

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA E FARMÁCIA

CURSO DE FARMÁCIA

AVALIAÇÃO DE DANOS NO DNA DE PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO

Daiana Nunes da Rosa

Santa Cruz do Sul

2016

Daiana Nunes da Rosa

AVALIAÇÃO DE DANOS NO DNA DE PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO

Trabalho de conclusão apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lia Gonçalves Possuelo

Coorientadora: Prof^a. Dr^aa Andréia Rosane de Moura Valim

Santa Cruz o Sul

2016

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente à minha mãe, Ana Clarice, e ao meu pai, Claudemiro, por me disponibilizarem a oportunidade de cursar o ensino superior, mesmo com as dificuldades enfrentadas até o término desta conclusão, pelo apoio incondicional, a compreensão por não poder ir para casa visitá-lo nos únicos dias disponíveis para voltar para casa, enfim, por serem meu alicerce e minha maior torcida, amo vocês. Aos meus irmãos, Michele e Paulo Renato, que mesmo com a distância influenciaram-me na conclusão. Pelo apoio, amor e força para encarar cada dificuldade impostas até o momento, palavras amigas e animadoras para cessar lágrimas derramadas em momentos de apreensão através de ligações, agradeço à minha amiga Sandra.

Um agradecimento especial ao meu noivo, Filipe Silveira, que compartilhou comigo momentos de *stress*, e acalmou, tranquilizou, me apoiou e me incentivou muito para a conclusão deste trabalho. Ajudou-me no desenvolvimento deste com o seu conhecimento e olhar crítico, assim como compreendeu o descumprimento de compromissos planejados anteriormente. Foi um verdadeiro companheiro de vida. Agradeço também aos meus sogros, Eva e João Paulo, pelo apoio moral, carinho, e ajuda disponibilizados.

Muito obrigada também à minha orientadora, Dra Lia Possuelo, e minha coorientadora, Dra Andréia Valim, que em meio a tantos compromissos conseguiram algumas horas para me receber e orientar com atenção. Obrigada pelas correções e suporte necessário.

Quanto aos colegas de pesquisa, além de me ajudarem no crescimento pessoal e profissional, agradeço à Maribel Bressiani e Augusto Weber, que me ajudaram na realização da metodologia realizada, me ouviram e me também ajudaram a escrever este trabalho. A professora Andrea Gonçalves que também está envolvida nesta pesquisa. A Cássia Goulart que disponibilizou seu tempo em me ajudar com a análise estatística e me recebeu em sua casa para que pudéssemos concluir esta análise.

Sem cada um destas pessoas não seria possível à realização deste trabalho, pois cada um me influenciou e motivou de alguma maneira que me impulsionasse ao fim. Muito obrigada a todos!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Taxas de mortalidade por câncer de brônquios e pulmões, brutas e ajustadas por idade, pelas populações mundial e brasileira de 2010, por 100.000 homens, Rio Grande do Sul, entre 2011 e 2013	15
Figura 2 – Taxas de mortalidade por câncer de brônquios e pulmões, brutas e ajustadas por idade, pelas populações mundial e brasileira de 2010, por 100.000 mulheres, Rio Grande do Sul, entre 2011 e 2013	16
Figura 3 – Processo de delineamento experimental realizado na pesquisa	26
Figura 4 – Mapa representativo da região do Vale do Rio Parto e Vale do Taquari, onde foi o local da pesquisa	27
Figura 5 – Imagem Microscópica de linfócitos humanos representando a diferenciação de danos	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Classificação da extensão tumoral para o CPPC	19
Tabela 2– Classificação NTM para o Câncer de Pulmão	20
Tabela 3– Estágio Patológico em subgrupos	21
Tabela 4– Características dos Sujeitos da Pesquisa	32
Tabela 5– Média do índice de dano (ID) observada no Ensaio Cometa Alcalino e Cinética de Reparo de acordo com o tipo de quimioterápico usado pelos pacientes	35

LISTA DE ABREVIATURAS

COI	Centro de Oncologia Integrado
CP	Câncer de Pulmão
CPCNP	Câncer de Pulmão de Não-Pequenas Células
CPPC	Câncer de Pulmão de Pequenas Células
DR	Dano Residual
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EC	Ensaio Cometa
ID	Índice de Dano
ID ALC	Índice de Dano Alcalino
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MMS	Metilmetano Sulfonato
RL	Radicais Livres
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T60'	Tempo 60 minutos
T180'	Tempo 80 minutos
UNISC	Universidade de Santa Cruz do Sul

RESUMO

Introdução: O câncer de pulmão é a neoplasia que ocorre em grande quantidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento, maioria em homens, mas apresenta-se em fase crescente em mulheres. A ocorrência pode ser por incapacidade de reparação de danos ocasionados a célula ou por acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Estes metabólitos ocasionam danos ao DNA que podem ser mensurados através do ensaio cometa. O Ensaio Cometa Alcalino é um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos no DNA de forma quantitativa induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. O dano é visualizado individualmente na célula através do aumento da migração do material genético. **Objetivos:** Comparar o nível de dano no DNA e a capacidade de reparação entre pacientes com câncer de pulmão e sem câncer de pulmão e a relacionar do nível de dano com o tipo de terapia. **Métodos:** Foi obtido a amostras de linfócitos de pacientes com câncer de pulmão em tratamento no de Oncologia Integrado no Hospital Ana Nery e indivíduos controles que faziam parte de grupos de terceira idade no município de Santa Cruz do Sul – RS. Realizou-se o ensaio do cometa com base na coloração da prata. Cem células por indivíduo foram visualmente examinadas para determinar danos de DNA. Foram considerados significativos resultados com $p < 0.05$, quando realizado análise de variância (ANOVA) com o *teste post-hoc* de Tukey. **Resultados:** Foi observado o predomínio do sexo masculino (68,8% CP e 55,6% controles), com idade adulta avançada ($65,4 \pm 6,77$ câncer de pulmão e $56,67 \pm 14,95$ controles), e de sujeitos de cor branca em ambos os grupos (78,1% câncer de pulmão e 100% controles). Vale ressaltar que os pacientes com câncer de pulmão relataram ter alta carga tabágica (93,2%) e por longo tempo em comparação com os controles (7,7%). É possível verificar que os controles possuem maior escolaridade. Relacionado aos danos no DNA, os pacientes com câncer de pulmão possuem índice de dano maior que controles. A classe terapêutica de antimetabólicos foi a que mostrou significância no índice de dano alcalino, tempo 60', tempo 180' ($p = 0.005$; $p = 0.053$; $p = 0.033$) quando comparado aos sujeitos controles da pesquisa, seguido do grupo que utilizou a associação de inibidor da topoisomerase II e alquilante ($p = 0.027$) no índice de dano alcalino, e o grupo usuário de antimitótico associado com alquilante no tempo 180' ($p = 0.031$), mostrando que estes podem ser mais prejudiciais ao DNA das células. **Conclusão:** Algumas classes terapêuticas de quimioterápicos apresentam mais danos ao DNA do que outras e que os pacientes com câncer de pulmão e os sujeitos controles possuem uma boa capacidade de reparação.

ABSTRACT

Introduction: Lung cancer is cancer that occurs in large quantities in both developed and underdeveloped countries, mostly in men, but comes in crescent phase in women. The occurrence may be for repair of disability caused damage the cell or by the accumulation of reactive oxygen species. These metabolites cause DNA damage that can be measured by the comet assay. The alkaline comet assay is a genotoxicity test able to detect DNA damage quantitatively induced by alkylating agents, intercalating and oxidants. The damage is displayed individually in cell by enhancing the migration of genetic material. **Objectives:** To compare the level of DNA damage and repair capacity between patients with lung cancer and without lung cancer and to relate the level of damage to the type of therapy. **Methods:** We obtained the samples of lymphocytes from patients with lung cancer treatment in the Integrated Oncology at Hospital Ana Nery and control subjects who were part of old age groups in Santa Cruz do Sul - RS. It carried out the comet assay based on silver staining. One hundred cells per individual were visually examined to determine DNA damage. They were considered significant with $p < 0.05$, when performed analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tukey. **Results:** It was observed the predominance of males (68.8% CP and 55.6% controls), with advanced adulthood (65.4 ± 6.77 lung cancro and 56.67 ± 14.95 controls), and subject white color in both groups (78.1% lung cancro and 100% controls). It is noteworthy that patients with lung cancer reported having high load smoking (93.2%) and for a long time compared with the controls (7.7%). It was possible that the controls have higher education. Related to DNA damage, patients with lung cancer damage index greater than controls. The antimetabolites therapy class was the one that showed significance in alkaline damage rate, time 60', time 180' ($p = 0.005$, $p = 0.053$; $= 0.033$) when compared to control subjects of the research, followed by the group using the topoisomerase inhibitor association II and alkylating ($p = 0.027$) in the alkaline damage rate and the user antimitotic alkylating group associated with the time 180' ($p = 0.031$), showing that they may be more damaging the DNA of cells. **Conclusion:** Some therapeutic classes of chemotherapeutic agents have more DNA damage than others and that patients with lung cancer and control subjects have a good ability to repair.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO-----	11
2 OBJETIVOS -----	13
2.1 Objetivo geral-----	13
2.2 Objetivos Específicos-----	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO-----	14
3.1 Câncer -----	14
3.2 Câncer de Pulmão -----	14
3.2.1 Epidemiologia-----	15
3.2.2 Fatores de Risco -----	17
3.2.3 Diagnóstico -----	19
3.2.4 Estadiamento do câncer de pulmão -----	20
3.2.5 Tratamento-----	22
3.3 Dano no DNA -----	25
4 METODOLOGIA-----	27
4.1 Delineamento da pesquisa -----	27
4.2 Local da pesquisa -----	27
4.3 População e amostra -----	28
4.4 Critérios de inclusão -----	29
4.5. Critérios de exclusão-----	29
4.6 Considerações éticas -----	29
4.7 Procedimentos metodológicos-----	29
4.7.1 Entrevista e revisão de prontuários -----	30
4.7.2. Procedimentos laboratoriais -----	30
4.7.2.1 Coleta de sangue e extração de linfócitos -----	30

7.2.2 Ensaio cometa (EC)-----	31
4.8 Análise dos dados-----	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	33
6 CONCLUSÃO-----	38
7 PERSPECTIVAS -----	39
REFERÊNCIAS -----	40
ANEXOS -----	47

INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é uma patologia que vem se expandindo a cada ano sendo que, mundialmente cresce cerca de 2% ao ano e se tornou o segundo câncer mais acometido entre homens e o quarto em mulheres (INCA, 2015a). Embora a ocorrência seja maior nos países desenvolvidos, a estatística vem aumentando para o desenvolvimento da doença em países em desenvolvimento (GUERRA, GALLO E MENDONÇA, 2005). Para o Brasil estimava-se que no ano de 2015 tenham sido diagnosticados aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, sendo que destes 27 mil casos sejam de pulmão. Entre os estados do Brasil, o Rio Grande do Sul apresenta-se com o maior número de casos de câncer de pulmão (INCA, 2015b). A estimativa mais recente do INCA indica que no ano de 2016, ocorra cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil, sendo que destes o câncer do pulmão apresenta-se o segundo mais frequente em homens (8,1%) e o quarto em mulheres (5,3%). No estado do Rio Grande do Sul a estimativa para homens e mulheres é cerca de 2640 e 1600 mil novos casos de câncer de pulmão, respectivamente (INCA, 2016b).

Esta neoplasia é dividida em dois grandes grupos: câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) câncer de pulmão de não-pequenas células (CPCNP). Sendo estes também subdivididos em outros três subgrupos (OMS, 2015). O CPCNP é o tipo de câncer de pulmão mais encontrado nos pacientes, atinge aproximadamente de 80% dos casos (HUANG, et al., 2014). Segundo o INCA (2016a), a maior causa do desenvolvimento de doenças pulmonares, inclusive do câncer de pulmão é o cigarro.

Além do consumo do tabaco, deve ser destacado que há outros fatores relacionados ao desenvolvimento da carcinogênese como poluição atmosférica, cromo, exposição a radônio, sílica, asbesto, níquel, presença de doenças pulmonares de base e presença de alterações genéticas, assim como a hepatite B e o HPV também são agentes que contribuem para o desenvolvimento da doença, e estes últimos com uma carga maior (OMS, 2015).

