

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROMOÇÃO DA SAÚDE – MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PROMOÇÃO DA SAÚDE**

Márcia Raquel Schneider

**SUSCETIBILIDADE GENÉTICA, DANO E REPARAÇÃO DO DNA E SUA  
RELAÇÃO COM O PERFIL FISIOPATOLÓGICO DE PACIENTES COM  
CÂNCER DE PULMÃO**

Santa Cruz do Sul 2017

Márcia Raquel Schneider

**SUSCETIBILIDADE GENÉTICA, DANO E REPARAÇÃO DO DNA E SUA  
RELAÇÃO COM O PERFIL FISIOPATOLÓGICO DE PACIENTES COM  
CÂNCER DE PULMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde – Mestrado, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Promoção da Saúde.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Andréia Rosane de Moura Valim

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Lia Gonçalves Possuelo

Colaborador (a): Dr<sup>a</sup> Andréa Gonçalves

Santa Cruz do Sul, 2017

## **BANCA EXAMINADORA**

Dr<sup>a</sup>. Andréia Rosane de Moura Valim

Professora orientadora – UNISC

Dr<sup>a</sup>. Silvia Isabel Rech Franke

Examinadora interna– UNISC

Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Examinador externo - UFGRS

## **AGRADECIMENTOS**

À Andreia Rosane de Moura Valim, que aceitou o desafio de me orientar na caminhada em busca do meu título de mestre, sabendo das minhas limitações na área da microscopia, mas nunca deixando de acreditar que eu seria capaz, gostaria de dizer que a maior descoberta dessa jornada foi, além do amor pela sala de aula, a paixão pela pesquisa. Eternamente grata.

À minha co-orientadora Lia Gonçalves Possuelo pelo incentivo e apoio durante as coletas, e todo o processo de desenvolvimento do trabalho, de forma muito competente e inspiradora.

À minha especial colaboradora Andrea Gonçalves, por todas as vezes que me estendeu a mão, e me mostrou o caminho, quando eu não fui capaz de enxergar, fazendo-se para mim, um exemplo de profissional a ser seguido.

Aos bolsistas do projeto, em especial à Maribel e Augusto, pela disposição e competência ao me passarem seus conhecimentos de bancada e oferecerem o suporte necessário para que pudéssemos obter o resultado esperado. À Paloma e Cássia, por abraçarem a minha causa, como se fosse a delas.

A todos que acreditaram, quando eu tive dúvidas.

Aos meus pais, pela fé e pelo suporte cuidando das minhas filhas com amor, todas as vezes que eu não pude me fazer presente como gostaria, sendo meu pai o exemplo de profissional e minha mãe, exemplo de mulher em todos os sentidos.

Às minhas filhas, pelas crianças maravilhosas que são.

## **DEDICATÓRIA**

*À lua e ao sol da minha vida, Sara e Mariá, motivo pelo qual cheguei aqui.*

*À minha mãe, por tantas razões que não saberia citar.*

*“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente.*

*Mas o que melhor se adapta às mudanças. ”*

*Charles Darwin*

## RESUMO

Doenças pulmonares são, atualmente, a terceira maior causa de morte no mundo e são caracterizadas por comprometer o trato respiratório de forma agressiva e debilitante. Podem apresentar inúmeras causas, dentre elas a mais significativa é o tabagismo, seguido da poluição ambiental, exposição ocupacional e fatores genéticos, além da debilidade do sistema imunológico. O câncer de pulmão tem 90% dos casos relacionados ao tabagismo, sendo que os outros 10% dividem-se em fatores ocupacionais, ambientais e genéticos. No mundo, atualmente cerca de 1,8 milhões de pessoas ao ano morrem por câncer de pulmão, sendo a maioria homens com idades entre 20 a 40 anos. O objetivo da pesquisa foi traçar o perfil fisiopatológico dos portadores de câncer de pulmão, quantificando o dano e reparação do DNA e identificando suscetibilidade genética. Assim, realizou-se ensaio cometa, teste de micronúcleos (para identificação de dano e reparação do DNA) e identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (para a identificação de suscetibilidade genética), a partir de 52 casos e 50 controles. Após análise estatística, ao comparar-se o resultado do ensaio cometa entre os grupos caso (CA) e controle (CO), observou-se que tanto a doença como o uso de quimioterápicos, podem exercer influência no estabelecimento do dano, bem como para a redução da capacidade de reparação. Entre os dois grupos a maioria foi do sexo masculino e não apresentava comorbidades associadas. A maioria dos pacientes do grupo caso foi ex-tabagista e com histórico superior a 15 anos de uso de tabaco. Ao analisar os protocolos de tratamento, a maioria dos pacientes fez uso de duas classes de quimioterápicos e tiveram dano basal ( $p= 0,015$ ) e residual ( $p= 0,05$ ) superior aos pacientes do grupo CO. Nas análises envolvendo a reparação do dano induzido por metilmetano de sulfonato (MMS), observou-se para os CO, que a relação entre o tempo zero (T0) e o tempo 60 minutos (T60) apresentou reparação, da mesma forma que do T0 em relação ao tempo 180 minutos (T180), de forma progressiva. No entanto para os CA, entre o T0 e o T60 ocorreu aumento do dano, observando-se a reparação somente no T180. A análise da frequência e tipo de micronúcleos revelou diferença nos alelos de risco dos genes IL6 (1800795), TNF- $\alpha$  (1800620) e VDR (2228570), pois apresentaram mais alterações nos pacientes com câncer de pulmão. A avaliação do rs 1800795 do gene IL6 revelou aumento no percentual de micronúcleos, broto nuclear, células binucleadas, cariorréticas e cariolíticas nos portadores do alelo de risco nos CA. Enquanto no rs 1800620 do gene TNF- $\alpha$  foi observado para os portadores do alelo de risco, redução no percentual de células basais, de micronúcleos, broto nuclear, células binucleadas e cariorréticas. A avaliação do rs 2228570 no gene VDR demonstrou redução no percentual de

células basais, aumento de micronúcleos, broto nuclear, células binucleadas e cariorréticas. Todos os resultados envolvendo os genes IL6, TNF- $\alpha$  e VDR, sinalizaram maior dano nos genótipos onde o alelo de risco se fez presente. A presença de micronúcleos é um sinalizador de dano irreparável, polimorfismos nos genes IL6 e VDR são importantes marcadores tumorais, por isso conclui-se que as análises realizadas são relevantes para entender a fisiopatologia do câncer de pulmão.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### ARTIGO 1

**Figura 1:** Fluxograma - amostragem final do estudo.

**Tabela I:** Características clínicas e farmacológicas dos grupos CA e CO.

**Figura 02:** Índice de Dano Alcalino e Dano Residual de CA e CO pelo ensaio cometa.

**Figura 03:** Cinética de reparação do dano no DNA induzido por MMS nas amostras CA e CO induzido pelo ensaio cometa.

**Figura 04:** Associação entre o ID no DNA induzido por MMS, nos tempos 0 e 60 minutos, nos pacientes com câncer de pulmão.

**Figura 05:** Índice de Dano Alcalino e Dano Residual de pacientes com câncer de pulmão estratificados pelos grupos envolvendo 1 ou 2 classes de quimioterápicos.

### ARTIGO 2

**Tabela I:** Características clínicas e farmacológicas dos grupos CA e CO.

**Tabela II:** Frequência de micronúcleos e anormalidades celulares em portadores de cancer de pulmão e controles, estratificados por polimorfistas genéticos IL6 (rs1800795).

**Tabela III:** Frequência de micronúcleos e anormalidades celulares em portadores de cancer de pulmão e controles, estratificados por polimorfistas genéticos TNF- $\alpha$  (rs 1800629).

**Tabela IV:** Frequência de micronúcleos e anormalidades celulares em portadores de cancer de pulmão e controles, estratificados por polimorfistas genéticos VDR (rs 2228570).



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BUD	Defeito na citocinese
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
IL	Interleucinas
IL-6	Interleucina-6
PCR	Proteína C- Reativa
SNPs	Single-Nucleotide Polymorphisms
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
VD	Vitamina D
VDR	Receptor de Vitamina D
CA	Casos de câncer
CO	Controles
T0	Tempo zero
T60	Tempo 60
T180	Tempo 180
OMS	Organização mundial da saúde
INCA	Instituto nacional do câncer
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
CEP	Comitê de ética em pesquisa
N	Número amostral
MN	Micronúcleos

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	04
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	05
<b>RESUMO</b> .....	06
<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</b> .....	08
<b>LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	09
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	11
<b><u>CAPÍTULO I</u></b> .....	12
PROJETO DE PESQUISA.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3 OBJETIVOS.....	32
4 MÉTODO.....	33
5 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO.....	38
6 RECURSOS HUMANOS E INFRA-ESTRUTURA.....	39
8 RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS.....	41
9 RISCOS/DIFICULDADES/LIMITAÇÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS.....	45
<b><u>CAPÍTULO II</u></b> .....	50
RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO.....	51
<b><u>CAPÍTULO III</u></b> .....	53
ARTIGO I.....	54
ARTIGO II.....	69
<b><u>CAPÍTULO IV</u></b> .....	88
NOTA A IMPRENSA.....	89
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90
<b>ANEXOS</b> .....	93
ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	94
ANEXO B – Diretrizes da revista Respiratory Research.....	97
ANEXO C - Normas da revista BMC Medical Genetics.....	104

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação de Mestrado, consoante ao Regimento do Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde da Universidade de Santa Cruz do Sul, é composta por cinco partes: projeto de pesquisa, relatório do trabalho de campo, artigos, nota para divulgação da pesquisa na imprensa e anexos.

Constam nesta dissertação dois artigos:

**Artigo 1-** Dano e reparação do DNA e sua relação com o perfil fisiopatológico de pacientes com câncer de pulmão em quimioterapia.

**Artigo 2-** Avaliação da frequência de micronúcleos e anormalidades celulares e de polimorfismos genéticos nos genes IL6, TNF- $\alpha$  e VDR em portadores de câncer de pulmão.

## **CAPÍTULO I – PROJETO DE PESQUISA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROMOÇÃO DA SAÚDE – MESTRADO**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PROMOÇÃO DA SAÚDE**

Márcia Raquel Schneider

**SUSCETIBILIDADE GENÉTICA, DANO E REPARAÇÃO DO DNA E SUA**  
**RELAÇÃO COM O PERFIL FISIOPATOLÓGICO DE PACIENTES COM CÂNCER**  
**DE PULMÃO**

Santa Cruz do Sul, 2015.

Márcia Raquel Schneider

**SUSCETIBILIDADE GENÉTICA, DANO E REPARAÇÃO DO DNA E SUA  
RELAÇÃO COM O PERFIL FISIOPATOLÓGICO DE PACIENTES COM  
CÂNCER DE PULMÃO**

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde – Mestrado, Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Promoção da Saúde.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Andréia Rosane de Moura Valim  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Lia Gonçalves Possuelo  
Colaboradora: Dr<sup>a</sup> Andrea Lúcia Gonçalves da Silva

Santa Cruz do Sul, 2015.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 CÂNCER DE PULMÃO E ALGUMAS DEFINIÇÕES.....	19
2.1.1 Características do câncer de pulmão.....	19
2.1.2 Fatores causais do câncer de pulmão.....	20
2.1.3 Epidemiologia do câncer de pulmão.....	21
2.1.4 Relação entre o câncer de pulmão e estilo de vida dos indivíduos.....	23
2.1.5 Alterações genéticas e o câncer de pulmão.....	24
2.1.6 Estresse oxidativo e câncer de pulmão.....	25
2.1.7 Teste de micronúcleos.....	26
2.1.8 Ensaio cometa.....	28
2.1.9 Polimorfismos de nucleotídeo único.....	29
2.1.10 Interdisciplinaridade: a importância do estudo para a promoção da saúde.....	29
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4 MÉTODO.....	33
4.1 População amostra.....	33
4.2 Delineamento metodológico.....	33
4.3 Hipóteses e variáveis.....	33
4.4 Procedimentos metodológicos .....	34
4.5 Técnicas e instrumentos de coletas de dados.....	35
4.5.1 Teste de micronúcleos com citoma bucal.....	35
4.5.2 Ensaio cometa.....	36
4.5.3 Identificação de polimorfismos.....	36
4.6 Processamento e análise de dados.....	37
4.7 Considerações éticas.....	37
5 CRONOGRAMA .....	38
6 RECURSOS HUMANOS E INFRAESTRUTURA.....	39
7 ORÇAMENTO, RECURSOS E MATERIAIS.....	40
8 RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS.....	41
9 RISCOS, DIFICULDADES E LIMITAÇÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43





## 1. INTRODUÇÃO

Doenças pulmonares são, atualmente, a terceira maior causa de morte no mundo e são caracterizadas por comprometer o trato respiratório de forma agressiva e debilitante. Podem apresentar inúmeras causas, dentre elas a mais significativa é o tabagismo, seguido da poluição ambiental, exposição ocupacional e fatores genéticos, além da debilidade do sistema imunológico (INCA, 2014; OMS, 2015).

O câncer de pulmão é uma patologia grave, caracterizada pelo comprometimento dos tecidos do pulmão, podendo ser de pequenas (15%) e não pequenas células (85%). Esta patologia pertence ao grupo de doenças respiratórias e tem 90% dos casos relacionados ao tabagismo, sendo que os outros 10% dividem-se em fatores ocupacionais, ambientais e genéticos. No mundo, atualmente cerca de 1,8 milhões de pessoas ao ano morrem por câncer de pulmão, sendo a maioria homens com idades entre 20 e 40 anos (ALGRANTI; BUCHINELLI; CAPITANI, 2010; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015).

A compreensão dos processos fisiopatológicos e genéticos da doença é extremamente necessária para buscar melhores alternativas terapêuticas, ou mesmo para preveni-la. Variações genéticas caracterizam as formações celulares alteradas, que são diferenciadas para cada tipo de câncer. Dentre muitos tipos de testes para verificar alterações genéticas e dano celular, estão os testes de micronúcleos, ensaio cometa e a detecção de polimorfismos de nucleotídeos únicos. Estes têm a finalidade de identificar os mecanismos patológicos celulares que se estabelecem no decorrer da doença e determinar se alterações genéticas pontuais levam a uma resposta diferenciada nos pacientes com câncer de pulmão (SILVA; ERDTMANN; HENRRQUES, 2003; SHAO, 2015).

O teste de micronúcleos identifica a perda total de cromossomos ou de seus fragmentos. Assim, a presença de micronúcleo pode ser caracterizada por lesão da genética do núcleo celular promovendo dano permanente, ocasionada por mutação ou agentes causadores externos, motivo pelo qual o teste tem sido muito utilizado para verificar o nível de lesão celular e a capacidade de regeneração das mesmas (THOMAS et al., 2009; SILVA; ERDTMANN; HENRRQUES, 2003).

Já, o ensaio cometa é utilizado para identificar danos no DNA, passíveis de reparo, por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Este teste é uma ferramenta comprovadamente

simples e eficaz para avaliar dano no DNA e determinar a eficácia de reparação do mecanismo do mesmo (SEKARANA, 2015).

A identificação de polimorfismos de nucleotídeo único pode ser importante para a evolução das espécies, mas é a partir delas que também podemos identificar a resistência ou suscetibilidade a agentes genotóxicos (SHAO, 2015).

O câncer de pulmão é considerado uma doença na qual existem interações entre fatores genéticos e ambientais, que são reconhecidas como sendo associadas com seu desenvolvimento. Ainda, a heterogeneidade entre diferentes grupos étnicos poderia ter efeitos diferentes e multifatoriais sobre o carcinoma sendo este, fator importante para confirmar a associação entre polimorfismos e a doença em várias populações (XU et al., 2005).

Considerando que o câncer de pulmão se caracteriza como uma doença com importantes alterações celulares e genéticas, o presente estudo aborda o seguinte **problema**: o teste de micronúcleos, ensaio cometa e polimorfismos de nucleotídeo único podem auxiliar na compreensão da fisiopatologia presente no câncer de pulmão?

## **2. CÂNCER DE PULMÃO E ALGUMAS DEFINIÇÕES**

O câncer de pulmão é uma doença que envolve várias características relacionadas à fisiopatologia e morfologia dos indivíduos. Inúmeros fatores causais são responsáveis para o seu desenvolvimento, sendo o tabagismo um importante fator relacionado com este tipo de câncer. Por esse motivo pode-se relacionar a comorbidade ao estilo de vida dos pacientes, à fatores genéticos, bem como a processos inflamatórios crônicos.

Para analisar suscetibilidade genética, dano e possível processo de reparo, os testes de micronúcleo, ensaio cometa e polimorfismo de nucleotídeo único podem ser utilizados diferentes abordagens que auxiliam na compreensão dos processos celulares e moleculares que ocorrem em doenças pulmonares como o caso do câncer.

### **2.1 Características do câncer de pulmão**

Neoplasia se caracteriza por uma formação celular anormal. Sendo assim, o aparecimento de tecido celular que excede o tecido normal de forma desordenada e que persiste após a suspensão do estímulo que provocou este aparecimento, é denominado neoplasma. Células neoplásicas competem com células normais por energia e substratos nutricionais, o que ocasiona a debilidade do paciente (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015).

Do ponto de vista anatomopatológico, o câncer de pulmão pode ser classificado como sendo de não-pequenas células (85% dos casos), dividido em adenocarcinoma, carcinoma epidermóide e carcinoma de grandes células; e carcinoma de pequenas células, que pode ser do tipo linfóide (possui grande capacidade de disseminação, rápido crescimento e pode ocasionar a invasão cerebral, tendo baixas chances de cura), intermediário e combinado (somando as três características anteriormente citadas). Os sintomas de ambos os tipos são tosse e sangramento por vias aéreas, além de quadros de pneumonia de repetição (INCA, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014) conceitua o câncer de pulmão como sendo um crescimento descontrolado de células do pulmão e atribui como causas, 90% advindas do tabagismo e 10% relacionadas à exposição aos agentes químicos, como asbesto e arsênico, entre outros, além de fatores genéticos, histórico familiar e doenças pulmonares obstrutivas crônicas como enfisema e bronquite.

Assim, sendo o câncer um crescimento desordenado fora de controle genético, as neoplasias podem ser consideradas não como sendo uma doença, mas um conjunto ou “sistema” de doenças, também conhecido como uma falha no controle genético celular, uma vez que todas as células no nosso corpo possuem a mesma formação. De maneira simplificada, o câncer é uma célula que sofreu mudança no seu DNA, tornando-a diferenciada, e ao se reproduzir, ocasionou formação de uma massa específica. Essa reprodução pode ocorrer por estímulo externo e ao utilizar nutrientes para se reproduzir, enfraquece o hospedeiro levando à falência do sistema fisiológico do mesmo (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015).

## **2.2 Fatores causais do câncer de pulmão**

O câncer de pulmão é uma patologia que há muitos anos vem liderando os índices de causa de morte entre homens e mulheres em todo o mundo, podendo apresentar como desencadeadores os fatores ambientais, genéticos e ocupacionais. O hábito de fumar é fator de risco já estabelecido para o desenvolvimento do câncer de pulmão, sendo que é maior entre homens do que entre mulheres. A doença tem distribuição mundial e é reconhecida como uma das principais causas de mortalidade entre indivíduos em fase produtiva. No Brasil, é a segunda maior causa de morte entre pacientes acima de 40 anos, atrás apenas de doenças cardiovasculares (SHEIBER; GOMES; COUTO, 2005).

As causas do câncer de pulmão estão relacionadas a múltiplos fatores, entre eles a hereditariedade, a genética e a influência do ambiente sobre os indivíduos. Isso não descarta a informação já conhecida de que o maior fator causal para o desenvolvimento da doença ainda está diretamente relacionado ao cigarro. Contudo, a abordagem sobre o diagnóstico da doença ainda é muito fraca devido ao fato de que o período de latência entre os primeiros sintomas e o diagnóstico da doença é grande, o que implica em um evento chamado “viés de lembrança” ou “viés de esquecimento”, tornando a coleta de dados confusa e muitas vezes inviável (ALGRANTI, BUSCHINELLI, CAPITANI, 2010).

Não se pode afirmar com certeza que o câncer de pulmão seja de caráter hereditário; contudo, estudos vêm-se encontrando resultados significativos que apontam para esta possibilidade. O câncer de pulmão continua sendo um grande responsável pelo alto número de mortes relacionadas a tumores no Brasil e no mundo. Infelizmente, a maioria dos pacientes (cerca de 70%) que chega ao diagnóstico, encontra-se em estágio avançado da doença e a

sobrevida se torna quase inviável. Apesar da cirurgia ou de tratamentos com quimioterapia, é provável que metade destes pacientes sofra recidivas no local ou a distância (INCA, 2014).

O tabagismo, entre todos os fatores de risco, é o mais relacionado ao desenvolvimento do câncer pulmão, podendo dar origem também, a outros tipos de câncer. Além do fumo, destaca como risco, a diferença entre os sexos e as raças relacionadas ao tabagismo, já que nas mulheres fumantes o câncer se manifesta com muito menos frequência do que em homens fumantes. O fumante passivo, a poluição atmosférica, o radônio, asbestos e outras fibras minerais, sílica, cromo, níquel, arsênico, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, fatores relacionados com o hospedeiro e por fim, fatores genéticos (ZAMBONI, 2002). Hashim et al. (2014) afirmaram que em países desenvolvidos o índice de câncer de pulmão causado por exposição à agentes ambientais e ocupacionais diminuiu consideravelmente, ao contrário dos índices identificados em países em desenvolvimento.

A exposição ao carbono e o acúmulo de nanopartículas no pulmão, podem ao longo do tempo, resultar em citotoxicidade, e levar ao desenvolvimento do câncer de pulmão. Ainda é estabelecida a relação de exposição ao amianto e arsênio como agente causador no aparecimento da doença (CHEN, 2015).

Eom et al. (2015) afirmam que mesmo sendo o tabaco o principal fator determinante para o desenvolvimento do câncer de pulmão, são necessários fatores genéticos adicionais que somados aos agentes de exposição vão incorrer na manifestação do câncer. Logo, a predisposição genética é fator inegável para o desencadeamento da doença, sendo que o indivíduo exposto a fatores de risco e com pré-disposição genética, encontra-se em situação de risco eminente.

