

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Polimorfismo no gene *hOGG1* (Ser326Cys): estudo do efeito do exercício físico no dano e na capacidade de reparação do DNA em humanos**

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

**Ana Inês Bento Fonseca e Silva**

Professora Doutora Maria Manuela do Outeiro Correia de Matos

Professor Doutor Jorge Frederico Pinto Soares



**Vila Real, 2018**



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Polimorfismo no gene *hOGG1* (Ser326Cys): estudo do efeito do exercício físico no dano e na capacidade de reparação do DNA em humanos**

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

**Ana Inês Bento Fonseca e Silva**

**Orientador:** Professora Doutora Maria Manuela do Outeiro Correia de Matos

**Coorientador:** Professor Doutor Jorge Frederico Pinto Soares

Composição do Júri:

Professora Doutora Ana Cristina Ramos Sampaio

Professora Doutora Isabel O'Neill de Mascarenhas Gaivão

Professora Doutora Amélia Maria Lopes Dias da Silva

Professora Doutora Maria Manuela do Outeiro Correia de Matos

**Vila Real, 2018**



As ideias apresentadas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor.



Este estudo encontra-se integrado no projeto “O papel do exercício físico na redução dos danos de DNA em linfócitos humanos: possível influência do stress oxidativo e da capacidade de reparação do DNA”, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Referência PTDC/DES/121575/2010). O trabalho foi realizado no Departamento de Desporto Exercício e Saúde, no Departamento de Biologia e Ambiente e no Departamento de Genética e Biotecnologia, na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.



Recomeça...  
Se puderes,  
Sem angústia e sem pressa.  
E os passos que deres,  
Nesse caminho duro  
Do futuro,  
Dá-os em liberdade.  
Enquanto não alcances  
Não descanses.  
De nenhum fruto queiras só metade.

<<Sísifo>>, Miguel Torga, in *Diário XIII*



## **Agradecimentos**

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, na pessoa do Magnífico Reitor, Professor Doutor António Fontainhas Fernandes, pela possibilidade de realização deste trabalho nesta instituição.

À coordenação do Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial, Professora Doutora Ana Sampaio e Professora Doutora Ana Margarida Calado, pela aprovação desta dissertação.

À Professora Doutora Maria Manuela Matos, pela orientação desta dissertação de mestrado bem como por toda a disponibilidade, apoio e incentivo demonstrados. Agradeço também pela cuidada revisão e correção da escrita do presente trabalho.

Ao Professor Doutor Jorge Soares, pela coorientação desta dissertação de mestrado bem como por todo o apoio e pela cuidada correção da escrita do presente trabalho.

A todos os Professores, pelos ensinamentos concedidos ao longo destes anos.

Ao Professor Doutor João Paulo Teixeira, por disponibilizar a utilização do microscópio de fluorescência no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, no Porto.

À Professora Doutora Sandra Martins, à Patrícia Silva e à Vanessa Almeida por todo o apoio prestado a nível laboratorial.

À Joana Pina, por toda a amizade e companheirismo ao longo do mestrado.

Ao “Reino Maravilhoso”, a magnífica cidade de Vila Real, onde vivi os melhores anos da minha vida. Aos melhores companheiros de licenciatura: momentos que passam, saudades que ficam.

À Catarina Sá Couto, por estar sempre presente.

A toda a família, pelo apoio ao longo do meu percurso.

Ao Pedro, um muito obrigado por todo o amor, carinho, motivação e dedicação, mas sobretudo por toda a paciência.

Aos meus pais, pelos valores transmitidos e pelas oportunidades que me proporcionaram ao longo da vida.

À ESTRELA que me acompanha todos os dias.