O tratamento pode ser por procedimento cirúrgico, submissão à radioterapia ou a quimioterapia, de forma isolada ou concomitante. A cirurgia tem uma ação importante no diagnóstico de todas as formas de câncer de pulmão e no tratamento curativo das formas precoces. A radioterapia é exigida em casos não cirúrgicos de estágio inicial, podendo ser usada tanto tratamento exclusivo, como também juntamente com outros programas de terapi, sendo também é altamente eficaz no tratamento paliativo. A quimioterapia produz respostas

quanto aos sintomas e também é uma boa opção no tratamento paliativo (POLLOCK et al, 2006).

Os fármacos utilizados na quimioterapia de pacientes com o câncer podem ser mutagênicos, cancerígenos ou teratogênicos em humanos, e podem apresentar diferentes efeitos adversos em pacientes que recebem doses terapêuticas, como por exemplo: náusea, danos no fígado, trocas entre cromátides irmãs em linfócitos periféricos, bem como danos no DNA (KOPJAR, GARAJ-VRHOVAC, 2000). A maioria dos medicamentos antineoplásicos são dirigidos para o tecido do câncer através da corrente sanguínea para atingir as células cancerígenas em todo o corpo, porém as células saudáveis do paciente também podem ter o seu DNA modificado (KOPJAR, GARAJ-VRHOVAC, MILAS, 2002; INCA, 2016a).

A fumaça do cigarro assim como outras substâncias carcinógenas, danificam o DNA de forma reversível ou irreversível (CEYLAN et al., 2006). Quando irreversível, as células modificadas do organismo podem ser eliminadas, e, caso seja reversível o sistema de reparo do próprio organismo consegue desfazer essa alteração (SOUZA E FONTANETTI, 2007) (PRADO, 2014). O sistema de reparo ineficiente vai manter essas células modificadas no organismo e com isso, ocorrerá a proliferação das mesmas ocasionando a carcinogênese. Os danos causados nas células podem ser quantificados através do ensaio cometa, que é considerado um método altamente sensível e rápido (BRIANEZI, CAMARGO E MIOT, 2009; RIBEIRO-VIEIRA et al., 2007). Este método tem sido usado para verificar o potencial genotóxico de produtos químicos, podendo ser um biomarcador para detectar a suscetibilidade genética e os danos no DNA relacionados com a carcinogênese (BRENDLER-SCHWAAB, 2005). Por meio desta técnica, pretendemos avaliar a quantidade de dano no DNA e a capacidade de reparo que os pacientes com ou sem a doença apresentam, para que se possa compreender melhor a fisiopatologia da doença, justificando a realização deste estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar o nível de dano no DNA e a capacidade de reparação entre pacientes com câncer de pulmão e sem câncer de pulmão atendidos no Centro de Oncologia Integrado do Hospital Ana Nery e relacionar os níveis de danos com a terapia utilizada aos pacientes com câncer de pulmão.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes participantes do estudo;
- Verificar a capacidade de reparo das células dos participantes da pesquisa quando expostos ao metilmetano sulfonato (MMS);
- Comparar o índice de dano no DNA ocasionado pelo uso de fármacos quimioterápicos de diferentes classes;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer

O câncer é a segunda principal causa de morte nos Estados Unidos, perde somente para as doenças cardiovasculares. Faz parte de um conjunto de 100 doenças que possuem em comum o crescimento desordenado das células, que invadem os tecidos e órgãos, que podem ou não se espalhar para outros órgãos do corpo (metástase) (PERES, 2015).

Conforme Stricker e Kumar (2008) a neoplasia é uma massa anormal de tecido, onde o crescimento é descontrolado e ultrapassa o tecido normal. Acredita-se que as células neoplásicas são transformadas porque elas se replicam ignorando os mecanismos reguladores que controlam o crescimento celular normal, por tanto, possuem autonomia e aumento de tamanho constante e indiferente ao seu ambiente local e ao estado nutricional do hospedeiro. Contudo, sua autonomia não é completa, pois todas as neoplasias dependem do hospedeiro para sua nutrição e suprimento sanguíneo.

As neoplasias são classificadas em duas categorias: benignas e malignas, sendo classificadas assim conforme o comportamento do neoplasma. O tumor é benigno quando as suas características macroscópicas e microscópicas são consideradas inofensivas, sendo localizado, sem disseminação para outros órgãos e passível de remoção cirúrgica. Neste tipo de tumor os pacientes sobrevivem na maioria dos casos e seu crescimento, normalmente, é de forma lenta. Quando se relaciona com a malignidade do câncer entende-se que a lesão pode invadir e destruir outras estruturas e se disseminar para outros órgãos, geralmente neste caso a neoplasia leva o paciente a óbito (SILVA, ERDTMANN, HENRIQUES, 2003).

Estes dois tipos, benigno e maligno, são compostos por duas estruturas básicas: (1) o parênquima, constituído de células transformadas ou neoplásicas que determina o seu comportamento biológico, e (2) o estroma de sustentação, constituído de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células inflamatórias do hospedeiro, não neoplásico, sendo essencial para o crescimento do neoplasma. Existem quatro critérios fundamentais pelos quais os tumores malignos e benignos podem ser diferenciados: diferenciação e anaplasia, velocidade de crescimento, invasão local e metástase (STRICKER e KUMAR, 2008).

3.2 Câncer de Pulmão

Do ponto de vista patológico, o câncer de pulmão pode ser classificado em dois tipos principais: câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) e câncer de pulmão de não-

pequenas células (CPCNP). O tumor de não-pequenas células corresponde a um grupo composto de três principais tipos histológicos e distintos: carcinoma epidermóide, carcinoma de grandes células e adenocarcinoma, ocorrendo em cerca de 75-80% dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão (HUANG, et al., 2014). Dentre os tipos celulares, o carcinoma indiferenciado de pequenas células (CIPC) destaca-se, com outros três subtipos celulares: linfocitóide (oat cell), intermediário e combinado (células pequenas mais carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma) (OMS, 2015).

A maioria das neoplasias de pulmão são de origem epitelial (carcinoma), sendo representadas, na sua maioria, adenocarcinoma (adenoCA), carcinoma indiferenciado de pequenas células (CIPC), pelo carcinoma espinocelular (CEC) e carcinoma indiferenciado de grandes células (CIGC) (IBIAPINA, 2002).

O CPPC é caracterizado como um tumor epitelial maligno representa apenas 18% de todos os casos de câncer de pulmão (BEADSMOORE e SCREATON, 2003). É composto por pequenas células com citoplasma escasso, bordas de célula causa mal definida, cromatina nuclear finamente granular, e nucléolo ausente ou discreto. As células são redondas, ovais e em forma de fuso, a moldagem nuclear é proeminente, a necrose é tipicamente extensa e a contagem mitótica é alta (IARC, 2015).

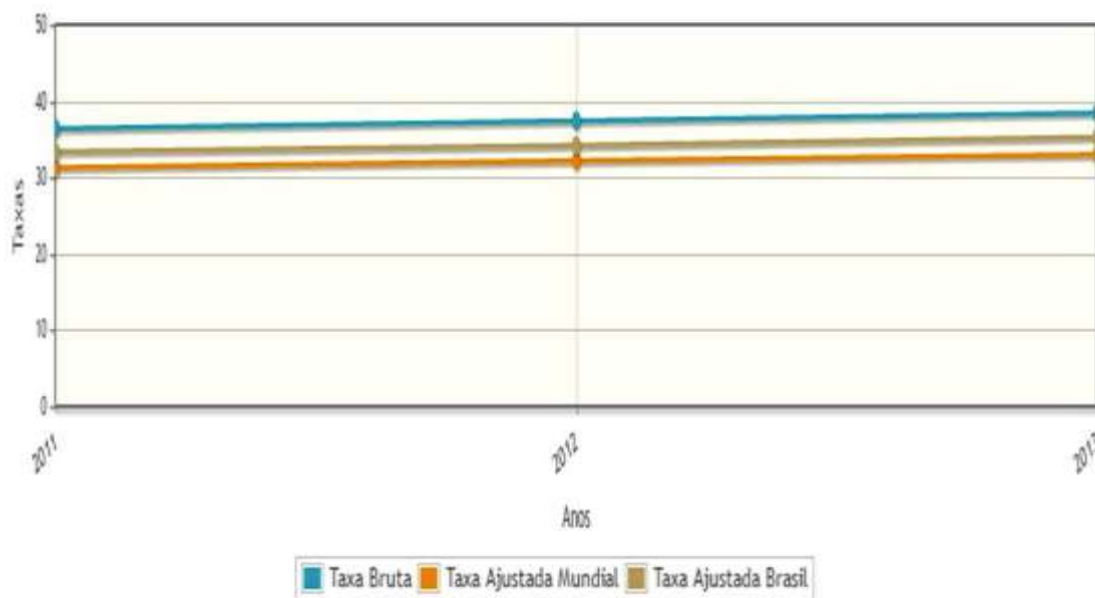
3.2.1 Epidemiologia

Segundo dados do INCA (2015a), o câncer de pulmão é o mais comum de todos os tumores malignos, apresentando aumento mundial de 2% por ano, sendo que a estimativa proposta pela OMS é de que até 2035 possa chegar a 24 milhões de novos casos (INCA, 2015; OMS, 2015). Estima-se que para o ano de 2015 tenham sido diagnosticados aproximadamente 576 mil casos novos de câncer no Brasil, destes 27 mil casos seriam de pulmão. A última estimativa mundial apontou incidência de 1,82 milhões de casos novos de câncer de pulmão no ano de 2012, sendo 1,24 milhão em homens e 583 mil em mulheres. Em 90% dos casos diagnosticados, o câncer de pulmão está associado ao consumo de derivados de tabaco. O câncer de pulmão, no fim do século XX, se tornou uma das principais causas de morte evitáveis (INCA, 2015c).

No ano de 2014, no Brasil, 82% dos óbitos por câncer de pulmão no sexo masculino estavam atribuídos ao tabagismo. Em mulheres esta média caiu para 41%. No Rio Grande do Sul a taxa bruta de mortalidade no sexo masculino no período de 2011 a 2013, se apresenta

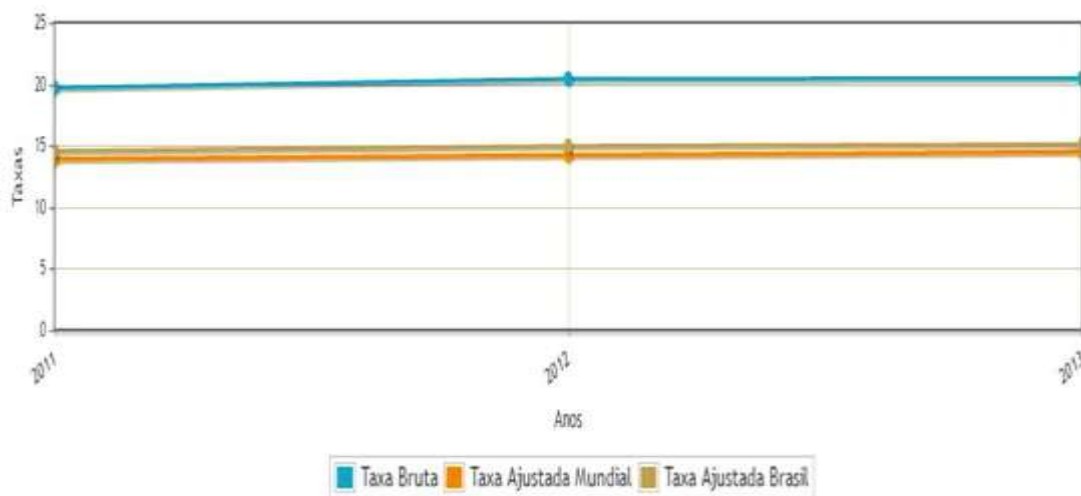
maior do que as taxas ajustadas a nível mundial e nacional por 100.000 mil homens (Figura 1). No sexo feminino, as taxas bruta e ajustada no mesmo período apresentam-se ainda mais elevadas do que no sexo masculino (Figura 2). Nos indivíduos que pararam de fumar, o risco de desenvolvimento da doença caiu gradualmente durante 15 anos e ainda permanecerá com chances 2 vezes maior que o daqueles pacientes que nunca fumaram (SOUZA, et al., 2014).

Figura 1: Taxas de mortalidade por câncer de brônquios e pulmões, brutas e ajustadas por idade, pelas populações mundial e brasileira de 2010, por 100.000 homens, Rio Grande do Sul, entre 2011 e 2013.