### **2.3 Epidemiologia do câncer de pulmão**

Em 1998, as neoplasias malignas de traqueia, brônquios e pulmões somaram 17% das mortes da população brasileira, sendo que em muitos países da Europa Ocidental e na América do Norte, o número de casos supera o índice de 100 para cada 100.000 habitantes. Já na China, Índia, países da América Latina e África, a incidência é de 25 casos de óbito para cada 100.000 habitantes. No Brasil, a maior incidência de câncer de pulmão se encontra nos estados do sul e sudeste, diferente de outros países, onde a doença se manifesta em regiões mais industrializadas e urbanas (SCHREIBER; GOMES; COUTO, 2005).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, esta doença é um dos tumores malignos que resulta em maior número de mortes, estando relacionada diretamente ao consumo dos derivados do tabaco. A estimativa é de que os casos de câncer de pulmão tenham um aumento do 2% ao ano em todo o mundo, sendo que em 2012 foram detectados 1,82 milhões de casos a nível mundial, sendo 1,24 milhões em homens e 523 mil diagnosticados em pacientes do sexo feminino (INCA, 2012).

Entre os casos diagnosticados, 90% estão diretamente relacionados ao cigarro, sendo que os números para o Brasil são igualmente alarmantes em se comparando aos resultados mundiais. No país, foram contabilizadas 22.424 mortes em 2011, considerando-se que a sobrevivência de 5 anos para pacientes diagnosticados encontra-se entre 13% e 21% em países desenvolvidos e entre 7% e 10% em países em desenvolvimento (ALGRANTI; BUCHINELLI; DE CAPITTANI, 2010; INCA, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014) declarou que no mundo ocorrem cerca de 170.000 mortes ao ano relacionadas ao câncer de pulmão. Em se tratando do Brasil, a estimativa para os anos de 2014 e 2015 foi de 16.400 novos casos em pacientes do sexo masculino e 10.300 em pacientes do sexo feminino, sendo respectivamente 16,4 casos novos para cada 100.000 habitantes do sexo masculino e 10,3 para cada 100.00 habitantes do sexo feminino (OMS, 2014).

Na década de 80, o câncer de pulmão atingiu o índice de 16% de novos casos em todo mundo. Porém, nos últimos anos, foi possível observar que sua mortalidade vem crescendo de forma rápida e alarmante. Contudo, o número de homens que desenvolveram o câncer de pulmão se manteve estável, enquanto o número de mulheres que apresentaram a doença aumentou significativamente. Segundo o autor, esse dado se refere ao fato de que o número de homens fumantes vem diminuindo, enquanto o número de mulheres fumantes encontra-se em nível crescente (ZAMBONI, 2002).

Um estudo realizado por Pasetto (2014), aponta Brasil, México e Colômbia como países que têm atingido níveis crescentes de novos casos de câncer de pulmão a cada ano, sendo que estes números estão relacionados diretamente à exposição ambiental e laboral, a fumaças (tabaco e poluição) e metais pesados. Também para Antonini (2014), epidemiologicamente houve aumento no número de casos novos da doença relacionados a fumaça por processos industriais que utilizam cromo, entre outros. A alternativa encontrada

foi substituir o cromo por níquel e cobre, contudo já existem evidências de que ambos são tóxicos e extremamente nocivos, por terem sido encontrados em acúmulo no pulmão de pacientes que desenvolveram o câncer de pulmão.

## **2.4 Relações do câncer de pulmão ao estilo de vida dos indivíduos**

Há muito se sabe que hábitos e estilo de vida estão diretamente relacionados à saúde dos indivíduos ou à probabilidade de desenvolver doenças. Nas últimas décadas, o câncer de pulmão deixou de ser uma doença rara do passado para ser uma epidemia mundial com altos índices de morbidade e mortalidade entre homens e mulheres, sendo que em maior número na população de 20 a 40 anos, de ambos os sexos. Em 1950, já se sabia que o tabagismo tinha relação direta com o aparecimento do câncer de pulmão, sendo este um fator externo extremamente determinante. Não somente o consumo do tabaco implica em estilo de vida, mas também exposição a agentes causadores em condições laborais e ambientais, bem como nível de desenvolvimento socioeconômico e social da população, são significativas para o desenvolvimento do câncer de pulmão (ZAMBONI, 2002; ALGRANTI; BUSHINELI; CAPITANI, 2010; HASHIM, 2014).

Sendo assim, o tabagismo, a poluição atmosférica, a exposição ao radônio em minas e tuncis (tendo gás liberado pela variação de temperatura, por rochas e solo de minas), asbesto e outras fibras minerais (presente em isolantes térmicos), cromo, níquel e arsênico (que são utilizados em vários processos industriais), além de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, são considerados substâncias nocivas ao qual a exposição laboral pode implicar no desencadeamento do câncer de pulmão (ZAMBONI, 2002). É muito importante ressaltar que não há registros epidemiológicos de que haja tumores especificamente profissionais, o que dificulta a prevenção de forma eficaz. Mesmo que saibamos da existência de agentes causadores em situações laborais, podemos considerar apenas como sendo fator causador, a possível exposição a agentes cancerígenos (HUNG, 2015).

Asbesto, no entanto, é um fator causador de risco já estabelecido para o desenvolvimento de câncer de pulmão. Logo, quanto maior a exposição, mais eminente se torna o risco; contudo, estudos comprovaram que, ao cessar a exposição, este diminui proporcionalmente. Também o uso do amianto foi proibido em países como a Suécia, já na década de 80, devido aos fatores de risco laborais. O desenvolvimento do câncer de pulmão varia entre os grupos ocupacionais dependendo do grau de exposição ao amianto. Além disso,

é fundamental ressaltar que o amianto interage com o tabaco, tornando essa combinação extremamente perigosa (JARVHOLM; ASTR; 2014). Tomioka et al. (2014) descrevem ainda, que derivados da benzina são comprovadamente responsáveis por casos confirmados de câncer de pulmão, ressaltando a necessidade de medidas preventivas a esses trabalhadores expostos direta ou indiretamente.

Não se pode ignorar o fato de que a cada dia cerca de 3 bilhões de pessoas (a maioria mulheres e crianças) em todo mundo estão expostas a níveis tóxicos de poluição que desencadeia inúmeros casos novos de câncer de pulmão em países menos desenvolvidos. O câncer de pulmão é o tipo mais fatal associado ao consumo de tabaco, à poluição ambiental, e a agentes ocupacionais como amianto, arsênio e cromo, entre outros. A *International Agency for Research on Cancer* lista 19 substâncias e situações ocupacionais associadas ao câncer de pulmão, porém, o fato de não se conseguir identificar com precisão a fase inicial da doença, acaba por comprometer a veracidade da informação. Esse fator comprometedor é conhecido por viés de lembrança, ou esquecimento, fator esse que vêm dificultando a comprovação de causa por motivo ocupacional. Tentativas globais para reduzir as muitas fontes de poluição do ar, vêm melhorando as condições de vida e reduzindo os riscos ocupacionais, contudo ainda são necessários muitos estudos para comprovar a relação do câncer com a ocupação (ALGRANTI; BUSCHINELLI; DE CAPITANI, 2010; LI et al., 2015).

## **2.5 Alterações genéticas relacionadas ao câncer de pulmão**

Alterações genéticas são encontradas nas mais variadas formas em se tratando da patologia câncer de pulmão. Recentemente, as plataformas genômicas de pesquisa de alto rendimento têm contribuído para diagnóstico, permitindo mapeamento celular personalizado. Os genes que sofrem processo de mutação mais frequentemente são *TP53* (53,6%), *KRAS* (16,1%), *STK11* (9,8%), *EGFR* (7,2%), *KEAP1* (6,6%) e *NFE2L2* (4,5%), além de inibidores de tirosina quinase (TKI geração) seguidos de segmentação do receptor do fator de crescimento epidérmico; porém, estima-se que apenas 1% dos genes envolvidos no desenvolvimento do câncer de pulmão seja estudado, e que cerca de 70 genes estejam envolvidos no processo (CRESS et al., 2014; KENMOTSU et al., 2014).

As alterações genéticas para o desenvolvimento do câncer de pulmão estão relacionadas, entre outros fatores, a características étnicas e raciais. A medida que estas alterações vão sendo estudadas, essas questões vão ficando mais claras, o que torna a



genotipagem essencial para que a terapêutica correta seja aplicada aumentando a condição de sobrevida dos pacientes. A identificação de mutações somáticas que promovem o crescimento e desenvolvimento do câncer de pulmão transformou o tratamento, pois a identificação do receptor sensível pode proporcionar o tratamento de melhor resposta. Contudo, terapias orientadas pelo mapeamento genético, têm apresentados resultados diferentes considerando-se pacientes fumantes ou não fumantes, o que condiciona a eficiência do tratamento por genotipagem, aos fatores de exposição ambientais (HEIST et al., 2012; BHAGIRATH et al., 2015).

Nos casos de câncer de pulmão, as alterações genéticas envolvem desde proliferação até metástase. Estima-se que até os dias atuais apenas 1% desses genes tenham sido mapeados, restando cerca de 383 para serem estudados. Para tanto, pesquisas têm sido realizadas afim se se encontrar biomarcadores que possam auxiliar na compreensão da doença e de os mecanismos nela envolvidos. Estimativas apontam que 15% das pessoas que fumam, desenvolvem o câncer de pulmão e outros 10% que nunca fumaram também tem chances de desenvolver a doença. Para os não fumantes, os fatores externos são fundamentais no desencadeamento da doença, contudo, fatores genéticos apontam risco para ambos (CRESS et al., 2014).

Recentemente foi associado ao desenvolvimento do câncer de pulmão um gene denominado BRCA2. Este é um dos envolvidos no reparo do dano de DNA que, quando sofre disfunção, aumenta a probabilidade de desenvolvimento do carcinoma. Fumantes, por estarem expostos ao agente externo, apresentam 25% mais chances de desenvolver o câncer de pulmão. A mutação genética aumenta em mais 25% as chances destes tabagistas desenvolverem a patologia. No entanto, indivíduos não fumantes, com pré-disposição genética também apresentam 25% de chances de desenvolver a doença (HEIST, 2012; ZEHNG, 2015).

## **2.6 Estresse oxidativo e o câncer de pulmão**

O estresse oxidativo ocorre, quando o sistema intrínseco de proteção da célula sofre com o excesso de radicais livres e libera oxigênio no organismo. Presente nas doenças pulmonares, pode causar danos a todos os tipos de biomoléculas, provocando lesões no DNA, que quando não é corretamente reparada pode iniciar e promover a carcinogênese (GASPAR, 2004; KOSHIOL et al., 2012).

Alguns estudos relatam que pacientes com câncer de pulmão apresentam elevados níveis do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e Fator de Necrose Tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ ) em lavado broncoalveolar (LBA) e no soro, comparados aos controles (DALAVERIS et al., 2008; GESSNER et al., 2010). A produção de TNF- $\alpha$  tem sido reportada em pacientes considerando-se várias hipóteses de como os mecanismos de atividade antitumoral podem levar a morte celular do tumor diretamente (apoptose celular) e indiretamente (bloqueando a formação de vasos sanguíneos e promovendo resposta inflamatória) (RAGAB et al., 2009). O recente avanço na pesquisa tem demonstrado o papel das citocinas e seus receptores na transformação e proliferação das células tumorais principalmente as do sistema hematopoiético.

Estas pesquisas revelam que o nível sérico de TNF- $\alpha$  aumenta proporcionalmente e significativamente com a evolução do câncer de pulmão e quando comparados a controles. Desta forma, TNF- $\alpha$  tem validade clínica diagnóstica para câncer de pulmão por predizer o estágio e monitorar a evolução da doença (EOM et al., 2015).

Muitos tipos de câncer têm alta capacidade antioxidante que elimina efetivamente espécies reativas de oxigênio protegendo dessa forma, as células cancerígenas. O estresse oxidativo representa risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão e estando associado ao fumo, pode causar graves danos ao DNA. Polimorfismos genéticos das enzimas antioxidantes têm um impacto sobre a variabilidade interindividual na defesa antioxidante, que também está associada à suscetibilidade ao câncer de pulmão (XI et al., 2014; EOM et al., 2015).

## **2.7 Teste de micronúcleos**

Micronúcleos são pequenos corpos celulares compostos por material cromossômico. Este material resulta de perda de fragmentos de cromossomos devido à ação de agentes externos que afetam o fuso miótico e ocasionam quebras. Células arredondadas ficam então, perdidas no citoplasma e formam uma membrana nuclear de forma arredondada. A presença de micronúcleos caracteriza alterações ou quebra do fuso miótico, resultados de dano no cromossomo e conseqüentemente no DNA. Assim, micronúcleos podem ser identificados em qualquer tipo de células, podendo ser facilmente coletada e utilizada de forma eficaz para o diagnóstico de várias doenças (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

O teste de micronúcleos é utilizado para identificar a instabilidade genômica através de células bucais. Os resultados mostram com sucesso danos causados por estilo de vida, tabagismo, submissão a tratamentos medicamentosos, exposição a fatores ocupacionais, e à substâncias químicas que podem potencializar o processo de mutação genética podendo levar ao desenvolvimento do câncer. Para a realização da coleta, utiliza-se um esfregaço da parte interna da bochecha do paciente o que torna o teste muito prático e não invasivo. Através dele é possível que se faça uma visualização precoce de danos em células basais que possam vir a sofrer apoptose. Assim, quanto antes o dano é identificado, maiores as chances de se prevenir ou prevenir a manifestação do câncer (THOMAS et al., 2009).

Assim, para avaliar aberrações cromossômicas e sendo muito sensível a nitrosamina e outros componentes encontrados no cigarro comprovadamente cancerígenos, teste de micronúcleos é altamente considerado como preditivo para câncer de pulmão, apresentando células binucleadas com micronúcleos, pontes nucleoplásmáticas e “botões” nucleares em linfócitos como fortes indicadores (ZENIN et al., 2008; MCHUGH et al., 2014).

Resultados antecipados de testes de micronúcleos dependem de vários fatores como: nível de exposição celular, potencial citotóxico e genotóxico, antecedentes genéticos além de idade e sexo dos pacientes testados. O mesmo identifica que a maioria dos estudos envolvendo micronúcleos apresentam alterações antecipadas e de grande espectro quando se trata de pacientes em tratamento de radioterapia, já que a mesma danifica as células de forma extrema. No entanto, a realização de estudos a partir de testes de micronúcleos é fundamental para se avaliar não somente o nível da lesão celular, mas também a capacidade de regeneração das mesmas (THOMAS, 2011).

Marcadores citogenéticos têm sido utilizados como indicadores de mutações genéticas ou exposição aos agentes causadores do câncer. Porém, a instabilidade cromossômica também tem sido associada a esses fatores, sendo que de acordo com estudos recentes, está associado ao aumento do câncer de pulmão. De acordo com Cheng et al. (1995), micronúcleos são fragmentos ou cromossomos inteiros que foram excluídos de núcleos durante o processo de mitose. Essas características são muito mais simples de se identificar do que alterações de micronúcleos em células do tipo linfócitos. Em seu estudo, identificou que pacientes com câncer de pulmão apresentam uma frequência muito maior de micronúcleos do que os pacientes que embora fumantes, não apresentavam a doença. Isso comprova a teoria de

eficácia do teste para avaliar dano e risco, de forma prática, rápida e não invasiva (MURRAY; ROSENTHAL; PHALLER, 2006).

## 2.8 Ensaio cometa

O ensaio cometa é muito utilizado para identificar danos no DNA, ocasionados por agentes intercalantes, oxidantes e alquilantes, pois apresenta resultados rápidos e eficazes relacionados a genotoxicidade. São utilizados dois modelos de testes ambos relacionados ao pH, sendo que o teste na versão neutra identifica quebras duplas na molécula de DNA e *crosslinks*, e a versão alcalina que detecta além de *crosslinks*, sítios alcali-lábeis e quebra de fita simples e dupla (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

A realização do ensaio consiste em dispor células em lâminas contendo agarose, que em seguida são transferidas para uma solução de detergentes e sais para promover a lise celular a fim de remover citoplasma e membrana do núcleo. Em seguida, submete-se as lâminas em uma solução que leva a alteração de pH, de acordo com o teste que está sendo realizado, para promover o desenovelamento do DNA que se dá pelo rompimento de estruturas presentes no núcleo celular. Para que ocorra a migração de fragmentos do DNA, é utilizada uma corrente elétrica, para enfim corar as lâminas para análise microscópica. Quando o DNA se encontra intacto sabe-se que a célula não contém dano, enquanto a célula lesada apresenta migração de DNA para fora do núcleo com formato que se assemelha a cauda de um cometa (SEKARANA, 2015).

Para Silva, Erdtmann e Henriques (2003), a vantagem da realização do teste é o fato deste poder ser realizado de forma rápida e sem grandes implicações financeiras, já que é um teste de baixo custo que apresenta resultados satisfatórios utilizando apenas células em proliferação, desde que em boa suspensão. É um teste muito aplicado para genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, que embora tenha sido desenvolvido a partir de sangue humano, vem sendo usado também para fungos, invertebrados, plantas e outros tecidos do organismo de forma variada. Porém, assim como outros testes, apresenta limitações: por não ser um teste de mutagênese, uma vez que o dano pode ser reparado; por necessitar um período de no máximo 24 horas para ser realizado (entre a exposição ao mutágeno e a preparação das lâminas) e ainda por ser um teste muito sensível, o que pode influenciar em processos conclusivos exigindo muita cautela.

## **2.9 Polimorfismo de nucleotídeo único**

A patogênese do câncer é complexa e ainda não foi completamente elucidada. As características genéticas são importantes fatores intrínsecos que desempenham papéis críticos no desenvolvimento da carcinogênese. Evidências indicam que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem estar relacionados à malignidade. Portanto, a identificação de fatores genéticos é fundamental para mensurar o risco do câncer e traçar estratégias de tratamento devidamente eficazes. Vários SNPs foram identificados em se tratando de câncer de pulmão, destacando-se: rs2240308 (exon1), rs9915936, exon5), rs1133683 (exon5), e rs4072245 (intron7). Entre estes, rs2240308 (exon1,148c/t) é o mais estudado e está intimamente relacionado com o risco de desenvolver a doença (GONG et al., 2015).

Recentemente estudos estão sendo realizados para avaliar a variabilidade individual associada com a susceptibilidade ao câncer de pulmão. Têm-se observado a importância do estudo de polimorfismos em genes que codificam proteínas envolvidas na resposta imunológica como fonte de susceptibilidade ao carcinoma (HAMA et al., 2011; SHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2011). Existe considerável evidência sugerindo que a expressão da citocina próinflamatória TNF- $\alpha$ , interleucinas, genes supressores de tumores, oncogenes e fator de transcrição NF-kB estão envolvidos na modulação de inflamação crônica. Estas moléculas são constitutivamente produzidas por uma variedade de células, em doenças inflamatórias crônicas, que por sua vez leva ao desenvolvimento de doenças mais graves, tais como doenças autoimunes, doenças pulmonares obstrutivas crônicas, doenças neurodegenerativas e câncer (ZHANG et al., 2011).

## **2.10 Interdisciplinaridade: a importância do estudo para a promoção da saúde**

A saúde pode ser entendida através de determinantes sociais. Para tanto, é preciso que se reconheça a realidade social da população a fim de se adotar políticas satisfatórias de promoção da saúde e prevenção da doença. A promoção da saúde está voltada ao bem-estar de forma geral, sendo considerada um instrumento político, conceitual e ideológico a ser utilizado para interferir no processo saúde-doença. Este conceito só pode ser posto em prática mediante a intervenção de profissionais de todas as áreas ligadas à saúde (SUCUPIRA; MENDES, 2003)

A promoção da saúde vai além dos cuidados com saúde. Ela engloba um compromisso social que não pertence somente aos setores de saúde, mas sim a comunidade em geral e as entidades governamentais. O processo de capacitação da sociedade para auxiliar na melhoria da qualidade de vida e saúde são fundamentais para que se entenda que a saúde deva ser vista como um recurso para a vida (Brasil, 2015).

A prática da interdisciplinaridade surgiu da necessidade de se compreender e desvendar a complexidade das situações clínicas, a fim de se desenvolver a ciência como um todo. Embora, na prática, têm-se encontrado dificuldades para atuar de forma interdisciplinar, pode-se observar que este conceito surgiu com o intuito de abordar áreas acadêmicas como mestrados, doutorados entre outros, para considerar novas formas de construção do conhecimento e avanço da pesquisa (PHILIPPI-JUNIOR; FERNANDE, 2015).

Segundo Cheng et al. (1995), o câncer de pulmão é uma doença de causas variadas, porém o consumo do tabaco tem sido apontado como maior fator causador externo. Sendo assim, a educação para a redução ou desistência do hábito de fumar assume grande impacto e possível efeito na redução de índices de novos casos de câncer. Este processo passa por atenção de equipe interdisciplinar envolvendo psicólogos, médicos, enfermeiros, entre outros, uma vez que o fumo é considerado vício e por esse motivo, é necessário atendimento de níveis que variam entre atenção física à psíquica.

É um grande desafio para a saúde de forma geral, educar a população para redução ou abandono hábito de fumar, fator determinante para o desenvolvimento do câncer de pulmão. É necessário um esforço de vários setores ligados à saúde e a políticas governamentais. Para Cestari e Zago (2005), a promoção da saúde em se tratando de pacientes com câncer, encontra-se distante do modelo desejado. Contudo, o investimento em pesquisa e aumento da valorização do conhecimento para orientar profissionais, são fundamentais a fim de se avançar na área.