## Resumo

O exercício físico está associado a um metabolismo aeróbio aumentado, o que pode resultar também no aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS podem reagir com várias macromoléculas, nomeadamente com o ácido desoxirribonucleico (DNA), causando quebras nas cadeias (DNA SBs) e uma variedade de bases modificadas. No entanto, o exercício físico regular está associado ao possível aumento da atividade de enzimas antioxidantes e de reparação, levando a uma maior resistência ao stresse oxidativo. O gene humano 8-oxoguanina DNA glicosilase 1 (*hOGG1*) codifica uma enzima (OGG1) responsável por excisar o produto mais comum de danos oxidativos no DNA, a 8-oxoguanina (8-oxoG), através da via de reparação por excisão de bases. O polimorfismo no gene *hOGG1* no codão 326 resulta na substituição de um aminoácido serina (Ser) (*wild-type*) por uma cisteína (Cys) (mutante) (Ser326Cys), tendo sido sugerido que os portadores do alelo mutante possuem uma atividade de excisão da 8-oxoG inferior à dos indivíduos *wild-type*. Desta forma, o objetivo deste estudo foi analisar a possível influência do polimorfismo *hOGG1* Ser326Cys nos danos e na capacidade de reparação do DNA em resposta a 16 semanas de exercício físico combinado em 56 indivíduos caucasianos (29 do sexo masculino e 27 do sexo feminino). O ensaio do cometa foi realizado em linfócitos e permitiu a avaliação dos danos do DNA, nomeadamente das DNA SBs e dos *FPG-sensitive sites*, e também da capacidade de reparação do DNA, avaliada através da atividade da OGG1. Os genótipos foram determinados através da metodologia *Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Os indivíduos Ser/Ser constituíram o grupo *wild-type* (n=35), enquanto que os restantes indivíduos Ser/Cys e Cys/Cys foram analisados em conjunto, constituindo o grupo mutante (n=21). Relativamente às diferenças existentes antes e após o exercício físico, no grupo *wild-type* os resultados mostraram uma diminuição significativa das DNA SBs e também dos *FPG-sensitive sites* ( $p < 0,001$ ), enquanto no grupo mutante os resultados apresentaram uma diminuição significativa apenas das DNA SBs ( $p = 0,027$ ). Não foram observadas alterações significativas na capacidade de reparação do DNA em ambos os grupos. Este estudo piloto sugere que o polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1* pode influenciar os danos e a capacidade de reparação do DNA em resposta ao exercício físico regular.

**Palavras-Chave:** danos no DNA; exercício físico; polimorfismo *hOGG1* Ser326Cys; reparação do DNA; stresse oxidativo.



## ***Abstract***

Exercise is associated with an enhanced aerobic metabolism, which can also result in an increased formation of reactive oxygen species (ROS). ROS can react with several organic structures, namely with deoxyribonucleic acid (DNA), causing DNA strand breaks (DNA SBs) and a variety of modified bases in DNA. However, regular physical exercise has been associated with the possible increase in antioxidant and repair enzymes, leading to an enhanced resistance to oxidative stress. The human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 gene (*hOGG1*) encodes an enzyme (OGG1) responsible for removing the most common product of oxidative damage in DNA, 8-oxoguanine (8-oxoG), through the base excision repair pathway. The genetic polymorphism of *hOGG1* at codon 326 results in a serine (Ser) (wild-type) to cysteine (Cys) (mutant) amino acid substitution (Ser326Cys), and it has been suggested that the carriers of the mutant allele exhibit lower 8-oxoG excision activity than the wild-type. Therefore, the aim of this study was to analyse the possible influence of *hOGG1* Ser326Cys polymorphism on DNA damage and repair activity in response to 16 weeks of combined physical exercise training in 56 healthy Caucasian individuals (29 males and 27 females). Comet assay was performed in lymphocytes and enabled the evaluation of DNA damage, both DNA SBs and FPG-sensitive sites, and also DNA repair, evaluated by OGG1 activity. The genotypes were determined by Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method. The individuals with Ser/Ser genotype were considered as wild-type group (n=35), while Ser/Cys and Cys/Cys genotypes were analyzed together as mutant group (n=21). Regarding differences between pre and post-training in the wild-type group, the results showed a significant decrease in DNA SBs and also in FPG-sensitive sites ( $p < 0.001$ ), while in the mutant group, the results only presented a significant decrease in DNA SBs ( $p = 0.027$ ). No significant changes in DNA repair activity were observed in both genotype groups. This pilot study suggests that *hOGG1* Ser326Cys polymorphism can influence DNA damage and repair activity in response to regular exercise training.

**Keywords:** DNA damage; DNA repair; *hOGG1* Ser326Cys polymorphism; oxidative stress; physical exercise.



Parte dos resultados apresentados já foram publicados em revistas científicas e apresentados em eventos científicos nacionais e internacionais:

**Trabalhos publicados em revistas científicas indexadas:**

Soares J.P., **Silva A.I.**, Silva A.M., Almeida V., Teixeira J.P., Matos M., Gaivão I., Mota M.P. (2015) Effects of physical exercise training in DNA damage and repair activity in humans with different genetic polymorphisms of *hOGG1* (Ser326Cys). *Cell Biochemistry & Function* **33**(8): 519-524.