FONTE: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade - SIM MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE MS/INCA/Conprev/Divisão de Vigilância.

Figura 2: Taxas de mortalidade por câncer de brônquios e pulmões, brutas e ajustadas por idade, pelas populações mundial e brasileira de 2010, por 100.000 mulheres, Rio Grande do Sul, entre 2011 e 2013.



FONTE: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade - SIM MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE MS/INCA/Conprev/Divisão de Vigilância.

A doença acomete indivíduos com idade avançada e sua prevalência nos últimos anos foi considerada maior em homens do que em mulheres (IBIAPINA, 2002), no entanto esta estatística tem mudado e o câncer de pulmão vem tornando-se uma doença cada vez mais abrangente entre as mulheres. Isto ocorre devido ao aumento do índice de mulheres fumantes, visto que o tabagismo é considerado o principal fator de risco, que aumenta as chances de desenvolvimento da neoplasia pulmonar de 10 a 30 vezes (OMS, 2015; PERES, 2015).

O CP permanece como uma doença altamente letal. A sobrevida média cumulativa em cinco anos é de 13% a 21% em países desenvolvidos e de 7% a 10% em países em desenvolvimento, com uma média mundial estimada de 11% (DUARTE, PASCHOAL, 2005).

3.2.2 Fatores de Risco

O tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas são indicados como as principais causas de desenvolvimento do câncer de pulmão, e o desenvolvimento se torna maior quando estes dois fatores são ingeridos concomitantemente (IARC, 2009). O uso do tabaco é o fator de risco mais importante, sendo o causador de aproximadamente 20% das mortes mundiais de todos os tipos câncer e cerca de 70% das mortes mundiais por câncer de pulmão. Mesmo os

casos de câncer sendo atribuídos ao uso do tabaco, a neoplasia também há crescimento entre os que nunca fumaram (SOUZA, et al., 2014) e representa 3% a 5% de todos os casos de câncer pulmonar (OLIVEIRA, SARAIVA, 2010).

Além do consumo do tabaco, deve ser destacado que há outros fatores relacionados ao desenvolvimento da carcinogênese como poluição atmosférica, cromo, exposição a radônio, sílica, asbesto, níquel, presença de doenças pulmonares de base e presença de alterações genéticas, assim como o HIV (OMS, 2015). Entre estes, é possível citar o radônio (Rn) que é um gás radioativo natural produzido pelo rádio e urânio (HYE, 2015), e que é considerado o segundo maior fator causador do câncer de pulmão (PETERSON, 2013), sendo possível encontrá-lo no solo, em locais fechados e, nas construções civis. Este composto emite partículas alfa que ao serem inaladas, irradiam o trato respiratório e promovem a carcinogênese (IBIAPINA, 2002). O radônio associado com o ato de fumar aumenta significativamente a possibilidade do desenvolvimento de câncer de pulmão (DENMAN, 2015).

O amianto ou asbesto é um grupo de fibras minerais compostas por silicatos de magnésio, cálcio, sódio ou ferro. São divididos em dois grupos: anfíbolios e serpentinas (INCA, 2015c), ambos estão implicadas na ocorrência de câncer e outras doenças em humanos (WÜNSCH FILHO, NEVES, MONCAU, 2001). Conforme a *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2015), da Organização Mundial da Saúde, classifica o amianto como carcinogênico comprovado para os humanos.

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada por uma inflamação crônica das vias respiratórias inferiores e, mais importante ainda, a presença de DPOC aumenta o risco de câncer de pulmão até 4,5 vezes entre os fumantes de longa duração e é encontrado em 50-90% dos pacientes com câncer de pulmão. O hábito de fumar está presente em ambos os casos, e a fumaça do cigarro induz, diretamente ou indiretamente, a resposta inflamatória e aumenta o número de espécies reativas do oxigênio (ROS) no pulmão (ADCOCK, CARAMORI, BARNES, 2011). Este por sua vez, provoca o estresse oxidativo, que danifica o DNA e promove a sua mutação (DURHAM, ADCOCK, 2015) através da inibição da função dos genes de reparação de DNA ocasionando aumento da expressão de DNA metiltransferases. Há também, um número expressivo de mediadores inflamatórios produzidos na DPOC, que são relevantes para o desenvolvimento do câncer de pulmão. Neste

caso, podem-se citar três citosinas importantes: TNF- α , IL-1 e IL-6, assim como as proteases (KING, 2015).

Quando falamos em paciente com HIV, o risco de desenvolvimento do câncer de pulmão é duas a três vezes maiores do que em indivíduos com a imunidade preservada (VANDENHENDE, et al. 2015). Alguns estudos realizados com esta população identificaram uma incidência alta de consumo de tabaco, porém não há comprovações exatas de alguma outra relação da ocorrência alta de câncer de pulmão nesses pacientes (ENGELS, et al., 2006; KIRK, et al., 2007).

3.2.3 Diagnóstico

O câncer de pulmão não possui sinais ou sintomas específicos nos estágios iniciais por isso o diagnóstico ocorre, muitas vezes, de forma tardia (WHITAKER et al., 2015), e ao acaso. Como consequência, há possibilidade de que 15% desses portadores tenham a chance de viver por ao menos 5 anos, enquanto que 85% do restante deles lutam contra a doença, sem a certeza de viver estes mesmos 5 anos (IRION, 2002). Tal problema pode ser evitado através da investigação precoce da doença (BARROS et al., 2006), fazendo com que seja possível realizar a remoção do tumor pelo processo cirúrgico ou tratamento com quimioterápicos (FERNÁNDEZ-BUSSY et al., 2015).

O diagnóstico definitivo é estabelecido pelo exame citológico ou histopatológico do material tumoral obtido por mediastinoscopia, broncoscopia, biópsia pleural ou biópsia pleuropulmonar a céu aberto ou vídeo-assistida. Eventualmente, o diagnóstico será feito após estudos anatomopatológico de peça cirúrgica – segmento, lobo pulmonar ou pulmão (BRASIL, 2014).

Para a avaliação dos linfonodos mediastinais, o método invasivo padrão indicado é a mediastinoscopia. Há também, o *enobroncial ultrasound* (EBUS) que tem sido utilizado com frequência no estadiamento no pulmão, pois é considerado um método minimamente invasivo e um teste que têm mostrado 93% de sensibilidade, 100% de especificidade (RIVERA, 2013) (DETTERBECK, 2007) e 96% de preditivo negativo na avaliação de linfonodos mediastinais e hiliares (TEDDE et al., 2012).

Um método menos invasivo (MORITZ et al., 2008), considerado mais abrangente por apresentar reprodutividade, confiabilidade e responsividade é o exame de escarro induzido (VERAS et al., 2011). Porém, sua confiabilidade vem diminuindo devido a maior

disponibilidade e disseminação da broncofibroscopia. Melhores resultados são encontrados quando os tumores se apresentam maiores e centrais (BRASIL, 2014), assim como, amostras colidas pela parte da manhã. É possível dizer então que os carcinomas escamosos são facilmente diagnosticados por este método, pois apresentam localização central, contraposto do adenocarcinoma, que possui localização periférica, sendo menos diagnosticado pelo escarro induzido (FERNANDEZ, JANETE, ZAMBONI, 2002).

A broncofibroscopia, segundo Fernandez et al. (2002), é o principal exame para o diagnóstico do câncer de pulmão e seu estadiamento, pois é um exame seguro, fácil e melhor tolerado pelo paciente. Porém, existem contraindicações, uma vez que pode provocar sangramento, instabilidade cardiovascular, hipoxemia e hipercapnia. Se forem utilizadas técnicas combinadas, como lavado, escovado e biópsia (três a cinco fragmentos), a sensibilidade pode chegar a 88% nos casos de lesões centrais endobrônquicas (SOUZA et al.,2014).

3.2.4 Estadiamento do câncer de pulmão

Para indicar corretamente o estadiamento do tumor, recomenda-se a realização de exames por imagem e a retirada de amostras teciduais. A técnica destes exames é considerada invasiva, mas este método associado com outros exames garante o melhor diagnóstico e aumenta significativamente a sobrevida o paciente (FERNANDEZ, JANETE, ZAMBONI, 2002).

Conforme descrito pelo INCA (2003), a classificação do sistema TNM não se aplicam adequadamente ao CPPC. Neste caso adota-se a classificação de extensão tumoral seguinte: Doença Limitada (DL) e Doença Extensa (DE) (Tabela1).

Tabela 1: Classificação da extensão tumoral para o CPPC.

DOENÇA LIMITADA (DL)	DOENÇA EXTENSA (DE)
Tumor que se enquadra em um campo de radioterapia. Geralmente, considera-se a doença confinada ao hemitórax em que se localiza o tumor primário e se incluir também o mediastino e linfonodos supraclaviculares.	Neoplasia disseminada ou que excede a definição de doença limitada. Assim, pacientes com metástase à distância são sempre classificados na categoria de doença extensa.

FONTE: INCA, 2003.

Para o CPNPC a classificação mais adequada é a classificação do tipo TNM (tabela 2), onde T representa a tumor primário, N linfonodos regionais e M as metástases distantes

(IARC, 2015). A classificação TNM é usualmente em conjunto com a classificação em subgrupos do estágio patológico (tabela 3), e juntos tem a finalidade ajudar a identificar os pacientes por subgrupos e assim, posteriormente, poder ser utilizados para estabelecer o prognóstico e suporte para a determinação das opções terapêuticas (OLIVEIRA, SARAIVA, 2010).

Tabela 2: Classificação NTM para o Câncer de Pulmão

T - Tumor Primário

TX – Tumor primário não individualizado.

T0 – Sem evidência de tumor.

Tis – Carcinoma in situ.

T1 – Tumor ≤ 3 cm no maior diâmetro, circundado por pulmão e pleura visceral:

T1a – tumor ≤ 2 cm

T1b – tumor > 2 cm mas ≤ 3 cm

T2 – Tumor > 2 cm mas ≤ 7 cm ou qualquer destes achados: envolvimento do brônquio principal a mais de 2 cm da carina principal, invasão da pleura visceral, associação com atelectasia ou pneumonia obstrutiva sem envolvimento de todo o pulmão.

T2a – tumor > 3 cm mas ≤ 5 cm

T2b – tumor > 5 cm mas ≤ 7 cm

T3 – Tumor > 7 cm ou que invade qualquer uma das seguintes estruturas: parede torácica, diafragma, nervo frênico, pleural mediastinal, pericárdio; ou tumor com menos de 2 cm da carina principal, mas sem envolvimento desta; ou se houver atelectasia ou pneumonite obstrutiva de todo pulmão; ou nódulo(s) tumoral (ais) no mesmo lobo do tumor primário.

T4 – Tumor de qualquer tamanho que invade qualquer uma das seguintes estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, nervo laríngeo recorrente, traquéia, esôfago, corpo vertebral, carina principal; nódulo(s) tumoral (ais) isolado em outro lobo ipsilateral.

N – Linfonodos Regionais

NX – Linfonodo regional não foram avaliados.

N0 – Sem metástase em linfonodo regional.

N1 – Metástase em linfonodo peribrônquico ipsilateral e/ou hilar ipsilateral e intrapulmonares, incluindo envolvimento por extensão direta.

N2 – Metástase em linfonodo mediastinal ipsilateral e/ou subcarinal

N3 – Metástase em linfonodo mediastinal contralateral; hilar contralateral; escalênico ipsilateral ou contralateral; ou supraclavicular.

M – Metástases Distantes

MX – Metástase à distância não estudada

M0 – Sem evidência de metástase à distância

M1 – Metástase à distância:

M1a – Nódulo (s) tumoral (ais) em lobo contralateral; tumor com nódulo pleural ou derrame pleural ou pericárdico maligno.

M1b – Metástase à distância (fora do tórax).

FONTE : Manual de Oncologia Clínica UICC, 2006; INCA, 2015 .

Tabela 3: Estágio Patológico em subgrupos.

Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio IA	T1	N0	M0
Estágio IB	T2	N0	M0
Estágio IIA	T1	N1	M0
Estágio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	
Estágio IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	
Estágio IIIB	Qualquer T	N3	M0
	T4	Qualquer N	
Estágio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

FONTE: IARC, 2015.