A partir dessa visão, este trabalho vem a somar para a construção do conhecimento buscando abranger todas as áreas ligadas à saúde como a psicologia, no processo de abordagem e apoio ao paciente; enfermagem, para auxílio direto na coleta do sangue e seleção dos pacientes; farmácia e biologia, realizando análise do material coletado; medicina, na interpretação e descrição dos resultados bem como na forma de aplica-los e a fisioterapia, para a realização do trabalho de pesquisa. Todas as áreas são fundamentais para construir o

conhecimento, esclarecer e estimular a redução da exposição aos fatores de risco causadores do câncer de pulmão, usando como base as informações sobre o perigo diretamente relacionado ao consumo do tabaco e exposição à diversos tipos de agentes genotóxicos. Também busca desenvolver a pesquisa de forma a contribuir através de seus resultados, com estudos mais avançados nas mais diversas áreas para o processo de cura e prevenção do câncer de pulmão, proporcionando ferramentas para que a biologia, farmácia, fisioterapia, medicina e enfermagem possam dar segmento a estudos no campo da genética e câncer de pulmão.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Traçar o perfil fisiopatológico dos portadores de câncer de pulmão, quantificando o dano e reparação do DNA e identificando suscetibilidade genética.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- ✓ Identificar as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes participantes do estudo;
- ✓ Avaliar danos no DNA ocasionados por agentes intercalantes, oxidantes e alquilantes por meio do ensaio cometa, utilizando a técnica alcalina para avaliar o dano e MMS para avaliar o reparo;
- ✓ Identificar a frequência de polimorfismos nos genes IL6, VDR e TNF $\alpha$  em portadores de câncer de pulmão;
- ✓ Correlacionar a presença de polimorfismos com danos no DNA, identificados pelo ensaio de micronúcleo e cometa;
- ✓ Avaliar se as terapêuticas farmacológicas e clínicas podem modular a evolução destas doenças, frente às alterações genéticas.



## **4. MÉTODO**

### **4.1 População e amostra**

A população em estudo prevê 50 pacientes com câncer de pulmão, sendo que a amostra se configurará por pacientes em tratamento para câncer de pulmão no Centro Integrado de Oncologia do Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul (COI), com idade acima de 18 anos, podendo ser de ambos os sexos, tendo as amostras coletadas no período de junho de 2013 a julho de 2016. Este estudo será controlado com sujeitos sem o diagnóstico de câncer de pulmão pareados por sexo e idade. Além dos dados sociodemográficos, serão obtidas amostras biológicas constituídas de sangue total e de células obtidas via raspado da mucosa bucal.

#### **4.1.1 Critérios de inclusão**

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

#### **4.1.2 Critérios de exclusão**

Não serão incluídos os pacientes cujas amostras forem insuficientes de raspado da mucosa oral, de sangue ou por perda no seu processamento.

### **4.2 Delineamento metodológico**

A presente pesquisa consiste em um estudo do tipo caso-controle, que atua na análise retrospectiva, longitudinal e epidemiológica com base observacional, comparando indivíduos expostos a doença com um grupo pareado de indivíduos não expostos (GAYA et al., 2008; HULLEY et al., 2008).

### **4.3 Hipóteses e variáveis**

O presente estudo levanta as seguintes hipóteses:

H1- Há relação entre as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes deste estudo e o desenvolvimento do câncer de pulmão;

H2- Há associação entre os danos no DNA ocasionados por agentes intercalantes, oxidantes e alquilantes e detectados por meio de ensaio cometa e o desenvolvimento do câncer de pulmão;

H3- Há relação entre a frequência de polimorfismo nos genes IL6, VDR e TNF alfa em portadores de câncer de pulmão, e o desenvolvimento da doença;

H4- Há associação entre a presença de polimorfismo com danos no DNA identificados pelo ensaio de micronúcleos e cometa e o desenvolvimento do câncer de pulmão;

H5- Verificar se as terapêuticas farmacológicas e clínicas podem modular a evolução do câncer de pulmão frente às alterações genéticas.

**As variáveis dependentes** serão estudadas da seguinte maneira: considerar-se-á como variáveis dependentes os resultados de ensaio cometa, polimorfismo e micronúcleo.

**As variáveis independentes** serão definidas da seguinte maneira:

*Sexo*: variável qualitativa nominal e dicotômica (masculino e feminino), obtida através de questionário, autorreferida pelo sujeito.

*Idade*: variável quantitativa contínua, referida em anos completos de vida, obtida através de um questionário autorreferido pelos participantes da pesquisa.

#### **4.4 Procedimentos metodológicos**

O presente estudo será realizado nas seguintes etapas:

1ª etapa: elaboração do projeto de pesquisa, com base em levantamento de material bibliográfico;

2ª etapa: encaminhamento do projeto para aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa;

3ª etapa: contato com COI para realizar a coleta de material genético, esclarecendo a importância da realização do projeto para a comunidade científica;

4ª etapa: encaminhamento e recolhimento TCLE, que deve ser lido e se necessário esclarecido a cada paciente objeto deste estudo;

5ª etapa: coleta dos dados (sangue e mucosa bucal) e a realização dos experimentos (no laboratório da UNISC), sendo este um estudo caso-controle, com pacientes pareados de acordo com idade e sexo, com e sem diagnóstico de câncer de pulmão;

6ª etapa: digitação dos resultados em planilhas para possibilitar a análise e comparação dos dados;

7ª etapa: análise dos dados coletados e discussão dos resultados;

8ª etapa: elaboração da dissertação, com base na literatura e achados da amostra;

9ª etapa: defesa da dissertação;

10ª etapa: divulgação dos resultados.

#### **4.5 Técnicas e instrumentos de coleta de dados**

Após a obtenção dos dados e amostras biológicas, definidas pelo sangue total e células da mucosa oral, estas serão processadas no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Unisc. O sangue total será imediatamente utilizado para a realização do ensaio cometa e posteriormente armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para extração do DNA e posterior identificação dos polimorfismos definidos no estudo. As células da mucosa oral serão armazenadas a temperatura de 4 a  $8^{\circ}\text{C}$ , até o momento da realização do ensaio de micronúcleo.

##### **4.5.1 Teste de micronúcleos com ensaio de citoma bucal**

As células serão obtidas após coleta das células da mucosa oral com escova *Cytobrush*, e acondicionadas em microtubos contendo fixador metanol. As células serão lavadas com o próprio fixador e a seguir dispostas em lâminas de microscopia limpa. A seguir, as lâminas serão coradas pelo método *Feulgen*, descrito por Thomas e colaboradores (2009). A análise

será realizada em microscopia óptica convencional, sendo contadas 1000 células por indivíduo para análise de micronúcleos e outras anomalias nucleares.

#### **4.5.2 Ensaio cometa**

Ensaio Cometa versão alcalina e capacidade de reparo serão realizados de acordo com Singh e colaboradores (1988). O teste consiste em obter-se uma suspensão celular, sendo preferível a execução do teste com linfócitos já isolados com Ficoll-Paque™ Plus, de acordo com recomendações do fabricante Amershan Biosciences Inc. Os linfócitos isolados serão misturados a uma agarose de baixo ponto de fusão e sobrepostos em uma lâmina de microscopia pré-coberta com agarose. As lâminas com a suspensão celular serão acondicionadas em cubeta contendo solução gelada concentrada de sais, para a lise das células por no máximo 48 horas em lise. Após, serão submetidos a uma corrente elétrica, para migração dos fragmentos de DNA. As lâminas serão fixadas e coradas com nitrato de prata de acordo com Nadin e colaboradores (2001).

A análise microscópica será realizada com óptica convencional. Serão analisadas 100 células por amostra (50 de cada lâmina em duplicada), sendo essas classificadas visualmente em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda: sem danos (classe 0) até dano máximo (classe 4). Uma vez obtidos os dados, será calculado o índice de danos de cada grupo estudado, que poderá variar entre zero e 400. Para examinar a capacidade de reparação de danos no DNA, os linfócitos isolados serão tratados com agente alquilante metilmetano sulfonato (MMS, 40µM) por 1 hora a 37°C. Após este tratamento, as células serão lavadas com PBS e após seguindo o mesmo procedimento utilizado para realização do ensaio cometa em 1h e 3h, como descrito anteriormente (AGNOLETTO et al., 2007).

#### **4.5.3 Identificação de polimorfismo**

A análise dos polimorfismos relacionados à susceptibilidade ao câncer de pulmão será realizada por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real, utilizando o aparelho StepOne Plus, Applied Biosystem™. O DNA será extraído a partir 500 µL de uma amostra de sangue total anticoagulado com EDTA, através do método de Salting out, conforme descrito por Miller, Dykes e Polesky (1988). Após a extração, o DNA será ressuspensionado em água Mili Q e armazenado à -20°C. O DNA extraído será utilizado em uma reação de PCR. Serão realizadas as análises para os SNP: IL6, TNF-alfa e VDR.

#### **4.6 Processamento e análise de dados**

Os dados serão armazenados em planilhas e posteriormente analisados no programa estatístico SPSS v. 20. Inicialmente, será realizada uma análise descritiva a fim de verificarmos os pacientes que apresentam diagnóstico de câncer de pulmão e alterações celulares para os testes de ensaio cometa, polimorfismos e micronúcleos. As diferenças serão verificadas através do teste t para amostras independentes, sendo consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### **4.7 Considerações éticas**

O presente estudo é um recorte de uma pesquisa mais ampla da UNISC, denominada “*Dano, Reparação e Suscetibilidade em Doenças Pulmonares*”, 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, sobre pesquisas envolvendo seres humanos, no que se refere à autonomia, beneficência, não maleficência e justiça. Submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNISC, estes preceitos serão mantidos através do conhecimento e da assinatura, em duas vias, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que assegurará os direitos e deveres que dizem respeito à comunidade científica e aos sujeitos da pesquisa, comprometendo-se com o máximo de benefícios e o mínimo de danos possíveis.

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 utilizará as amostras que se encontram em um biorrepositório. O regulamento foi previamente assinado pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UNISC. Serão utilizadas somente as amostras as quais possuem o termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo paciente ou familiar responsável.

## 5. CRONOGRAMA

Atividades/Etapas Metodológicas	2015		2016		2017
	1º sem.	2º sem.	1º sem.	2º sem.	1º sem.
Encaminhamento ao Comitê de Ética			X		
Coleta de dados			X	X	
Análises laboratoriais			X	X	
Digitação dos dados				X	
Análise e discussão dos dados				X	
Redação final da dissertação				X	
Pré-defesa da dissertação				X	
Encaminhamento do artigo para publicação					X
Apresentação dos resultados no Conselho Municipal de Saúde					X
Defesa da dissertação					X

## **6. RECURSOS HUMANOS E INFRAESTRUTURA**

A infraestrutura necessária para o desenvolvimento do presente estudo será disponibilizada pela Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). A UNISC apresenta laboratórios com infraestrutura adequada para o desenvolvimento deste. As coletas e o armazenamento do material biológico serão realizados no Centro de Oncologia do Hospital Ana Nery (COI) e as demais metodologias baseadas em análise celular e molecular serão realizadas no Laboratório de Genética e Biotecnologia da UNISC.

Para coleta de dados, a pesquisa contará com a participação de bolsistas de pesquisa. No Laboratório Genética e Biotecnologia da UNISC são executadas as metodologias de ensaios de toxicidade genética (cometa, polimorfismos e micronúcleos). Este possui todos os equipamentos necessários à execução do projeto: equipamento automatizado para as determinações bioquímicas, estufas, balanças, centrífugas, microcentrífugas, geladeiras, freezer, banhos-maria, autoclaves, capelas de fluxo laminar e exaustão, pipetadores automáticos, vidraria e equipamentos de informática.

## 7. ORÇAMENTO/ RECURSOS MATERIAIS

Descrição	Qtde.	Valor Unitário	Valor total
Ácido bórico	2	R\$ 86,00	R\$ 172,00
Ácido Clorídrico	2	R\$ 15,00	R\$ 30,00
Agarose (100 gramas)	4	R\$ 215,40	R\$ 860,00
Agarose low melting 25 g	1	R\$ 400,00	R\$ 400,00
Agulhas descartáveis BD – 100 agulhas	100	R\$ 12,00	R\$ 1.200,00
Brometo de etídio 10 mg/ml - 10 ml	1	R\$ 95,00	R\$ 95,00
Caixas de luvas de procedimento - com talco	30	R\$ 18,00	R\$ 540,00
Caixas de luvas de procedimento - sem talco	20	R\$ 36,00	R\$ 720,00
Carvão ativado	1	R\$ 25,00	R\$ 25,00
<i>Cytobrosh</i>	20	R\$ 24,00	R\$ 480,00
D-glicose anidra (pó), 1Kg	1	R\$ 116,82	R\$ 116,82
DMSO (Dimetilsulfóxido)	1	R\$ 208,98	R\$ 208,98
EDTA 250 g	1	R\$ 160,00	R\$ 160,00
ETANOL ABSOLUTO	10	R\$ 96,45	R\$ 964,50
Ficoll-Paque™ Plus – 100 mL	5	R\$ 218,00	R\$ 1.090,00
Fita de pH de 0 a 14 (cx com 100 fitas)	10	R\$ 48,00	R\$ 480,00
Lâminas	100	R\$ 6,90	R\$ 690,00
Lamínulas	100	R\$ 5,90	R\$ 590,00
Metilmetano sulfonato – 50 mL	1	R\$ 186,00	R\$ 186,00
Metanol anidro (líquido), 1000mL	10	R\$ 244,85	R\$ 2.440,00
Micro Amp Fast Optica	1	R\$ 1.500,00	R\$ 1.500,00
Microtubos de 0,2 mL	2	R\$ 21,00	R\$ 42,00
Microtubos de 1,5 mL	2	R\$ 21,60	R\$ 43,20
Microtubos de 2,0 mL	2	R\$ 24,50	R\$ 49,00
Ponteiras amarelas (200 µL)	2	R\$ 7,00	R\$ 14,00
Ponteiras amarelas com filtro (200 µL)	1	R\$ 172,00	R\$ 172,00
Ponteiras azuis (1000 µL)	2	R\$ 18,50	R\$ 37,00
Ponteiras de 0,2 a 2 µL com filtro	1	R\$ 164,20	R\$ 164,20
Primers e sondas para qPCR Custom TaqMan SNP Genotyping Assays. Primers e Probes Assays- byDesign utilizados em ensaios de Genotipagem de SNPs Humano nos sistemas de PCR em Tempo Real.	6	R\$ 1.160,03	R\$ 6.960,00
Proteinase K	1	R\$ 340,00	R\$ 340,00
Reativo de <i>Schiff</i>	5	R\$ 150,00	R\$ 750,00
SDS 100 g	1	R\$ 120,00	R\$ 120,00
Seringa BD Plastipak 10mL sem agulha	100	R\$ 0,78	R\$ 78,00
TAQMAN UNIVERSAL MASTER MIX	2	R\$ 2.354,23	R\$ 4.708,00
Tris base	4	R\$ 257,60	R\$ 1.030,00
Triton X-100 (líquido), 1L	1	R\$ 210,33	R\$ 210,33
Tubos coletores vácuo com EDTA	10	R\$ 48,00	R\$ 480,00
WELL OPTICAL ADHESIVE FIM	6	R\$ 926,96	R\$ 5.561,76
<b>TOTAL</b>			<b>R\$ 33.707,79</b>

Financiamento via Fapergs/PPSUS



## **8 RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS**

O presente estudo visa identificar alterações presentes em amostras de sangue e mucosa bucal de pacientes com câncer de pulmão, para testes de polimorfismos de nucleotídeo único, micronúcleos e ensaio cometa a fim de comparar o aparecimento da doença à danos genéticos específicos e, dessa forma, contribuir para estudos futuros que visam identificar a causa e cura da doença.

Logo, busca-se poder contribuir para a saúde pública fornecendo novos dados de pesquisa na área de câncer de pulmão, doença que causa milhares de mortes no mundo todos os anos, e que vem crescendo de forma preocupante. Os resultados obtidos neste estudo, servirão de instrumento para outros projetos que envolvam a busca do entendimento das causas e evolução da doença, a fim de beneficiar a população, não só com informação à respeito dos fatores causadores como também sobre as formas de prevenção.

## **9 RISCOS, DIFICULDADES E LIMITAÇÕES**

O risco encontra-se em não se atingir um número mínimo de amostras, uma vez que o local de coleta a disposição é único e com poucos pacientes em tratamento que se disponibilizam a participar do estudo.

Quanto às dificuldades que podem vir a ser encontradas durante a execução deste projeto, estão a baixa adesão dos pacientes devido ao fato de que precisam estar em tratamento no COI, dispostos a colaborar com coleta de sangue e mucosa bucal, em um período de pouca receptividade devido à gravidade da patologia (câncer de pulmão) e o alto índice de óbitos, pois a doença avança de forma rápida e muitas vezes é diagnosticada de forma tardia.

Considera-se limitação importante o fato de não se ter acesso para coleta em pacientes internados, somente tendo a disposição pacientes em tratamento ambulatorial.

## REFERÊNCIAS

1. AGNOLETO, A. et al. Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. *Clinical Biochemistry Journal*, v. 40, n. 16, p. 1252-1258, 2007. Fator de impacto: 2,265.
2. ALGRANTI, E.; BUSCHINELLI J. T. P.; CAPITANIE. M.; Câncer de pulmão ocupacional. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.36, n. 6, p. 784-794, 2010. Fator de impacto: 1,27.
3. ANTONINI, M. A. et al. Evaluation of the Pulmonary Toxicity of a Fume Generated from a Nickel-, Copper-Based Electrode to be Used as a Substitute in Stainless Steel Welding, *Revista. Environmental Health Insights*, v.8, n.1, p. 11-22, 2014. Qualis: A1.
4. BHAGIRATH, D. et al. Cell type for origin as well as genetic alterations contribute to breast cancer phenotypes. *Oncotarget Journal*, v. 6, n. 11, p. 9018-9030, 2014. Fator de impacto: 6,63.
5. Brasil, 2015. Disponível em <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/carta\\_ottawa.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/carta_ottawa.pdf)> Acesso em: 20 abril 2015.
6. CESTARI, M. E. W.; ZAGO, M. M. F.; A prevenção do câncer e a promoção da saúde: um desafio para o século XXI. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 58, n. 2, p. 218- 221, 2005. Qualis: A2.
7. CHEN, D. et al. Gene expression profile of human lung epithelial cells chronically exposed to single-walled carbon nanotubes. *Nanoscale Research Letters*, v.10, n. 15, p. 1-15, 2015. Fator de impacto: 2.481.
8. CHENG, T. J. et al. Increased Micronucleus Frequency Lymphocytes from Smokers With Lung Cancer. *Mutation Research*, v., n. 349 p. 43-50, 1996. Qualis A2.
9. CRESS, D. W. et al. Lung Cancer Mutations and use of Targeted Agents in Hispanics. *Oncotarget Journal*, v.9, n. 10, p. 225-232, 2014. Fator de impacto: 6, 63.
10. DALAVERIS, E. et al. VEGF, TNF- $\alpha$  and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung Cancer Journal*, v.64, n. 2, p. 219-225, 2008. Fator de impacto: 3,737.
11. DALRYMPLE, A. et al. An improved method for the isolation of rat alveolar type II lung cells: Use in the Comet assay to determine DNA damage induced by cigarette smoke. *Regulatory Toxicology and Pharmacology Journal*, v.8, n.72, p. 140-149, 2015. Fator de Impacto: 2,328.
12. DING, N.; ZHOU, N.; REN, M. N. Respiratory cancers and pollution. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v.19, p. 31-37, 2015. Qualis: B2.
13. EOM, S. et al. Paraoxonase 1 Genetic Polymorphisms and Smoking and Their Effects on Oxidative Stress and Lung Cancer Risk in a Korean Population. *Plos One Journal*, v. 10, n. 3, p. 1-15, 2015. Fator de impacto: 3,53.
14. GASPARI, P. et al. CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic diseases and non-small-cell lung cancer? *Genetic and Molecular Biology*, v. 27, n. 2, p. 133-138, 2004. Fator de impacto: 0,876.
15. GAYA, A. et al. *Ciências do movimento humano: introdução à metodologia da pesquisa*. Porto Alegre: Artmed, 2008.
16. GESSNER, C. et al. Angiogenic markers in breath condensate identify non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Journal*, v.68, n. 2, p. 177-184, 2010. Fator de impacto: 3,737.
17. GONG, J. et al. Effect of the association between AXIN2 rs2240308 polymorphism and cancer risk. *Journal Nature Scientific Reports*, v.5, n. 10111, p. 1-9, 2014. Fator de impacto: 5,078.
18. HASHIM, D.; BOFFETTA, P. Occupational and Environmental Exposures and Cancers in Developing Countries. Icahn School of Medicine at Mount Sinai. *State of the Art Review*. v. 80, p. 393-411, 2014. Qualis: B2.