**Abstracts publicados em revistas científicas indexadas:**

**Silva A.I.**, Soares J.P., Silva A.M., Silva P., Almeida V., Matos M., Teixeira J.P., Gaivão I. O., Mota M. P. (2015) Effects of physical exercise training in DNA damage and repair - could the difference be in *hOGG1* Ser326Cys polymorphism? *Frontiers in Genetics Conference Abstract: ICAW 2015 - 11<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop*, Antwerp, Belgium. **(Comunicação Oral e Comunicação em Poster)**

**Comunicações apresentadas em eventos científicos nacionais e internacionais:**

**Silva A.I.**, Soares J.P., Silva A.M., Silva P., Almeida V., Teixeira J.P., Gaivão I., Mota M.P., Matos M. (2016) DNA damage and repair in humans with *hOGG1* Ser326Cys polymorphism: new insights into physical exercise. VIII Jornadas de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, In *Livro de resumos*, Vila Real, Portugal. **(Comunicação Oral)**

**Silva A.I.**, Soares J.P., Silva A.M., Teixeira J.P., Gaivão I., Mota M.P., Matos M. (2016) Impact of physical exercise training on DNA damage and repair: does gender play a role? ICOETox 2016 - 3<sup>rd</sup> International Conference of Environmental and Occupational Health, In *Abstract book*, Porto, Portugal. **(Comunicação em Poster)**



## **Índice Geral**

<b>RESUMO</b>	IX
<b><i>ABSTRACT</i></b>	XI
<b>ÍNDICE GERAL</b>	XV
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	XIX
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	XXI
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	XXIII
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	3
1.1. Exercício Físico	3
1.2. Stresse Oxidativo	6
1.3. Mecanismos de Defesa Antioxidante	7
1.3.1. Mecanismos enzimáticos	8
1.3.2. Mecanismos não enzimáticos	9
1.4. Danos Oxidativos no DNA	10
1.5. Mecanismos de Reparação do DNA	11
1.5.1. Via de reparação por excisão de bases (BER)	12
1.6. Biomonitorização Humana	14
1.6.1. Ensaio do cometa	16
1.6.2. Marcadores genéticos	16
1.6.2.1. Marcadores de DNA	16
1.6.2.1.1. PCR-RFLP	17
<b>2. OBJETIVOS</b>	21

<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1. Amostra	25
3.1.1. Avaliação antropométrica	25
3.1.2. Colheita de amostras de sangue	26
3.1.2.1. Isolamento de linfócitos	26
3.1.3. Exercício físico	27
3.2. Ensaio do Cometa	27
3.2.1. Ensaio do cometa <i>in vivo</i>	28
3.2.1.1. Incorporação das células em agarose	28
3.2.1.2. Lise	28
3.2.1.3. Tratamento enzimático	28
3.2.1.4. Tratamento alcalino	29
3.2.1.5. Eletroforese	29
3.2.1.6. Neutralização	29
3.2.1.7. Coloração	29
3.2.1.8. Visualização ao microscópio de fluorescência e Análise	30
3.2.2. Ensaio de reparação por excisão de bases do DNA <i>in vitro</i>	31
3.2.2.1. Preparação do extrato	31
3.2.2.2. Preparação do substrato	31
3.2.2.3. Incorporação das células em agarose e Lise do substrato	32
3.2.2.4. Reação	32
3.3. Marcadores Moleculares	33
3.3.1. Extração de DNA genómico	33
3.3.1.1. Lise celular	33
3.3.1.2. Remoção do RNA	33
3.3.1.3. Adição de etanol	34
3.3.1.4. Ligação do DNA	34
3.3.1.5. Lavagem da membrana de sílica	34
3.3.1.6. Secagem da membrana de sílica	34
3.3.1.7. Eluição do DNA	34
3.3.2. Análise quantitativa e qualitativa do DNA extraído	35

3.3.3. PCR-RFLP ( <i>Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )	35
3.3.3.1. Resolução dos produtos de restrição em géis de agarose	36
3.4. Análise Estatística	36
<b>4. RESULTADOS E ANÁLISE DE RESULTADOS</b>	<b>41</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>61</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO ADMINISTRADO À AMOSTRA EM ESTUDO.</b>	<b>79</b>