3.2.5 Tratamento

O tratamento depende do tipo de câncer de pulmão apresentado pelo paciente. As terapias empregadas para o combate ao câncer de pulmão são a radioterapia, a cirurgia, e a quimioterapia (ANDRADE e SILVA, 2007). Elas são usadas em conjunto no tratamento das neoplasias malignas, variando apenas quanto à importância de cada uma e a ordem de sua indicação (INCA, 2015). O tratamento é diferente para o câncer de pulmão de pequenas células e para o câncer de pulmão de não pequenas células (CANCER RESEARCH UK, 2014).

O tratamento cirúrgico do câncer pode ser aplicado com finalidade curativa ou paliativa. Quando indicado retira-se nos casos iniciais e é considerado um procedimento curativo. A ressecção curativa é aquela em que todo o câncer visível é removido (BRASIL, 2002). A remoção do tumor pode consistir em uma seção do pulmão, um lobo ou todo o pulmão (CANCER RESEARCH UK, 2014). O tumor primário deve ser removido tendo uma margem de segurança que varia de acordo com o tipo histológico e a localização (INCA, 1993).

No CPPC o tratamento de escolha é a quimioterapia. O processo cirúrgico não é recomendado para este tipo de neoplasia por seu comportamento biológico de originar metástases, caso contrário, se não houver nenhum sinal de metástase do câncer o processo cirúrgico pode ser empregado (BRASIL, 2014). Mesmo sendo raro no CPPC, geralmente a metástase ocorre na época do diagnóstico. Assim, a quimioterapia geralmente é o principal tratamento (CANCER RESEARCH UK, 2014).

Já no CPCNP a cirurgia é a terapêutica com maior propensão a cura nos doentes com doença localizada ao diagnóstico realizada por toracotomia ou toracoscopia vídeo-assistida (BRASIL, 2014). O CPCNP pode ser tratado também com quimioterapia, radioterapia ou uma

combinação destes, dependendo a fase em que a doença é diagnosticada (CANCER RESEARCH UK, 2014).

A radioterapia é o uso de raios de alta energia. Pode ser realizado sozinho ou com outro tratamento como a quimioterapia ou cirurgia (CANCER RESEARCH UK, 2014). Essa terapêutica aumenta a sobrevivência de pacientes acometidos com o CPPC, sendo rotineiramente indicado para este tipo de câncer. A irradiação craniana com a finalidade de profilaxia previne a recorrência do tumor no sistema nervoso central (SNC), sendo recomendada para pacientes que tiveram controle da doença torácica, e permite o controle temporário de sintomas de metástase no SNC (BRASIL, 2014). No CPCNP a radio terapia externa (teleterapia) é indicada em qualquer estágio do tumor, com a finalidade paliativa ou curativa e também o seu uso associado com a quimioterapia ou a radioterapia.

A quimioterapia é a forma de tratamento sistêmico que utiliza medicamentos denominados quimioterápicos, podem quimioterápicos propriamente ditos, bioterápicos, hormonioterápicos, alvoterápicos, imunoterápicos, para destruir as células cancerosas (INCA, 2015). O tratamento pode ser somente com a quimioterapia isoladamente ou com outros tratamentos (CANCER RESEARCH UK, 2014). O esquema padrão da quimioterapia para ambos os tipos tumorais, CPPC e CPCNP, envolve a associação de derivados da platina (cisplatina, carboplatina) e o etoposido. Outras associações que podem apresentar toxicidade variável e resultados similares incluem medicamentos como: ciclofosfamida, doxorubicina e etoposido; ciclofosfamida, doxorubicina e vincristina; ciclofosfamida, doxorubicina e vincristina (CAV); cisplatina e topotecano; cisplatina e irinotecano; carboplatina e paclitaxel; ifosfamida, cisplatina e etoposido; carboplatina e gemcitabina (BRASIL, 2014).

O tratamento cirúrgico é o único método considerado potencialmente curativo. A quantidade de tratamento que necessário para o paciente depende do tipo de câncer que apresenta, da extensão e localização e da debilitação do paciente. Para a acurácia do tumor no paciente muitas vezes a utilização da combinação de dois ou mesmo os três métodos de tratamento se torna necessário (OLIVEIRA, SARAIVA, 2010; SPP, 2015).

Os terapêuticos antineoplásicos podem interagir com o DNA inibindo sua síntese ou causando lesões irreparáveis, sendo capaz de levar a morte da célula. Em função do modo de ação desses medicamentos, são divididas em quatro grandes grupos de antineoplásicos de escolha em protocolos diferentes de tratamento, são eles: compostos antimetabólicos, agentes

alquilantes, compostos antimetabólitos e inibidores de topoisomerase (CUNHA, LEHMANN, 2003).

Os agentes alquilantes são definidos como compostos eletrofílicos. Ele faz a alteração de um átomo de hidrogênio do DNA por um grupo alquila em condições fisiológicas. Pode ser dividido em dois grupos: o S_{N1} e S_{N2} . O grupo S_{N2} liga-se principalmente nos sítios de nitrogênio das bases do DNA, tendo como exemplo o bissulfan; e o grupo S_{N1} forma espécies muito reativas, ligando-se aos sítios de oxigênio e de grupo fosfato, como exemplo pode-se citar o melfalan. Os alquilantes podem induzir a aductos e ser subdivididos em agentes alquilantes mono ou bifuncionais, onde um ocasiona distorção no DNA e dificulta o reconhecimento e o reparo da lesão pelas enzimas de reparação do DNA e outro possui a capacidade de gerar pontes no DNA, que podem ser intra ou intercadeia, respectivamente (CUNHA, LEHMANN, 2003; ALMEIDA et al., 2005)

Os inibidores da topoisomerase são capazes de induzir a morte celular através da catástrofe mitótica gerada, da indução de apoptose e indução de mutações. Porém estes mecanismos podem levar à resistência aos fármacos, dificultando futuras terapias; podem levar também a mutações e células germinativas e o desenvolvimento de tumores secundários a partir de células normais. Inibidores da topoisomerase I atuam no relaxamento da supertorção do DNA e pode ser dividido em: (a) os venenos de top1, que impede a liberação da enzima, mantendo as quebras simples na fita do DNA, e (b) supressores da top1 que impedem a ligação da enzima no DNA. Os inibidores da topoisomerase II estão na maioria dos tratamentos utilizados e é considerada mais letal nas células com altas taxas de replicação de DNA, como exemplo pode ser citada a doxorubicina. Estes dois grupos podem levar a deleções de uma base no DNA e posteriormente o surgimento de uma nova neoplasia (CUNHA, LEHMANN, 2003).

Agentes antimitóticos são fármacos que atuam nos microtúbulos que constituem o fuso mitótico, atuando na polimerização e despolimerização dos microtúbulos. No que se refere aos inibidores da polimerização é possível destacar os alcaloides da vinca (vimblastina e a vincristina). Referindo-se aos inibidores da despolimerização, se caracteriza por combinar-se com dímeros α,β -tubulina e como exemplo temos o paclitaxel. Este agente mostrou estar associado com distúrbios de fusos metafásicos e com a ação aneugênica deste inibidor da despolimerização da tubulina (CUNHA, LEHMANN, 2003).

Outro conjunto de quimioterápicos são os antimetabólitos, que são compostos inibidores da síntese do DNA e compostos que alteram o padrão da metilação do mesmo. Desta classe podem-se citar os inibidores da DNA polimerase, que é um nucleotídeo competitivo com a enzima, pois pode se ligar ao DNA e quando incorporada neste, impede a elongação da cadeia e a ligação de fragmentos de DNA recém sintetizados. Além dos inibidores da enzima DNA polimerase é possível citar os agentes inibidores da timidilato sintase, que inibe a síntese de dTMP (desoxitimidina monofosfato); os inibidores da diidrofolato redutase, que apresenta papel crítico na manutenção de folato na forma reduzida; e também os inibidores da ribonucleotídeo redutase, que provoca inibição imediata na síntese do DNA agindo como inibidor desta enzima. Por último, o mecanismo que inibe a metilação da citosina é relacionado aos inibidores da metilação do DNA, que posteriormente resulta em ativação gênica, diferenciação celular e bloqueando assim, a proliferação celular. O efeito genotóxico apresentado pelos mecanismos dos antimetabólitos é a indução de mutações pontuais no DNA (CUNHA, LEHMANN, 2003).

3.3 Dano no DNA

O DNA pode ser danificado de muitas maneiras. Mutações espontâneas surgem por uma variação conformacional ou mesmo reação química, que podem ser consideradas normais ou também, mudar alguma subunidade do DNA (nucleotídeos). Além disso, certas substâncias mutagênicas (carcinógenos), tanto endógenas quanto exógenas, podem causar alterações genéticas que causam o câncer (MALUF, ERDTMANN, 2003). Algumas das substâncias já foram mencionadas anteriormente, mas destacamos as substâncias químicas presentes no fumo, a idade (acúmulo de dano no DNA ou capacidade diminuída de reparo) e sexo do paciente (PRADO, 2014). A inalação de compostos do cigarro desencadeia um processo inflamatório, que possui além da presença de macrófagos, linfócitos e neutrófilos, a participação de células estruturais (epiteliais e fibroblastos) (COSTA, RUFINO, SILVA, 2009).

A fumaça do cigarro possui mais de 4700 compostos químicos com radicais livres (RL) e outros oxidantes presentes em altas concentrações. Dos componentes do cigarro, muitos são considerados cancerígenos, e contém partículas muito pequenas que penetram profundamente nos pulmões (CEYLAN et al., 2006). A inalação exacerbada de RL pode gerar um

desequilíbrio entre antioxidantes e oxidantes ocasionando o estresse oxidativo (MALUF et al., 2007; PAGLIUSO et al., 2006).

As substâncias carcinógenas danificam o DNA por causarem trocas de bases nitrogenadas durante a duplicação celular. Em células somáticas que se dividem com frequência, não há tempo para que os mecanismos de reparo do DNA funcionem antes que a duplicação ocorra novamente (ALMONDES et al, 2010). Na maioria dos casos a lesão é reparada pelo próprio organismo, quando não reparada estas células podem ser eliminadas por apoptose (SOUZA E FONTANETTI, 2007; PRADO, 2014). Porém há a possibilidade de não serem reparadas devido a um sistema de reparo ineficiente, podendo gerar altas taxas de mutações (MALUF, ERDTMANN, 2003).

Os fármacos utilizados na terapia de pacientes com o câncer podem ser mutagênicos, cancerígenos ou teratogênicos em humanos, e podem apresentar vários efeitos adversos agudos e crônicos diferentes em pacientes que recebem doses terapêuticas, como por exemplo: toxicidade aguda, náusea, danos no fígado, lesões cromossômicas, trocas entre cromátides irmãs em linfócitos periféricos, bem como danos no DNA (KOPJAR, GARAJ-VRHOVAC, 2000). A maioria dos medicamentos antineoplásicos são dirigidos para o tecido do câncer, porém as células saudáveis do paciente também podem ter o seu DNA modificado (KOPJAR, GARAJ-VRHOVAC, MILAS, 2002).

