenômeno se deve à dificuldade do diagnóstico nas fases iniciais da doença, frequentemente assintomática, e da alta mortalidade em sua fase Muito Severa (GOLD, 2011), causando uma sub-representação das fases iniciais dentre os pacientes estudados. Pode-se ver também que, ainda que os pacientes com DPOC sejam mais propensos a comorbidades (Decramer, M. *et al.*, 2012), a presença destas é bastante semelhante em ambos os grupos nessa investigação.

O fumo ainda é o fator de risco mais importante em todo o mundo (Mannino, D. M. e Buist, A. S., 2007), especialmente em países onde a população não se utiliza de queima de biomassa em seu dia-a-dia. Nesses países, estima-se que 73% da mortalidade por DPOC esteja relacionada com o tabagismo. Ainda assim, apenas uma parcela dos tabagistas que varia de 20 a até 50% (Rennard, S. I. *et al.*, 2006) desenvolve DPOC. E o restante? Uma das principais teorias é que a “resistência” ou a “vulnerabilidade” à DPOC seja conferida por fatores genéticos que modulem a resposta às agressões ambientais, o que motivou a investigação da influência de diferentes polimorfismos na resposta à DPOC, nesta pesquisa.

## 5.2 Análise Comparativa do Perfil Genético

Os controles e pacientes não apresentaram diferenças significativas nas frequências gênicas de todos os polimorfismos analisados e apenas o grupo controle

do polimorfismo *GPx1 Pro198Leu* não se encontrava em EHW, o que provavelmente se deve à amostragem limitada.

De um modo geral, as frequências obtidas neste trabalho foram bastante semelhantes às de outros estudos (Tabela 6 e Seção 4.2), com exceção do alelo *CYP1A1 2453A* nos pacientes, *GSTP1 Ile105Val* e *GPx1 Pro198Leu*.

### 5.3 Ensaio Cometa

Quando os índices de dano do ensaio cometa alcalino e modificado foram analisados, como esperado, foi constatado que em todas as modalidades os pacientes apresentaram níveis de dano no DNA superiores. Especulando-se sobre a etiologia desse dano, dois fatores precisam ser levadas em consideração: os hábitos tabágicos dos pacientes e as próprias manifestações da DPOC.

Partindo do conhecimento de que uma parcela superior dos pacientes fuma ou fumou, por períodos mais longos e em maior quantidade, é bastante provável que este padrão de consumo seja um contribuinte para a geração de dano. A fumaça do cigarro apresenta uma mistura complexa de substâncias tóxicas e carcinogênicas que contém uma grande quantidade de radicais livres, em ambas as fases gasosa e particulada. Testes feitos por Huang *et al.* (2005), constataram que a concentração de radicais livres na fumaça de três marcas de cigarro variou de 18,64 a 54,81 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/L e que a presença de filtro causava uma diferença negligenciável nessa concentração (Huang, M.F. *et al.*, 2005). A fase gasosa contém O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e NO, que possuem uma meia-vida relativamente curta, mas podem reagir entre si para formar o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que pode difundir-se por grandes distâncias, causando danos ao interstício pulmonar. A fase particulada é rica em radicais orgânicos como radicais semiquinonas, mais estáveis e que podem reagir com o oxigênio celular, ocasionando a produção contínua de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e OH<sup>•</sup> (Irfan, R., 2011). Adicionalmente, o alcatrão é um quelante de metais e pode formar complexos com as semiquinonas e com Fe<sup>2+</sup>, criando uma fonte contínua de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pryor, W. A. *et al.*, 1993).

O dano oxidativo direto pode induzir à geração de compostos como o 8-isoprostano, que induzem à quimiotaxia das células inflamatórias aos pulmões. A reação pró-inflamatória ainda pode ser agravada pelo aumento da permeabilidade da membrana e enfraquecimento das junções de oclusão, o que induz às células ciliadas do epitélio a recrutar linfócitos T (principalmente CD8<sup>+</sup>), B e mastócitos (Nussbaumer-Ochsner, Y. *et al.*, 2011).

Independentemente do aspecto local da inflamação, a fumaça ainda pode ocasionar manifestações sistêmicas inflamatórias através da estimulação à liberação de células polimorfonucleares (PMNs), ativação da coagulação, estresse oxidativo e ação direta sobre o sistema endotelial, o que explicaria pelo menos em parte, a grande parcela de fumantes (e pacientes de DPOC ligada ao fumo) que apresentam comorbidades cardiovasculares (Nussbaumer-Ochsner, Y. e Rabe, K. F., 2011).

Mas o que leva à patogênese da DPOC em si? Acredita-se que nos indivíduos acometidos por DPOC originária do fumo exista uma resposta inflamatória exacerbada a este poluente (Hogg, J. C., 2004). A inflamação em si é uma grande geradora de ERO e pode se tornar sistêmica em alguns casos (Brusselle, G. G. *et al.*). Como agravante, ainda existem indícios que a capacidade antioxidante desses indivíduos é diminuída (Rahman, I. *et al.*, 1996). Todas essas constatações ratificam a ocorrência de um alto índice de DNA nos pacientes, bem como, a origem oxidativa desse dano, representada pelos índices do cometa modificado com Fpg e Endo III.

A ocorrência de dano no DNA em pacientes de DPOC foi detectada recentemente por Aoshiba e colaboradores (2012), que constataram a presença de quebras duplas e 8-OHdG nesses indivíduos. Outros trabalhos, como o de Maluf e colaboradores, realizado em 2007, bem como o de Ceylan e colaboradores (2006) também detectaram índices de dano do ensaio cometa superiores em acometidos por DPOC.

## 5.4 Peroxidação Lipídica e Carbonilação Proteica

ROS podem danificar todos os tipos de biomolécula 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 e Gutteridge, 2007).

A geração de espécies reativas próxima de membranas ricas em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) inicia a peroxidação lipídica, que ocorre quando  $\text{HO}\cdot$  e  $\text{ONOO}\cdot$  abstraem um hidrogênio alélico dos PUFAs, o que gera um radical lipídico menos ativo ( $\text{L}\cdot$ ). Esse, por sua vez, reage com oxigênio molecular, gerando um radical lipídico peroxil ( $\text{LOO}\cdot$ ), resultando na formação de hidroperóxidos de lipídios (LOOH). Os LOOH reagem com metais para formar radicais lipídicos alcoxil ( $\text{LO}\cdot$ ). Ambos radicais peroxil e alcoxil podem gerar aldeídos  $\beta$ -insaturados por ciclização e/ou  $\beta$ -cisão e degradação, gerando produtos altamente eletrofílicos como 4-HNE (4-hidroxi-nonenal), malondialdeído (MDA) e acroleína (Fritz, K. S. e Petersen, D. R., 2011). Esses radicais tem uma meia vida mais longa e podem difundir-se para outras áreas mais distantes causando danos em outros lipídios, DNA e proteínas.

A carbonilação proteica pode ocorrer direta ou indiretamente. Na via direta, existe o ataque oxidativo de resíduos de lisina, arginina, treonina ou prolina. Na via indireta, cisteína, histidina ou lisina podem reagir com compostos carbonílicos reativos gerados como subprodutos das reações de peroxidação lipídica (Dalle-Donne, I. *et al.*, 2003).

Os processos de inflamação exacerbada e seu reforço pelo do tabagismo levam à formação de um ambiente propício para a peroxidação lipídica e carbonilação proteica. Diversos trabalhos identificaram um aumento de MDA e carbonilação proteica em pacientes com DPOC e fumantes, nível ainda mais elevado nas exacerbações (Nadeem, A. *et al.*, 2005; Hanta, I. *et al.*, 2006; Vibhuti, A. *et al.*, 2007; Vibhuti, A. *et al.*, 2010), enquanto outros não foram tão conclusivos (Mesia-Vela, S. *et al.*, 2008; Skyba, P. *et al.*, 2009; Torres-Ramos, Y. D. *et al.*, 2009). A princípio, os

resultados deste trabalho pareciam mais condizentes com os últimos. Os níveis de MDA e carbonilação proteica foram bem semelhantes entre pacientes e controles, mesmo quando estratificados por idade, estadiamento da doença, hábitos tabágicos e sexo (dados não apresentados).

Depois de feita a separação dos pacientes entre aqueles que frequentam ou não as atividades de reabilitação é possível ver claramente que aqueles que atendem às atividades apresentam um nível menor de ambos carbonilação proteica e peroxidação lipídica. Curiosamente, a literatura indica que o exercício normalmente causa um aumento destes marcadores (Fogarty, M. C. *et al.*, 2011). De fato, embora este seja um fato bem conhecido, não se aplica para todo o tipo de exercício. O exercício 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, E. M. *et al.*, 2005; Siu, P. M. *et al.*, 2011). Outras observações importantes que poderiam contribuir para a diminuição dos marcadores é que este subgrupo que frequenta a reabilitação pulmonar recebe um acompanhamento médico, nutricional, farmacológico e fisioterapêutico muito mais cuidadoso, tendo a oportunidade de controlar melhor a DPOC, bem como a hipertensão arterial sistêmica, alimentação e massa corporal.