## Índice de Figuras

<b>FIGURA 1</b> - Frequência com que os europeus nunca praticam exercício físico.	5
<b>FIGURA 2</b> - Conversão da Guanina em 8-oxoguanina após oxidação mediada pelas ROS.	11
<b>FIGURA 3</b> - Via de reparação por excisão de bases (BER).	13
<b>FIGURA 4</b> - Imagem representativa do funcionamento do <i>software</i> Comet Assay IV™.	30
<b>FIGURA 5</b> - Imagens de cometas obtidos através do ensaio do cometa, realizado em linfócitos humanos.	42
<b>FIGURA 6</b> - Resultado representativo da análise por PCR-RFLP do polimorfismo genético no gene <i>hOGG1</i> (Ser326Cys).	44
<b>FIGURA 7</b> - Efeito do exercício físico nas variáveis obtidas através da realização do ensaio do cometa (média $\pm$ DP) nos grupos <i>wild-type</i> (homozigóticos Ser/Ser) e mutante (heterozigóticos Ser/Cys e homozigóticos Cys/Cys).	46



## Índice de Tabelas

<b>TABELA 1</b> - Caracterização da amostra.	41
<b>TABELA 2</b> - Efeito do exercício físico nas variáveis obtidas através da realização do ensaio do cometa na amostra total.	43
<b>TABELA 3</b> - Distribuição dos genótipos e frequência dos alelos de acordo com o polimorfismo <i>hOGG1</i> Ser326Cys na amostra.	44
<b>TABELA 4</b> - Correlações entre as variáveis em estudo nos grupos <i>wild-type</i> e mutante, antes das 16 semanas de exercício físico.	48
<b>TABELA 5</b> - Correlações entre as variáveis em estudo nos grupos <i>wild-type</i> e mutante, depois das 16 semanas de exercício físico.	48



## Lista de Siglas e Abreviaturas

% TI – % de DNA na cauda do cometa, do inglês % *Tail Intensity*

8-oxoG – 8-oxoguanina

A<sub>260</sub> – absorvância a 260 nm

A<sub>280</sub> – absorvância a 280 nm

A – adenina (base)

AFLPS – do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphism*

APE1 – endonuclease AP 1, do inglês *AP Endonuclease 1*

BER – reparação por excisão de bases, do inglês *Base Excision Repair*

BrEt – brometo de etídio

BSA – albumina do soro bovino, do inglês *Bovine Serum Albumin*

C – citosina (base)

CAT – catalase

Cys – cisteína (aminoácido)

DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA – ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

DNA SBs – quebras nas cadeias do DNA, do inglês *DNA strand breaks*

DP – desvio padrão

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

FPG – formamidopirimidina DNA glicosilase

G – guanina (base)

GPx – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

GSH – glutathione reduzida

GSSG – glutathione oxidada

HEPES – ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanossulfônico

*hOGGI* – gene humano 8-oxoguanina DNA glicosilase 1

HR – recombinação homóloga, do inglês *Homologous Recombination*

IMC – índice de massa corporal

LigIII – ligase III

LMP – do inglês *low melting point*

NADPH – fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida reduzido

NEIL1 – do inglês *nei like DNA glicosilase 1*

NER – reparação por excisão de nucleótidos, do inglês *Nucleotide Excision Repair*

NHEJ – reparação por junção de extremidades não homólogas, do inglês *Non-Homologous End Joining*

NMP – do inglês *normal melting point*

OGG1– 8-oxoguanina DNA glicosilase 1

PARG – poli (ADP-ribose) glicohidrolase

PARP – poli (ADP-ribose) polimerase

pb – pares de bases

PBS – tampão fosfato-salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PCR – reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polimerase Chain Reaction*

pH – potencial de hidrogénio iónico

Pol $\beta$  – polimerase  $\beta$

RAPDs – do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP – do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*