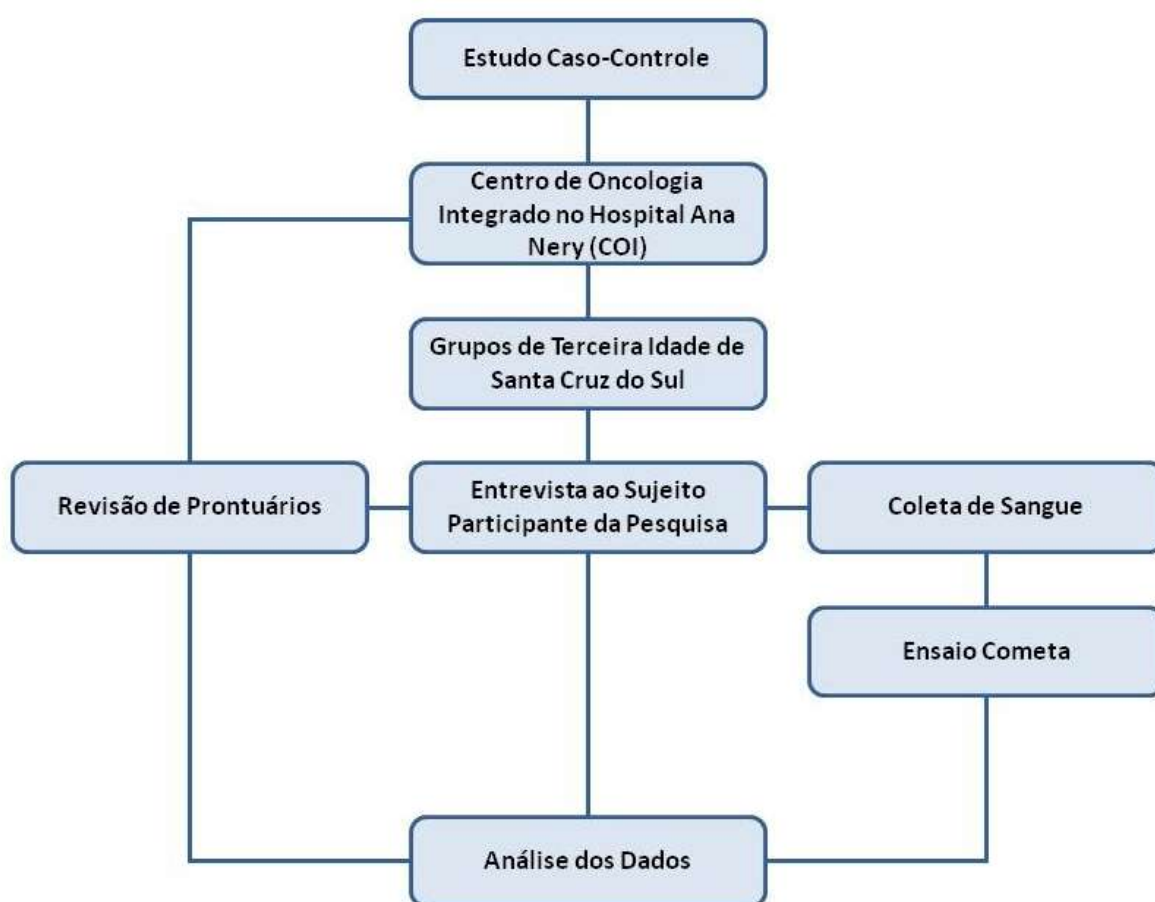
O ensaio cometa tem sido bastante utilizado na detecção de genotoxicidade por ter capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas. Diferente das mutações, as lesões detectadas com o ensaio cometa são passíveis de correção (SOUZA, FONTANETTI, 2007). A técnica é considerada rápida, fácil, de baixo custo e altamente sensível (BRIANEZI, CAMARGO E MIOT, 2009; RIBEIRO-VIEIRA et al., 2007). O ensaio cometa deve ser usado apenas como indicativo de risco (MALUF, ERDTMANN, 2003).

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento da pesquisa

O presente estudo fez parte de um projeto maior, denominado “*Dano, Reparação e Suscetibilidade em Doenças Pulmonares*”, aprovado pelo CEP da UNISC sob parecer nº 374.298 de 14/08/2013. O estudo foi executado de acordo com o delineamento experimental demonstrado na Figura 3.

Figura 3: Processo de delineamento experimental realizado na pesquisa.

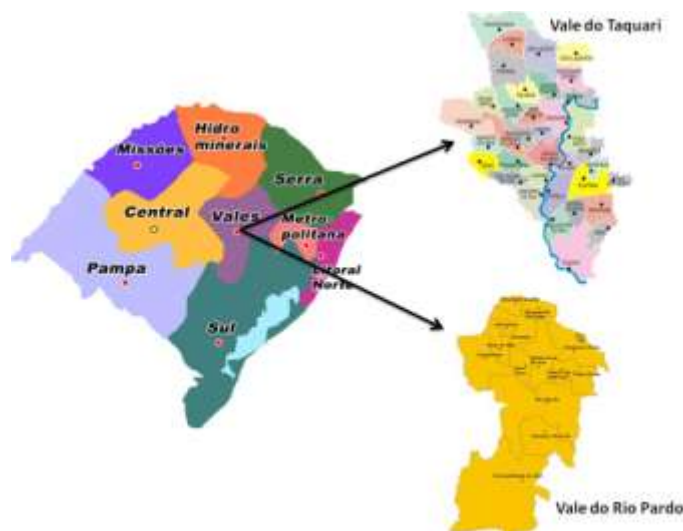


4.2 Local da pesquisa

A coleta de dados e das amostras dos pacientes foi realizada no Centro de Oncologia Integrado no Hospital Ana Nery, localizado no município de Santa Cruz do Sul – RS (Figura 4). As amostras foram analisadas no Laboratório de Biotecnologia da UNISC. O local de pesquisa foi escolhido por ser um centro de referência na área da oncologia na região

e pelo pacientes estarem em grande contato com a planta que compõem o cigarro, por ser uma região produtora de fumo.

Figura 4: Mapa representativo da região do Vale do Rio Pardo e Vale do Taquari, onde foi o local da pesquisa.



FONTE: Mapas retirados do Google e imagem adaptada pelo autor.

4.3 População e amostra

A população em estudo é composta por 32 pacientes com câncer de pulmão e 9 indivíduos saudáveis. Sendo que a coleta de dados e obtenção das amostras biológicas dos pacientes com câncer de pulmão foi realizada no Cento de Oncologia Integrado no Hospital Ana Nery, que abrange a região dos Vales do Rio Pardo e Taquari, e os indivíduos saudáveis faziam parte de grupos de terceira idade localizados no município de Santa Cruz do Sul – RS. As amostras foram analisadas no Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). As coletas foram iniciadas em agosto de 2015.

Todos os sujeitos selecionados para a pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A) e responderam a um questionário de saúde pessoal (ANEXO B), contendo informações demográficas, exposição a radiações e medicamentos, além de hábitos alimentares e consumo de bebidas alcoólicas. Os pacientes foram caracterizados quanto ao sexo, idade, cor da pele autorreferida, escolaridade, histórico de tabagismo. As informações retiradas do prontuário do paciente relacionaram-se ao uso de quimioterápicos, início da terapia, quais eram os medicamentos. Além destes dados, foram obtidas amostras

biológicas constituídas de sangue total para a realização do ensaio cometa que possibilita a visualização de dano nas células.

4.4 Critérios de inclusão

- a) Pacientes com autonomia e idade acima de 18anos;
- b) Pacientes concordantes em participar do estudo por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento (TCLE);
- c) Paciente com diagnóstico de câncer de pulmão em tratamento no COI.

4.5. Critérios de exclusão

Pacientes cujas amostras de sangue foram insuficientes ou por perda no seu processamento.

4.6 Considerações éticas

O presente estudo foi um braço de uma pesquisa mais ampla da UNISC, denominada “*Dano, Reparação e Suscetibilidade em Doenças Pulmonar*”, já aprovada pelo CEP da UNISC sob parecer nº 374.298 de 14/08/2013. Este estudo atende os referenciais básicos da Bioética, previstos na Resolução 466/12 do Ministério da Saúde.

O TCLE é um documento elaborado pelo pesquisador, aprovado pelo CEP, em duas vias (uma do pesquisador e outra do participante), no intuito de formalizar a anuência à participação no estudo. O sigilo e a preservação da identidade dos participantes foram garantidos em todos os momentos da realização deste estudo. Ressalta-se ainda, que esta pesquisa segue os requisitos do regulamento da Resolução 441, de 12 de maio de 2011, do Conselho Nacional de Saúde, a qual utilizou amostras que se encontravam em um biorrepositório. O regulamento foi previamente assinado pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UNISC. Foram utilizadas somente as amostras as quais possuísem o termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo paciente ou familiar responsável.

4.7 Procedimentos metodológicos

Para a realização da coleta do material biológico dos pacientes acometidos pelo câncer de pulmão, foi realizado contato com COI para esclarecer a importância da realização do projeto para a comunidade científica e verificar o agendamento da quimioterapia dos

pacientes. Com a aprovação do COI, no dia em que o paciente realizava a quimioterapia foi explicado o objetivo da pesquisa e se o paciente aceitava participar, o TCLE era entregue ao paciente que fazia a leitura e assinava. Em um momento posterior a assinatura, foi realizada uma entrevista para obtenção dos dados epidemiológicos do paciente. Após responder ao questionário, foi realizada coleta de uma amostra de sangue no momento da punção para realização da quimioterapia. A amostra coletada foi transportada para o Laboratório de Biotecnologia da UNISC onde foram armazenadas até a realização do ensaio cometa.

Após a realização do ensaio cometa, todos os resultados foram digitados em planilhas excel e posteriormente realizada análise dos dados em software SPSS.

4.7.1 Entrevista e revisão de prontuários

A entrevista foi realizada face a face durante a realização da quimioterapia do paciente no Hospital Ana Nery. Foram coletadas informações socioeconômicas, situação tabágica do paciente, histórico de outras doenças pulmonares e esquema terapêutico. Em um segundo momento foi realizado a revisão dos prontuários dos pacientes na base de dados disponibilizada pelo COI, como a data da primeira consulta médica no COI, o uso de agentes quimioterápicos, qual a data de início do tratamento com estes quimioterápicos e qual o tempo em meses para utilização deste esquema. A classificação terapêutica dos medicamentos foi feita através e pesquisas em artigos científicos e baseada na literatura proposta por Cunha & Lehmann (2003).

No prontuário dos pacientes disponibilizado pelo COI, foi pesquisado o começo de tratamento e os fármacos utilizados na quimioterapia e após os fármacos foram classificados em classes farmacêuticas.

Todos os indivíduos do grupo controle (pareados por sexo e idade) foram entrevistados e, após esta, tiveram uma amostra de sangue coletada através de punção venosa.

4.7.2. Procedimentos laboratoriais

4.7.2.1 Coleta de sangue e extração de linfócitos

Foram coletados 10 mL de sangue, de ambos os grupos analisados através da punção venosa. A amostra de sangue foi colocada em tubos com anticoagulante com EDTA envolto em papel alumínio para evitar o contato da luz, cujo contato causa dano na amostra. Após foi

submetido ao processo de extração dos linfócitos, onde retirou-se 2 mL sangue total+EDTA lavou-se com 2 mL de PBS 1X. Fez-se uma centrifugação (20 minutos, 3500 rpm) para a obtenção da nuvem de linfócitos. Para o armazenando dos linfócitos, a nuvem de linfócitos foi separada em duas alíquotas contendo Ficoll e foi submetido ao congelamento para a realização do ensaio cometa na versão alcalina e cinética de reparo (COLLINS et al., 2008; SINGH et al., 1988).

7.2.2 Ensaio cometa (EC)

As amostras foram descongeladas, em seguida foi realizada a confecção das lâminas do EC. Adiciona-se a 20 µL de linfócitos a 200 µL de agarose de baixo ponto de fusão. A ressuspensão foi espalhada em uma lâmina de microscopia previamente pré-coberta com uma agarose na concentração de 1,5% e refrigeradas (cerca de 4°C), por 10 minutos. As lâminas foram colocadas em cubetas envolvida em papel alumínio, contendo solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 100mM, NaOH 20mM) e mantidas sob-refrigeração (4°C) por uma semana (GUNASEKARANA, RAJ E CHAND, 2015).

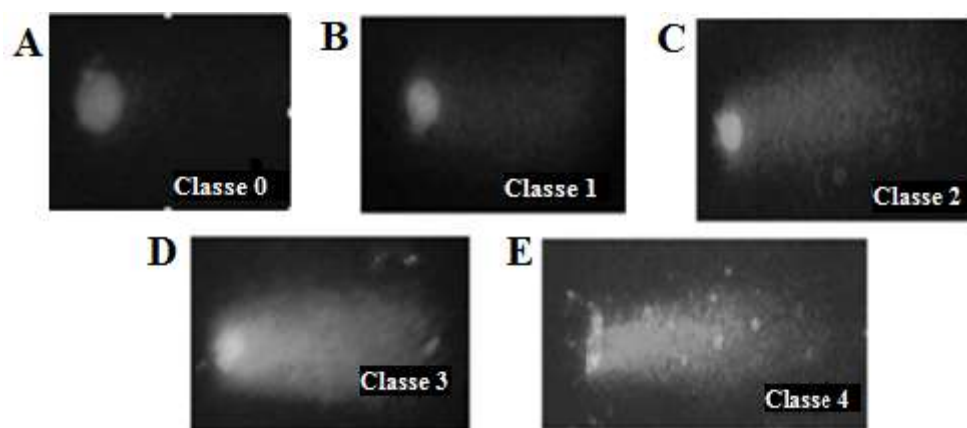
Posteriormente, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese (com gelo em volta da cuba) e submersas em tampão alcalino (NaOH 10M, EDTA 200mM) gelado por 20 minutos. As lâminas são expostas a uma corrente elétrica de 25 V e 300 mA é aplicado por 40 minutos para que ocorra a migração do DNA (MORO, BRUCKER, CHARÃO et al., 2012).