## 5.5 Investigação da Influência dos Biomarcadores de Suscetibilidade E Biomarcadores de Exposição e Efeito.

### 5.5.1 Polimorfismos e Ensaio Cometa: Enzimas da Fase I.

Embora a metabolização de xenobióticos pelas enzimas do citocromo P450 seja um passo muito importante para a detoxificação, manutenção da homeostase depende de um frágil equilíbrio entre sua indução, atividade e dos níveis de atividade de outras enzimas adiante na cascata do metabolismo (especialmente as da fase II), pois os subprodutos de sua metabolização frequentemente são mais tóxicos que as substâncias originais, processo conhecido como bioativação (Androutsopoulos, V. *et al.*, 2009). Qualquer desequilíbrio entre a taxa de produção desses metabólitos e sua excreção pode gerar um perigoso acúmulo de subprodutos altamente reativos dentro da célula.

Tendo em vista esse fenômeno, não é surpresa a constatação de que pacientes portadores do alelo variante *CYP1A1 2453 A/-* apresentem índices de dano superiores às suas contrapartes (Tabela 16, no Anexo C). Todas as variantes de *CYP1A1* parecem apresentar uma indutibilidade maior, especialmente pela fumaça do cigarro (Crofts, F. *et al.*, 1994). Há ainda um agravante: a enzima gerada por *CYP1A1 2453A*, apresenta uma produção mais elevada de diol-epóxido 2 [ (±)-B[a]P-r-7,t-8-dihidrodiol-t-9,10-epóxido (DE2)], metabólito do benzo[a]pireno, que atua como agente alquilante do DNA e pode estabelecer complexos com a topoisomerase I (atividade chamada de *top1 poison*), aprisionando-a e induzindo-a a clivar diversos sítios em ambas as fitas do DNA, o que pode levar à recombinação ou até à morte celular (Pommier, Y. *et al.*, 2002).

É bastante provável que o polimorfismo *CYP2E1 -1053T* tenha um efeito bastante semelhante sobre os índices de dano no DNA (Tabela 16 e Figura 11). Esta enzima está envolvida também na ativação de compostos presentes na fumaça do cigarro, especialmente as N-nitrosaminas (Bartsch, H. *et al.*, 2000), que podem, depois de ativadas, formar adutos, induzir quebras no DNA e aumentar as concentrações de 8-oxo-dG (Hecht, S. S., 1999). O alelo variante do polimorfismo *CYP2E1 C-1053T* está

associado a uma mudança no promotor que permite que os seus fatores de transcrição se liguem mais fortemente a ele, aumentando seus níveis de transcrição (Watanabe, J. *et al.*, 1994). Esse polimorfismo está associado não só a níveis de expressão mais elevados, mas a maior quantidade de proteína e maior atividade enzimática (Arif, E. *et al.*, 2007).

Entretanto, as diferenças encontradas não estavam relacionadas ao alelo variante, mas sim entre os controles e os pacientes homocigotos para o alelo comum (*CYP2E1 -1053C*), no qual os casos são um pouco mais prejudicados dos que os indivíduos de função pulmonar saudável. Uma hipótese que poderia explicar esse fenômeno é a repressão de *CYP2E1* as citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-6. Na presença destas, existe um decréscimo na expressão do gene. (Richardson, T. A. *et al.*, 2005). É fato conhecido que a DPOC apresenta um forte componente inflamatório, e que os pacientes apresentam níveis elevados destes fatores em sua circulação. Portanto, seria possível que nesses indivíduos que apresentam a variante de metabolização normal e o quadro inflamatório exacerbado, os níveis de *CYP2E1* fiquem aquém do necessário para uma detoxificação eficiente, acarretando índices de dano superiores em ambos os cometa alcalino simples e modificado.

### 5.5.2 Polimorfismos e Ensaio Cometa: Enzimas da Fase II.

Glutathione S-Transferases (GSTs) são enzimas da Fase II de metabolização que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos potencialmente carcinogênicos à GSH (Hayes, J. D. *et al.*, 2005). Dentre seus substratos estão HAPs, esteroides, hormônios tireoideanos, entre outros.

A deleção homocigótica de *GSTM1* é responsável pela ausência da isoenzima  $\mu$  (McCarty, K. M. *et al.*, 2008). A ausência da enzima está associada com redução de afinidade a ligação com substratos genotóxicos, como epóxidos derivados de HAPs (Hayes, J. D. *et al.*, 1995), o que poderia gerar excesso de compostos reativos e, conseqüentemente, dano celular. De fato, diversos estudos demonstraram associação



do genótipo *GSTM1 null* e a formação de adutos no DNA (Lee, M.-S. *et al.*, 2010; García-Suástegui, W. A. *et al.*, 2011) e ID mais elevado no ensaio cometa alcalino (Sánchez-Guerra, M. *et al.*, 2012). Na amostra desta pesquisa, a ausência da enzima não parece influenciar muito os níveis de dano. A diferença evidenciada pelo teste estatístico é que os pacientes apresentam índices de dano do cometa alcalino simples consistentemente maiores do que os controles e, embora se possa perceber a existência de uma tendência de dano superior associada com o gene funcional, não é possível confirmar essa relação devido à grande variação nos níveis de dano entre os indivíduos estudados.

O polimorfismo de *GSTT1 null* teoricamente apresenta um comportamento bem semelhante à *GSTM1 null*. Existem diversas associações com a deleção de *GSTT1* e um aumento em marcadores de exposição a carcinógenos e aumento de risco para diversas doenças (Da Silva, J. *et al.*, 2008; Abhishek, S. *et al.*, 2010; Rouissi, K. *et al.*, 2011; Sánchez-Guerra, M. *et al.*, 2012).

Contudo, neste estudo, a presença de *GSTT1* funcional parece desempenhar um papel diferente do esperado (Tabela 16) entre os pacientes. Indivíduos com o gene íntegro apresentam um dano superior em todas as modalidades de cometa além de uma tendência de dano maior nos casos (estatisticamente significativa no caso da Fpg) em relação aos seus pares portadores da deleção.

Existem duas hipóteses para essa resposta não usual. A primeira é fundamentada no trabalho de van der Toom *et al.* (2007). Neste trabalho os autores constataram que componentes da fumaça do cigarro como a acroleína, formaldeído e crotonaldeído ao passarem pelo processo de detoxificação eram conjugados de forma irreversível à GSH, o que impedia a reciclagem da mesma e gerava conjugados que eram tóxicos para a célula. Não obstante, é necessária cautela por se tratar de um estudo *in vitro*. É difícil antecipar se a resposta seria a mesma no pulmão.

A segunda hipótese é que a presença da isoenzima  $\theta$  esteja causando a bioativação das nitrosaminas presentes na fumaça do cigarro, que poderiam estar prejudicando as células (Hecht, S. S., 1999; Pavanello, S. *et al.*, 2000). Também é possível que exista alguma variável não controlada como alimentação ou a exposição

a algum agente tóxico que seja ignorada pelo paciente, ou talvez até mesmo a influência de outros polimorfismos em desequilíbrio de ligação com *GSTT1*.

No caso de *GSTP1 Ile105Val*, embora a mutação atinja uma área adjacente ao sítio-ativo da enzima, prejudicando sua interação com diversos substratos (Zimniak, P. *et al.*, 1994), os resultados de diversos trabalhos parecem conflitantes. Enquanto certos estudos não reportaram efeito algum do polimorfismo sobre manifestações como asma (Muñoz, B. *et al.*, 2012), níveis de dano no DNA de indivíduos saudáveis (Wlodarczyk, M. *et al.*, 2011) ou câncer de mama (Mccarty, K. M. *et al.*, 2008), outros encontraram correlações positivas de risco com o alelo variante, *105Val* (Romieu, I. *et al.*, 2006; Melén, E. *et al.*, 2008; Karam, R. A. *et al.*, 2012). Liu e colaboradores, em 2008, observaram uma associação positiva entre os homozigotos *Ile/Ile* em um aumento do risco de dano no DNA causado por exposição a pesticidas. Outro estudo que analisou a formação de adutos de BPDE (Benzo[a]pireno diol epóxido) com DNA em leucócitos de fumantes, também encontrou um resultado semelhante, onde os portadores homozigóticos para o alelo selvagem sofriam de maior formação deste tipo de aduto (Ludovici, M. *et al.*, 2004).