19. HEIST, R. S. et al. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *Journal of Thoracic Oncology*, v.7, n.9, p. 924-933, 2012. Fator de impacto: 5,8.
20. HULLEY, Stephen S.B. et al. Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica. Porto Alegre: Artmed, 2008.
21. HUNG, M. et al. Comparison of expected health impacts for major cancers: Integration of incidence rate and loss of quality-adjusted life expectancy. *Cancer Epidemiology Journal*, v.39, p. 126-132, 2015. Fator de impacto: 6.178.
22. INCA, 2015: banco de dados do INCA, 2015. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 15 abril 2015.
23. JARVHOLM, B.; ASTR E. The Risk of Lung Cancer After Cessation of Asbestos Exposure in Construction Workers Using Pleural Malignant Mesothelioma as a Marker of Exposure. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, v. 56, n. 12, p. 1297-1302, 2014. Fator de impacto: 1.797.
24. KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; ASTER, J.C. *Robbins: Patologia estrutural e funcional*. 9. ed., São Paulo: Elsevier, 2015.
25. KOSHIOL, J.; LIN, S.W. Can tissue-based immune markers be used for studying the natural history of cancer? *Annals Epidemiology Journal*, v. 22, n. 7, p. 520-530, 2015. Fator de impacto: 2,15.
26. MALTA, D. C. et. al. Tendência de mortalidade de câncer de pulmão, traquéia e brônquios no Brasil, 1980-2003. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.33, n.5, pag. 536-543, 2007. Fator de Impacto: 1,27.
27. MCHUGH, M. K., et al. Use of the Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay (CBMN) to Detect Gender Differences and Genetic Instability in a Lung Cancer Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Previv*: v. 22, n.1, p. 135-145, 2013. Fator de impacto: 4,32.
28. MULLER, F. L. et al. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology Medical*, v.43, n.8, p. 477-503, 2007. Qualis: A2.
29. MURRAY, R. P.; ROSENTHAL, K. S.; PHALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
30. NADIN, S. B.; VARGAS, L. M.; CIOCCA, D. A silver staining Method for single cell gel assay. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 49, n. 9, p. 118-1186, 2001. Fator de impacto: 2,549.
31. Organização Mundial da Saúde, 2015: banco de dados da OMS, 2015. Disponível em: <<http://www.paho.org/bra/>>. Acesso em: 16 abril 2015.
32. PASETTO, R. et al., *Occupational Burden of Asbestos-related Cancer in Argentina, Brazil, Colombia, and Mexico*. *Annals of Global Health* v.80, p. 263-268, 2014.
33. PHILIPPI Jr., A; FERNANDES, V. *Práticas da interdisciplinaridade no ensino de pesquisa*. Barueri, SP: Manole, 2015.
34. RAGAB, S. M.; SAMAKA, R. M.; SHAMS, T. M. HER2/neu expression.: a predictor for differentiation and survival in children with wilms thumor. *Pathology and Oncology Reserach*, v.16, n. 1, p. 61-67, 2009.
35. RENNARD, S. I.; TOGO, S.; HOLZ, O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair. A mechanism for the development of emphysema. *American Thoracic Society*, v. 3, n.8, p.703-708, 2006.
36. SCHREIBER, L. B., GOMES, R., COUTO, T. M. *Homens e Saúde Coletiva*. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 10, n.1, p. 7-17, 2005. Qualis: B1.
37. SEKARANA, V.; RAJ, G.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *Journal of clinical and diagnostic research*, v.9, n. 3, p. 1-5, 2015. Fator de impacto: 3, 23.
38. SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J. A. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

39. SHAO, W.; HE, J. Polymorphism and lung cancer susceptibility e meta-analysis. *Annals of Transnational Medicine*, v.3, n.7, p.93-97, 2015. Fator de impacto: 4.165.
40. SHI, Z.; YONG G. S.; LIU, L. G. Polymorphisms in ERCC1 and XPF gene and response to chemotherapy and overall survival of non-small cell lung cancer. *International Journal Clinical and Experimental Pathology*, v. 8, n.3, p. 3132-3137, 2015. Fator de Impacto:1,783.
41. SUCUPIRA, A. C.; MENDES, R.; Promoção da Saúde: conceitos e definições. *Sanare*, v.4, n. 1, p. 07-10, 2003. Qualis: B1.
42. THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome assey. *Nature Procols.* v.4, n. 6, p. 825-837, 2009. Qualis A1.
43. THOMAS Philip.; Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lynfocytes and buccal cells. *Mutagenesis*, v. 26,, p. 69-76, 2011. Qualis A2.
44. TOMIOKA, K. et al. Risk for lung cancer in workers exposed to benzidine and/or betanaphthylamine: a protocol for systematic review and meta-analysis. *Biomed Central*, v.3, n.112, p. 1-6, 2014. Qualis: B4.
45. XU, Y. et al. Genetic polymorphisms in oxidative stress-related genes are associated with clinicl outcome in pacientes with advanced nos-smal cell lung câncer receiving tyrosine kinase inibitors. *Am Journal Cancer*, v.4, n.6, p. 934-942, 2014. Fator de impacto: 4,165.
46. ZAMBONI, Mauro. Epidemiologia do câncer de pulmão. *Jornal de Pneumologia*, v. 28, n.1, p. 41-47, 2002.
47. L-ZEIN, R. A. et al. Cytokinesis-Blocked Micronucleus Cytome Assay Biomarkers Identify Lung Cancer Cases Amongst Smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Preview*, v.17, n.5, p. 1111-1119, 2008. Fator de impacto: 4,32.

## **ANEXO 1- 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: SUSCETIBILIDADE GENÉTICA, DANO E REPARAÇÃO DO DNA E SUA RELAÇÃO COM O PERFIL FISIOPATOLÓGICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO**

**Coordenadoras da Pesquisa:** Prof.<sup>a</sup> 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 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 2 – Carta de aceite direcionada ao Comitê de Ética e Pesquisa**

Santa Cruz do Sul, 04 de agosto de 2015.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UNISC)

Prezados Senhores,

Declaramos para os devidos fins conhecer o protocolo de pesquisa intitulado:

“ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO AVALIADAS PELO ENSAIO COMETA, MICRONÚCLEOS E POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO”, desenvolvido pela acadêmica Márcia Raquel Schneider do Curso de Mestrado em Promoção da Saúde da Universidade de Santa Cruz do Sul-UNISC, sob a orientação da professora Andreia de Moura Valim bem como os objetivos e a metodologia de pesquisa e autorizamos o desenvolvimento no Centro de Oncologia Integrado do Hospital Ana Nery, em Santa Cruz do Sul.

Informamos concordar com o parecer ético que será emitido pelo CEP/UNISC, conhecer e cumprir com a Resolução do CNS 466/12 e demais Resoluções Éticas Brasileiras. Esta instituição está ciente das suas corresponsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa e no seu compromisso do resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária. Atenciosamente,

---

Assinatura e carimbo do responsável institucional

**CAPITULO II**  
**RELATÓRIO DE PESQUISA**

## RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO

O presente estudo é um recorte de uma pesquisa mais ampla da UNISC denominada “Dano, Reparação e Susceptibilidade em Doenças Pulmonares”, no qual avaliou-se 52 casos de câncer pulmão e 50 controles pelos testes de ensaio cometa, micronúcleos e polimorfismos de nucleotídeo único, afim de se observar o dano, reparo e condições genéticas de predisposição ao desenvolvimento da doença.

Buscou-se coletar todos os casos no mesmo local, sendo este o Centro Integrado de Oncologia do Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul (COI). Todos os pacientes foram triados pelos enfermeiros encarregados de ministrar a quimioterapia nos pacientes e ao entrar em contato com os mesmos e explicar o procedimento, coletou-se sangue e mucosa oral. Em alguns casos os pacientes sentiram-se inseguros e negaram-se a participar da pesquisa o que dificultou o alcance de um n amostral maior. A coleta de sangue dependia da condição do acesso venoso que nem sempre era adequado, uma vez que a quimioterapia danifica os mesmos ou por uma característica individual do paciente, e não se atingia os 6 mL necessários para a realização de todos os testes.

Em se tratando dos controles, as dificuldades começaram nos critérios de inclusão rigorosos onde os candidatos não poderiam apresentar histórico tabágico, câncer na família ou mesmo doença respiratória de repetição na infância. Além do fato de ser necessária a retirada de sangue por punção, o que não se fez necessário com os casos, uma vez que se utilizou o mesmo acesso para a quimioterapia. O recrutamento dos controles precisou acontecer por ordem aleatória e na tentativa de parear a amostra por sexo e idade, encontrou-se dificuldade em atingir os requisitos da amostra controle, o que demandou mais tempo do que o planejado.

Da mesma forma, casos de óbitos e desistência, bem como internação dos pacientes triados surgiram como impedimento, em muitos momentos, para as coletas. Grande parte dos pacientes casos necessitava deslocar-se do interior para a realização do tratamento e muitas vezes estes não compareciam.

No entanto a maior dificuldade ocorreu nas análises laboratoriais pois muitas lâminas tiveram de ser refeitas por problemas na coloração e a maioria precisou ser contada mais de uma vez demandando mais horas de trabalho do que se esperava no início do processo. Por fim, todos os dados devidamente tabulados encontraram-se em condições de ser

analisados, e observando-se todos os critérios de exclusão, o número final de amostras apresentou-se abaixo do esperado, contudo os resultados apresentaram significância estatística necessária para justificar a pesquisa.

**CAPITULO III**  
**ARTIGOS**

## **ARTIGO 1**

### **DANO E REPARAÇÃO DO DNA E SUA RELAÇÃO COM O PERFIL FISIOPATOLÓGICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO**

*(Elaborado de acordo com as normas da Revista Respiratory Research. Qualis A1/Fator de Impacto 3,7)*

# DANO E REPARAÇÃO DO DNA E SUA RELAÇÃO COM O PERFIL FISIOPATOLÓGICO EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO EM QUIMIOTERAPIA

## DAMAGE AND REPARATION OF DNA AND ITS RELATIONSHIP TO THE PHYSIOPATHOLOGICAL PROFILE IN PATIENTS WITH LUNG CANCER IN CHEMOTHERAPY

Marcia Raquel Schneider<sup>1</sup>, Andréa Lúcia Gonçalves da Silva<sup>2</sup>, Cássia da Luz Goulart<sup>3</sup>, Paloma de Borba Schneiders<sup>3</sup>, Lia Gonçalves Possuelo<sup>1,4</sup>, Andreia Rosane de Moura Valim<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul–UNISC, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. liapossuelo@unisc.br; avalim@unisc.br

<sup>2</sup>Departamento de Educação Física e Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul–UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brasil. andreag@unisc.br

<sup>3</sup>Bolsista de Iniciação Científica- PUIC da Universidade de Santa Cruz do Sul– UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brasil. luz.cassia@hotmail.com; pb-schneiders@hotmail.com

<sup>4</sup>Departamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul–UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brasil.

Autor Correspondente: Andreia Rosane de Moura Valim. Rua Gaspar Silveira Martins 888/5. Cep 96820-002. Bairro Santo Inácio. Rio Grande do Sul.

### RESUMO

**Introdução:** O câncer de pulmão possui elevada morbimortalidade, sendo que em 2016, segundo o INCA (2017), o número de casos foi de 28.220, sendo 17.330 homens e 10.890 mulheres. O tratamento consiste no uso de quimioterápicos que, assim como a doença, agredem as células e podem causar dano no DNA. **Objetivo:** Investigar o dano e a reparação do DNA em pacientes com câncer de pulmão em tratamento quimioterápico e sua relação com o perfil fisiopatológico. **Métodos:** Estudo caso-controle que avaliou 24 pacientes com câncer de pulmão (CA) e 23 indivíduos sem histórico tabágico ou de câncer na família e sem doença respiratória na infância (CO). Linfócitos de sangue periférico foram usados para realizar ensaio cometa alcalino ( $pH > 13$ ) e avaliar o dano no DNA, bem como para avaliar a reparação do DNA após tratamento por metilmetano sulfonato (MMS) após 1 hora (h) e 3 h a 37°C. A porcentagem de dano residual (DR) após 3 h de tratamento com MMS foi calculada para cada paciente. **Resultados:** Compuseram maioria no grupo CA, eram pacientes do sexo masculino, ex-fumantes, com histórico tabágico superior há 15 anos, sem comorbidades associadas. Os danos alcalino e residual no DNA foram mais elevados no grupo CA quando comparados aos CO (dano alcalino  $p=0,015$  e DR  $p=0,05$ ). Após 1h de tratamento com MMS houve incremento no dano no DNA do grupo CA quando comparado ao grupo CO, indicando falha na reparação do DNA. Após 3h de tratamento com MMS observou-se reparação do DNA em ambos os grupos. **Conclusão:** Pacientes com câncer de pulmão foram na maioria homens, ex-

tabagistas e com mais de 15 anos de consumo de tabaco, em tratamento quimioterápico, apresentam elevados índices de dano no DNA e deficiência na sua capacidade de reparação frente ao dano induzido, quando comparado a controles.

**Palavras chave:** Câncer de pulmão. Ensaio cometa. Dano e reparação. DNA.

## **ABSTRACT**

**Background:** Lung cancer has high morbidity and mortality, and in 2016, according to INCA (2017), the number of cases was 28,220, of which 17,330 were men and 10,890 were women. The treatment consists of the use of chemotherapeutic agents that, like the disease, attack the cells and can cause DNA damage. **Objective:** Investigate DNA damage and repair in patients with lung cancer in chemotherapy and its relationship with the pathophysiological profile. **Methods:** A case-control study evaluated 24 patients with lung cancer (CA) and 23 individuals with no smoking history or cancer in the family and without respiratory disease in childhood (CO). Peripheral blood lymphocytes were used to perform alkaline comet assay (pH > 13) and to assess DNA damage as well as to evaluate Methyl methane sulfonate (MMS) DNA repair after 1 hour (h) and 3 h at 37 ° C. The percentage of residual damage (DR) after 3 h of MMS treatment was calculated for each patient. **Results:** the majority of patients were in the AC group, male patients, former smokers, with a history of smoking for 15 years and without associated comorbidities. Alkaline and residual damages were higher in the AC group when compared to controls (alkaline damage  $p = 0.015$  and DR  $p = 0.05$ ). After 1 h of MMS treatment the DNA damage of the CA increased indicating failure to repair it, compared to the controls, and after 3 h DNA repair was observed in both groups. **Conclusion:** Patients with lung cancer are mostly men, former smokers and with more than 15 years of tobacco consumption, undergoing chemotherapy, have high rates of DNA damage and deficiency in their ability to repair against induced damage when compared to Controls.

**Keywords:** Lung cancer. Comet assay. Damage and repair. DNA.

## **INTRODUÇÃO**

O câncer de pulmão é uma doença que acomete homens e mulheres, principalmente acima de 50 anos, e vem crescendo de forma expressiva no mundo, tendo como principal causa o tabagismo (INCA, 2017; OMS, 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017) declarou que no mundo ocorrem cerca de 170.000 mortes ao ano relacionadas ao câncer de pulmão. No Brasil, em 2016 ocorreram 28.220 novos casos, sendo 17.330 em pacientes do sexo masculino e 10.890 em pacientes do sexo feminino (INCA, 2017). Fatores genéticos e



ocupacionais também são responsáveis pelo desencadeamento e pela evolução da doença. Com alta morbidade e mortalidade, o câncer de pulmão tem sido tema de inúmeras pesquisas com intuito de melhorar as formas de prevenção, diagnóstico precoce e a compreensão de sua fisiopatologia (INCA, 2017; OMS, 2017).

O tratamento para o câncer de pulmão, contudo, continua paliativo na maioria dos casos, considerando-se os altos índices de metástases e reincidência no período de 5 anos (JIANG et al., 2015). Cirurgias de ressecção e tratamentos à base de quimioterápicos e radioterapia provocam reações adversas que variam entre febre, queda de cabelo, fraqueza, redução da imunidade e principalmente dano no DNA. O dano no DNA pode ser identificado pelo ensaio cometa alcalino e cinética de reparação, sendo ambos os testes considerados eficazes, de baixo custo e fácil realização (SEKARANA, 2015; DUSINSKA, 2015; COLLINS, 2008).

O dano no DNA pode ser considerado positivo quando se avalia a necessidade de lesar ou destruir células cancerosas, porém não somente células malignas são atingidas de forma seletiva, o que provoca lesão em células saudáveis durante o tratamento (WALKING et al., 2016). É preciso considerar que, ao avaliar-se o dano no DNA de pacientes, tanto em tratamento de câncer como no grupo controle, aspectos como o envelhecimento natural ou patologias pregressas podem influenciar no resultado do índice de dano de forma geral (WALKING et al., 2016). Em decorrência dos rígidos critérios de admissão destes pacientes nas pesquisas, a literatura contemporânea ainda é inconclusiva sobre os efeitos da quimioterapia sobre o dano do DNA nos pacientes com câncer de pulmão.

Os avanços no campo da biologia celular e molecular estão permitindo melhor entendimento dos mecanismos de lesão e reparação do DNA em vários processos patológicos. Estudos realizados com pacientes de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), asma, tuberculose, entre outros, têm utilizado o ensaio cometa como método de avaliação do dano no DNA. É um teste que identifica danos no DNA, passível de reparo, sendo este induzido por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes, comprovadamente eficazes para este tipo de avaliação (SEKARANA, 2015; WASSON, MARTIN, DOWNES, 2008; DUSINSKA; 2015; COLLINS, 2008; AGNOLETO et al., 2007).

Nesse sentido, investigamos o dano no DNA em pacientes com câncer de pulmão submetidos a tratamento quimioterápico e a reparação do DNA frente ao dano induzido com agente alquilante, bem como sua relação com o perfil fisiopatológico desses pacientes.

## **MÉTODOS**

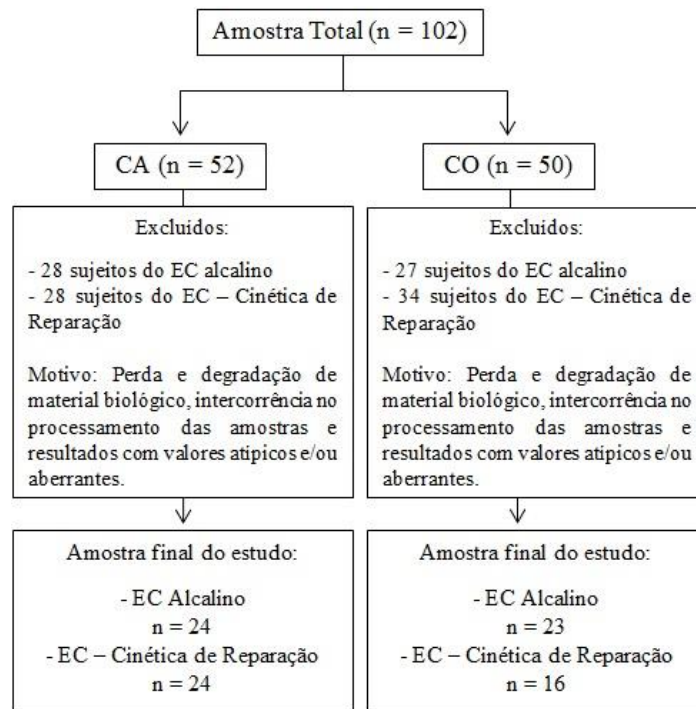
### **Delineamento da pesquisa**

Estudo do tipo caso-controle, com amostragem de conveniência e não probabilística cumpriu aos aspectos éticos e legais de pesquisa que envolve seres humanos, com aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Santa Cruz do Sul sob o protocolo de nº 346.984. Os pacientes com câncer de pulmão que compuseram o grupo caso (CA) foram selecionados no Centro de Oncologia Integrado (COI) do Hospital Ana Nery na cidade de Santa Cruz do Sul, RS. Os sujeitos que compuseram o grupo controle (CO) foram convidados formalmente a participar desta pesquisa junto à Associação dos Aposentados de Santa Cruz do Sul (APOPESC). Todos os indivíduos que participaram da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### **Crítérios de inclusão e exclusão dos sujeitos da pesquisa**

Foram incluídos na pesquisa inicialmente 102 indivíduos, homens e mulheres, divididos em dois grupos: grupo caso (CA); grupo controle (CO). O grupo CA foi composto por 52 pacientes portadores de câncer de pulmão em tratamento quimioterápico que consentiram formalmente em participar da pesquisa. Foram excluídos os portadores de câncer de pulmão hospitalizados e em fase terminal. Foram incluídos no CO 50 indivíduos adultos, em boas condições de saúde, não portadores de câncer de pulmão, que consentiram formalmente em participar da pesquisa, sendo excluídos os sujeitos com histórico tabágico e familiar de câncer, e relato de doença respiratória de repetição na infância.

Para garantir a qualidade do experimento laboratorial, foram excluídos dos grupos CA e CO amostras com reduzido número de células presentes nas lâminas, degradação do material biológico, resultados com valores atípicos e/ou aberrantes e intercorrências no processamento das amostras (FIGURA 01).



**Figura 01. Fluxograma- amostragem final do estudo para realização do ensaio cometa.** n: número amostral; CA: grupo de casos com câncer de pulmão; CO: grupo controle; EC: ensaio cometa.

### **Coleta de dados epidemiológicos e clínicos**

No início do estudo todos os participantes responderam a um questionário de levantamento de dados sociodemográficos e clínicos, para conhecimento do seu estado de saúde e tipo de quimioterápicos utilizados especificamente no grupo CA. Após este levantamento inicial foi possível identificar as drogas utilizadas pelos pacientes em tratamento de quimioterapia. Todos os indivíduos do grupo CA fizeram uso de um ou mais quimioterápicos, pertencentes às classes de compostos de platina, alcaloides da vinca, taxanos, bifosfonatos, podofilotoxinas e análogos das pirimidinas. A partir disso, os mesmos foram agrupados pela utilização de uma ou duas classes de quimioterápicos.

### **Obtenção de material biológico**

Amostra de sangue periférico foi coletada por meio de punção venosa, em um único momento, e armazenada em tubo com EDTA protegido de luz. Uma alíquota deste sangue foi utilizada para extração de linfócitos e subsequente realização do ensaio cometa, versão alcalina e cinética de reparação, e outra alíquota foi guardada em ultrafreezer caso fosse necessária a realização de novas análises.

### **Ensaio cometa versão alcalina**

O ensaio cometa na versão alcalina foi realizado de acordo com Singh e colaboradores (1988). A interpretação dos resultados do ensaio cometa considerou 5 níveis, desde dano zero

(DNA se encontra intacto) até a presença de uma cauda (à semelhança de um cometa), que pode variar de 1 a 4, dependendo do tamanho da mesma (SEKARANA, 2015).

O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas. Alíquotas de 20 µL de linfócitos foram misturadas a 200 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,7% em tampão fosfato) e foram colocadas sob lâminas de microscópio pré-revestidas com 1,5% de agarose. Posteriormente as lâminas foram incubadas em solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, 20 mM de NaOH, pH 10,2, 1% de Triton X-100, e 10% de DMSO). Após 24 horas, as lâminas foram removidas a partir da solução de lise e colocadas numa unidade de eletroforese, cobertas por tampão alcalino, refrigeradas a 4°C. Na versão alcalina do ensaio cometa (NaOH 10M, EDTA 1 mM, e pH > 13), foram realizados 20 minutos de desnaturação e 15 minutos de eletroforese. Para avaliação dos danos do DNA, foram analisadas 100 células por amostra por microscopia óptica (100 x). As células foram classificadas visualmente nas cinco classes. Em seguida, foi calculado o índice de dano (ID) para cada amostra, podendo variar de 0 (completamente sem danos: 100 células × 0) a 400 (com dano máximo: 100 células × 4).