ROS – espécies reativas de oxigénio, do inglês *Reactive Oxygen Species*

Ser – serina (aminoácido)

sítios AP – sítios apurínicos/apirimidínicos

SNP – do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

SOD – superóxido dismutase

SSRs – do inglês *Simple Sequence Repeats*

T – timina (base)

tampão TBE – tampão tris/borato/EDTA

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

XRCC1 – do inglês *X-ray Repair Cross-Complementing 1*

# **Capítulo 1 – Introdução**



### **1. Introdução**

A atividade física diária foi uma componente importante da vida durante a evolução do *Homo sapiens*, devido à necessidade de viajar, caçar e lutar, sendo que para a sobrevivência da espécie foi essencial um alto nível de aptidão física (Radak *et al.*, 2013). Desde a segunda metade do século 20, que a aptidão física se tornou uma componente menos crítica da vida diária dos seres humanos, graças aos avanços tecnológicos (Mattson *et al.*, 2014). Como resultado desta diminuição exponencial, a inatividade física tornou-se parte do quotidiano, surgindo como um fator de risco para um número considerável de doenças, o que resulta em elevados prejuízos para os sistemas de saúde (Ding *et al.*, 2016).

O exercício físico constitui uma componente essencial de qualquer estratégia de prevenção de doença e promoção da saúde. As características individuais da população devem ser consideradas, a fim de permitir a criação de um conjunto de recomendações para a prescrição de exercício físico, de forma objetiva e adequada.

#### **1.1. Exercício Físico**

A atividade física compreende qualquer movimento corporal produzido pela contração muscular que resulte num gasto energético acima do nível de repouso. Embora relacionado com a atividade física, o exercício físico é um conceito menos abrangente e é definido por movimentos corporais planeados, organizados e repetidos com o objetivo de manter ou melhorar uma ou mais componentes da aptidão física (Caspersen *et al.*, 1985). Esta constitui o conjunto de atributos, adquiridos ou desenvolvidos, que habilitam para a realização da atividade física, nomeadamente o estado de saúde, a aptidão cardiovascular, o perfil músculo-esquelético, a composição corporal e o metabolismo (Warburton *et al.*, 2006).

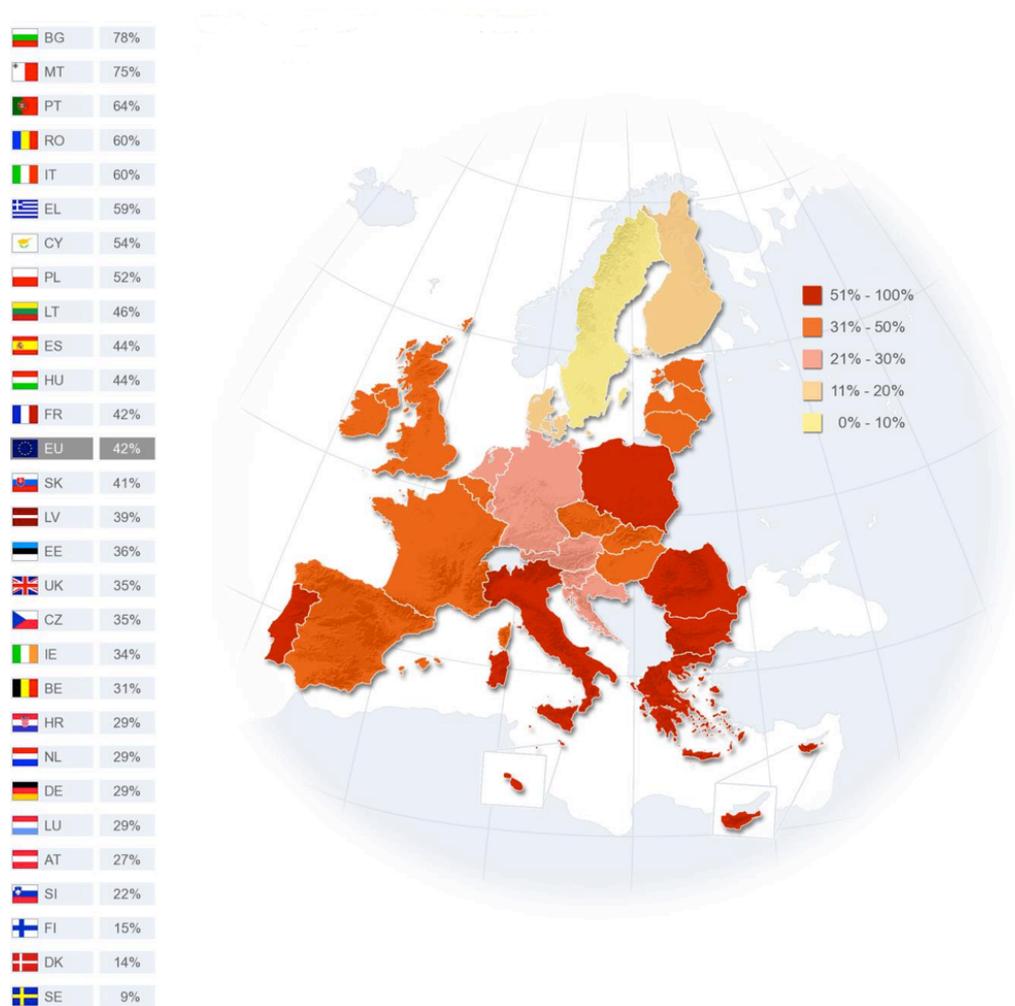
As investigações epidemiológicas sistemáticas iniciadas há cerca de 60 anos por Jeremy Morris (Morris *et al.*, 1953; Morris e Crawford, 1958) e outros estudos que se seguiram vieram confirmar a importância do exercício físico regular na melhoria da saúde e da longevidade, e evidenciar a necessidade de um dispêndio energético semanal de pelo menos 1000 kcal (Paffenbarger *et al.*, 1986). No seguimento dos diferentes estudos efetuados surge, em 1995, a primeira recomendação relativa ao exercício físico e saúde pública, publicada nos Estados Unidos pelo Centro de Controlo e Prevenção de Doenças e pelo Colégio Americano de