Um fato interessante que poderia explicar essa gama tão variada de respostas aparentemente conflitantes é a constatação de que o efeito de diminuição de atividade da enzima é substrato-dependente. De fato, *GSTP1 105Val* parece ter sua atividade específica aumentada sete vezes em relação a HAPs, enquanto que apresenta uma atividade 3 vezes menor em relação a 1-cloro-3,4-dinitrobenzeno (Hu, X. *et al.*, 1997; Watson, M. A. *et al.*, 1998).

Nos indivíduos do grupo controle existe uma tendência de dano menor associada ao genótipo variante nas três modalidades de ensaio cometa, entretanto, nos pacientes o dano é bastante semelhante entre os dois genótipos ou ligeiramente maior nos portadores de *Val/-*. Quando esses portadores dos grupos controle e DPOC são comparados, os pacientes apresentam ID do cometa alcalino superior aos controles. O efeito diferencial poderia ser devido às diferenças intrínsecas entre dois grupos: talvez em condições de homeostase, a afinidade a certos substratos seja vantajosa, diminuindo o dano causado. Em contrapartida, em indivíduos que já

sofrem com uma carga oxidativa maior, proveniente não só de fatores externos, mas de outras origens como o estresse endógeno gerado pela inflamação crônica presente na DPOC, esse estreitamento da gama de substratos poderia ser uma característica desvantajosa, explicando, desta forma, o dano superior no cometa alcalino e as tendências de dano superior nas outras modalidades.

### 5.5.3 Polimorfismos e Ensaio Cometa: Enzimas Antioxidantes.

A catalase é uma das primeiras linhas de defesa antioxidante do organismo. É mais abundante no fígado, rins e eritrócitos, onde é citoplasmática (Halliwell, B., 1994). *CAT C-262T*, o polimorfismo que foi investigado nesse trabalho, encontra-se no promotor, e está relacionado com um aumento da transcrição do gene e com níveis mais elevados da enzima nos eritrócitos (Forsberg, L. *et al.*, 2001; Ho, J. C. *et al.*, 2006), embora haja controvérsias quanto a isso (Nadif, R. *et al.*, 2005).

Nos indivíduos que foram analisados, o polimorfismo não parece exercer influência alguma quando comparados entre genótipos. Contudo, os pacientes homocigotos *C/C* apresentaram um dano superior aos controles no cometa alcalino modificado com Fpg e Endo III ( $P < 0,001$ ; 0,016 e 0,003 respectivamente), como apresentado na Tabela 16. Embora seja possível perceber uma tendência de dano inferior nos pacientes que apresentam ao menos um alelo *T/-*, devido à falta de significância estatística não é possível afirmar que este efeito seja relacionado a uma vantagem conferida pelo genótipo.

Em contrapartida, em *GPx1 Pro198Leu* as diferenças que foram encontradas estavam associadas aos portadores do alelo variante *Leu/-*. Pacientes portadores deste alelo variante apresentaram dano superior aos controles, tanto no cometa alcalino quanto nos cometas que identificam dano oxidativo. Estudos *in vitro* que buscaram esclarecer o efeito biológico das variantes genóticas demonstraram que, além do alelo variante estar associado com alguns tipos de neoplasias malignas (Kucukgergin, C. *et al.*, 2011; Haug, U. *et al.*, 2012) também apresenta uma resposta

diminuída à ingestão de selênio, que normalmente estimula a transcrição de *GPx1* (Hu, Y. J. e Diamond, A. M., 2003), evidência apoiada por outros trabalhos, um realizado nos EUA (Bastaki, M. *et al.*, 2006) e outro na Dinamarca (Malling, T. H. *et al.*, 2009). Desse modo, pessoas com dieta pobre em selênio, poderiam apresentar níveis inferiores de enzima (Brozmanova, J. *et al.*, 2010). Ainda que essa seja uma explicação plausível para os resultados observados não é possível confirmá-la, pois não há informações sobre os níveis deste micronutriente nos indivíduos estudados. Ainda assim, não seria surpresa se esses indivíduos apresentassem uma dieta pobre, já que a grande maioria dos acometidos tem pouca escolaridade e baixo poder aquisitivo.

Em geral, os resultados evidenciam a existência de um efeito modulatório nos níveis de dano no DNA associado ao perfil genético individual (Anexo C). Não obstante, é interessante como a mesma variante pode exercer papéis diferentes conforme o estilo de vida, dieta e, como é possível ver em alguns dos polimorfismos, alterações patológicas.

## 5.6 Micronúcleos da Mucosa Oral

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, pode-se presumir que o resultado é bastante semelhante se não mais condizente com as condições naturais de ocorrência de micronúcleos (Titenko-Holland, N. *et al.*, 1994). De fato, a mucosa oral é ainda 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, N. *et al.*, 2008), o que torna sua aplicação neste estudo ainda mais relevante, levando-se em conta a estreita ligação da DPOC com o tabagismo.

Neste trabalho, as frequências dos micronúcleos de controles e pacientes foram bastante semelhantes. Os primeiros apresentaram uma frequência de MN cuja média girava em torno de 25,8%, enquanto os últimos apresentaram em torno de 26,1%, valores ligeiramente superiores aos encontrados em diversos trabalhos, de 5 a 25% (Holland, N. *et al.*, 2008). De fato o valor é semelhante ao obtido para indivíduos saudáveis maiores de 60 anos (22,6%) pelo projeto HUMN<sub>XL</sub> (HUman MicroNucleus exfoliated buccal cells), uma iniciativa pela elaboração de um banco de dados de valores frequências de MN, a fim de avaliar a influência de fatores como idade e risco ocupacional (Bonassi, S. *et al.*, 2011).

Duas hipóteses prováveis para a ausência de diferenças entre os dois grupos é que: 1) Os danos vistos no ensaio cometa são reparados antes de causarem maiores prejuízos para as células ou 2) As células que foram muito danificadas sofrem apoptose, sendo eliminadas das contagens.

### **5.6.1 Polimorfismos e Micronúcleos de Mucosa.**

Embora até a data da elaboração deste manuscrito ainda não estivesse disponível qualquer trabalho sobre a influência de polimorfismos na ocorrência de MN em pacientes de DPOC, são abundantes as investigações que abordam sua influência, especialmente frente a exposições ocupacionais, especialmente em genes de reparo, como *XRCC1*, *ERCC2* e *XPB* (Dhillon, V. S. *et al.*, 2011) e enzimas do metabolismo, como as GSTs.

Como é recorrente em trabalhos deste tipo, os resultados são divergentes. Muitos deles apresentaram resultados bastante semelhantes aos encontrados em nosso estudo: a aparente ausência de modulação sobre a ocorrência dos polimorfismos *CYP1A1\*4*, *CYP2E1 Thr462Asn*, *GSTM1null*, *GSTT1null*, e *GSTP1 Ile105Val* (Carstensen, U. *et al.*, 1993; Teixeira, J. P. *et al.*, 2004; Testa, A. *et al.*, 2005; Da Silva, J. *et al.*, 2008; Chen, L. *et al.*, 2010) embora inúmeros outros tenham relatado associação, tanto para os alelos selvagens, quanto para os mutantes (Masetti, S. *et al.*, 2003; Iarmarcovai, G. *et al.*, 2006; Jiang, S. *et al.*, 2010). Ainda que a literatura seja

abundante para os polimorfismos citados, não foi possível encontrar estudos que abordem o mesmo tema com os polimorfismos GPx1 *Pro198Leu* ou CAT *C-262T*.

Essas discrepâncias entre trabalhos podem ser devidas não somente a diferenças na metodologia e amostragem entre os diferentes grupos de pesquisa, mas também ao papel dualístico que enzimas como as do citocromo P450 e glutathione transferases desempenham. Ainda que fundamentais para a manutenção da homeostase elas também podem atuar na bioativação de compostos carcinógenos e na depleção do estoque de glutathione quando as conjugações são feitas com certos compostos (Parl, F. F., 2005; Guengerich, F. P., 2008), como já abordado na seção que trata do polimorfismo de *GSTT1<sub>null</sub>* e o ensaio cometa, podendo apresentar resultados diametralmente opostos, dependendo do tipo de exposição, idade e hábitos do grupo investigado.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Os dados analisados nesta dissertação permitem concluir que ainda que os pacientes acometidos pela DPOC apresentem índices elevados de dano no DNA, provavelmente oriundos do processo inflamatório crônico (causado tanto por fatores endógenos como exógenos), este dano não é perpetuado na forma de eventos clastogênicos, seja pela reparação eficiente das lesões ou pela eliminação das células deletérias através da apoptose. Os polimorfismos parecem apresentar efeito modulatório unicamente nos índices de dano e, algumas vezes, é exclusivo dos pacientes ou controles. Ainda assim, nenhum dos polimorfismos parece conferir risco adicional especificamente para o desenvolvimento do desfecho DPOC. E, finalmente, embora se tenha constatado que os pacientes que não participam das atividades de reabilitação pulmonar apresentam níveis de peroxidação lipídica maiores e uma tendência a níveis superiores de carbonilação proteica, acredita-se que no caso específico deste trabalho, estes marcadores não sejam os mais apropriados para avaliar o estatus dos pacientes devido a sua extrema labilidade frente às condições fisiológicas dos indivíduos.