### **Reparação do dano no DNA**

Para a avaliação da capacidade de reparação do DNA, linfócitos totais foram tratados com o agente de alquilação metil metanossulfonato (MMS) ( $8 \times 10^{-5}$  m) durante 5 minutos a 37°C (SILVA et al., 2007; AGNOLETO et al., 2007). Após o tratamento as células foram lavadas em PBS (centrifugação por 5 minutos a 3500 rpm) por duas vezes. Alíquotas de suspensão (20 µL) foram processadas imediatamente (tempo 0 minutos), após 60 e 180 minutos pós incubação com MMS através do ensaio cometa versão alcalina. Os resultados foram analisados seguindo os critérios de Agnoletto et al. (2007), relacionando-se diferentes períodos pós incubação com MMS como o tempo zero minuto (T0`), ao tempo sessenta minutos (T60`) e o T0` ao tempo setenta e oitenta minutos (T180`), para identificar e comparar o dano no DNA, entre os casos e controles. A percentagem de danos no DNA após T180` pós-incubação com MMS foi calculada utilizando-se o valor de T0` para cada sujeito como sendo 100% de dano induzido, e este foi intitulado Dano Residual (DR) (AGNOLETO et al., 2007).

### **Análise estatística**

Os resultados experimentais e dados epidemiológicos foram analisados utilizando o programa *Statisc Package for the Social Science* versão 23.0 (SPSS 23.0). Foi realizada análise descritiva a fim de traçar o perfil epidemiológico e fisiopatológico dos portadores de câncer de pulmão, quantificando o índice de dano e cinética de reparação do DNA. Posteriormente, foi realizado Teste *t Student* para análises paramétricas ou *Mann-Whitney* para as análises não

paramétricas. Os resultados foram avaliados segundo as suposições de normalidade, variância constante e independência. Foi considerado significativo um  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

As características clínicas dos grupos CA e CO estão descritas na Tabela I, onde observamos uma maior frequência do sexo masculino e histórico tabágico no grupo CA e maior frequência do sexo feminino no grupo CO, porém sem significância.

**Tabela I.** Características clínicas dos grupos CA e CO.

Variáveis	CA (n=24)	CO (n=23)	Valor de <i>p</i>
Sexo, n (%) <sup>α</sup>			0,30
Masculino	13 (54,2)	9 (39,1)	
Feminino	11 (45,8)	14 (60,9)	
Etnia, n (%) <sup>α</sup>			0,10
Caucasiano	19 (79,2)	22 (95,7)	
Não-caucasiano	5 (20,8)	1 (4,3)	
Histórico tabágico, n (%) <sup>α</sup>			
Fumante	7 (29,2)	-	-
Ex-fumante	15 (62,5)	-	-
Nunca fumante	2 (8,3)	23 (100,0)	-
Tempo Tabagismo, n (%)			
10-15 anos	1 (4,5)	-	-
Mais de 15 anos	21 (95,5)	-	-
Comorbidades, n (%)			0,78
Sim	11 (45,8)	14 (60,8)	
Não	13 (54,2)	9 (39,1)	
Cigarros fumados/ano (mediana)	7300 (1460-21900)	-	-
Índice de Dano DNA*			
ID Alcalino (média±dp)	291,1±53,1	261,6±32,4	0,018
Idade em anos (média±dp)*	67,4±7,0	63,3±7,4	0,06

Dados expressos em  $\pm$ : média e desvio padrão; n (%): número amostral e porcentagem; CO: grupo controle; CA: grupo com câncer de pulmão; ID: índice de dano; <sup>α</sup>: teste de qui-quadrado; \*: Teste *t student*.

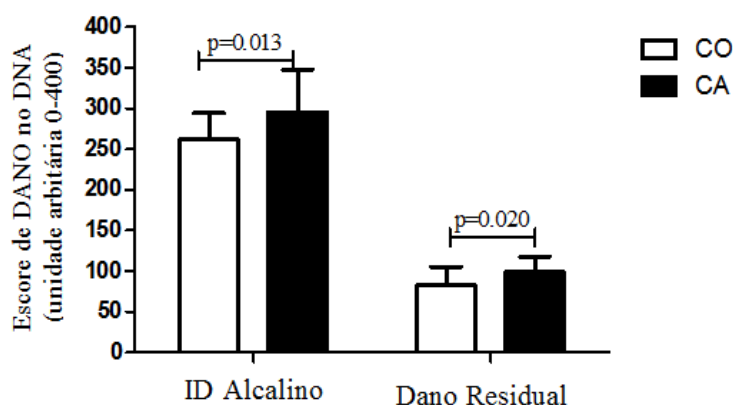
Entre os pacientes do grupo CA, 29% eram fumantes ativos enquanto 62,5% eram ex-fumantes e 8,3% nunca fumaram. A carga tabágica anual dos portadores de câncer de pulmão mostrou-se elevada 7.300 (1.460- 21.900) cigarros no ano, e 95,5% fumou por mais de 15 anos]. Com relação à presença de comorbidades como hipertensão arterial, depressão, alteração de colesterol entre outras, observou-se frequência semelhante em ambos os grupos.

Os quimioterápicos utilizados no tratamento pertenciam às classes de compostos de platina, alcaloides da vinca, taxanos, bifosfonatos, podofilotoxinas e análogos das pirimidinas, e todos os pacientes com câncer de pulmão passaram por tratamento com um, dois ou três

medicamentos, não somando mais do que duas classes [n=5 (21%) utilizaram uma classe de quimioterápico; n=19 (79%) utilizaram duas classes].

O dano basal no DNA, avaliado pelo ensaio cometa alcalino diferiu significativamente entre os grupos, sendo que, o índice de dano encontrado no grupo CA foi significativamente maior ( $p=0,018$ ), quando comparado ao CO (TABELA I).

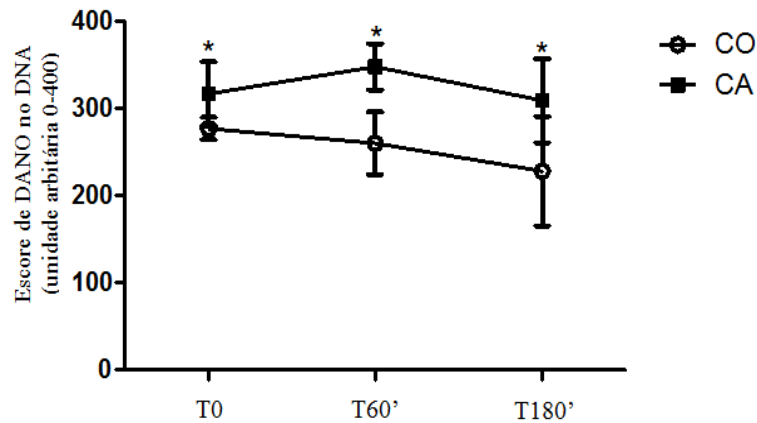
O DR estimado, após cinética de reparação do DNA, também diferiu significativamente ( $p=0,020$ ) entre os grupos sugerindo que portadores de câncer de pulmão apresentaram um déficit na reparação do DNA (FIGURA 02).



**Figura 02. Índice de Dano Alcalino e Dano Residual dos grupos CA e CO pelo ensaio cometa.** CO: grupo controle; CA: grupo com câncer de pulmão; ID: índice de dano. Realizado Test *t student* para comparar o índice de dano alcalino e o dano residual entre os grupos.

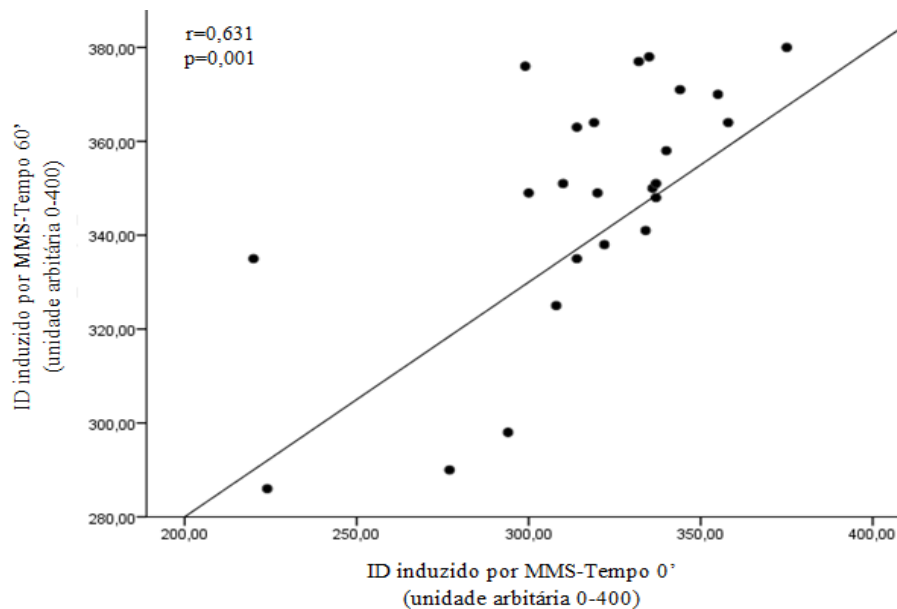
Ao observar-se grupos CA e CO (FIGURA 2), em se tratando do ensaio cometa alcalino, encontrou-se maior índice de dano alcalino e dano residual entre os CA ( $p=0,013$ ;  $p=0,020$ ). Nas análises envolvendo a reparação do dano induzido por MMS, observou-se diferença significativa entre os grupos, CA e CO no T0', T60' e no T180' (FIGURA 03). Ao comparar-se as amostras de ambos os grupos (CA e CO), identificou-se que o índice de reparação apresenta perfil diferenciado.

No grupo CO, a reparação acontece de forma progressiva nos três tempos, enquanto no grupo CA, ocorre aumento do dano no T60' (após exposição ao MMS), e a reparação pode ser observada somente no T180'. É importante ressaltar que para o grupo CA o dano é maior em todos os tempos, e a cinética de reparo ocorre no T180', porém em menor proporção.



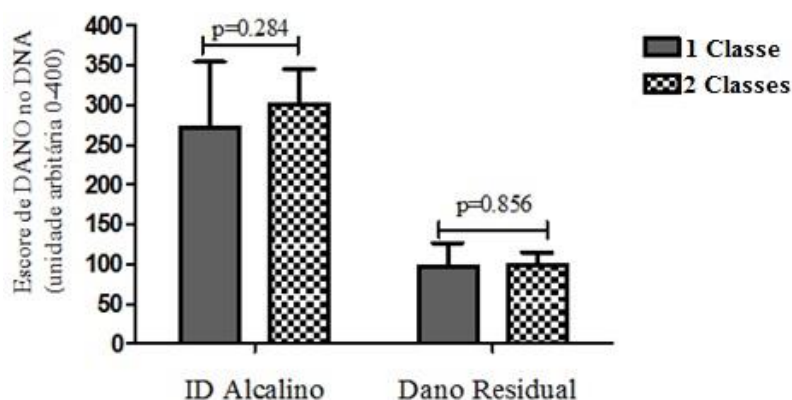
**Figura 03. Cinética de reparação do dano no DNA induzido por MMS nas amostras de CA e CO pelo ensaio cometa.** T0: tempo zero; T60: tempo de 60 minutos; T180: tempo de 180 minutos após dano induzido por MMS. CO: grupo controle; CA: grupo com câncer de pulmão; MMS: metil metanosulfonato. Test t de *student* com  $*p < 0.001$  ao compararmos os tempos de dano induzido por MMS entre os grupos.

Foi encontrada correlação entre o ID no T0 com ID no T60, somente para o grupo CA, sugerindo que portadores de câncer de pulmão com alta suscetibilidade ao dano induzido por MMS apresentam dificuldade em iniciar ou há um retardo na reparação do DNA (FIGURA 04).



**Figura 04. Associação entre o ID no DNA induzido por MMS, nos tempos 0 e 60 minutos, nos pacientes com câncer de pulmão.** ID: índice de DANO; MMS: metil metanosulfonato; Utilizada Correlação de *Spearman*.

Quando estratificados os resultados do ensaio cometa do grupo CA para as classes de quimioterápicos utilizados em seu tratamento, nenhuma diferença significativa foi observada. Apesar disto, pacientes com câncer de pulmão em tratamento com 2 classes de quimioterápicos apresentam valores de ID basal e DR mais elevados (ID Alcalino  $301,2 \pm 43,8$ ; DR  $99,2 \pm 15,5$ ) quando comparados aos pacientes em tratamento com 1 classe (ID  $272,0 \pm 82,6$ ; DR  $97,5 \pm 29,4$ ) (FIGURA 05).



**Figura 05. Índice de Dano Alcalino e Dano Residual de pacientes com câncer de pulmão estratificados pelos grupos envolvendo 1 ou 2 classes de quimioterápicos.** 1 classe: n° sujeitos=5; 2 classes: n° sujeitos=19; ID: índice de dano. Realizado Test *t student* para comparar o índice de dano alcalino e o dano residual entre os grupos.

## DISCUSSÃO

Segundo o INCA (2017), no Brasil atualmente, os indivíduos que desenvolvem câncer de pulmão são em maioria homens, com idades entre 35 e 70 anos, sendo 90% com histórico tabágico, com sobre vida de apenas cinco anos (7% a 10% no total), representando 24.490 mortes ao ano. A estimativa para 2016 foi de 17.330 novos casos entre homens e 9.675 entre mulheres, sendo que estes valores superados, totalizando 28.220 novos casos. Conforme observado neste estudo, a maioria dos pacientes que compunham o grupo caso foi de homens, acima de 65 anos e fumantes ou com histórico tabágico.

Este trabalho, que teve por objetivo investigar o dano no DNA e sua capacidade de reparação, por meio de ensaio cometa alcalino e cinética de reparo induzida por MMS, possibilitou a análise dos dados de pacientes com câncer de pulmão comparados a indivíduos do CO.

Os pacientes do grupo CA apresentaram um dano basal no DNA mais elevado que os CO ( $p=0,018$ ), bem como cinética de reparação alterada e dano residual aumentado. O uso de quimioterápicos parece influenciar na elevação do índice de dano no DNA, porém nossos



resultados não podem comprovar tal informação. Por meio do ensaio cometa detecta-se uma infinidade de danos e só a partir da análise desses fatores é possível definir o dano basal. Por esse motivo, ao comparar-se resultados dos grupos CA e CO no presente estudo, observou-se que patologias adjacentes ou pregressas podem estar presentes tanto em CA como em CO, alterando os valores de base para ambos os grupos e dificultando o estabelecimento dos valores de normalidade (DUSINSKA, COLLINS, 2008).

Para Rennard, Togo e Hoelz (2006), todo tipo de agressão ao tecido pulmonar pode causar dano ao DNA. Logo, embora o grupo CO não apresente histórico de câncer de pulmão ou patologias infecciosas de repetição na infância, diferentes agentes externos, como idade elevada, estresse, exposição à fumaça, entre outros, podem influenciar pela elevação dos valores do dano basal. Mesmo o grupo CO tendo sido exposto a esses fatores, o grupo CA apresentou valores de dano no DNA superiores, o que nos leva a crer que tanto o desenvolvimento da doença como a quimioterapia podem ser considerados importantes agentes no dano do DNA de pacientes com câncer de pulmão em fase de tratamento quimioterápico, como descreve Choi et al. (2015), em seu estudo.

Dusinska e Collins (2008) afirmam que a reparação do DNA é fundamental para a proteção contra o câncer de pulmão, pois remove mutações indesejadas presentes na fita de DNA. Diferenças individuais e exposição a agentes químicos e genotóxicos influenciam de forma direta nesse processo e, conseqüentemente, na susceptibilidade ao câncer. Desse modo, ao observar-se os resultados representados na Figura 3, concluímos que existe menor capacidade de reparação por parte dos pacientes do grupo CA e maior dano residual.

Seguindo a linha de análise de resultados de Agnoletto et al. (2007), identificou-se que as relações entre o T0' e T60' para o grupo CA apontaram dificuldade no processo de reparação, sendo esta reestabelecida ao comparar-se T0' e T180', enquanto para CO, a reparação ocorre em T60' e T180'. Isso nos leva a crer que pacientes portadores de câncer e em tratamento de quimioterapia apresentam dano no DNA importante e com menores condições de reparação. Os agentes citotóxicos quimioterápicos podem causar neoplasias secundárias e evolução de células tumorais, contribuindo para o agravamento do dano ao DNA (SZIKRISZ et al., 2016; MUENYI, LJUNGMAN, STATES 2015). Logo, a capacidade de reparo de células tumorais é um dos principais determinantes da eficácia e da resistência a quimioterápicos prejudiciais ao DNA, como, por exemplo, a cisplatina, usada em mais de 90% dos tratamentos de quimioterapia para câncer de pulmão (CHOI et al., 2015).

Os pacientes com câncer se encontram em tratamento de quimioterapia, sendo submetidos ao uso de substâncias farmacológicas extremamente agressivas ao DNA, o que

pode justificar maiores índices de dano e reparo em menor escala no grupo CA. Tais substâncias compunham o tratamento de forma combinada, conforme o tipo de câncer e progressão da doença. Todos os quimioterápicos eram pertencentes às classes: compostos de platina, alcaloides da vinca, taxanos, bifosfonatos, podofilotoxinas e análogos das pirimidinas e a maioria dos protocolos era composta por mais de uma substância quimioterápica, agravando os resultados para dano residual. Como pode-se observar neste estudo, a maioria dos pacientes do grupo CA (60,9%) utilizou duas classes em seu tratamento, ampliando a probabilidade de dano no DNA.

Sabe-se, no entanto, que além dos fatores genéticos, o hábito de fumar por períodos prolongados e em grande quantidade, é comprovadamente fator causador de desenvolvimento do câncer de pulmão. Existem no cigarro cerca de 4,7 mil substâncias tóxicas consideradas cancerígenas que causam inegavelmente, além do câncer de pulmão, dano ao DNA (OMS, 2015). Sendo assim, não somente a quimioterapia, mas também o histórico e carga tabágica do paciente, secundariamente a fatores genéticos e de doença respiratória de repetição na infância, são responsáveis diretos pelo dano ao DNA e redução da sua capacidade de reparação (RENNARD; TOGO; HOELZ, 2006; CAO et al., 2015).

Pesquisas com maior número de indivíduos poderão contribuir para a comprovação de que o dano e a capacidade de reparação podem estar de fato relacionados ao perfil fisiopatológico dos pacientes, bem como ao tratamento, possibilitando assim o desenvolvimento de novas técnicas que possam reduzir os efeitos nocivos ao organismo.

## **CONCLUSÃO**

Com base nas observações, supõe-se que a presença da doença, com maior incidência entre pacientes do sexo masculino, ex-tabagistas, com histórico tabágico superior há 15 anos, assim como a exposição a agentes genotóxicos e citotóxicos são possíveis mecanismos importantes de dano no DNA, tanto para índices basais como residuais. Estudos por períodos mais prolongados e com amostra probabilística são necessários para que se possa comprovar de forma definitiva a relação entre o dano e reparação do DNA com o perfil fisiopatológico dos pacientes com câncer de pulmão.

## **REFERÊNCIAS**

1. AGNOLETO, M. H. et al., Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. *Clinical Biochemistry*, v. 40, n. 1, p. 1252-1258, 2007.
2. ALGRANTI, E.; BUSCHINELLI J. T. P.; CAPITANI E. M.; Câncer de pulmão ocupacional. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 36, n. 6, p. 784-794, 2010.
3. BHAGIRATH, D. et al. Cell type for origin as well as genetic alterations contribute to breast cancer phenotypes. *Oncotarget Journal*, v. 6, n. 11, p. 9018-9030, 2014.
4. CHOI, Y. J. et al. Enhanced nucleotide excision repair capacity in lung cancer cells by preconditioning with DNA-damaging agents. *Oncotarget*, v.6, n.26, p. 22575-22587, 2015
5. COLLINS, A. R., et al. The comet assay: topic issues. *Mutagenesis*, v. 23, n. 3, p. 143-150, 2008.
6. DUSINSKA, M; COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene environment interactions. *Mutagenesis*. v. 23, n. 3, p. 191-205, 2008.
7. EOM, S. et al. Paraoxonase 1 Genetic Polymorphisms and Smoking and Their Effects on Oxidative Stress and Lung Cancer Risk in a Korean Population. *Plos One Journal*. v. 10, n. 3, p. 1-15, 2015.
8. GAYA, A. et al. *Ciências do movimento humano: introdução à metodologia da pesquisa*. Porto Alegre: Artmed, 2008.
9. HASHIM, D.; BOFFETTA, P. Occupational and Environmental Exposures and Cancers in Developing Countries. Icahn School of Medicine at Mount Sinai. *State of the Art Review*. v. 80, p. 393-411, 2014.
10. HEIST, R. S. et al. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *Journal of Thoracic Oncology*. v. 7, n. 9, p. 924-933, 2012.
11. HUNG, M. et al. Comparison of expected health impacts for major cancers: Integration of incidence rate and loss of quality-adjusted life expectancy. *Cancer Epidemiology Journal*. v. 39, p. 126-132, 2015.
12. INCA, 2017: banco de dados do INCA, 2016. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acessado em janeiro de 2017.
13. INCA, 2016: banco de dados do INCA, 2016. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acessado em agosto de 2016.
14. INCA, 2016: banco de dados do INCA, 2016. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acessado em dezembro de 2016.
15. JIANG, T. et al. Inflammation and cancer: inhibiting progression of residual hepatic vx2 carcinoma by anti-inflammatory drug after incomplete radiofrequency ablation. *Journal Clinical Exp. Pathology*. v. 8, n. 11, p. 13945-13956, 2015.
16. MUENYI, S. C.; LJUNGMAN, M.; STATES, J. C. Arsenic disruption of DNA damage responses – potential role in carcinogenesis and chemotherapy. *Biomolecules*, v. 5, n. 1, p. 2184-2193, 2015.
17. MURRAY, R. P.; ROSENTHAL, K. S.; PHALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
18. Organização Mundial da Saúde, 2015: banco de dados da OMS, 2015. Disponível em: <<http://www.paho.org/bra/>>. Acesso em: 16 junho 2016.
19. RENNARD, S. I.; TOGO, S.; HOLZ, O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair. A mechanism for the development of emphysema. *American Thoracic Society*. v. 3, n.8, p.703-708, 2006.
20. SHAO, W.; HE, J. Polymorphism and lung cancer susceptibility e meta-analysis. *Annals of Transnational Medicine*, v. 3, n. 7, p. 93-97, 2015.