As lâminas foram submersas em solução de neutralização, lavadas suavemente em água deionizada e postas para secar. Após as mesmas são colocadas em cubetas com solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco 5%, glicerol 5%) durante 10 minutos e lavadas com água destilada (BERSCH, PÉRICO E POZZOBON, 2014). Por fim, a coloração foi realizada com nitrato de prata, como descrito por Nadin; Vargas-Roig; Ciocca (2001) e analisadas em microscopia óptica convencional. 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), representados na Figura 5.

A capacidade de reparação do DNA foi avaliada em uma alíquota de linfócitos incubados com MMS (metilmetano sulfonato) a 37°C por 5 minutos. Após a incubação foi realizada a retirada do MMS através de lavagem com PBS 1X, os danos no DNA foram avaliados pelo ensaio cometa alcalino – cinética de reparação, nos tempos 60 minutos (T60') e tempo 180 minutos (T180') após a retirada do agente. As lâminas foram analisadas por

microscopia óptica convencional, 100 células em duplicata, para o cálculo do Índice de Dano (ID). O dano residual (DR) foi calculado como um percentual do dano inicial (T60' = 100% de dano) para o dano final (T180').

Figura 5: Imagem Microscópica de linfócitos humanos representando a diferenciação de danos.,onde varia de uma célula sem dano (A) até seu dano máximo (E).



A imagem A é referente a célula que não possui dano no seu DNA, caracterizado dano 0; a imagem B indica um dano 1, a imagem C representa um dano 2, a imagem D indica um nível de dano de classe 3 e a última imagem (E) representa o dano maior que é classificado como dano 4. FONTE: (PEREIRA,2012)

4.8 Análise dos dados

Para análise dos dados, utilizou-se o programa *SPSS 20.0* for Windows e empregou-se análise descritiva (média, desvio padrão, frequência e quartis), também foi usada a análise de variância (ANOVA) com o *teste post-hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados dois grupos, um identificado como caso em que fizeram parte os pacientes portadores de câncer de pulmão e outro denominado controle em que sujeitos com a função pulmonar preservada foram incluídos. As características gerais dos pacientes com câncer de pulmão (CP) e do grupo controle são apresentadas na Tabela 4. Houve predominância do sexo masculino, com idade adulta avançada, e de sujeitos de cor branca em ambos os grupos. Vale ressaltar que os pacientes com câncer de pulmão relataram ter alta carga tabágica e fumaram por mais tempo comparação com os controles. É possível verificar que os controles possuem maior escolaridade.

Tabela 4: Características dos Sujeitos da Pesquisa.

	CP n=32 (%)	Controle n=9 (%)	P
Idade (anos) ^a	65,41±6,77	56,67±14,95	0,015
Sexo (masculino)	22 (68,8)	5 (55,6)	0,692
Cor da Pele (branco)	25 (78,1)	9 (100)	0,315
Escolaridade			
Ensino superior completo	0	4 (44,4)	
Ensino Médio completo/ incompleto	4 (12,5) / 1 (3,1)	4 (50) / 0 (0)	0,046
Ensino Fundamenta completo/ incompleto	11(34,4) / 10 (31,2)	0 (0) / 1 (11,1)	
Não alfabetizado	6 (18,8)	0 (0)	
Status do tabagismo			
Nunca/Ex /Fumante	2/25/5	6/0/3	0,002
Tabagismo > 30 anos	24 (93,2)	2 (7,7)	0,53

n, número amostral; p considerado significante quando <0.05; ^aExpressos em média ± dp.

Neste estudo foi observado que a faixa etária dos sujeitos com CP enquadra-se como adulta avançada confirmando achados em outros estudos, assim como a alta prevalência de homens (BOGNAR et al., 2015; INCA, 2016; NOVAES et al., 2008). Sabendo que a população portadora de CP predominante é de idade adulta avançada, vale ressaltar que o envelhecimento contribui no aumento de dano no DNA, seja pelo acúmulo de dano não reparado ou pela falha dos sistemas de reparação do organismo (HOEIJMAKERS, 2009; INCA, 2016).

Os sujeitos pesquisados apresentaram grande carga tabágica e por um longo período de tempo, assim como observado no estudo realizado por Souza et al. (2014). O tabagismo é um dos principais fatores de risco para o surgimento do câncer de pulmão, pois o cigarro e derivados são formados por uma mistura complexa de mais de 4700 componentes químicos,

com radicais livres e outros oxidantes presentes em altas concentrações (CEYLAN et al., 2006; VINEIS et al., 2005). O hábito de fumar também pode levar ao desenvolvimento de outras doenças, como a DPOC, doença cardíaca coronariana, acidente vascular cerebral (POLUYI et al., 2015). Por tanto é um fator a ser observado com cuidado, pois o hábito de fumar também pode contribuir na frequência de danos e mutações no DNA, para além dos danos ocorridos, como consequência do metabolismo basal. Em nossos grupos em estudos possuem indivíduos fumantes e ex-fumantes (KIM et al. 2004; HOEIJMAKERS, 2009).

A quimioterapia é uma das opções para tratar o câncer de pulmão, em que são usados medicamentos que são transportados pela corrente sanguínea para destruir as células doentes. O tratamento e sua duração variam de acordo com o estágio do câncer e o tipo de câncer (pequenas células e não pequenas células) que o paciente apresenta (INCA, 2016). Os pacientes incluídos no estudo, até o momento da coleta de dados, tinham uma média de tempo de tratamento de 3,9 meses. De acordo com a análise da classe dos quimioterápicos utilizados, verificou-se que 31,3% usavam antimetabólicos associados com alquilantes, 28,1% inibidores da topoisomerase 2 (TOP2), 18,8% antimetabólicos isolados e 15,6% inibidor da TOP2 associado com alquilante. 3,1% usaram isoladamente um antimitótico e antimetabólico associado com alquilante.

O EC permite identificar dano no DNA e comparar entre diferentes grupos. A versão alcalina do ensaio cometa, realizado neste estudo, descrita por Singh et al. (1988) é um método adotado pela maioria dos laboratórios por ser mais sensível na detecção dos danos no DNA, como: quebra de fita simples e dupla, lesões de sítios alcalinos lábeis e locais de reparos incompletos e *crosslinks* (BRIANEZI, CAMARGO, MIOT, 2009; LEITE, ZANDONATO, FLUMINHAN, 2013). Através deste método, torna-se possível também a visualização do potencial de reparo que a célula possui frente a um agente danoso (NASCIMENTO et al., 2000). Em nosso estudo observamos que os danos no DNA dos pacientes com câncer de pulmão e controles apresentam níveis diferentes, sendo muito mais frequentes, ou seja, com maior ID ALC ($p = 0.001$), como também, no T60' ($p = 0.006$) e T180' ($p = 0.001$) nos portadores de CP quando comparados ao grupo controle.

O índice de dano foi comparado entre os grupos caso e controle (Tabela 5). Observou-se que comparando o grupo controle com os pacientes que usam antimetabólico, o ID ALC foi menor ($p = 0.005$). Assim como, o ID dos pacientes do grupo controle foi menor quando

comparado com o ID de pacientes que fazem uso da associação de inibidor de TOP2 e agentes alquilantes ($p = 0,027$).

No ensaio cometa de reparo no T60' o ID dos controles em uso de antimetabólicos foi maior que os controles ($p = 0.053$). No T180' os pacientes usuários de quimioterápicos da classe antimetabólico apresentaram um ID superior quando comparado aos controles ($p = 0.033$). Além disso, a associação antimitótico + alquilante em pacientes casos elevou o ID quando comparado aos pacientes controles ($p = 0,031$). Relacionado ao dano residual (DR), não houve diferença estatística quando comparadas as diferentes classes de quimioterápicos e associações nos pacientes casos com os controles.

Por conseguinte, avaliamos o ID ALC e os comparamos com os danos causados nas células dos pacientes e controles. Verificando o dano residual dos mesmos, podemos observar que após a exposição ao agente mutagênico MMS, as células são capazes de reverter os danos causados, independentemente se forem de pacientes casos ou controles. A capacidade de reparação de danos ocasionados por fator exógeno também foi relatado por Agnoletto et al. (2007), onde os grupo de pacientes com câncer de mama e o grupo controle foram expostos ao MMS e ao H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e apresentaram danos elevados, porém os danos foram corrigidos após 3h de exposição ao agente mutagênico apenas nos sujeitos, diferente do presente trabalho que os dois grupos reverteram os danos causados no DNA.

Podemos remeter ao estudo realizado por Rojas et al. (2009) que avaliou se o medicamento etoposídeo (um inibidor da TOP2) poderia causar dano ao DNA das células e se seriam reversíveis, através do ensaio cometa, alcançando como resultado a confirmação de que o fármaco pode causar danos ao DNA em células sanguíneas de diferentes formas quando comparado a um grupo celular que não teve contato com o fármaco, mas os danos não foram reversíveis, diferente do observado no presente estudo em que estes danos ocasionados nas células foram reversíveis. Outro estudo, realizado por Campos-Nebel, Larripa e González-Cid (2010) mostrou que os inibidores da TOP2 ocasionam dano ao DNA, porém são reversíveis, assim como no nosso estudo que obtivemos uma redução dos danos no DNA nas células de pacientes que usavam o fármaco de forma isolada e nos pacientes que usavam o mesmo fármaco em associação com um alquilante.

Foi observado no presente estudo que os pacientes usuários de quimioterápico da classe antimetabólico apresentaram IDs maiores, indicando o potencial genotóxico da classe. Importa salientar que os danos observados no ensaio cometa de reparo apontam para

reversibilidade destes, indicado pelo dano residual baixo. Tendo em vista os IDs aumentados que observamos nesta classe de quimioterápico, um estudo que investigava a genotoxicidade do medicamento utilizado na quimioterapia da classe do antimetabólico, administrou doses diferentes em culturas de linfócitos para verificar o dano através da análise de aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs, e mostrou que essa classe terapêutica é altamente genotóxica e citotóxica (AYDEMIR, ÇELIKLER, BILALOĞLU, 2005).

Tabela 5: Média do índice de dano (ID) observada no Ensaio Cometa Alcalino e Cinética de Reparo de acordo com o tipo de quimioterápico usado pelos pacientes.

Classe	CP (n=30)			DR
	ID ALC	ID T60'	ID T180'	
Média geral	188,8±77,1 ^α	302,2±87,7 ^α	259,7±88,5 ^α	115,8±141,7
Inibidor da TOP2	168,7±77,9	299,5±114,6	242,9±95,5	161,8±254,3
Antimetabólico	230,7±92,6 [#]	341,8±66,3 [*]	278,2±67,3 ^{&}	82,6±254,3
Inibidor da TOP2 + Alquilante	214,6±74,2 [#]	300,6±93,5	265,4±76,4	100,3±49,2
Antimitótico + Alquilante	168,9±64,7	281,6±72,4	260,8±107,1 ^{&}	102,1±52,3
	Controles (n=9)			
Sem fármaco	92,33±42,4 [#]	202,78±100,3 [*]	134,2±78,1 ^{&}	77,3±45,9

Foram retirados dois pacientes para realizar a análise estatística, por ter duas classes diferentes de quimioterápico com apenas um paciente usuário de cada uma estas classes. [#]diferença significativa entre os controles sem fármaco e os casos que usavam antimetabólicos e inibidor a TOP2+alquilante; ^{*} diferença significativa entre os controles sem fármaco e os casos que usavam antimetabólico; [&]diferença significativa entre os casos que usavam antimitótico+alquilante e antimetabólico, $p < 0.05$ pelo teste ANOVA com *post hoc* de Tukey; ^αdiferença significativa entre os grupos através do teste *t de student* independente.

O ensaio cometa realizado em linfócitos de pacientes que apresentavam o uso de antimetabólico associado ao alquilante (ID ALC = 343; ID T60' = 400; ID T180' = 284 e DR = 71) mostrou que o uso associado destes dois grupos farmacêuticos possui uma diminuição no dano ocasionado no DNA. Este resultado condiz com um estudo feito por Ledermann et al. (2010) em pacientes com câncer de ovário, que mostrou que quando essas duas classes foram usadas juntas o antimetabólico auxiliou a reparação do dano ocasionada pelo alquilante. Assim como os pacientes que utilizaram o antimitótico isolado apresentaram um ID inicial alto (ID ALC = 237) e quando tratados com o agente mutagênico para verificar sua capacidade de reparação obtivemos um aumento do dano (ID T60' = 334), seguido de um reparo inicial satisfatório (ID T180' = 94), mostrando um sistema de reparação eficiente (DR = 28,1).