### 6.1 Conclusões Específicas

1. As características das populações estudadas diferiram unicamente quanto aos hábitos tabágicos: um número superior de pacientes fumava ou fumou ( $P=0,002$ ), por períodos maiores de 30 anos ( $P=0,020$ ), uma quantidade maior de 20 cigarros por dia ( $P<0,001$ );
2. Todas as frequências dos polimorfismos estudados encontravam-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto *GPx1 Pro198Leu* e as frequências foram condizentes com a maioria dos estudos realizados em populações semelhantes;
3. Não houve diferenças nas frequências dos polimorfismos entre controles e pacientes de DPOC;

4. Pacientes com DPOC apresentam índices de dano superiores aos controles nos cometas alcalino ( $P < 0,001$ ), modificado com a endonuclease Fpg ( $P = 0,0297$ ) e com a Endo III ( $P = 0,0098$ );
5. Em *CYP1A1 C2453A*, os pacientes portadores dos genótipos C/A + A/A apresentam dano superior aos de genótipo C/C da mesma classe, para os cometas alcalino ( $P = 0,012$ ) e modificado com Fpg ( $P = 0,023$ ) e Endo III ( $P = 0,021$ );
6. Em *CYP2E1 C-1053T*, os pacientes homozigotos para o alelo C apresentaram dano superior aos controles de mesmo genótipo nos cometas alcalino ( $P < 0,001$ ), modificado com Fpg ( $P = 0,017$ ) e Endo III ( $P = 0,006$ );
7. Em *GSTM1<sub>null</sub>* os pacientes apresentaram dano superior aos controles no cometa alcalino para ambos os genótipos presente ( $P = 0,011$ ) e nulo ( $P = 0,015$ );
8. Em *GSTT1<sub>null</sub>* os pacientes que possuíam a enzima funcional apresentaram dano superior aos controles de mesmo genótipo nos cometas alcalino ( $P < 0,001$ ), modificado com Fpg ( $P = 0,029$ ) e Endo III ( $P = 0,004$ ), bem como dano superior aos de genótipo ausente no cometa modificado com Fpg ( $P = 0,004$ );
9. Em *GSTP1 Ile105Val*, os pacientes portadores do alelo *Val* apresentaram maior índice de dano no cometa alcalino do que os controles ( $P < 0,001$ );
10. Em *CAT C-262T*, os pacientes homozigotos para o alelo C apresentaram dano superior aos controles de mesmo genótipo nos cometas alcalino ( $P < 0,001$ ), modificado com Fpg ( $P = 0,016$ ) e Endo III ( $P = 0,003$ );
11. Em *GPx1 Pro198Leu*, os pacientes portadores do alelo *Leu* apresentaram dano superior aos controles de mesmo genótipo nos cometas alcalino ( $P < 0,001$ ), modificado com Fpg ( $P = 0,018$ ) e Endo III ( $P = 0,019$ );
12. Não houve diferença entre os marcadores de peroxidação lipídica ( $P = 0,272$ ) e carbonilação proteica ( $P = 0,536$ ) entre controles e pacientes.
13. A prática de exercícios de reabilitação pulmonar parece atuar na redução dos níveis de peroxidação lipídica ( $P < 0,001$ );
14. Não houve diferença nas frequências de formação de micronúcleos de mucosa oral entre controles e pacientes ( $P = 0,651$ ).



15. Nenhum dos polimorfismos estudados apresentou efeito modulatório sobre as frequências de micronúcleos de mucosa oral;

## 7 PERSPECTIVAS

A fim de sedimentar o conhecimento sobre os aspectos do estresse oxidativo/antioxidante na DPOC seria interessante complementar os resultados obtidos nessa investigação das seguintes maneiras:

1. O aumento do número de investigados conferiria maior certeza aos efeitos dos polimorfismos sobre os biomarcadores, especialmente nos alelos mais raros abordados aqui;
2. O acréscimo de um polimorfismo do gene da superóxido-dismutase tornaria mais completo o panorama das enzimas antioxidantes.
3. A avaliação dos níveis de enzimas SOD, CAT e GPx permitiria avaliar o estatus antioxidante dos pacientes, bem como a relação dos níveis dessa enzima com os polimorfismos nos genes correspondentes;
4. Com a inclusão de mais sujeitos na pesquisa, seria possível avaliar os efeitos de conjuntos de genótipos sobre os marcadores ao invés de apenas genótipos isolados;
5. Seria interessante complementar os dados de defesa antioxidante com dados sobre capacidade de reparo e polimorfismos de diferentes vias de reparo destes pacientes.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHISHEK, S. et al. Association of GSTM1 and GSTT1 gene deletions with susceptibility to DNA damage in the pesticide-exposed workers of Punjab. *Rejuvenation Res*, v. 13, n. 2-3, p. 281-4, Apr-Jun, 2010.

ABNET, C. C. et al. The influence of genetic polymorphisms in Ahr, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, GST M1, GST T1 and UGT1A1 on urine 1-hydroxypyrene glucuronide concentrations in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. *Carcinogenesis*, v. 28, n. 1, p. 112-7, Jan, 2007.

AFONSO, A. S. M. et al. COPD in the general population: Prevalence, incidence and survival. *Respiratory Medicine*, v. 105, n. 12, p. 1872-1884, 2011.

AMORIM, L. M. F. et al. Analysis of CYP1A1 exon 7 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene variations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 547, n. 1-2, p. 35-40, 2004.

ANDRADE JÚNIOR, D. R. D. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, p. 60-68, 2005.

ANDROUTSOPOULOS, V.; TSATSAKIS, A.; SPANDIDOS, D. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, v. 9, n. 1, p. 187, 2009.

ANTOGNELLI, C. et al. CYP17, GSTP1, PON1 and GLO1 gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: an Italian case-control study. *BMC Cancer*, v. 9, p. 115, 2009.

AOSHIBA, K. et al. Dna damage as a molecular link in the pathogenesis of copd in smokers. *European Respiratory Journal*, January 20, 2012, 2012.

ARAÚJO, A. J. D. et al. Diretrizes para Cessação do Tabagismo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 30, p. S1-S76, 2004.

ARIF, E. et al. Association of CYP2E1 and NAT2 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Clinica Chimica Acta*, v. 382, n. 1-2, p. 37-42, 2007.

ARMSTRONG, D.; BROWNE, R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol*, v. 366, p. 43-58, 1994.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARTSCH, H. et al. Genetic Polymorphism of CYP Genes, Alone or in Combination, as a Risk Modifier of Tobacco-related Cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 9, n. 1, p. 3-28, January 1, 2000, 2000.

BASTAKI, M. et al. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenet Genomics*, v. 16, n. 4, p. 279-86, Apr, 2006.

BONASSI, S. et al. The HUman MicroNucleus project on exfoLiated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 728, n. 3, p. 88-97, 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2012.

BROZMANOVA, J. et al. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol*, v. 84, n. 12, p. 919-38, Dec, 2010.

BRUSSELLE, G. G.; JOOS, G. F.; BRACKE, K. R. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, v. 378, n. 9795, p. 1015-1026, 2011.

CAMELIER, A. A. et al. Deficiência de alfa-1 antitripsina: diagnóstico e tratamento. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 34, p. 514-527, 2008.

CAMP, P. G.; O'DONNELL, D. E.; POSTMA, D. S. Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Men and Women. *Proceedings of the American Thoracic Society*, v. 6, n. 6, p. 535-538, September 15, 2009, 2009.

CAMPOS, H. S. *Mortalidade por DPOC no Brasil, 1980-1998*. Pulmão RJ. Vol.12, n.4, out-nov-dez, 2003.

CARSTENSEN, U. et al. B- and T-lymphocyte micronuclei in chimney sweeps with respect to genetic polymorphism for CYP1A1 and GST1 (class Mu). *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 289, n. 2, p. 187-195, 1993.

CASCORBI, I.; BROCKMOLLER, J.; ROOTS, I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res*, v. 56, n. 21, p. 4965-9, Nov 1, 1996.

CEYLAN, E. et al. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respiratory Medicine*, v. 100, n. 7, p. 1270-1276, 2006.

CHAKRABORTY, S. et al. Chronic exposures to cholinesterase-inhibiting pesticides adversely affect respiratory health of agricultural workers in India. *J Occup Health*, v. 51, n. 6, p. 488-97, 2009.

CHEN, L. et al. Polymorphisms of GSTT1 and GSTM1 and increased micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes in residents at an e-waste dismantling site in China. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 45, n. 4, p. 490-497, 2010/02/08, 2010.