Medicina Desportiva, que preconiza a realização de pelo menos 30 minutos de exercício físico de intensidade moderada por dia, preferencialmente todos os dias da semana (Pate *et al.*, 1995).

Atualmente, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde, os indivíduos com idades compreendidas entre os 18 e os 64 anos devem acumular pelo menos 150 minutos por semana de exercício físico de intensidade moderada (30 minutos por dia, 5 dias por semana), ou 60 a 75 minutos por semana de exercício aeróbio de intensidade vigorosa (20 a 25 minutos por dia, 3 dias por semana), ou alguma combinação equivalente de exercício aeróbio de intensidade moderada e vigorosa. De notar que os indivíduos adultos devem ainda praticar exercícios de força de intensidade moderada a elevada que envolvam grandes grupos musculares, 2 a 3 vezes por semana. A acumulação de pelo menos 150 minutos por semana de exercício físico de intensidade moderada também se aplica aos indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos, sendo que na impossibilidade de concretização deste objetivo, se sugere que estes sejam o mais possível fisicamente ativos, dentro das suas limitações (WHO, 2010).

A prática regular de exercício físico reduz o risco de doenças associadas ao estilo de vida, aumenta a esperança média de vida e aumenta significativamente a qualidade de vida, sobretudo nos idosos. De facto, segundo os resultados obtidos em vários estudos, o exercício físico regular reduz a pressão arterial, melhora o nível das lipoproteínas de alta densidade e da glicose no sangue, preserva ou potencia a mineralização óssea, e reduz o risco de cancro do cólon e da mama nas mulheres (Yan *et al.*, 2011; Bassil e Gougeon, 2013; Lacza e Radak, 2013; Mellett e Bousquet, 2013; Strasser, 2013). Por outro lado, contribui para a preservação da função cognitiva e diminui o risco de depressão e de demência, diminui o stresse e melhora a qualidade do sono, aumentando o bem-estar e o otimismo (Hillman *et al.*, 2008; Radak *et al.*, 2014). Em idosos, está igualmente associado a uma redução do risco de queda e a uma diminuição das limitações funcionais (Brovold *et al.*, 2013; Frazzitta *et al.*, 2013).

Não obstante às recomendações atualmente existentes, bem como às evidências que associam a prática regular de exercício físico com uma vasta lista de efeitos benéficos para a saúde, milhões de pessoas optam por um estilo de vida sedentário. Um relatório sobre o desporto e a atividade física na Europa, publicado pela Comissão Europeia (2014), constatou que 42% dos europeus nunca praticam exercício físico, e que os cidadãos do Norte da Europa são os que praticam mais exercício físico, ao contrário dos cidadãos que vivem no Sul. Portugal encontra-se entre os países que menos exercício pratica, sendo que 64% dos portugueses nunca praticam exercício físico (Figura 1).



**Figura 1** - Frequência com que os europeus nunca praticam exercício físico (Adaptado de *Special Eurobarometer 412 "Sport and physical activity"*, Comissão Europeia, 2014).