21. SEKARANA, V.; RAJ, G.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *Journal of clinical and diagnostic research*, v. 9, n. 3, p. 1-5, 2015.
22. SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.
23. SZIKRISZT, B. et al. A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics. *Genome Biology*, v.17, n. 99, p 1-19, 2016.
24. THOMAS, Philip; Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*, v. 26, p. 69-76, 2011.
25. WALKING, M. A. et al. Evaluation of arsenic trioxide potential for lung cancer treatment. Assessment of apoptotic mechanisms and oxidative damage. *J. Cancer Sci. Ther.* v. 8, n. 1, p. 1-9, 2016.
26. WASSON, G. R. et al. The use of comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis*. v. 23, n. 8, p. 153-162, 2008.
27. ZAMBONI, Mauro. Epidemiologia do câncer de pulmão. *Jornal de Pneumologia*, v. 28, n. 1, p. 41-47, 2002.

## **ARTIGO 2**

### **FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E ANORMALIDADES CELULARES EM PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO COM POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM IL6, TNF- $\alpha$ e VDR.**

*(Atigo desenvolvido com base nas normas da revista BMC Medical Genetics. Fator de  
Impacto  
1,463))*

# FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS, ANORMALIDADES CELULARES E DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NOS GENES IL6, TNF- $\alpha$ E VDR EM PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO

## FREQUENCY OF MICRONUCLE, CELLULAR ABNORMALITIES AND GENETIC POLYMORPHISMS IN IL6, TNF- $\alpha$ AND VDR GENES IN LUNG CANCER CARRIERS

Màrcia Raquel Schneider<sup>1</sup>, Andréa Lúcia Gonçalves da Silva<sup>2</sup>, Maribel Bressani<sup>4</sup>, Augusto Ferreira Weber<sup>4</sup>, Lia Gonçalves Possuelo<sup>1,4</sup>, Andreia Rosane de Moura Valim<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul–UNISC, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. [liapossuelo@unisc.br](mailto:liapossuelo@unisc.br); [avalim@unisc.br](mailto:avalim@unisc.br)

<sup>2</sup>Departamento de Educação Física e Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul–UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brasil. [andreag@unisc.br](mailto:andreag@unisc.br)

<sup>3</sup>Bolsista de Iniciação Científica- PUIC da Universidade de Santa Cruz do Sul– UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brasil. [luz.cassia@hotmail.com](mailto:luz.cassia@hotmail.com); [pb-schneiders@hotmail.com](mailto:pb-schneiders@hotmail.com)

<sup>4</sup>Departamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul–UNISC, Santa Cruz do Sul/RS, Brasil.

Autor Correspondente: Andreia Rosane de Moura Valim. Rua Gaspar Silveira Martins 888/5. Cep 96820-002. Bairro Santo Inácio. Rio Grande do Sul.

### RESUMO

**Introdução:** O câncer de pulmão é uma patologia com alto índice de mortalidade, que atingiu 28.220 indivíduos no Brasil, somente no ano de 2016, sendo maior o número de casos entre homens, acima de 50 anos e com histórico tabágico. Avaliação da presença de micronúcleos (MN) e de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes como IL6, TNF- $\alpha$  e VDR, são utilizados como importantes marcadores de anomalias genéticas. **Objetivo:** avaliar a frequência de micronúcleos e anormalidades celulares em portadores de câncer de pulmão e sua associação aos genes IL6, TNF- $\alpha$  e VDR. **Métodos:** Estudo caso-controle que avaliou 52 pacientes com câncer de pulmão (CA) e 40 indivíduos sem histórico tabágico e familiar de câncer, e sem doença respiratória na infância (CO). Amostras de sangue periférico para a extração do DNA foram coletadas por meio de punção venosa. As amostras de mucosa oral foram obtidas por *Cytobrush*, e fixadas em metanol. As lâminas foram coradas pelo método Feulgen, sendo contadas 1000 células por indivíduo. Análise dos SNPs foi realizada por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real. Foram analisados SNP nos genes IL6 (rs 1800795), TNF- $\alpha$  (rs 1800629) e VDR (rs 2228570). **Resultados:** compuseram maioria no grupo CA, pacientes do sexo masculino, ex-fumantes, com histórico tabágico superior há 30 anos e sem comorbidades associadas. O grupo CA, apresentou redução

significativa nos percentuais de células basais, e aumento da frequência de micronúcleos e anormalidades celulares em relação aos controles (células binucleadas, broto nuclear, células cariorréticas, cariolíticas e picnóticas). Os CA portadores do alelo de risco G (GG+GC), no rs1800795 do gene IL6, apresentaram percentuais aumentados de MN ( $p<0,001$ ), reduzidos de células basais ( $p<0,001$ ), aumento de broto nuclear ( $P<0,001$ ), aumento do percentual de células binucleadas ( $p<0,001$ ) e cariorréticas ( $p=0,008$ ). Quanto ao rs 1800629 no gene TNF- $\alpha$ , os indivíduos CA, com o alelo de risco A (AA+AG) apresentaram redução no percentual de células basais ( $p=0,001$ ), aumento no percentual de MN diferenciados ( $p<0,001$ ), aumento de broto nuclear ( $p<0,001$ ) e células binucleadas ( $p<0,001$ ), além de maior número de células cariorréticas. Pacientes CA com o alelo de risco T (TT+TC) no rs 2228570 do gene VDR apresentaram redução no percentual de células basais ( $p<0,001$ ), aumento de MN diferenciado ( $p<0,001$ ), broto nuclear ( $p<0,001$ ), células binucleadas ( $P<0,001$ ) e de células cariorréticas ( $p=0,053$ ), quando comparados aos controles. **Conclusão:** Pacientes com câncer de pulmão são na maioria homens, ex-tabagistas, com histórico tabágico superior a 30 anos, com maior frequência de MN e quando comparadas as frequências dos alelos de risco e a frequência de micronúcleos e anormalidades celulares, verificamos que os pacientes CA com alelo de risco nos três genes estudados, apresentaram maior frequência de MN e anormalidades celulares. A frequência de células basais foi menor neste grupo.

**Palavras chave:** Câncer de pulmão. Micronúcleos. Polimorfismos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Lung cancer is a pathology with a high mortality rate, which reached 28,220 individuals in Brazil, only in 2016, with the highest number of cases among men, over 50 years old and with a history of smoking. Evaluation of the presence of micronuclei (MN) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes like IL6, TNF- $\alpha$  and VDR are used as important markers of genetic abnormalities. **Objective:** to evaluate the frequency of micronuclei and cellular abnormalities in lung cancer patients and its association with IL6, TNF- $\alpha$  and VDR genes. **Methods:** A case-control study was conducted to evaluate 52 patients with lung cancer (CA) and 40 individuals with no smoking and family history of cancer, and no respiratory disease in childhood (CO). Peripheral blood samples for DNA extraction were collected by venipuncture. Oral mucosa samples were obtained by Cytobrosh, and fixed in methanol. Oral mucosa samples were obtained by Cytobrosh, and fixed in methanol. The slides were stained by the Feulgen method, counting 1000 cells per subject. Analysis of the SNPs was performed by real-time PCR (Polymerase Chain Reaction). SNPs were analyzed in

the IL6 (rs 1800795), TNF- $\alpha$  (rs 1800629) and VDR (rs 2228570) genes. **Results:** the majority of patients were in the AC group, male patients, ex-smokers, with a history of smoking for 30 years and without associated comorbidities. The CA group showed a significant reduction in basal cell percentages, and an increase in micronuclei frequency and cellular abnormalities in relation to the controls (binucleate cells, nuclear bud, karyoretic, caryolytic and picnotic cells). In the IL6 gene rs1800795, the presence of increased G (p <0.001), reduced basal cell (p <0.001), increased nuclear bud (P <0.001), increased percentage of binucleate cells (p <0.001) and karyoretic cells (p = 0.008). As regards rs 1800629 in the TNF- $\alpha$  gene, CA individuals with the risk A allele (AA + AG) presented a reduction in the percentage of basal cells (p = 0.001), an increase in the percentage of differentiated MNs (p <0.001) (P <0.001) and binucleate cells (p <0.001), in addition to a greater number of karyortic cells. Patients CA with the risk allele T (TT + TC) in rs 2228570 of the VDR gene presented a reduction in the percentage of basal cells (p <0.001), increase in differentiated MN (p <0.001), nuclear outbreak (p <0.001) Binucleate cells (P <0.001) and karyoretic cells (p = 0.053), when compared to controls. **Conclusion:** Patients with lung cancer are mostly men, ex-smokers, with a smoking history of more than 30 years, with a higher frequency of MN, and when comparing the frequencies of risk alleles and the frequency of micronuclei and cellular abnormalities, we found that CA patients with risk alleles in the three genes studied, presented higher MN frequency and cellular abnormalities. The basal cell frequency was lower in this group.

**Key words:** Lung cancer. Micronuclei. Polymorphisms.

## INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é uma das maiores causas de morte entre homens, com idades entre 35 e 70 anos no Brasil e no mundo. Além do tabagismo, considerado o fator de maior relevância para o desenvolvimento da doença, fatores ambientais e genéticos também estão relacionados ao câncer de pulmão (INCA, 2016; OMS, 2015; CRESS et al., 2014).

Marcadores citogenéticos têm sido utilizados como indicadores de mutações ou exposição aos agentes causadores do câncer uma vez que a instabilidade cromossômica também tem sido associada ao aumento do carcinoma pulmonar. O teste de micronúcleos é utilizado para identificar a instabilidade genômica através de células bucais, nas quais as alterações são mais facilmente observadas do que em linfócitos, sendo marcador preditivo para câncer de pulmão. Podem ser identificados danos relacionados com estilo de vida, tabagismo, tratamento farmacológico, exposição a fatores ocupacionais, e a substâncias químicas que



podem potencializar o processo de alterações genéticas levando ao desenvolvimento da doença (ZENIN et al., 2008; MCHUGH et al., 2014).

Estudos envolvendo micronúcleos demonstram a presença de alterações de grande espectro quando se trata de pacientes em tratamento para câncer, já que a mesma danifica as células de forma extrema (THOMAS, 2011, JIA, 2015). Pacientes com câncer de pulmão apresentam uma frequência muito maior de micronúcleos do que os pacientes que embora fumantes, não apresentam a doença. Desta forma, este teste tem se mostrado eficaz para avaliar dano no DNA e fatores de risco, de forma prática, rápida e não invasiva (MURRAY; ROSENTHAL; PHALLER, 2006).

Assim como a presença de micronúcleos e aberrações cromossômicas, polimorfismos de nucleotídeo único em genes envolvidos no processo inflamatório, como IL6, TNF- $\alpha$  e VDR, estão sendo estudados e associados à suscetibilidade para o desenvolvimento de câncer. Têm-se observado a importância da identificação de SNPs em genes que codificam proteínas envolvidas na resposta imunológica como fonte de suscetibilidade a diversos tipos de câncer (BHAGIRATH et al., 2015; GONG et al., 2015; HEIST et al., 2012; HAMA et al., 2011; SHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2011).

Estas proteínas são responsáveis pela indução de elementos importantes da resposta inflamatória aguda no processo de lesão celular das células do epitélio pulmonar. Além de auxiliar na regulação da resposta imunológica, são considerados marcadores específicos (DUTTA et al., 2012; SEOW et al., 2006) podendo estar relacionados ao câncer de pulmão os SNPs presentes nos genes IL6 (rs 1800795), TNF- $\alpha$  (rs 1800629) e VDR (rs 2228570). O aumento dos níveis séricos de IL6 no organismo pode potencializar metástases de células cancerosas através de mecanismos como hiper-regulação da expressão de receptores de células endoteliais, e pelo estímulo de fatores de crescimento (XU et al., 2011). O que se sabe por estudos do TNF- $\alpha$  é que este gene está cada vez mais relacionado com a susceptibilidade de diversas doenças como o câncer de pulmão (HAN et al., 2012; SHUKLA et al., 2012; CHANG et al., 2012) e que em se tratando da vitamina D, a ação imunológica depende do VDR, a que se tem associada a eficiência da resposta para o desenvolvimento do câncer (WILKER et al., 2009).

Com base nessas informações, este estudo avaliou a frequência de micronúcleos e anormalidades celulares em portadores de câncer de pulmão e sua associação aos genes IL6, TNF- $\alpha$  e VDR.

## **MÉTODOS**

### **Delineamento da pesquisa**

O presente estudo foi realizado com pacientes portadores de câncer de pulmão (grupo CA) e indivíduos controle (grupo CO), sendo do tipo caso-controle, com amostragem de conveniência e não probabilística. A pesquisa foi aprovada pelo CEP da UNISC sob o protocolo de nº 346.984. Os pacientes CA foram recrutados no Hospital Ana Nery junto ao centro integrado de oncologia (sendo 52 CA) e os indivíduos controle (50 CO) foram recrutados aleatoriamente junto à Associação dos Aposentados de Santa Cruz.

### **Critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos da pesquisa**

Foram incluídos pacientes com câncer de pulmão, atendidos no COI, que estavam em fase inicial de quimioterapia, sendo que pacientes em fase terminal e hospitalizados foram excluídos da amostra. Foram incluídos no CO indivíduos adultos, em boas condições de saúde, não portadores de câncer de pulmão, que consentiram formalmente em participar da pesquisa, sendo excluídos os sujeitos com histórico tabágico e familiar de câncer, e relato de doença respiratória de repetição na infância.

Amostras com número reduzido de células presentes, material degradado e valores atípicos/aberrantes, foram excluídos para que fosse mantida a qualidade do experimento. Logo, a amostra final consistiu em 52 pacientes compondo o grupo CA e 40 o grupo CO.

### **Coleta de dados epidemiológicos e clínicos**

Informações clínicas como utilização de medicamentos, mensuração da pressão arterial e patologias pregressas ou concomitantes, dos pacientes do grupo CA, foram coletadas nos prontuários do COI. Todos os sujeitos da pesquisa responderam um questionário com características epidemiológicas como escolaridade, local onde reside, sexo, idade, entre outros. Os pacientes CA foram classificados de acordo com o número de classes de quimioterápicos utilizados no tratamento.

### **Obtenção de material biológico**

Amostras de sangue periférico para a extração do DNA foram coletadas por meio de punção venosa e armazenadas em tubo com EDTA. As amostras de mucosa oral foram obtidas de ambos os lados da bochecha do indivíduo, através do uso de escova de *Cytobrush*, sendo fixadas em tubos devidamente identificados, contendo metanol.

### **Ensaio de Micronúcleos – Citoma Bucal (BMCyt)**

Adaptamos o ensaio BMCyt do método descrito por Thomas et al. (2009). Amostras de células bucais foram colhidas e processadas em conformidade com os mesmos autores. As células foram diretamente fixadas em metanol (uma adaptação do protocolo original). Para cada sujeito foram preparados dois microtubos com metanol, um para as células da bochecha esquerda e outro para bochecha direita. As células foram coletadas por rotação de uma escova

*cytobrush*, em um movimento espiral, 20 vezes contra a superfície interna da parede da bochecha. A cabeça da *cytobrush* foi colocada em seus respectivos microtubo contendo 1000 µL de metanol (SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2013). Em seguida, as amostras foram transportadas laboratório e mantidos sob refrigeração (5°C) antes da realização o teste do micronúcleo.

As células foram centrifugadas e lavadas com metanol após o sobrenadante foi removido para concentrar um maior número de células. Aproximadamente 200 µL da suspensão celular foram espalhadas sobre uma lâmina de microscópio e deixadas secar. Em seguida, as lâminas foram colocadas num recipiente contendo 50% de etanol durante 1 minuto e imediatamente transferidas para um frasco de coloração contendo 20% de etanol para 1 minuto adicional. Depois de lavar as lâminas com água durante 2 minutos, adicionou-se ácido clorídrico 5 M durante 30 min para permitir a hidrólise celular.

Após hidrólise celular, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos e depois com água destilada durante 1 minuto. Subsequentemente, as lâminas foram mantidas durante 1 h e 20 minutos no reagente de *Schiff* para coloração e depois lavado com água destilada. Após coloração, as células foram contra-coradas com *Fast Green* por 20 segundos e depois lavado com água destilada durante 2 minutos. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e armazenadas para análise. Análise de lâminas foi realizada por um investigador cegado utilizando um microscópio óptico convencional com uma ampliação de 400X. Um total de 2.000 células por lâmina foi analisado para uma contagem total de 4.000 células por amostra. O BMCyt pode ser usado como um indicador de danos no DNA (MN e/ou botões nucleares - BUDS), defeitos de citocinese (Células binucleadas - BC), potencial de proliferação (frequência de células basais), morte celular apoptótica (cromatina condensada - CC, células cariorréticas - CR, células picnóticas - PY) e necrótica (células cariолíticas- CL) (SILVA et al., 2013).

### **Identificação de polimorfismo**

A análise dos polimorfismos relacionados à suscetibilidade ao câncer de pulmão foi realizada por PCR em tempo real, utilizando o aparelho StepOne Plus, Applied Biosystem™. O DNA foi extraído a partir 500 µL de uma amostra de sangue total anticoagulado com EDTA, através do método de Salting out (MULLER; DYKES; POLESKY, 1988). Após a extração, o DNA foi ressuspensionado em água Mili Q e armazenado à -20°C. Foram analisados os SNP nos genes IL6 (rs 1800795), TNF-α (rs 1800629) e VDR (rs 2228570).

### **Análise estatística**

Os resultados e dados epidemiológicos foram analisados utilizando o programa *Statisc Package for the Social Science* versão 23.0 (SPSS 23.0). Foi realizada análise descritiva a fim de traçar o perfil epidemiológico e fisiopatológico dos portadores de câncer de pulmão e controles, quantificando o índice de dano e cinética de reparação do DNA. Posteriormente, foi realizado Teste *t Student* para análises paramétricas ou *Mann-Whitney* para as análises não paramétricas. Os resultados foram avaliados segundo as suposições de normalidade, variância constante e independência. Foi considerado significativo um  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

No presente estudo foram analisadas 92 amostras, sendo 52 pacientes com câncer de pulmão (CA) e 40 indivíduos controles (CO). Na Tabela I estão descritas as características epidemiológicas dos pacientes estudados. Os pacientes do grupo CA eram na maioria (76,9%) ex-fumantes, consumiram tabaco por mais de 30 anos (57,1%) e sem comorbidades associadas (65,4%). A maioria dos pacientes do grupo CA (62,75%) fez uso de duas ou mais drogas na sessão de tratamento, não ultrapassando duas classes de quimioterápicos.

Quanto ao citoma bucal, observou-se redução no percentual de células basais ( $p < 0,001$ ) e aumento de micronúcleo diferenciado [MN ( $p < 0,001$ )], de broto nuclear ( $p < 0,001$ ), células binucleadas ( $p < 0,001$ ), cromatina condensada ( $p = 0,023$ ), células cariorréticas ( $p = 0,040$ ), nos indivíduos do grupo CA, quando comparados aos CO.

**Tabela I.** Características clínicas e farmacológicas dos grupos CA e CO.

Variáveis	CA (n=52)	CO (n=40)	P
Idade (anos)*	66,7±7,0	61,3±10,5	0,003
Cigarros fumados (ano)	9223,8±611,1	-	-
Sexo*, n (%)			
Masculino	37 (72,5)	14 (27,5)	0,001
Feminino	15 (36,6)	26 (63,4)	0,086
Histórico tabágico, n (%)*			
Fumante	9 (17,3)	-	-
Ex-fumante	40 (76,9)	-	-
Nunca fumante	3 (5,8)	40 (100,0)	<0,001
Comorbidades, n(%)			
Sim	18 (34,6)	22 (55,0)	1,000
Não	34 (65,4)	18 (45,0)	0,084
Citoma Bucal (% células)			
Basal	0,87 (0,05-2,25)	1,57 (0,50-2,70)	<0,001
MN (basal)	0 (0-0,05)	0 (0-0,10)	0,909
MN (diferenciada)	0,20 (0-0,65)	0 (0-0,20)	<0,001
Broto Nuclear	0,15 (0-0,35)	0 (0-0,10)	<0,001
Binucleadas	0,20 (0-0,35)	0 (0-0,30)	<0,001
Cromatina Condensada	0,95 (0,05-1,95)	0,80 (0,50-1,45)	0,023
Cariorréticas	1,15 (0,05-1,95)	0,97 (0,50-2,05)	0,040
Picnóticas	1,30 (0,05-3,15)	1,05 (0,30-2,15)	0,087
Cariolíticas	1,22 (0,40-1,95)	1,05 (0,50-1,85)	0,101

CO: grupo controle; CA: grupo com câncer de pulmão; \*: teste de qui-quadrado; •: Teste *t student*.<sup>#1</sup> Classe: Única classe de quimioterápico utilizado no tratamento; <sup>#2</sup> Classes: Duas classes de quimioterápico utilizado no tratamento; MN: micronúcleo.

A frequência de MN e anormalidades celulares estratificados por polimorfismos genéticos encontram-se descritos nas Tabelas II, III e IV. Os pacientes do grupo CA portadores do alelo de risco G (GG+GC), no rs1800795 do gene IL6, apresentaram redução no percentual de células basais. Aumento do na frequência de MN, broto nuclear, células binucleadas e cariorréticas.