CHOI, J. Y. et al. Polymorphisms in oxidative stress-related genes are not associated with prostate cancer risk in heavy smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 16, n. 6, p. 1115-20, Jun, 2007.

CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE. National clinical guideline on management of chronic obstructive pulmonary disease in adults in primary and secondary care. *Thorax*, v. 59 Suppl 1, p. 1-232, Feb, 2004.

CIENCEWICKI, J.; TRIVEDI, S.; KLEEBERGER, S. R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol*, v. 122, n. 3, p. 456-68; quiz 469-70, Sep, 2008.

COLOMBO, J. et al. GSTT1, GSTM1 and CYP2E1 genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population. *World J Gastroenterol*, v. 10, n. 9, p. 1240-5, May 1, 2004.

COSTA, C. et al. CXCR3 and CCR5 chemokines in induced sputum from patients with COPD. *Chest*, v. 133, n. 1, p. 26-33, Jan, 2008.

CRAWFORD, A. et al. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene*, n. 0, 2012.

CROFTS, F. et al. Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis*, v. 15, n. 12, p. 2961-2963, December 1, 1994, 1994.

DA SILVA, J. et al. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis*, v. 23, n. 5, p. 415-422, September 1, 2008, 2008.

DAHL, M. et al. Superoxide dismutase 3 polymorphism associated with reduced lung function in two large populations. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 178, n. 9, p. 906-12, Nov 1, 2008.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in molecular medicine*, v. 9, n. 4, p. 169-176, 2003.

DE BOER, W. I. Cytokines and therapy in COPD: a promising combination? *Chest*, v. 121, n. 5 Suppl, p. 209S-218S, May, 2002.

DE OLIVEIRA HIRAGI, C. et al. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three Brazilian population groups. *Genet Mol Biol*, v. 34, n. 1, p. 11-8, Jan, 2011.

DECRAMER, M.; JANSSENS, W.; MIRAVITLLES, M. Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, v. 379, n. 9823, p. 1341-1351, 2012.

DECRAMER, M. et al. COPD as a lung disease with systemic consequences--clinical impact, mechanisms, and potential for early intervention. *COPD*, v. 5, n. 4, p. 235-56, Aug, 2008.

DEMENT, J. M. et al. Airways obstruction among older construction and trade workers at Department of Energy nuclear sites. *Am J Ind Med*, v. 53, n. 3, p. 224-40, Mar, 2010.

DENISON, M. S.; NAGY, S. R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 43, p. 309-34, 2003.

DHILLON, V. S. et al. Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 33-42, January 1, 2011, 2011.

DOLL, R. et al. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ*, v. 328, n. 7455, p. 1519, Jun 26, 2004.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, v. 23, n. 3, p. 191-205, May, 2008.

EARLY, D. S. et al. The association between a functional CYP1A1 polymorphism and colorectal neoplasia risk in post menopausal women. *Dig Dis Sci*, v. 55, n. 10, p. 2965-70, Oct, 2010.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res*, v. 285, n. 1, p. 35-44, Jan, 1993.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 125-132, January 1, 2011, 2011.

FISCHER, B. M.; PAVLISKO, E.; VOYNOW, J. A. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, v. 6, p. 413-21, 2011.

FOGARTY, M. C. et al. Exercise-induced lipid peroxidation: Implications for deoxyribonucleic acid damage and systemic free radical generation. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 52, n. 1, p. 35-42, 2011.

FORSBERG, L. et al. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 30, n. 5, p. 500-505, 2001.

FRITZ, K. S.; PETERSEN, D. R. Exploring the Biology of Lipid Peroxidation-Derived Protein Carbonylation. *Chemical Research in Toxicology*, v. 24, n. 9, p. 1411-1419, 2011/09/19, 2011.

GARCÍA-SUÁSTEGUI, W. A. et al. Seasonal variations in the levels of PAH-DNA adducts in young adults living in Mexico City. *Mutagenesis*, v. 26, n. 3, p. 385-391, May 1, 2011, 2011.

GASPAR, P. et al. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, p. 133-138, 2004.

GODOY, D. V. D. et al. 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*, v. 27, p. 193-198, 2001.

GOLD. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. 2011.

GONTIJO, A.; TICE, R. *Teste do cometa para a detecção de dano no DNA em células individualizadas*. In: RIBEIRO, L. M.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.) *Mutagênese ambiental*, 2003; 1ª ed, Porto Alegre: ULBRA.

GOODSELL, DAVID. *Catalase*. Protein Data Bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=57>>. Acessado em: 14 de março de 2012.

GUECHEVA, T. N.; HENRIQUES, J.A.P. Metabolismo de Xenobióticos: Citocromo P-450. In: *Genética Toxicológica*, 2003. 1ª ed. Porto Alegre: Alcance (ed).

GUENGERICH, F. P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*, v. 14, n. 6, p. 611-50, Jun, 2001.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, v. 21, n. 1, p. 70-83, 2008/01/01, 2008.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, v. 344, n. 8924, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J.M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ª ed., New York: Oxford University Press, 2007.

HALPIN, D. M.; TASHKIN, D. P. Defining disease modification in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*, v. 6, n. 3, p. 211-25, Jun, 2009.

HAMANISHI, T. et al. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and



risk of macrovascular diseases in japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes*, v. 53, n. 9, p. 2455-60, Sep, 2004.

HANTA, I. et al. Oxidant–Antioxidant Balance in Patients with COPD. *Lung*, v. 184, n. 2, p. 51-55, 2006.

HART, J. E. et al. Chronic obstructive pulmonary disease mortality in railroad workers. *Occup Environ Med*, v. 66, n. 4, p. 221-6, Apr, 2009.

HAUG, U. et al. Glutathione peroxidase tagSNPs: Associations with rectal cancer but not with colon cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, Feb 27, 2012.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 45, n. 1, p. 51-88, 2005.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 30, n. 6, p. 445-600, 1995.

HECHT, S. S. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 424, n. 1-2, p. 127-142, 1999.

HO, J. C. et al. Manganese Superoxide Dismutase and Catalase Genetic Polymorphisms, Activity Levels, and Lung Cancer Risk in Chinese in Hong Kong. *Journal of Thoracic Oncology*, v. 1, n. 7, p. 648-653, 2006.

HOGG, J. C. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 350, p. 2645-2653, 2004.

HOLLAND, N. et al. 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/Reviews in Mutation Research*, v. 659, n. 1-2, p. 93-108, 2008.

HU, X. et al. Activity of Four Allelic Forms of Glutathione S-Transferase hGSTP1-1 for Diol Epoxides of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 238, n. 2, p. 397-402, 1997.

HU, Y. J.; DIAMOND, A. M. Role of Glutathione Peroxidase 1 in Breast Cancer. *Cancer Research*, v. 63, n. 12, p. 3347-3351, June 15, 2003, 2003.

HUANG, M. F.; LIN, W. L.; MA, Y. C. A study of reactive oxygen species in mainstream of cigarette. *Indoor Air*, v. 15, n. 2, p. 135-140, 2005.

HUANG, Y.-C. et al. p-Phenylenediamine induced DNA damage in SV-40 immortalized human uroepithelial cells and expression of mutant p53 and COX-2 proteins. *Toxicology Letters*, v. 170, n. 2, p. 116-123, 2007.

HUMAN CYTOCHROME P450 (CYP) ALLELE NOMENCLATURE DATABASE. Disponível em: <http://www.cypalleles.ki.se/>, acessado em março de 2012.

IARMARCOVAI, G. et al. A combined analysis of XRCC1, XRCC3, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and centromere content of micronuclei in welders. *Mutagenesis*, v. 21, n. 2, p. 159-165, March 2006, 2006.

ICHIMURA, Y. et al. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J Urol*, v. 172, n. 2, p. 728-32, Aug, 2004.

IHSAN, R. et al. Multiple Analytical Approaches Reveal Distinct Gene-Environment Interactions in Smokers and Non Smokers in Lung Cancer. *PLoS One*, v. 6, n. 12, p. e29431, 2011.

IRFAN, R. Pharmacological antioxidant strategies as therapeutic interventions for COPD. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, n. 0, 2011.

JAKOBY, W. B.; ZIEGLER, D. M. The enzymes of detoxication. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, n. 34, p. 20715-8, December 5, 1990, 1990.

JANCIAUSKIENE, S. M. et al. The discovery of alpha1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med*, v. 105, n. 8, p. 1129-39, Aug, 2011.

JIANG, S. et al. Genomic damages in peripheral blood lymphocytes and association with polymorphisms of three glutathione S-transferases in workers exposed to formaldehyde. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 695, n. 1-2, p. 9-15, 2010.