Apesar de o MMS ser também um agente alquilante, como alguns quimioterápicos, e induzir as células a um estado de defesa antioxidante não se observou no presente estudo

diferença estatística no DR dos controles e dos casos. Este estudo pode ser melhorado ampliando casos e controles, mas especialmente os controles, permitindo uma melhor comparação entre os grupos.

6 CONCLUSÃO

O objetivo deste estudo foi comparar o nível de dano no DNA e a capacidade de reparação entre pacientes com câncer de pulmão e sem câncer de pulmão atendidos no Centro de Oncologia Integrado do Hospital Ana Nery e relacionar os níveis de danos com a terapia utilizada aos pacientes com câncer de pulmão. Foi observado no presente estudo que os pacientes com o câncer de pulmão apresentaram maior dano no DNA e menor capacidade de reparo quando comparado aos sujeitos controles.

A análise dos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes participantes do estudo permitiu identificar maioria do sexo masculino (68,8% CP e 55,6% sujeitos controles), com a cor da pele autorreferida branca por 78,1% dos pacientes com CP e 100% do grupo controle, uma população com idade adulta avançada com média de 65,4 para o grupo de pacientes casos e de 56,67 para os controles, apresentou um período de tabagismo alto pelos pacientes com CP (93,2%) e baixa pelo grupo controle (7,7%) e o grupo controle com o grau de escolaridade maior (4 com ensino superior, 4 com ensino médio completo e 1 com ensino fundamental incompleto) enquanto os pacientes com o CP apresentaram a maioria com ensino fundamental completo e/ou incompleto (11 e 10 respectivamente).

A capacidade de reparo das células dos participantes da pesquisa quando expostos ao MMS foi diferente entre os casos e os controles (mas sem mostrar diferença estatística) em que se observou que no T60' (tempo de maior ação do MMS) os pacientes casos atingiram um ID $302,2 \pm 87,7$ e os controles um ID $202,68 \pm 100,3$ e seu dano residual foi de DR $115,8 \pm 141,7$ e DR $77,3 \pm 45,9$, respectivamente. Mostrando que mesmo os pacientes com CP apresentaram capacidade de reparo, no entanto menor que os sujeitos saudáveis.

O uso de quimioterápico entre os pacientes com o CP influenciou no nível de dano e reparação das células quando expostas ao MMS. A classe terapêutica de antimetabólicos foi a que maior ID no ID ALC, T60', T180' ($p = 0.005$; $p = 0.053$; $p = 0.033$) quando comparado aos sujeitos controles da pesquisa, seguido do grupo que utilizou a associação de inibidor da topoisomerase II e alquilante ($p = 0.027$) no ID ALC, e o grupo usuário de antimitótico associado com alquilante no T180' ($p = 0.031$), mostrando que estes podem ser mais prejudiciais ao DNA das células.

7 PERSPECTIVAS

Ampliar o número amostral a ser analisado, principalmente quando refere-se ao número de amostras que compõem o grupo controle. Além disso, seria necessária a realização do teste micronúcleos para determinação dos danos permanentes nas células.

Ainda em estudos futuros, sugere-se avaliar melhor a diferença de danos causados pelo MMS e cisplatina e/ou carboplatina, uma vez que ambos são agentes aquilantes. Assim como, relacionar o estadiamento da doença com os danos no DNA ocasionados nas células dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ADCOCK, IM; CARAMORI, G. e BARNES, PJ. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: New Molecular Insights. *Respiration*. Vol. 81, p. 265–284, 2011.
- AGNOLETTO, MH;GUECHEVA, TN; DONDÉ, F et al. Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. *Clinical Biochemistry*. Vol. 40, p.1252–1258, 2007.
- ALMEIDA, VL de; Leitão, A; Reina, LCB et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celula. *Química Nova*. Vol. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALMONDES, KGS; LEAL, GVS; COZZOLINO, SMF; et al. The role of selenoproteins in câncer. *Revista da Associação Médica Brasileira*. Vol. 56, n. 4, p. 484-488, 2010.
- ANDRADE, M; SILVA, SR. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. *Revista Brasileira de Enfermagem*. Brasília. Vol. 60, n. 3, pag. 331-5, 2007.
- AYDEMIR,N; ÇELIKLER, S; BILALOĞLU, R. In vitro genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes. *Mutation Research*. Vol. 582, p.35–41, 2005.
- BARROS, JÁ; VALLADARES, G; FARIA, AR et al. Diagnóstico precoce do câncer de pulmão: o grande desafio. Variáveis epidemiológicas e clínicas, estadiamento e tratamento. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. Vol. 32, n. 3, pag. 221-7,2006.
- BEADSMOORE, C.J. E SCREATON N.J. Classification, staging and prognosis of lung cancer. *European Journal of Radiology*. Vol. 45, p. 8-17, 2003.
- BERSCHI, BR; PÉRICO, E e POZZOBON, A. Verificação de dano no dna de células sanguíneas em adultos jovens consumidores de tabaco. *Caderno pedagógico*. Vol. 11, n. 1, p. 8-19, 2014.
- BOGNAR, CLFB; SIMON, SD; GANSL, RC et al. The impact of erlotinib use in non-small-cell lung câncer patients treated in a private reference general hospital and in a private cancer clinic from 2005 to 2011. *Einstein*.Vol. 13, n. 2, p. 215-220, 2015.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 2ª ed. Rio de Janeiro (RJ): INCA; 2002.
- BRASIL, Ministério da Saúde/ Secretaria de Atenção à Saúde/ Departamento de Regulação, Avaliação e Controle/Coordenação Geral de Sistemas de Informação – 19ª Edição. Janeiro de 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção a Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRENDLER-SCHWAAB, S; Hartmann, A; Pfuhrer, S et al. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. Vol. 20, n. 4, p. 245--254, 2005.

BRIANEZI, G; CAMARGO, JLV; MIOT, HA. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* . Vol. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

CAMPOS-NEBEL, M; LARRIPA, I; GONZÁLEZ-CID, M. Topoisomerase II-Mediated DNA Damage Is Differently Repaired during the Cell Cycle by Non-Homologous End Joining and Homologous Recombination. *PLoS ONE*. Vol. 5, n. 9, 2010.

CEYLAN, E; KOCYIGIT, A; GENCER, M et al. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respiratory Medicine*. Vol. 100, p. 1270–1276, 2006.

COLLINS, A.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G. et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. Vol. 23, n. 3, p. 143–151, 2008.

COSTA, CH DA; RUFINO, R E SILVA, JRL. células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. *Revista da Associação Médica Brasileira*. Vol. 55, n. 3, p. 347-54, 2009.

CUNHA, K e LEHMANN, M. Drogas anticâncer e seus efeitos genotóxicos. In.: SILVA, J da; ERDTMANN, B e HENRIQUES, JAP (Org.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

DENMAN, AR; ROGERS, S; ALI, A, et al. Small area mapping of domestic radon, smoking prevalence and lung cancer incidence e A case study in Northamptonshire, UK. *Journal of Environmental Radioactivity*, 150 ,159e169, 2015.

DETTERBECK. F.C.; JANTZ, M.A.; WALLACE, M, et al. Invasive mediastinal staging of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. Vol. 132, n. 3 (Suppl.), pag. 202S-220S, 2007.

DUARTE, RLM e PASCHOAL, MEM. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. Vol. 32, n. 1, p. 56-65, 2005.

DURHAM, A.L.; ADCOCK. I.M. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung Cancer*. Vol. 90, pag. 121–127, 2015.

ENGELS, EA.; BROCK, MV.; CHEN, J. *et al.* Elevated Incidence of Lung Cancer Among HIV-Infected Individuals. *Journal of Clinical Oncology*. Vol. 24 , n. 9, p. 1383-1388, 2006.

FERNÁNDEZ-BUSSY, S.; LABARCA, G.; CANAL, S. *et al.* Diagnostic yield of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for mediastinal staging in lung cancer. *Jornal Brasileira de Pneumologia*. Vol. 41, n. 3, pag. 219-224, 2015.

FERNANDEZ, A.; JATENE, FB., ZAMBONI, M. Diagnóstico e estadiamento do câncer de pulmão. *Jornal de Pneumologia*. Vol. 28, n. 4, pag. 219-228, 2002.

GUERRA, MR; GALLO, CVM e MENDONÇA, GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*. Vol. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GUNASEKARANA, V; RAJ, GV e CHAND, P. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Vol. 9, n. 3, p. 01-05, 2015.

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

HUANG, CY.; HUANG, HY.; FORREST, MD. *et al.* Inhibition Effect of a Custom Peptide on Lung Tumors. *PLOS ONE*. Vol. 9, n. 10, 2014.

HYE A.L; LEE, WK; DOHEE, L. *et al.* Risks of Lung Cancer due to Radon Exposure among the Regions of Korea. *Journal Korean Medical Science*. Vol. 30, n. 5, pag. 542-548, 2015.

IARC. Tumours of the Lung, 20015. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb10/bb10-chap1.pdf>>

IARC. A review of human carcinogens. Part E: Personal habits and indoor combustions / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France, 2009.

IARC, Asbestos (Chrysotile, Amosite, Crocidolite, Tremolite, Actinolite, and Anthophyllite), 2015. Disponível em: < <http://www.iarc.fr/> >

IBIAPINA, JO. Câncer de Pulmão. In: VIEIRA, SC; LUSTOSA, AML; BARBOSA, CNB *et al.* *Oncologia básica*. Teresina, PI: Fundação Quixote, 2002.

INCA . Carcinoma de Pulmão de Células não Pequenas. *Revista Brasileira de Cancerologia*. Vol. 48, n. 4, p. 485-492, 2002.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Controle do Câncer (2015a): uma proposta de integração ensino-serviço. 2.ed. ver. Atual. Rio de Janeiro: Pro-Onco, 1993. Acessado em: setembro de 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=98>

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Controle do Câncer (2015b): banco de dados do INC, 2015. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>

INCA, Instituto Nacional de Câncer (2015c). Tipos de câncer: pulmão. Acessado em novembro de 2015. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao>>

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer. Carcinoma de pequenas células de pulmão. *Revista Brasileira de Cancerologia*. Vol. 49, n. 3, pag. 149-152, 2003.

INCA, Instituto Nacional de Câncer (2016a). ABC do câncer. Acessado em junho de 2016. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf>

INCA, Instituto Nacional de Câncer (2016b). Estimativas 2016: Incidências do câncer no Brasil. Acessado em: Junho de 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>

IRION, KL. Diagnóstico precoce do câncer de pulmão. *Radiologia Brasileira*. Vol. 35, n. 3. III-IV, 2002.

KIM, H.; LIU, X.; KOBAYASHI, T et al. Reversible Cigarette Smoke Extract-Induced DNA Damage in Human Lung Fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Vol. 31, p. 483-490, 2004.

KING, PT. Inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and its role in cardiovascular disease and lung cancer. *Clinical and Translational Medicine*. 4:26, 2015.

KOPJAR, N; GARAJ-VRHOVAC, V. Application of the alkaline comet assay in human biomonitoring for genotoxicity: a study on croatin medical personnel handling antineoplastic drugs. *Mutagenesis*. Vol. 16, n. 1, p. 71-78, 2000.

KOPJAR, N; GARAJ-VRHOVAC, V; MILAS, I. Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. *Journal Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. Vol. 22, p. 13-30, 2002.

LEDERMANN, JÁ; Gabra, H; Jayson, GC et al. Inhibition of Carboplatin-Induced DNA Interstrand Cross-link Repair by Gemcitabine in Patients Receiving these Drugs for Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*. Vol. 16, n. 19, 2010.

LEITE, KAS; ZANDONATO, VV; FLUMINHAN, A. Avaliação da genotoxicidade provocada por fatores ambientais em *Tradescantia pallida cv purpurea* através do ensaio cometa. *IX Fórum Ambiental da Alta Paulista*. V. 9, n. 11, p. 399-417, 2013.