**Tabela II.** Frequência de micronúcleos e anormalidades celulares em portadores de câncer de pulmão e controles estratificados por polimorfismos genéticos IL6 (rs1800795)

Variáveis	CO (n=40)			CA (n=50)			<i>p</i> entre os grupos CC	<i>p</i> entre os grupos GG+GC
	IL6 (SNP rs1800795)			IL6 (SNP rs1800795)				
	CC (n=8)	GG+GC (n=32)	<i>P</i>	CC (n=7)	GG+GC (n=43)	<i>p</i>		
Basal	1,45 (0,80-2,00)	1,60 (0,50-2,70)	0,396	0,95 (0,10-1,95)	0,85 (0,05-2,25)	0,891	0,121	<0,001
MN (basal)	0 (0-0,5)	0 (0-0,10)	1,00	0 (0-0,5)	0 (0-0,5)	0,426	0,613	0,631
MN (diferenciada)	0 (0-0,20)	0 (0-0,10)	0,496	0,30 (0,15-0,60)	0,20 (0-0,65)	0,106	0,001	<0,001
Broto Nuclear	0 (0-0,5)	0 (0-0,10)	1,00	0,15 (0,5-0,30)	0,15 (0-0,35)	0,565	<0,001	<0,001
Binucleadas	0,07 (0-0,30)	0 (0-0,20)	0,153	0,25 (0,05-0,35)	0,20 (0-0,35)	0,459	0,072	<0,001
Cromatina Condensada	0,62 (0,50-1,0)	0,82 (0,50-1,45)	0,109	1,05 (0,40-1,65)	0,95 (0,05-1,95)	0,364	0,054	0,183
Cariorrética	1,05 (0,50-2,05)	0,92 (0,55-2,00)	0,396	0,90 (0,35-1,35)	1,20 (0,05-1,95)	0,045	0,281	0,008
Picnóticas	0,92 (0,50-1,55)	1,05 (0,50-1,85)	0,235	1,30 (0,05-1,55)	1,30 (0,05-3,15)	0,584	0,779	0,136
Cariolitica	1,20 (0,50-1,85)	1,02 (0,50-1,85)	0,174	1,40 (0,45-1,90)	1,20 (0,40-1,95)	0,784	1,00	0,053

CO: grupo controle; CA: grupo com câncer de pulmão; IL6: Interleucina 6; SNP: Prevalência dos polimorfismos; CC: Genótipo selvagem; GG+GC: variante genótipo para presença de alelo de risco;; Realizado teste de *Mann-Whitney U*.

Quanto ao rs 1800629 no gene TNF- $\alpha$ , foi observado que no grupo CA os pacientes com o alelo de risco A (AA+AG) apresentaram redução no percentual de células basais, aumento no percentual de MN diferenciados, aumento de broto nuclear e células binucleadas, além de maior número de células cariorréticas (Tabela III).

**Tabela III.** Frequência de micronúcleos e anormalidades celulares em portadores de câncer de pulmão e controles estratificados por polimorfismos genéticos TNF $\alpha$  (rs1800629)

Variáveis	CO (n=40)			CA (n=50)			<i>p</i> entre os grupos GG	<i>p</i> entre os grupos AA+AG
	TNF $\alpha$ (SNP rs1800629)		<i>P</i>	TNF $\alpha$ (SNP rs1800629)		<i>p</i>		
	GG (n=31)	AA+AG (n=9)			GG (n=27)		AA+AG (n=23)	
Basal	1,60 (0,50-2,70)	1,35 (0,85-1,85)	0,106	1,10 (0,10-2,25)	0,80 (0,05-1,45)	0,038	<0,001	0,001
MN (basal)	0 (0-0,10)	0 (0-0,05)	0,924	1,10 (0,10-2,25)	0,80 (0,05-1,45)	0,017	0,392	0,651
MN (diferenciada)	0 (0-0,10)	0 (0-0,20)	0,566	0,20 (0,-0,65)	0,20 (0-0,60)	0,969	<0,001	<0,001
Broto Nuclear	0 (0-0,10)	0 (0-0,05)	0,610	0,10 (0-0,35)	0,15 (0-0,30)	0,721	<0,001	<0,001
Binucleadas	0 (0-0,30)	0 (0-0,25)	0,750	1,50 (0-0,35)	0,20 (0,10-0,35)	0,035	<0,001	<0,001
Cromatina Condensada	0,80 (0,50-1,45)	0,80 (0,50-1,10)	0,588	1,05 (0,05-1,90)	0,95 (0,40-1,95)	0,552	0,057	0,157
Cariorrética	1,00 (0,50-2,05)	0,95 (0,55-1,40)	0,824	1,05 (0,05-1,90)	1,25 (0,35-1,95)	0,012	0,574	0,022
Picnóticas	1,05 (0,30-2,15)	1,30 (0,50-1,50)	0,849	1,30 (0,05-2,85)	1,35 (0,35-3,15)	0,254	0,502	0,341
Cariolitica	1,05 (0,50-1,85)	1,10 (0,95-1,85)	0,306	1,20 (0,55-1,95)	1,30 (0,40-1,85)	0,340	0,047	0,869

CO: grupo controle; CA: grupo com câncer de pulmão; TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral; SNP: Prevalência dos polimorfismos; GG: Genótipo selvagem; AA+AG: variante genótipo para presença de alelo de risco; Realizado teste de *Mann-Whitney U*.



Pacientes do grupo CA, com o alelo de risco T (TT+TC) no rs 2228570 do gene VDR apresentaram, como nos demais SNPs, maior redução no percentual de células basais, aumento de MN diferenciado, broto nuclear e em células binucleadas, quando comparados aos controles (Tabela IV).

**Tabela IV.** Frequência de micronúcleos e anormalidades celulares em portadores de câncer de pulmão e controles estratificados por polimorfismos genéticos VDR (rs2228570)

Variáveis	CO (n=40)			CA (n=50)			<i>p</i> entre os grupos CC	<i>p</i> entre os grupos TT+TC
	VDR (SNP rs2228570)			VDR (SNP rs2228570)				
	CC (n=15)	TT+TC (n=25)	<i>P</i>	CC (n=26)	TT+TC (n=24)	<i>P</i>		
Basal	1,60 (0,80-2,30)	1,50 (0,50-2,70)	0,967	1,15 (0,10-2,25)	0,75 (0,05-1,75)	0,044	0,007	<0,001
MN (basal)	0 (0-0,10)	0 (0-0,05)	0,253	0 (0-0,05)	0 (0-0,05)	0,105	0,875	0,580
MN (diferenciada)	0 (0-0,20)	0 (0-0,10)	0,451	0,20 (0,-0,65)	0,20 (0-0,60)	0,469	<0,001	<0,001
Broto Nuclear	0 (0-0,05)	0 (0-0,10)	0,942	0,15 (0,05-0,35)	0,15 (0-0,30)	0,714	<0,001	<0,001
Binucleadas	0 (0-0,30)	0 (0-0,15)	0,519	1,50 (0,05-0,35)	0,20 (0-0,35)	0,184	0,001	<0,001
Cromatina Condensada	0,80 (0,50-1,10)	0,80 (0,50-1,45)	0,327	1,00 (0,05-1,90)	0,95 (0,40-1,95)	0,697	0,019	0,357
Cariorrética	0,95 (0,55-2,05)	1,05 (0,50-2,00)	0,634	1,05 (0,55-1,90)	1,25 (0,05-1,95)	0,043	0,206	0,053
Picnóticas	1,05 (0,50-1,55)	1,05 (0,30-2,15)	0,900	1,30 (0,05-2,85)	1,30 (0,05-3,15)	0,800	0,356	0,123
Cariolítica	1,10 (0,50-1,85)	1,00 (0,50-1,85)	0,595	1,35 (0,55-1,95)	1,17 (0,40-1,85)	0,203	0,296	0,431

CO: grupo controle; CA: grupo com câncer de pulmão; VDR: Receptor celular de vitamina D; SNP: Prevalência dos polimorfismos; CC: Genótipo selvagem; TT+TC: variante genótipo para presença de alelo de risco; Realizado teste de *Mann-Whitney U*.

## DISCUSSÃO

Este trabalho, que teve por objetivo identificar a frequência de micronúcleos e anormalidades celulares em portadores de câncer de pulmão e a associação com polimorfismos genéticos nos genes IL6, TNF- $\alpha$  e VDR, possibilitou a análise de 52 pacientes com câncer de pulmão que compuseram o grupo CA, comparados a 40 indivíduos CO.

Os pacientes do grupo CA apresentaram média de idade de 66,7 anos, sendo a maioria do sexo masculino e fumantes por mais de 30 anos. Conforme o INCA (2016) e a OMS (2015), o câncer de pulmão tem apresentado evolução no número de casos, à nível nacional e mundial, principalmente em homens, fumantes ou ex-fumantes, acima de 50 anos.

Os CA apresentaram, ao exame de citoma bucal, redução estatisticamente significativa no número de células basais, aumento de micronúcleos diferenciados sendo eles: aumento de células binucleadas e de broto nuclear (cromossomos que sofreram mutação no processo de mitose), além do aumento da cromatina condensada (provoca morte celular e está relacionada a agressão sofrida pela célula, tal como o fumo ou doenças crônicas, entre outros), células carioréticas (resulta na apoptose), cariolíticas (provoca morte celular por necrose) e picnóticas (culminam em morte celular e escamação), resultados de alto dano, ao comparar-se com os CO. O teste de citoma bucal permite avaliar o dano no DNA, a instabilidade cromossômica, morte celular, além da capacidade de regeneração por meio de células da mucosa oral, características essas identificadas nos pacientes com câncer de pulmão do presente estudo. A identificação precoce de danos em células basais indica possível processo de apoptose celular (THOMAS et al., 2009).

Os pacientes CA apresentaram menor número de células basais e aumento no número de alterações celulares, em comparação ao CO, apontando dano e instabilidade genômica em pacientes com câncer de pulmão e em quimioterapia, podendo este, estar relacionado tanto à doença, como ao tratamento (SZIKRISZ et al., 2016; KENMOTSU, et al., 2015, MUENYI, LJUNGMAN, STATES, 2015).

Resultados de testes de micronúcleos dependem de vários fatores como: nível de exposição celular, potencial citotóxico e genotóxico, antecedentes genéticos, além de idade e sexo dos pacientes testados. Observou-se no estudo, portanto, que os pacientes do grupo CA, portadores de câncer de pulmão e expostos à quimioterapia, apresentaram maior número de alterações e presença de micronúcleos, quando comparados aos CO. A realização de estudos a partir de testes de micronúcleos é fundamental para se avaliar não somente o nível da lesão celular, mas também a capacidade de reparação das mesmas (THOMAS et al., 2011).

Vários SNPs no gene IL-6 foram descritos, o mais estudado é o -174G/C (rs1800795), segundo He et al. (2009). Ele afirma que os indivíduos com o alelo G nesta posição exibem um

aumento da resposta inflamatória, como observado de forma mais prevalente entre os pacientes CA, sendo que genótipos CG e GG também estão relacionados com o aumento da inflamação no câncer de pulmão (AMIRZARGAR et al., 2006; HE et al., 2009; SEOW et al., 2006).

Para os sujeitos CA os resultados puderam ser comparados aos estudos de Seifart et al. (2005) e Colakogullari et al. (2008), que observaram maior prevalência do genótipo heterozigoto nos casos em uma população alemã e turca, respectivamente. Sabe-se que o polimorfismo estudado no gene que codifica a IL6 está estritamente relacionado com a predisposição à doença, além disso, o alelo dito de risco é responsável por aumentar a produção de citocinas responsáveis pelos processos inflamatórios que provocam anormalidades celulares, fator de relevância na promoção da carcinogênese (ZHOU et al., 2015; JIA et al., 2015).

Os resultados observados para os polimorfismos nos genes IL6, TNF-  $\alpha$  E VDR apresentaram, pois, maior frequência para os pacientes que compunham o grupo CA. Marcadores citogenéticos são utilizados como indicadores de mutações genéticas ou exposição à agentes causadores do câncer. Porém, a instabilidade cromossômica identificada nesse estudo e mais exacerbada nos pacientes portadores de câncer de pulmão, também pode estar associada, de acordo com Murray; Rosenthal e Phaller (2006), ao desenvolvimento da doença.

A associação entre polimorfismos (SNPs) e a capacidade de prevenir e identificar a predisposição à doença, foi descrita por Lee et al. (2015), no qual se refere ao SNP IL6 (rs 1800795), e observou que na presença do alelo de risco (G) ocorreu maior defeito na citocinese ou divisão celular, além do maior número de aberrações cromossômicas, conforme observado nos pacientes do grupo CA, confirmando a hipótese de este (IL6) ser importante marcador genético pró-inflamatório e possível preditivo para câncer de pulmão CA (GONG et al., 2014).

Em se comparando pacientes do grupo CA e indivíduos CO, com relação aos marcadores TNF $\alpha$  (rs 1800629) e VDR (rs 2228570) observou-se que, assim como para IL6 (1800795), na presença do alelo de risco, identificou-se menor número de células basais presentes e aumento de células anormais que sofreram alterações no processo mitótico, fator que se pode atribuir ao processo inflamatório. Logo, inflamação e anormalidades celulares podem estar diretamente relacionadas, e este processo pode desencadear o câncer de pulmão (ZHENG et al., 2015).

Desta forma, IL6 induz a produção de proteínas de fase aguda da resposta inflamatória, tais como a proteína C-reativa (PCR) (FERRARI et al., 2013; MARTINEZ et al., 2013). Já TNF- $\alpha$  pode ser considerado de validade clínica diagnóstica para câncer de pulmão, através de valores aumentados para pacientes com a doença, (RAGAB et al., 2009). Também a falta de vitamina D, comprovadamente causa uma resposta imune ineficiente. Dessa forma, como a ação imunológica

da vitamina D depende do VDR, tem-se associado à eficiência da resposta imunológica para o câncer, á esses polimorfismos de VDR (WILKER et al., 2009).

Estudos com amostras maiores e em diferentes populações podem, pois, auxiliar na comprovação dos resultados encontrados, para que estes marcadores sejam efetivamente utilizados como preditivos para o desenvolvimento do câncer de pulmão, possibilitando diagnóstico precoce e possíveis linhas de tratamento eficazes. O que pudemos observar, é que pacientes com alelo de risco (SNPs) sofrem inflamação diferenciada, podendo ser esta a causa do maior estresse oxidativo e maiores alterações cromossômicas, o que pode ser possível causa do desenvolvimento do câncer de pulmão.

## CONCLUSÃO

Com base nas observações, supõe-se que a presença da doença, com maior incidência entre pacientes do sexo masculino, ex-tabagistas, com histórico tabágico superior a 30 anos, com marcadores genéticos em IL6, TNF- $\alpha$  e VDR, é maior, indicando a efetividade do teste de micronúcleos e SNPs. Estudos por períodos mais prolongados e com amostra maior são necessários para que se possa comprovar de forma definitiva a relação entre estes marcadores e a predisposição genética ao desenvolvimento do câncer de pulmão.

## REFERÊNCIAS

1. AMIRZARGAR, A. A. et al. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *European Cytokine Network*, n. 2, v. 17, p. 84-9, 2006.
2. BHAGIRATH, D. et al. Cell type for origin as well as genetic alterations contribute to breast cancer phenotypes. *Oncotarget Journal*, v. 6, n. 11, p. 9018-9030, 2014.
3. CHENG, T. J. et al. Increased Micronucleus Frequency Lymphocytes from Smokers With Lung Cancer. *Mutation Research*, v. 1, n. 349 p. 43-50, 1996.
4. COLAKOGULLARI, M. et al. The involvement of IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  gene polymorphisms among Turkish lung cancer patients. *Cell Biochemistry and Function*, v. 26, p. 283–290, 2008.
5. CRESS, D. W. et al. Lung Cancer Mutations and use of Targeted Agents in Hispanics. *Oncotarget Journal*, v. 9, n. 10, p. 225-232, 2014.
6. DUTTA, R. K. et al. IL-6 inhibits IFN- $\gamma$  induced autophagy in Mycobacterium tuberculosis H37Rv infected macrophages. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; v. 44, p.942– 954, jun.2012.
7. FERRARI, R. et al. Three-year follow-up of Interleukin 6 and C-reactive protein in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*; n. 24, v. 14, p.1-7, 2013.
8. GONG, Juan, et al. The association between AXIN2 rs2240308 polymorphism and cancer risk. *Nature Cientific Reports*. v. 5, n. 1, p. 1-9, 2015.
9. HE, J. Q. et al. Associations of IL6 polymorphisms with lung function decline and COPD. *Thorax an International Journal of Respiratory Medicine*, v. 64, p. 698–704, 2009
10. HEIST, R. S. et al. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *Journal of Thoracic Oncology*, v. 7, n. 9, p. 924-933, 2012.

11. INCA, 2016: banco de dados do INCA, 2015. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acessado em agosto de 2016.
12. JIA, W. et al. A study on the effect of IL-6 gene polymorphism on the prognosis of nonsmall-cell lung cancer. *Journal of OncoTargets and Therapy*, n.8, v. 23, p.2699–2704, 2015.
13. KENMOTSU, H. Prospective genetic profiling of squamous cell lung cancer and adenosquamous carcinoma in Japanese patients by multitarget assays. *BMC Cancer*. v. 14, n.786, p. 1-12, 2015.
14. LEE, S. V. Functional intronic *ERCC1* polymorphism from regulomeDB can predict survival in lung cancer after surgery. *Oncotarget*. v. 10, n. 1, p. 1-17., 2015.
15. MARTINEZ, A. N.; MEHRA, S.; KAUSHAL D. Role of Interleukin 6 in Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis Infection. *The Journal of Infectious Diseases*; n. 8, v. 207, p.1253–61, abr.2013.
16. MCHUGH, M. K., et al. Use of the Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay (CBMN) to Detect Gender Differences and Genetic Instability in a Lung Cancer Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Previw*: v. 22, n. 1, p. 135-145, 2013.
17. MUENYI, S. C.; LJUNGMAN, M.; STATES, J. C. Arsenic disruption of DNA damage responses – potential role in carcinogenesis and chemotherapy. *Biomolecules*, v. 5, n. 1, p. 2184-2193, 2015.
18. MULLER, S. A.; DYKES, D. D.; PLOLENSKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, v.16, n.3, p.1215-1221, 1988.
19. MURRAY, R. P.; ROSENTHAL, K. S.; PHALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
20. OMS 2016: Banco de dados da OMS 2015. Disponível em [www.oms.org](http://www.oms.org). Acessado em 10.01.2017.
21. SEOW, A. et al. Joint effect of asthma/atopy and an IL-6 gene polymorphism on lung cancer risk among lifetime non-smoking Chinese women. *Carcinogenesis*, n. 6, v. 27, p.1240-1244, 2006.
22. RAGAB, S. M.; SAMAKA, R. M.; SHAMS, T. M. HER2/neu expression: a predictor for differentiation and survival in children with wilms thumor. *Pthology and Oncology Reserach*, v. 16, n. 1, p. 61-67, 2009.
23. SEIFART, C. et al. TNF-alpha, TNF-beta, IL-6, and IL-10 promoter polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Tissue Antigens*, n. 1, v. 65, p. 93– 100, 2005.
24. SEOW, A. et al. Joint effect of asthma/atopy and an IL-6 gene polymorphism on lung cancer risk among lifetime non-smoking Chinese women. *Carcinogenesis*, n. 6, v. 27, p.1240-1244, 2006.
25. SILVA, da Silva A.L., et al. Evaluation of DNA damage in COPD patients and its correlation with polymorphisms in repair genes. *BMC Med Genet*. v. 1, n. 14, p.93-105, 2013.
26. SILVA, A. L. J., et al. Effect of physical exercise on the level of DNA damage in chronic
27. Obstructive pulmonary disease patients. *ISRN Pulmonology*. 2013; 2013:907520.
28. SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J. A. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.
29. SZIKRISZT, B. et al. A compreehensive survey of the mutagenic impacto off common cancer cytotoxics. *Genome Biology*, v.17, n. 99, p 1-19, 2016.
30. THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome assey. *Nature Procols*. v. 4, n. 6, p. 825-837, 2009.
31. THOMAS, Philip; Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lynfocytes and buccal cells. *Mutagenesis*, v. 26, p. 69-76, 2011.
32. ZHANG, G. et al. A Functional Single-Nucleotide Polymorphism in the Promoter of the Gene Encoding Interleukin 6 Is Associated With Susceptibility to Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, n. 11, v. 205, p.1697–1704, 2012.
33. ZHENG, X. et al. Distinct genetic alterations in small cell carcinoma from different anatomic sites. *Experimental hematology e oncology*. v. 4, n. 2, p 1-9, 2015.

34. ZHOU, W. et al. Meta-analysis of the associations between TNF- $\alpha$  or IL-6 gene polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *European Journal of Medical Research*, n.1, v. 20, p.28, 2015.
35. XU, B. et al. IL-6 174G>C polymorphism and cancer risk: a meta-analysis involving 29,377 cases and 37,739 controls. *Molecular Biology Reporters*, v. 38, p. 2589–2596, 2011.

**CAPITULO IV**  
**NOTA A IMPRENSA**

## **NOTA À IMPRENSA**

O câncer de pulmão é uma doença que acomete indivíduos no mundo todo, de forma grave. O tabagismo é considerado o maior causador do desenvolvimento da doença, além de fatores genéticos. Esta pesquisa foi resultado da Dissertação de Mestrado da aluna Márcia Raquel Schneider e envolveu 52 pacientes com câncer de pulmão e 50 indivíduos que compuseram o grupo controle, sendo eles homens e mulheres com média de idade de 64,7 anos. Este estudo teve como objetivo investigar a suscetibilidade genética, dano e reparação do DNA e sua relação com o perfil fisiopatológico de pacientes com câncer de pulmão, através do ensaio cometa, micronúcleo e polimorfismos de nucleotídeo único.

A partir dos resultados concluiu-se que os testes realizados podem ser considerados válidos como possíveis indicadores para o desenvolvimento do câncer de pulmão, contudo pesquisas com maior número de indivíduos precisam ser realizadas para que se possa confirmar esses achados.