KANAZAWA, H.; YOSHIKAWA, J. Elevated oxidative stress and reciprocal reduction of vascular endothelial growth factor levels with severity of COPD. *Chest*, v. 128, n. 5, p. 3191-7, Nov, 2005.

KARAM, R. A. et al. Impact of glutathione-S-transferase gene polymorphisms on enzyme activity, lung function and bronchial asthma susceptibility in Egyptian children. *Gene*, n. 0, 2012.

KOH, W. P. et al. Glutathione S-transferase (GST) gene polymorphisms, cigarette smoking and colorectal cancer risk among Chinese in Singapore. *Carcinogenesis*, v. 32, n. 10, p. 1507-11, Oct, 2011.

KRAJINOVIC, M. et al. Genetic susceptibility to breast cancer in French-Canadians: Role of carcinogen-metabolizing enzymes and gene-environment interactions. *International Journal of Cancer*, v. 92, n. 2, p. 220-225, 2001.

KUCUKGERGIN, C. et al. Association between genetic variants in glutathione peroxidase 1 (GPx1) gene, GPx activity and the risk of prostate cancer. *Minerva Urol Nefrol*, v. 63, n. 3, p. 183-90, Sep, 2011.

LAIZO, A. [Chronic obstructive pulmonary disease - a review]. *Rev Port Pneumol*, v. 15, n. 6, p. 1157-66, Nov-Dec, 2009.

LAKHDAR, R. et al. Combined analysis of EPHX1, GSTP1, GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms in relation to chronic obstructive pulmonary disease risk and lung function impairment. *Dis Markers*, v. 30, n. 5, p. 253-63, 2011.

LEE, M.-S.; SU, L.; CHRISTIANI, D. C. Synergistic Effects of NAT2 slow and GSTM1 null Genotypes on Carcinogen DNA Damage in the Lung. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 19, n. 6, p. 1492-1497, June 1, 2010, 2010.

LEI, C. et al. Interaction of glutathione peroxidase-1 and selenium in endemic dilated cardiomyopathy. *Clin Chim Acta*, v. 399, n. 1-2, p. 102-8, Jan, 2009.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, v. 186, p. 464-78, 1990.

LIGHTFOOT, T. et al. Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, v. 91, n. 9, p. 1222-1227, 2006 Sep, 2006.

LIU, G. High mobility group protein-1 inhibits phagocytosis of apoptotic neutrophils through binding to phosphatidylserine. *J. Immunol.*, v. 181, p. 4240-4246, 2008.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, v. 15, n. 7, p. 1957-97, Oct 1, 2011.

LUDOVICI, M. et al. Benzo(a)pyrene Diolepoxide (BPDE)-DNA Adduct Levels in Leukocytes of Smokers in Relation to Polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 13, n. 8, p. 1342-1348, August 1, 2004, 2004.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*, v. 380, n. 1-2, p. 50-58, 2007.

MACNEE, W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, v. 2, n. 4, p. 258-66; discussion 290-1, 2005a.

MACNEE, W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, v. 2, n. 1, p. 50-60, 2005b.

MACNEE, W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*, v. 28, n. 3, p. 479-513, v, Sep, 2007.

MAK, J. C. et al. Polymorphisms in manganese superoxide dismutase and catalase genes: functional study in Hong Kong Chinese asthma patients. *Clin Exp Allergy*, v. 36, n. 4, p. 440-7, Apr, 2006.

MALLING, T. H. et al. Sex determines the influence of smoking and gene polymorphism on glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Scand J Clin Lab Invest*, v. 69, n. 2, p. 295-302, 2009.

MALUF, S. W. et al. DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 626, n. 1-2, p. 180-184, 2007.

MAN, W. D. et al. Community pulmonary rehabilitation after hospitalisation for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: randomised controlled study. *BMJ*, v. 329, n. 7476, p. 1209, Nov 20, 2004.

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

MANNINO D.M.; BRAMAN S. The epidemiology and economics of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2007; 4(7):502-506.

MASETTI, S. et al. Interactive effect of the glutathione S-transferase genes and cigarette smoking on occurrence and severity of coronary artery risk. *J Mol Med (Berl)*, v. 81, n. 8, p. 488-94, Aug, 2003.

MCCARTY, K. M. et al. PAH-DNA Adducts, Cigarette Smoking, *GST* Polymorphisms, and Breast Cancer Risk. *Environ Health Perspect*, v. 117, n. 4, 2008.

MCGRATH, M.; HANKINSON, S. E.; DE VIVO, I. Cytochrome P450 1A1, cigarette smoking, and risk of endometrial cancer (United States). *Cancer Causes Control*, v. 18, n. 10, p. 1123-30, Dec, 2007.

MELÉN, E. et al. Interactions between Glutathione *S*-Transferase P1, Tumor Necrosis Factor, and Traffic-Related Air Pollution for Development of Childhood Allergic Disease. *Environ Health Perspect*, v. 116, n. 8, 2008.

MENEZES, A. M. B. et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in São Paulo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 21, p. 1565-1573, 2005.

MERCKEN, E. M. et al. Rehabilitation Decreases Exercise-induced Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 172, n. 8, p. 994-1001, October 15, 2005, 2005.

MESIA-VELA, S. et al. Plasma carbonyls do not correlate with lung function or computed tomography measures of lung density in older smokers. *Biomarkers*, v. 13, n. 4, p. 422-34, Jun, 2008.

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Evidence for an association between haptoglobin and MnSOD (Val9Ala) gene polymorphisms in essential hypertension based on a Brazilian case-control study. *Genet Mol Res*, v. 9, n. 4, p. 2166-75, 2010.

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

MOERLOOSE, K. B.; PAUWELS, R. A.; JOOS, G. F. Short-term cigarette smoke exposure enhances allergic airway inflammation in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 172, p. 168-172, 2005.

MONTELLANO, P. R. O. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 3a. edição, 2005.

MUÑOZ, B. et al. The relationship among IL-13, GSTP1, and CYP1A1 polymorphisms and environmental tobacco smoke in a population of children with asthma in Northern Mexico. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 33, n. 2, p. 226-232, 2012.

NADEEM, A.; RAJ, H.; CHHABRA, S. Increased Oxidative Stress and Altered Levels of Antioxidants in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Inflammation*, v. 29, n. 1, p. 23-32, 2005.

NADIF, R. et al. Association of CAT polymorphisms with catalase activity and exposure to environmental oxidative stimuli. *Free Radic Res*, v. 39, n. 12, p. 1345-50, Dec, 2005.

NISHIMOTO, I. N. et al. Cytochrome P450 2E1 Polymorphism in Gastric Cancer in Brazil: Case-Control Studies of Japanese Brazilians and Non-Japanese Brazilians. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 9, n. 7, p. 675-680, July 1, 2000, 2000.

NUSSBAUMER-OCHSNER, Y.; RABE, K. F. Systemic Manifestations of COPD. *Chest*, v. 139, n. 1, p. 165-173, January 1, 2011, 2011.

OLIVEIRA, J. C. A. et al. PROJETO DIRETRIZES. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. *Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica*. 2001. Disponível em [www.amb.org.br/projeto\\_diretrizes](http://www.amb.org.br/projeto_diretrizes).

OLVERA-BELLO, A. E. et al. Susceptibility to the cytogenetic effects of dichloromethane is related to the glutathione S-transferase theta phenotype. *Toxicol Lett*, v. 199, n. 3, p. 218-24, Dec 15, 2010.

PARL, F. F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Letters*, v. 221, n. 2, p. 123-129, 2005.

PAULIN, E.; BRUNETTO, A. F.; CARVALHO, C. R. F. Efeitos de programa de exercícios físicos direcionado ao aumento da mobilidade torácica em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica. *Jornal de Pneumologia*, v. 29, p. 287-294, 2003.

PAVANELLO, S.; CLONFERO, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 463, n. 3, p. 285-308, 2000.

PEREIRA, C. A. D. C.; SATO, T.; RODRIGUES, S. C. Novos valores de referência para espirometria forçada em brasileiros adultos de raça branca. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 33, p. 397-406, 2007.

POMMIER, Y. et al. Different Effects on Human Topoisomerase I by Minor Groove and Intercalated Deoxyguanosine Adducts Derived from Two Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Diol Epoxides at or Near a Normal Cleavage Site. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 16, p. 13666-13672, April 19, 2002, 2002.

PRYOR, W. A.; STONE, K. Oxidants in Cigarette Smoke Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 686, n. 1, p. 12-27, 1993.

RAASCHOU-NIELSEN, O. et al. GPX1 Pro198Leu polymorphism, interactions with smoking and alcohol consumption, and risk for lung cancer. *Cancer Lett*, v. 247, n. 2, p. 293-300, Mar 18, 2007.

RABE, K. F. et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 176, n. 6, p. 532-555, September 15, 2007, 2007.