MALUF, SW e ERDTMANN, B. Biomonitorização do dano genético em humanos. In.: SILVA, J da; ERDTMANN, B e HENRIQUES, JAP (Org.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

MORITZ, P.; STEIDLE, LJM.; FELISBINO, MB *et al.* Determination of the inflammatory component of airway diseases by induced sputum cell counts: use in clinical practice. *Jornal Brasileira de Pneumologia*. Vol. 34, n. 11, pag913-921,2008.

MORO, AM; BRUCKER, N e CHARÃO, M *et al.* Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene. *Mutation Research*. Vol. 746, p. 42– 48, 2012.

NADIN, SB; VARGAS-ROIG, LM AND CIOCCA, DR. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Vol. 49, n. 9. pag. 1183–1186, 2001.

NASCIMENTO, PA; SUZUKI MF, DA SILVA MA *et al.* Avaliação da capacidade de reparo ao dano induzido no DNA pela radiação ionizante em indivíduos sadios e em pacientes com câncer de mama. *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares*. São Paulo, 2000.

NOVAES, FT; CATANEO, DC, RUIZ JUNIOR, RL *et al.* Câncer de pulmão: histologia, estágio, tratamento e sobrevida. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. Vol. 34, n. 8, p.. 595-600, 2008.

OMS, Organização Mundial da Saúde. Acessado em outubro de 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/>>

PERES,AC. Câncer: um raio x atualizado da doença. *Radis*. n.155.Ago, 2015. Disponível em: <www.wnsp.fiocruz.br/radis> .

OLIVEIRA, C; SARAIVA, A. Comparative study between computed tomography and bronchoscopy in the diagnosis of lung cancer. *Radiologia Brasileira*. Vol. 43, n. 4, pag. 229– 235; 2010.

PRADO, BBF. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. *Câncer /artigos*.P. 21 -24, 2014.

PAGLIUSO, RG; GOLONI-BERTOLLO, EM; FILHO, MA et al. Oxidative stress and Renal Chronic Allograft Dysfunction. *Revista Arquivos de Ciência da Saúde*. Vol. 13, n. 4, p. 223-227, 2006.

PETERSON, E; AKER, A; KIM, JH et al. Lung cancer risk from radon in Ontario, Canada: how many lung cancers can we prevent? *Cancer Causes & Control*, 24:2013–2020, 2013.

POLLOCK, RE; DOROSHOW, JH; KHAYAT, D et al.. Manual de oncologia Clínica da União Internacional Contra o Câncer. 8. ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006.

POLUYI, EO; ODUKOYA, OO; AINA, B et al. Tobacco related knowledge and support for smoke-free policies among community pharmacists in Lagos state, Nigeria. *Pharmacy Practice*. Vol. 13n. 1, p.486, 2015

RIBEIRO-VIEIRA, R. A. M. A.; et al. Paracoccidioidomycosis: no genetic damage in human peripheral blood cells of patients assessed by single-cell gel (comet) assay. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V. 40, n. 4, p. 476-478. 2007.

RIVERA, MP; MEHTA, AC; WAHIDI, MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. Vol. 143(5 Suppl), Pag. 142S-65S,2013.

ROJAS, E; MUSSALI, P; TOVAR, E et al. DNA-AP sites generation by Etoposide in whole blood cells. *BMC Cancer*. Vol 9, p. 398, 2009.

SPP, Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Qual o tratamento para o cancro de pulmão? Acessado em 21/10/2015. Disponível em: <<http://www.sppneumologia.pt/textos/?imc=51n81n>>

SILVA, J da; ERDTMANN, B e HENRIQUES, JAP (Org.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

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

SOUZA, MCS; VASCONCELOS, AGG; RABELO, MS; et al. Perfil dos pacientes com câncer de pulmão atendidos no Instituto Nacional de Câncer, segundo condição tabagística, 2000 a 2007. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. Pag. 175-188, 2014.

SOUZA, FJFB; PERIN, GT; SILVA, ALL. *et al.* Rendimento diagnóstico de câncer de pulmão por intermédio de fibrobroncoscopia e tomografia. *Revista da Sociedade Brasileira de Clinica Medica*. Vol. 12, n. 1, pag. 51-6, 2014.

SOUZA, TS e FONTANETTI,CS. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. *Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento de Petróleo e Gás*. Campinas: Copyright, 2007.

STRICKER, TP; UMAR, V. Neoplasia. In:KUMAR, V; ABBAS, AK; FAUSTO, N; et al. Robbins, *Patologia Básica*. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

TEDDE, ML.; FIGUEIREDO, VR.; TERRA, RM. *et al.* Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in the diagnosis and staging of mediastinal lymphadenopathy: initial experience in Brazil. *Jornal Brasileira de Pneumologia*. Vol. 38, n.1, pag. 33-40,2012.

VANDENHENDE, MA.; ROUSSILLON, C.; HENARD, S. *et al.* Cancer-Related Causes of Death among HIV Infected Patients in France in 2010: Evolution since 2000. *PLOS ONE*. 2015.

VERAS, TN; PIZZICHINI, E; STEIDLE, LJM, et al. Cellular composition of induced sputum in healthy adults. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. Vol. 37, n. 3, pag.348-353,2011.

VINEIS, P; AIROLDI, L; VEGLIA, F. 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. *British Medical Journal*,330(7486): 277, 2005.

WHITAKER, KL.; WINSTANLEY, K.; MACLEOD, U. *et al.* Low cancer suspicion following experience of a cancer ‘warning sign’. *European Journal of Cancer*, 2015.

WÜNSCH FILHO, V.; NEVES, H. e MONCAU, JE. Amianto no Brasil: conflitos científicos e econômicos. *Revista da Associação Médica Brasileira*. Vol. 47, n. 3, p. 259-61, 2001.

ZAMBONI, M. Epidemiologia do câncer de pulmão. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. Vol. 28, n. 1, p. 41-47, 2002.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido

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.

Nome do sujeito: _____

Origem do Sujeito: _____

Pesquisa: DANO, REPARAÇÃO E SUSCEPTIBILIDADE EM DOENÇA PULMONAR.

Coordenadoras da Pesquisa: Prof.^a Dra. Lia Gonçalves Possuelo, do Curso de Biologia (51-84713720), Prof. Dra. Andréa Lúcia Gonçalves da Silva (51- 84385204)

Objetivos e benefícios

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo **objetivo principal** estudar a população com doença pulmonar (Tuberculose, DPOC e Câncer de Pulmão), da região de Santa Cruz do Sul, através da avaliação e quantificação de danos e capacidade de reparação no DNA, bem como identificação de susceptibilidade genética na população em questão. **Os benefícios principais desta pesquisa serão:** identificação de fatores de risco genético para o desenvolvimento destas doenças pulmonares, bem como o comportamento de dano genético e sua relação com a progressão da doença. Você receberá, sem custo algum, os resultados desta pesquisa. Quando constatada alguma situação anormal, o sujeito será informado para procurar assistência especializada na área da saúde.

Procedimentos

Para realizar essa pesquisa será necessária a **coleta de sangue e uma coleta de células da cavidade oral**. Serão coletados cerca de 10 mL de sangue da veia do braço e, ainda, para quem concordar, será coletada uma gota de sangue de um dos dedos da mão, a partir de uma pequena picada. As células da cavidade oral serão coletadas com uma pequena escova, semelhante a uma escova de dente oral, que será esfregada na parte de dentro da bochecha em movimentos circulares.

Local de estudo

Os procedimentos da **coleta de sangue e células da cavidade oral**, bem como a aplicação de um **questionário** sobre dados de saúde e estilo de vida serão realizados no ambulatório da DPOC ou TB do Hospital Santa Cruz e no Centro de Oncologia Integrado do Hospital Ana Nery. As análises genéticas serão realizadas nos laboratórios de Bioquímica e de Genética e Biotecnologia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC).

Riscos e desconfortos

Para a coleta de sangue e células da cavidade oral, será utilizado **material totalmente descartável** e um **profissional devidamente capacitado** fará a coleta, **respeitando as normas de biossegurança**. Embora não haja risco para a sua saúde, somente a coleta de sangue pode ocasionar, eventualmente, um pequeno arroxamento na região da punção, que desaparece, em poucos dias. Os demais procedimentos (exames) serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos aos participantes do estudo.

Desistência na participação do estudo

A participação de cada indivíduo nesse estudo é voluntária, ou seja, quem não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde. Se concordar em participar do estudo e mudar de ideia no decorrer do mesmo, estará livre para fazê-lo, e da mesma forma não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

Gostaria de ser comunicado dos resultados desta pesquisa?

- () Sim, gostaria.
- () Não gostaria de ser comunicado dos resultados desta pesquisa.

Compensação financeira

Não haverá nenhum pagamento aos indivíduos que concordarem em participar do estudo, bem como os participantes do estudo não terá nenhum custo adicional relacionado aos procedimentos e recebimento do laudo com os resultados.

Confidencialidade das informações

Toda a informação individual que será fornecida pelo participante do estudo e os resultados dos exames realizados serão considerados confidenciais. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código (número) criado na entrada do estudo; este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo. Este banco será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos, no meio científico.

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo

Este termo de consentimento explica o estudo que está sendo proposto e convida os indivíduos a participar; no entanto, se houver alguma dúvida, estas poderão ser esclarecidas, pela equipe do estudo pelos telefones: 84385204 (profª Andréa) e 84713720 (prof Lia).

Em caso de danos

Se o participante do estudo acha que teve algum problema de saúde, relacionado com a sua participação no estudo, o tratamento será fornecido pelo SUS, na instituição participante.

Autorização para estocagem de material biológico

1. Permito que minha amostra de sangue seja guardada para ser utilizada em outra pesquisa, mediante protocolo de pesquisa autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISC, ficando, no entanto livre para solicitar a destruição da mesma a qualquer momento, se assim desejar; (sem minha identificação e/ou mantendo minha privacidade).

- () Sim, permito
- () Não permito que minha amostra seja utilizada em novos estudos
- () Desejo que minha amostra seja destruída após o fim do presente estudo.

O significado de sua assinatura

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre o termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar deste estudo. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

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

Assinatura do responsável. Data:

Assinatura do Coordenador do estudo. Data:

Obs.: O presente documento, baseado no item IV das diretrizes e normas regulamentares para pesquisa em saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do voluntário ou de seu responsável legal e outra com o pesquisador responsável.

ANEXO B – Questionário

QUESTIONÁRIO

Identificação: _____ Data: _____ Diagnóstico clínico: _____

Nome: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Fone: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Idade: _____

Gênero: () Masculino () Feminino

2. Raça: () 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. Você é fumante atualmente? () Sim () Não () Ex-fumante

8. Fumou ou fuma por quanto tempo? _____

9. Há quanto tempo parou de fumar? _____

10. Que tipo de cigarro você fuma ou fumava?

() Cigarro com filtro () Cigarro sem filtro () Palheiro () Cachimbo

() Charuto () Todas as opções () Outro. Qual? _____

11. Quantos cigarros você fuma(ava) por dia? _____

12. Há quanto tempo você tem o diagnóstico da doença? _____

13. Histórico de doença pulmonar na família? () Sim. Qual _____ ()

Não

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

() Sim. Qual? _____ () Não

15. Você usa medicamentos para tratar a doença pulmonar?

() Sim. Quais? _____ () Não

16. Você usa algum outro medicamento por conta própria?

() Sim. Quais? _____ () Não

17. Você realiza oxigenoterapia? () Sim () Não

18. Você apresenta alguma comorbidade (Ex: Diabetes, hipertensão, Distúrbio psiquiátrico, Imunodepressão, hepatite, HIV Positivo, etc.)?

() Sim. Qual? _____ () Não

19. Você utiliza medicamentos para estas doenças?

() Sim. Quais? _____ () Não

20. Você teve hospitalizado recentemente? () Não () Sim Quando? _____

21. Grau de Dispneia (falta de ar): () Leve () Moderada () Grave () Muito Grave

26. Avaliação Antropométrica

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

Peso Kg : _____ Estatura(m): _____ IMC= _____

Dados para busca em prontuário:

Data da primeira consulta médica no COI: _____

Sítio do tumor primário: (0) Lobo: _____ (1) brônquio: _____ (2) pulmão: _____
(3) outro: _____ (4) não disponível

Estadiamento: (0) I (1) II (2) III (3) IV

Esquema terapêutico de primeira linha recebido:

Agentes

quimioterápicos: _____

Data de início: _____

Tempo em meses para utilização deste esquema: _____