## REFERÊNCIAS

1. AGNOLETO, A. et al. Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. *Clinical Biochemistry Journal*, v. 40, n. 16, p. 1252-1258, 2007.
2. ALGRANTI, E.; BUSCHINELLI J. T. P.; CAPITANI E. M.; Câncer de pulmão ocupacional. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 36, n. 6, p. 784-794, 2010.
3. ANTONINI, M. A. et al. Evaluation of the Pulmonary Toxicity of a Fume Generated from a Nickel-, Copper-Based Electrode to be Used as a Substitute in Stainless Steel Welding, *Revista. Environmental Health Insights*, v. 8, n. 1, p. 11-22, 2014.
4. ALGRANTI, E.; BUSCHINELLI J. T. P.; CAPITANI E. M.; Câncer de pulmão ocupacional. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 36, n. 6, p. 784-794, 2010.
5. BHAGIRATH, D. et al. Cell type for origin as well as genetic alterations contribute to breast cancer phenotypes. *Oncotarget Journal*, v. 6, n. 11, p. 9018-9030, 2014. Brasil, 2015. Disponível em <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/carta\\_ottawa.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/carta_ottawa.pdf)> Acesso em: 20 abril 2015.
6. CESTARI, M. E. W.; ZAGO, M. M. F.; A prevenção do câncer e a promoção da saúde: um desafio para o século XXI. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 58, n. 2, p. 218- 221, 2005.
7. CHEN, D. et al. Gene expression profile of human lung epithelial cells chronically exposed to single-walled carbon nanotubes. *Nanoscale Research Letters*, v. 10, n. 15, p. 1-15, 2015
8. CHENG, T. J. et al. Increased Micronucleus Frequency Lymphocytes from Smokers With Lung Cancer. *Mutation Research*, v. 1, n. 349 p. 43-50, 1996.
9. CHOI, Y. J. et al. Enhanced nucleotide excision repair capacity in lung cancer cells by preconditioning with DNA- damaging agents. *Oncotarget*, v. 6, n. 26, p. 22575-22587, 2015.
10. CRESS, D. W. et al. Lung Cancer Mutations and use of Targeted Agents in Hispanics. *Oncotarget Journal*, v. 9, n. 10, p. 225-232, 2014.
11. COLLINS, A. R., et al. The comet assay: topic issues. *Mutagenesis*, v. 23, n. 3, p. 143-150, 2008.
12. DALAVERIS, E. et al. VEGF, TNF- $\alpha$  and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung Cancer Journal*, v. 64, n. 2, p. 219-225, 2008.
13. DALRYMPLE, A. et al. An improved method for the isolation of rat alveolar type II lung cells: Use in the Comet assay to determine DNA damage induced by cigarette smoke. *Regulatory Toxicology and Pharmacology Journal*, v. 8, n. 72, p. 140-149, 2015.
14. DING, N.; ZHOU, N.; REN, M. N. Respiratory cancers and pollution. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 19, p. 31-37, 2015.
15. DUSINSKA, M; COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene environment interactions. *Mutagenesis*. v. 23, n. 3, p. 191-205, 2008.
16. EOM, S. et al. Paraoxonase 1 Genetic Polymorphisms and Smoking and Their Effects on Oxidative Stress and Lung Cancer Risk in a Korean Population. *Plos One Journal*, v. 10, n. 3, p. 1-15, 2015
17. GASPAR, P. et al. CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic diseases and non-small-cell lung cancer? *Genetic and Molecular Biology*, v. 27, n. 2, p. 133-138, 2004.
18. GAYA, A. et al. *Ciências do movimento humano: introdução à metodologia da pesquisa*. Porto Alegre: Artmed, 2008.
19. GESSNER, C. et al. Angiogenic markers in breath condensate identify non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Journal*, v. 68, n. 2, p. 177-184, 2010.
20. GONG, J. et al. Not of the association between AXIN2 rs2240308 polymorphism and cancer risk. *Journal Nature Scientific Reports*, v. 5, n. 10111, p. 1-9, 2014.
21. HASHIM, D.; BOFFETTA, P. Occupational and Environmental Exposures and Cancers in Developing Countries. Icahn School of Medicine at Mount Sinai. *State of the Art Review*. v. 80, p. 393-411, 2014.

22. HEIST, R. S. et al. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *Journal of Thoracic Oncology*, v. 7, n. 9, p. 924-933, 2012.
23. HULLEY, Stephen S.B. et al. *Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica*. Porto Alegre: Artmed, 2008.
24. HUNG, M. et al. Comparison of expected health impacts for major cancers: Integration of incidence rate and loss of quality-adjusted life expectancy. *Cancer Epidemiology Journal*, v. 39, p. 126-132, 2015.
25. INCA, 2015: banco de dados do INCA, 2015. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 15 abril 2015.
26. JARVHOLM, B.; ASTR E. The Risk of Lung Cancer After Cessation of Asbestos Exposure in Construction Workers Using Pleural Malignant Mesothelioma as a Marker of Exposure. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, v. 56, n. 12, p. 1297-1302, 2014.
27. JIANG, T. et al. Inflammation and cancer: inhibiting tumor progression and residual hepatic vx2 carcinoma by anti-inflammatory drug after incomplete radiofrequency ablation. *Journal Clinical Exp. Pathology*. v. 8, n. 11, p. 13945-13956, 2015.
28. KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; ASTER, J.C. *Robbins: Patologia estrutural e funcional*. 9. ed., São Paulo: Elsevier, 2015.
29. KOSHIOL, J.; LIN, S.W. Can tissue-based immune markers be used for studying the natural history of cancer? *Annals Epidemiology Journal*, v. 22, n. 7, p. 520-530, 2015.
30. L-ZEIN, R. A. et al. Cytokinesis-Blocked Micronucleus Cytome Assay Biomarkers Identify Lung Cancer Cases Amongst Smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Preview*, v. 17, n. 5, p. 1111-1119, 2008.
31. MALTA, D. C. et al. Tendência de mortalidade de câncer de pulmão, traquéia e brônquios no Brasil, 1980-2003. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.33, n.5, pag. 536-543, 2007.
32. MCHUGH, M. K., et al. Use of the Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay (CBMN) to Detect Gender Differences and Genetic Instability in a Lung Cancer Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Preview*: v. 22, n. 1, p. 135-145, 2013.
33. MULLER, S. A.; DYKES, D. D.; PLOLENSKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, v.16, n.3, p.1215-1221, 1988.
34. MUENYI, S. C.; LJUNGMAN, M.; STATES, J. C. Arsenic disruption of DNA damage responses – potential role in carcinogenesis and chemotherapy. *Biomolecules*, v. 5, n. 1, p. 2184-2193, 2015.
35. MULLER, F. L. et al. Trends in oxidative aging theories. *Free Radicical Biology Medical*, v. 43, n. 8, p. 477–503, 2007.
36. MURRAY, R. P.; ROSENTHAL, K. S.; PHALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
37. NADIN, S. B.; VARGAS, L. M.; CIOCCA, D. A silver staining Method for single cell gel assay. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 49, n. 9, p. 118-1186, 2001.
38. Organização Mundial da Saúde, 2015: banco de dados da OMS, 2015. Disponível em: <<http://www.paho.org/bra/>>. Acesso em: 16 abril 2015.
39. PASETTO, R. et al., *Occupational Burden of Asbestos-related Cancer in Argentina, Brazil, Colombia, and Mexico*. *Annals of Global Health* v. 80, p. 263-268, 2014.
40. PILIPPI Jr., A; FERNANDES, V. *Práticas da interdisciplinaridade no ensino de pesquisa*. Barueri, SP: Manole, 2015.
41. RAGAB, S. M.; SAMAKA, R. M.; SHAMS, T. M. HER2/neu expression.: a predictor for differentiation and survival in children with wilms tumor. *Pathology and Oncology Research*, v. 16, n. 1, p. 61-67, 2009.
42. RENNARD, S. I.; TOGO, S.; HOLZ, O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair. A mechanism for the development of emphysema. *American Thoracic Society*, v. 3, n. 8, p. 703-708, 2006.

43. SCHREIBER, L. B., GOMES, R., COUTO, T. M. Homens e Saúde Coletiva. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 10, n. 1, p. 7-17, 2005.
44. SEKARANA, V.; RAJ, G.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *Journal of clinical and diagnostic research*, v. 9, n. 3, p. 1-5, 2015.
45. SILVA, A. L. J., et al. Effect of physical exercise on the level of DNA damage in chronic obstructive pulmonary disease patients. *ISRN Pulmonology*. 2013;2013:907520.
46. SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J. A. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.
47. SILVA, da Silva A.L., et al. Evaluation of DNA damage in COPD patients and its correlation with polymorphisms in repair genes. *BMC Med Genet*. v. 1, n. 14, p.93-105, 2013.
48. SHAO, W.; HE, J. Polymorphism and lung cancer susceptibility e meta-analysis. *Annals of Transnational Medicine*, v. 3, n. 7, p. 93-97, 2015.
49. SHI, Z.; YONG G. S.; LIU, L. G. Polymorphisms in ERCC1 and XPF gene and response to chemotherapy and overall survival of non-small cell lung cancer. *International Journal Clinical and Experimental Pathology*, v. 8, n. 3, p. 3132-3137, 2015.
50. SZIKRISZT, B. et al. A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics. *Genome Biology*, v. 17, n. 99, p. 1-19, 2016.
51. SUCUPIRA, A. C.; MENDES, R.; Promoção da Saúde: conceitos e definições. *Sanare*, v. 4, n. 1, p. 07-10, 2003.
52. THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. v. 4, n. 6, p. 825-837, 2009.
53. THOMAS, Philip; Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*, v. 26, p. 69-76, 2011.
54. TOMIOKA, K. et al. Risk for lung cancer in workers exposed to benzidine and/or betanaphthylamine: a protocol for systematic review and meta-analysis. *Biomed Central*, v. 3, n. 112, p. 1-6, 2014.
55. WALKER, M. A. et al. Evaluation of arsenic trioxide potential for lung cancer treatment. Assessment of apoptotic mechanisms and oxidative damage. *J. Cancer Sci. Ther.* v. 8, n. 1, p. 1-9, 2016.
56. WASSON, G. R. et al. The use of comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis*. v. 23, n. 8, p. 153-162, 2008.
57. XU, Y. et al. Genetic polymorphisms in oxidative stress-related genes are associated with clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving tyrosine kinase inhibitors. *Am Journal Cancer*, v. 4, n. 6, p. 934-942, 2014.
58. ZAMBONI, Mauro. Epidemiologia do câncer de pulmão. *Jornal de Pneumologia*, v. 28, n. 1, p. 41-47, 2002.
59. ZHENG, X. et al. Distinct genetic alterations in small cell carcinoma from different anatomic sites. *Experimental hematology e oncology*. v. 4, n. 2, p 1-9, 2015.

## **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.**

Nome do sujeito: \_\_\_\_\_

Origem do sujeito: \_\_\_\_\_

### **Pesquisa: SUSCETIBILIDADE GENÉTICA, DANO E REPARAÇÃO DO DNA E SUA RELAÇÃO COM O PERFIL FISIOPATOLÓGICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO**

**Coordenadoras da Pesquisa:** Prof.<sup>a</sup> 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 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 – Diretrizes da revista *Respiratory Research* – Qualis A1

### Presubmission enquiries

If you wish to make a presubmission enquiry about the suitability of your manuscript, please [email the editors](#) who will respond to your enquiry as soon as possible.

### Criteria

Research articles should report on original primary research.

*Respiratory Research* strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's [information on recommended repositories](#).

### Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

### Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:
  - "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
  - or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the "Acknowledgements" section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

### Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the [CONSORT](#) extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Methods:** how the study was performed and statistical tests used
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** brief summary and potential implications



- **Trial registration:** If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be in stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our [editorial policies](#) for more information on trial registration

## **Keywords**

Three to ten keywords representing the main content of the article.

## **Background**

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

## **Methods**

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

## **Results**

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

## **Discussion**

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

## **Conclusions**

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

## **List of abbreviations**

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

## **Declarations**

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and material
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

### **Ethics approval and consent to participate**

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state “Not applicable” in this section.

### **Consent for publication**

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state “Not applicable” in this section.

### **Availability of data and materials**

All manuscripts must include an ‘Availability of data and materials’ statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or

generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].<sup>[Reference number]</sup>

### **Competing interests**

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each author's competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

### **Funding**

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

### **Authors' contributions**

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

### **Acknowledgements**

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

### **Authors' information**

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

## Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

## References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. The reference numbers must be finalized and the reference list fully formatted before submission.

Examples of the BioMed Central reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely.

See our editorial policies for author guidance on good citation practice.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link (e.g. for blogs) they should be included in the reference.

### Example reference style:

*Article within a journal* Smith JJ. The world of science. Am J Sci. 1999;36:234-5.

*Article within a journal (no page numbers)* Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. BMC Med. 2013;11:63.

*Article within a journal by DOI* Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. Dig J Mol Med. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

*Article within a journal supplement* Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. Blood 1979;59 Suppl 1:26-32.

*Book chapter, or an article within a book* Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. International review of cytology. London: Academic; 1980. p. 251-306. OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem*. 2007. doi:10.1007/128\_2006\_108.

**Complete book, authored** Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

**Online document** Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

**Online database** Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

**Supplementary material/private homepage** Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

**University site** Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

**FTP site** Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

**Organization site** ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

**Dataset with persistent identifier** Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

### **Figures, tables additional files**

See [General formatting guidelines](#) for information on how to format figures, tables and additional files.

[Submit your manuscript in Editorial Manager](#)

## Preparing your manuscript

This section provides general style and formatting information only. Formatting guidelines for specific article types can be found below.

- [Research article](#)
- [Technical advance article](#)
- [Database article](#)
- [Software article](#)
- [Debate](#)
- [Case report](#)
- [Study protocol](#)

### General formatting guidelines

- [Preparing main manuscript text](#)
- [Preparing illustrations and figures](#)
- [Preparing tables](#)
- [Preparing additional files](#)

[Back to top](#)

### Preparing main manuscript text

Quick points:

- Use double line spacing
- Include line and page numbering
- Use SI units: Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF
- Do not use page breaks in your manuscript

#### **File formats**

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- TeX/LaTeX (use BioMed Central's TeX template)

**Please note:** editable files are required for processing in production. If your manuscript contains any non-editable files (such as PDFs) you will be required to re-submit an editable file if your manuscript is accepted.

Note that figures must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file. For more information, see [Preparing figures](#) below.

#### **Additional information for TeX/LaTeX users**

Please use [BioMed Central's TeX template](#) and BibTeX stylefile if you use TeX format. When submitting TeX submissions, please submit your TeX file as the main manuscript file and your bib/bbl file as a dependent file. Please also convert your TeX file into a PDF and submit this PDF as an additional file with the name 'Reference PDF'. This PDF will be used by our production team as a reference point to check the layout of the article as the author intended. Please also note that all figures must be coded at the end of the TeX file and not inline.

All relevant editable source files must be uploaded during the submission process. Failing to submit these source files will cause unnecessary delays in the production process.

<b>TeX templates</b>
<a href="#">BioMedCentral article</a> (ZIP format) - preferred template
<a href="#">Springer article</a> svjour3 (ZIP format)
<a href="#">birkjour</a> (Birkhäuser, ZIP format)
<a href="#">article</a> (part of the <a href="#">standard TeX distribution</a> )
<a href="#">amsart</a> (part of the <a href="#">standard TeX distribution</a> )

### **Style and language**

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Visiting the [English language tutorial](#) which covers the common mistakes when writing in English.
- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates [Nature Research Editing Service](#) and [American Journal Experts](#).

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in the journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

### **Data and materials**

For all journals, BioMed Central strongly encourages all datasets on which the conclusions of the manuscript rely to be either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main paper or additional supporting files, in machine-readable format (such as spread sheets rather than PDFs) whenever possible. Please see the list of [recommended repositories](#) in our editorial policies.

For some journals, deposition of the data on which the conclusions of the manuscript rely is an absolute requirement. Please check the Instructions for Authors for the relevant journal and article type for journal specific policies.

For all manuscripts, information about data availability should be detailed in an 'Availability of data and materials' section. For more information on the content of this section, please see the Declarations section of the relevant journal's Instruction for Authors. For more information on BioMed Centrals policies on data availability, please see our [editorial policies].

### **Formatting the 'Availability of data and materials' section of your manuscript**

The following format for the 'Availability of data and materials' section of your manuscript should be used:



"The dataset(s) supporting the conclusions of this article is(are) available in the [repository name] repository, [unique persistent identifier and hyperlink to dataset(s) in http:// format]."

The following format is required when data are included as additional files:

"The dataset(s) supporting the conclusions of this article is(are) included within the article (and its additional file(s))."

BioMed Central endorses the Force 11 Data Citation Principles and requires that all publicly available datasets be fully referenced in the reference list with an accession number or unique identifier such as a DOI.

For databases, this section should state the web/ftp address at which the database is available and any restrictions to its use by non-academics.

For software, this section should include:

- Project name: e.g. My bioinformatics project
- Project home page: e.g. <http://sourceforge.net/projects/mged>
- Archived version: DOI or unique identifier of archived software or code in repository (e.g. enodo)
- Operating system(s): e.g. Platform independent
- Programming language: e.g. Java
- Other requirements: e.g. Java 1.3.1 or higher, Tomcat 4.0 or higher
- License: e.g. GNU GPL, FreeBSD etc.
- Any restrictions to use by non-academics: e.g. licence needed

Information on available repositories for other types of scientific data, including clinical data, can be found in our [editorial policies](#).

## **References**

See our [editorial policies](#) for author guidance on good citation practice.

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. The reference numbers must be finalized and the reference list fully formatted before submission. For further information including example references please read our reference preparation guidelines.

### **What should be cited?**

Only articles, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited.

Unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE.

Any in press articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

### **How to format your references**

Examples of the BioMed Central reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style, they may need to be retyped and carefully proofread.

**Web links and URLs:** All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Authors may wish to make use of reference management software to ensure that reference lists are correctly formatted.

**Example reference style:**

*Article within a journal*

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234-5.

*Article within a journal (no page numbers)*

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Med.* 2013;11:63.

*Article within a journal by DOI*

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s801090000086.

*Article within a journal supplement*

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

*Book chapter, or an article within a book*

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology*. London: Academic; 1980. p. 251-306.

*OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)*

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem.* 2007. doi:10.1007/128\_2006\_108.

*Complete book, authored*

Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

*Online document*

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title\\_of\\_subordinate\\_document](http://www.rsc.org/dose/title_of_subordinate_document). Accessed 15 Jan 1999.

*Online database*

Healthwise Knowledgebase. *US Pharmacopeia*, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

*Supplementary material/private homepage*

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

*University site*

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

*FTP site*

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

*Organization site*

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

*Dataset with persistent identifier*

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

**[Back to top](#)**

## Preparing figures

When preparing figures, please follow the formatting instructions below.

- Figures should be provided as separate files, not embedded in the main manuscript file.
- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file that fits on a single page in portrait format.
- Tables should NOT be submitted as figures but should be included in the main manuscript file.
- Multi-panel figures (those with parts a, b, c, d etc.) should be submitted as a single composite file that contains all parts of the figure.
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figures should be uploaded in the correct orientation.
- Figure titles (max 15 words) and legends (max 300 words) should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- Figure keys should be incorporated into the graphic, not into the legend of the figure.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats, see our detailed instructions.
- Individual figure files should not exceed 10 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.
- **Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere.** In order for all figures to be open access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non open access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

## **Figure file types**

We accept the following file formats for figures:

- EPS (suitable for diagrams and/or images)
- PDF (suitable for diagrams and/or images)
- Microsoft Word (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- PowerPoint (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- TIFF (suitable for images)
- JPEG (suitable for photographic images, less suitable for graphical images)
- PNG (suitable for images)
- BMP (suitable for images)
- CDX (ChemDraw - suitable for molecular structures)

For information and suggestions of suitable file formats for specific figure types, please see our [author academy](#).

## **Figure size and resolution**

Figures are resized during publication of the final full text and PDF versions to conform to the BioMed Central standard dimensions, which are detailed below.

Figures on the web:

- width of 600 pixels (standard), 1200 pixels (high resolution).

Figures in the final PDF version:

- width of 85 mm for half page width figure
- width of 170 mm for full page width figure
- maximum height of 225 mm for figure and legend
- image resolution of approximately 300 dpi (dots per inch) at the final size

Figures should be designed such that all information, including text, is legible at these dimensions. All lines should be wider than 0.25 pt when constrained to standard figure widths. All fonts must be embedded.

## **Figure file compression**

- Vector figures should if possible be submitted as PDF files, which are usually more compact than EPS files.
- TIFF files should be saved with LZW compression, which is lossless (decreases file size without decreasing quality) in order to minimize upload time.
- JPEG files should be saved at maximum quality.
- Conversion of images between file types (especially lossy formats such as JPEG) should be kept to a minimum to avoid degradation of quality.

If you have any questions or are experiencing a problem with figures, please contact the customer service team at [info@biomedcentral.com](mailto:info@biomedcentral.com).

## **[Back to top](#)**

## **Preparing tables**

When preparing tables, please follow the formatting instructions below.

- Tables should be numbered and cited in the text in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, Table 2 etc.).
- Tables less than one A4 or Letter page in length can be placed in the appropriate location within the manuscript.

- Tables larger than one A4 or Letter page in length can be placed at the end of the document text file. Please cite and indicate where the table should appear at the relevant location in the text file so that the table can be added in the correct place during production.
- Larger datasets, or tables too wide for A4 or Letter landscape page can be uploaded as additional files. Please see [below] for more information.
- Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). Please use the standard file extensions.
- Table titles (max 15 words) should be included above the table, and legends (max 300 words) should be included underneath the table.
- Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files, but should be formatted using 'Table object' function in your word processing program.
- Color and shading may not be used. Parts of the table can be highlighted using superscript, numbering, lettering, symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend.
- Commas should not be used to indicate numerical values.

If you have any questions or are experiencing a problem with tables, please contact the customer service team at [info@biomedcentral.com](mailto:info@biomedcentral.com).

**Back to top**

## Preparing additional files

As the length and quantity of data is not restricted for many article types, authors can provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

All Additional files will be published along with the accepted article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files, if requested, should be sent by email to the journal's editorial email address, quoting the manuscript reference number. Please do not send patient consent forms unless requested.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" should be included as additional files. Since many web links and URLs rapidly become broken, BioMed Central requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. Do not include any individual participant details. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission. Each additional file should be cited in sequence within the main body of text.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'

For further guidance on how to use Additional files or recommendations on how to present particular types of data or information, please see [How to use additional files](#).