RAHMAN, I. et al. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 154, n. 4, p. 1055-60, October 1, 1996, 1996.

RAM, F. S. et al. Hospital at home for patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: systematic review of evidence. *BMJ*, v. 329, n. 7461, p. 315, Aug 7, 2004.

REID, P. T.; SALLENAVE, J. M. Cytokines in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Pharm Des*, v. 9, n. 1, p. 25-38, 2003.

RENNARD, S. I.; VESTBO, J. COPD: the dangerous underestimate of 15%. *The Lancet*, v. 367, n. 9518, p. 1216-1219, 2006.

REPINE, J. et al. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 156, n. 2, p. 341-357, August 1, 1997, 1997.

REZNICK, A. Z. et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem J*, v. 286 ( Pt 2), p. 607-11, Sep 1, 1992.

RHEE, S. G. et al. Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal*, v. 7, n. 5-6, p. 619-26, May-Jun, 2005.

RICHARDSON, T. A.; MORGAN, E. T. Hepatic Cytochrome P450 Gene Regulation during Endotoxin-Induced Inflammation in Nuclear Receptor Knockout Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 314, n. 2, p. 703-709, August 1, 2005, 2005.

ROMIEU, I. et al. GSTM1 and GSTP1 and respiratory health in asthmatic children exposed to ozone. *European Respiratory Journal*, v. 28, n. 5, p. 953-959, November 1, 2006, 2006.

ROUISSI, K. et al. Smoking and Polymorphisms in Xenobiotic Metabolism and DNA Repair Genes are Additive Risk Factors Affecting Bladder Cancer in Northern Tunisia. *Pathology & Oncology Research*, v. 17, n. 4, p. 879-886, 2011.

RUFINO, R.; SILVA, J. R. L. E. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 32, p. 241-248, 2006.

SAN JOSE, C. et al. CYP1A1 gene polymorphisms increase lung cancer risk in a high-incidence region of Spain: a case control study. *BMC Cancer*, v. 10, n. 1, p. 463, 2010.

SÁNCHEZ-GUERRA, M. et al. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 742, n. 1-2, p. 66-71, 2012.

SANTOS, M. C. et al. Systemic markers of the redox balance in chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers*, v. 9, n. 6, p. 461-9, Nov-Dec, 2004.



SCHMIDT, M. I. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *The Lancet*, v. 377, n. 9781, p. 1949-1961, 2011.

SCHWARZ, D. et al. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis*, v. 22, n. 3, p. 453-459, March 1, 2001, 2001.

SIN, D. D. et al. Understanding the Biological Differences in Susceptibility to Chronic Obstructive Pulmonary Disease between Men and Women. *Proceedings of the American Thoracic Society*, v. 4, n. 8, p. 671-674, December 1, 2007, 2007.

SIU, P. M. et al. Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. *Experimental Physiology*, v. 96, n. 9, p. 889-906, September 1, 2011, 2011.

SKYBA, P. et al. Nutritional status in relation to respiratory impairment and systemic inflammation in patients with acute exacerbations of COPD. *Med Sci Monit*, v. 15, n. 10, p. CR528-533, Oct, 2009.

SMITH, C. J.; HANSCH, C. The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate. *Food and Chemical Toxicology*, v. 38, n. 7, p. 637-646, 2000.

SOMMER, A. et al. Smoking, the xenobiotic pathway, and clubfoot. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, v. 91, n. 1, p. 20-8, Jan, 2011.

SOUSA, C. A. D. et al. Doença pulmonar obstrutiva crônica e fatores associados em São Paulo, SP, 2008-2009. *Revista de Saúde Pública*, v. 45, p. 887-896, 2011.

STAMPFLI, M. R.; ANDERSON, G. P. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*, v. 9, n. 5, p. 377-384, 2009.

STOCKLEY, R. A.; MANNINO, D.; BARNES, P. J. Burden and Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, v. 6, n. 6, p. 524-526, September 15, 2009, 2009.

STRANGE, R. C. et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 482, n. 1-2, p. 21-26, 2001.

SUZEN, H. S. et al. CAT C-262T and GPX1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population. *Mol Biol Rep*, v. 37, n. 1, p. 87-92, Jan, 2010.

TEIXEIRA, J. P. et al. Occupational exposure to styrene: modulation of cytogenetic damage and levels of urinary metabolites of styrene by polymorphisms in genes CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1. *Toxicology*, v. 195, n. 2-3, p. 231-242, 2004.

TESTA, A. et al. A multi-biomarker analysis of DNA damage in automobile painters. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 46, n. 3, p. 182-188, 2005.

THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat. Protocols*, v. 4, n. 6, p. 825-837, 2009.

TITENKO-HOLLAND, N.; MOORE, L. E.; SMITH, M. T. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat Res*, v. 312, n. 1, p. 39-50, Feb, 1994.

TITENKO-HOLLAND, N. et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutat Res*, v. 388, n. 1, p. 85-95, Jan 15, 1997.

TORRES-RAMOS, Y. D. et al. Correlation of Plasma Protein Carbonyls and C-Reactive Protein with GOLD Stage Progression in COPD Patients. *Open Respir Med J*, v. 3, p. 61-6, 2009.

VIBHUTI, A. et al. Genetic polymorphisms of GSTP1 and mEPHX correlate with oxidative stress markers and lung function in COPD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 359, n. 1, p. 136-142, 2007.

VIBHUTI, A. et al. CYP1A1, CYP1A2 and CYBA gene polymorphisms associated with oxidative stress in COPD. *Clinica Chimica Acta*, v. 411, n. 7-8, p. 474-480, 2010.

VINEIS, P. et al. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ*, v. 330, n. 7486, p. 277, Feb 5, 2005.

WATANABE, J.; HAYASHI, S.-I.; KAWAJIRI, K. Different Regulation and Expression of the Human CYP2E1 Gene Due to the RsaI Polymorphism in the 5'-Flanking Region. *Journal of Biochemistry*, v. 116, n. 2, p. 321-326, August 1, 1994, 1994.

WATSON, M. A. et al. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, v. 19, n. 2, p. 275-280, February 1, 1998, 1998.

WEDZICHA, J. A. Exacerbations: etiology and pathophysiologic mechanisms. *Chest*, v. 121, n. 5 Suppl, p. 136S-141S, May, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *World Health Statistics*. WHO, 2008. pp 30.

WLODARCZYK, M.; NOWICKA, G. Common polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 and XPD genes and endogenous DNA damage. *Molecular Biology Reports*, p. 1-6, 2011.

WOUTERS, E. F. et al. Systemic and local inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: is there a connection? *Proc Am Thorac Soc*, v. 6, n. 8, p. 638-47, Dec, 2009.

WRIGHT, C. M. et al. Genetic association study of CYP1A1 polymorphisms identifies risk haplotypes in nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Journal*, v. 35, n. 1, p. 152-159, January 1, 2010, 2010.

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*, v. 108, p. 101-6, 1998.

ZIMNIAK, P. et al. Naturally Occurring Human Glutathione S-transferase GSTP1-1 Isoforms with Isoleucine and Valine in Position 104 Differ in Enzymic Properties. *European Journal of Biochemistry*, v. 224, n. 3, p. 893-899, 1994.

ZOTOVA, E. V. et al. [Search for the association of polymorphic markers for genes coding for antioxidant defense enzymes, with development of diabetic polyneuropathies in patients with type 1 diabetes mellitus]. *Mol Biol (Mosk)*, v. 38, n. 2, p. 244-9, Mar-Apr, 2004.

## 9 ANEXOS

### **Anexo A -Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido**

#### **AOS PARTICIPANTES**

**Este é um documento importante. Por favor, leia-o com atenção. Ele contém as informações necessárias para você em relação a este projeto. Se aceitar participar deste projeto, você deverá assinar este consentimento. Sua assinatura significa que foi informado (a) da natureza do projeto e que você concorda em participar.**

Título da pesquisa: LESÃO OXIDATIVA E PERFIS GENÉTICOS NA FISIOPATOGENIA DA DPOC

Quando você tem uma doença pulmonar obstrutiva crônica – DPOC (bronquite e enfisema) haverá presença de secreção brônquica, ou seja, “catarro”, falta de ar ao esforço e tosse, devido à destruição do tecido pulmonar. Esta doença é principalmente causada pelo cigarro e é irreversível, podendo levar a incapacidade física e diminuição da qualidade de vida, sendo necessário tratamento hospitalar prolongado e uso de oxigênio em casa e no agravamento da doença. Para melhorarmos o tratamento ao portador de DPOC é necessário que se conheçam quais são as alterações fisiológicas apresentadas pelos pacientes. Desta forma, para evitar a progressão e agravamentos da doença, a ciência vem estudando as alterações ocorridas no DNA retirado das células do sangue. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa é caracterizar as alterações ocorridas no DNA dos portadores de DPOC e compará-los com o DNA de sujeitos não fumantes e fumantes, porém sem doença pulmonar. O estudo será realizado na região de Santa Cruz do Sul/RS, terá 04 anos de duração.

Todos os pacientes que aceitarem participar do trabalho deverão fazer coleta de sangue venoso, que será realizada por profissional qualificado integrante desta pesquisa, com material adequado e esterilizado, sem custos para o participante. Sendo assim, os benefícios que você pode obter com este estudo relaciona-se com o

maior conhecimento sobre a doença para propor um tratamento seguro que possa bloquear a sua evolução e melhorar sua prevenção.

É importante ressaltar que riscos existem, embora sejam pequenos, e neste caso, uma descoberta antecipada das possíveis alterações fisiopatogênicas pode ser vantajoso para uma intervenção precoce e precisa. Talvez o risco maior fosse o desconforto da coleta de sangue com possibilidade de pequeno hematoma doloroso, e para evitar que isto aconteça na pesquisa será usado um equipamento adequado e profissional habilitado para coleta.

Ressaltamos também que a concordância em participar deste estudo não implica necessariamente em qualquer modificação no tratamento clínico e medicamentoso que já está sendo feito, salvo em casos de real necessidade de alteração do mesmo e com autorização do seu médico responsável. Neste caso, você terá a garantia de resposta a qualquer pergunta, bem como acesso aos testes e avaliações realizadas. Ainda, não terá nenhuma remuneração por participar desta pesquisa, terá a liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si.

Este estudo obedece a Resolução 196 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, no que se refere ao sigilo profissional e direito de privacidade do paciente.

Eu, .....(paciente ou responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito do tratamento recebido e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A Dra Andréa Lúcia Gonçalves da Silva, pesquisadora responsável, certificou-me de que todos os dados desta pesquisa referentes à minha pessoa serão confidenciais, bem como o meu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face destas informações.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar a Dra Andréa Lúcia Gonçalves da Silva, pesquisadora responsável, no telefone 85390847 ou 37153915.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido.

---

Assinatura do Paciente

---

Data

---

Nome

\_\_\_\_\_

Pesquisadora:

\_\_\_\_\_

Data

Este formulário foi lido para \_\_\_\_\_ (nome do paciente) em -----  
-/ -----/ ----- por \_\_\_\_\_ enquanto eu estava presente.

\_\_\_\_\_

Assinatura de testemunha

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

Nome

**Anexo B** – Questionário das Características sócio-demográficas e clínicas dos integrantes.

Nº: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Fone: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Gênero: ( ) Masculino ( ) Feminino

2. Etnia: ( ) Branca ( ) Negra ( ) Parda ( ) Outro Qual? \_\_\_\_\_

3. Estado Civil: ( ) Solteiro(a) ( ) Casado(a) ( ) Viúvo(a) ( ) Separado(a)

4. Escolaridade:

( ) Analfabeto ( ) Ensino fundamental incompleto ( ) Ensino fundamental completo

( ) Ensino médio incompleto ( ) Ensino médio completo

( ) Ensino superior incompleto ( ) Ensino superior completo

5. Ocupação (*Obs: Se aposentado, citar sua última atividade*):

\_\_\_\_\_

6. Qual a sua renda familiar? *Atenção: some todos os salários brutos (sem deduções) dos membros da sua família que trabalham que estejam morando em sua casa. Inclua o seu salário, caso você trabalhe. Se for casado(a), refira-se à sua própria família.*

( ) Até 2 salários mínimos ( ) De 2 a 4 salários mínimos

( ) De 4 a 6 salários mínimos ( ) De 6 a 10 salários mínimos

( ) de 10 a 15 salários mínimos ( ) Mais de 15 salários mínimos

7. Qual o número total dos membros da sua família que dependem da renda familiar?

Um     Dois     Três     Quatro     Cincos     Mais de cinco

8. Qual o número de cômodos (peças) em sua casa?

Um     Dois     Três     Quatro     Cincos     Mais de cinco

9. Você é fumante atualmente?  Sim  Não

10. Já fumou?  Sim  Não

11. Fumou por quanto tempo? \_\_\_\_\_

12. Há quanto tempo parou de fumar? \_\_\_\_\_

13. Que tipo de cigarro você fuma ou fumava?

Cigarro com filtro     Cigarro sem filtro     Palheiro     Cachimbo

Charuto     Todas as opções     Outro. Qual? \_\_\_\_\_

14. Quantos cigarros você fuma(ava) por dia? \_\_\_\_\_

15. Há quanto tempo você tem DPOC? \_\_\_\_\_

16. Alguém de sua família tem ou teve DPOC?  Sim  Não  Não sei

17. Você teve algum tipo de doença respiratória na infância?

Sim. Qual? \_\_\_\_\_  Não

18. Você usa medicamentos para tratar a DPOC?

Sim. Quais? \_\_\_\_\_  Não

19. Você usa algum outro medicamento por conta própria?

Sim. Quais? \_\_\_\_\_  Não

20. Você utiliza medicamentos?

Sim. Quais? \_\_\_\_\_  Não



21. Você realiza oxigenoterapia?  Sim  Não
22. Você realiza alguma terapia alternativa?
- Sim. Qual? \_\_\_\_\_  Não
23. Você apresenta alguma comorbidade ( Ex: Diabetes, hipertensão, Imunodepressão, hepatite, HIV Positivo, etc.)?
- Sim. Qual? \_\_\_\_\_  Não
24. Você teve hospitalizado recentemente?  Não  Sim Quando? \_\_\_\_\_
25. Grau de Dispneia (falta de ar):  Leve  Moderada  Grave  Muito Grave
26. O que você costuma fazer no seu dia-a-dia que envolva esforço físico?
- Nada (Sedentário)  Pouca atividade física (Pequeno nível de esforço físico)
- Atividade Moderada (esforço médio)  Atividade com grande nível de esforço físico
27. Horas trabalhadas por dia que envolva esforço físico:
- Menos de 6h  De 6 a 8h  Mais de 8h
28. Caminha para o trabalho ou para fazer suas atividades diárias (ir no banco, fazer compras)?  Sim  Não
29. Pratica exercício físico regularmente, por pelo menos 30 minutos, no mínimo 2 vezes por semana?  Sim  Não
30. Frequência de sua atividade física?
- Diariamente  1 vez por semana  2 vezes por semana
- 3 vezes na semana  Mais de 3 vezes por semana
31. Tempo médio gasto em cada sessão de exercício físico?
- Menos de 1 hora  De 1 a 2 horas  Mais de 2 horas

32. Descreva o tipo de seu exercício físico regular:

- Caminhada     Corrida     Anda de bicicleta     Exercícios musculares localizados  
 Natação     Esportes coletivos     Dança, ginástica aeróbica

33. Avaliação Antropométrica

Data ...../...../.....

**Peso Kg :** \_\_\_\_\_ **Estatura(m):** \_\_\_\_\_ **IMC=** \_\_\_\_\_

## ANEXO C

**Tabela 16:** Resumo dos resultados obtidos sobre a modulação dos polimorfismos investigados sobre os índices de dano do ensaio cometa.

Polimorfismo	Genótipo	Grupos Comparados	ID Cometa Alcalino	ID Cometa Fpg	ID Cometa Endo III
<b><i>CYP1A1</i></b> <b><i>C2453A</i></b>	<i>C/A + A/A</i>	DPOC <i>C/A + A/A</i> x DPOC <i>C/C</i>	↑	↑	↑
<b><i>CYP2E1 C-</i></b> <b><i>1053T</i></b>	<i>C/C</i>	DPOC <i>C/C</i> x Controles <i>C/C</i>	↑	↑	↑
<b><i>GSTM1 null</i></b>	<i>presente</i>	DPOC <i>presente</i> x Controles <i>presente</i>	↑	-	-
	<i>ausente</i>	DPOC <i>ausente</i> x Controles <i>ausente</i>	↑	-	-
<b><i>GSTT1 null</i></b>	<i>presente</i>	DPOC <i>presente</i> x Controles <i>presente</i>	↑	↑	↑
	<i>presente</i>	DPOC <i>presente</i> x DPOC <i>ausente</i>	-	↑	-
<b><i>GSTP1</i></b> <b><i>Ile105Val</i></b>	<i>Ile/Val + Val/Val</i>	DPOC <i>Ile/Val + Val/Val</i> x Controles <i>Ile/Val + Val/Val</i>	↑	-	-
<b><i>CAT C-262T</i></b>	<i>C/C</i>	DPOC <i>C/C</i> x Controles <i>C/C</i>	↑	↑	↑
<b><i>GPx1</i></b> <b><i>Pro198Leu</i></b>	<i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>	DPOC <i>Pro/Leu + Leu/Leu</i> x Controles <i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>	↑	↑	↑