O exercício físico encontra-se associado a um metabolismo aeróbio aumentado. No entanto, quando praticado regularmente está também associado com o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e de reparação do DNA, com baixos níveis de danos oxidativos e com níveis aumentados de resistência ao stress oxidativo (Alessio e Goldfarb, 1988; Radak *et al.*, 2000; Radak *et al.*, 2002). Assim, pode considerar-se que os efeitos do exercício físico são sistêmicos e complexos (Radak *et al.*, 2008a), sendo que dependem do nível de treino dos indivíduos, das características do exercício, como tipo, intensidade, duração, volume e frequência (Kemi *et al.*, 2005; Matsuo *et al.*, 2014), e do eventual aumento dos níveis de stress oxidativo (Radak *et al.*, 2001).

## **1.2. Stresse Oxidativo**

Em organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o normal funcionamento da célula, na maior parte sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS). Uma grande quantidade de ROS é removida da célula através dos mecanismos de defesa antioxidante, sendo que o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes é essencial para o normal funcionamento do organismo (Valko *et al.*, 2007).

O stresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes da célula, devido a um aumento da taxa de produção de ROS, ou a uma redução nas defesas antioxidantes, ou ainda à conjugação destes dois fatores (Sies, 2015). Nestas situações, as ROS em excesso podem oxidar e danificar os lípidos celulares, as proteínas e o DNA (Valko *et al.*, 2007), resultando numa possível perda de funcionalidade ou até mesmo na perda de viabilidade da célula (Lee *et al.*, 2004). De facto, a produção excessiva de ROS encontra-se associada como causa, ou como estando relacionada com várias doenças, nomeadamente com vários tipos de cancro, diabetes, doenças cardiovasculares e neurológicas, entre outras (Giustarini *et al.*, 2009). Encontra-se inclusivamente relacionada com o processo de envelhecimento (Mota *et al.*, 2004). Por outro lado, em concentrações baixas ou moderadas, as ROS estão envolvidas em vários processos fisiológicos, nomeadamente na sinalização celular, na regulação da expressão de determinados genes e na resposta inflamatória (Droge, 2002).

Os radicais livres constituem um grupo de substâncias químicas que se caracterizam por possuírem um ou mais eletrões desemparelhados numa das suas orbitais externas, particularidade que lhes confere a reatividade e a instabilidade química que os caracterizam, ao reagir com outras moléculas na sua proximidade, comportando-se como oxidantes ou como redutores, através da captação ou da cedência de eletrões e/ou átomos de hidrogénio. Contudo, existem outras moléculas altamente reativas e potencialmente tóxicas para o organismo, mas que não contêm qualquer eletrão desemparelhado nas suas orbitais. Como tal, em detrimento da designação de radicais livres passou a utilizar-se genericamente a designação de espécies reativas de oxigénio, para englobar os radicais livres associados aos átomos de oxigénio e também as moléculas que não possuem átomos com eletrões desemparelhados, potencialmente geradores desses radicais (Halliwell, 1991). O radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) são as ROS que possuem uma maior relevância biológica, devido à sua elevada

toxicidade e ao facto de serem os mais prevalentes nos organismos aeróbios (Halliwell, 1991; Gutteridge e Halliwell, 2000).

O metabolismo celular ao consumir oxigénio, mesmo em situações basais, promove a formação contínua de ROS, através da redução da molécula de oxigénio (Droge, 2002; Mota *et al.*, 2004). O oxigénio molecular é considerado uma molécula potencialmente oxidante dada a sua tendência para captar eletrões, uma vez que possui na sua orbital externa dois eletrões desemparelhados com *spins* paralelos. Assim, através da redução do oxigénio molecular pode formar-se o radical  $O_2^{\bullet-}$ , o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) ou o radical  $HO^{\bullet}$  (Fridovich, 1999). De notar que, as ROS podem ser produzidas nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático, nos lisossomas, nas membranas celulares, nos peroxissomas e no citosol (Ferreira *et al.*, 2007).

O radical  $O_2^{\bullet-}$  é a forma reduzida do oxigénio molecular, formado através da captação de um eletrão (Droge, 2002; Lee *et al.*, 2004). Este radical não consegue atravessar facilmente as membranas celulares, ficando normalmente confinada ao local onde é produzida, podendo desencadear um conjunto de reações químicas com os ácidos gordos dos fosfolípidos e consequentemente comprometer o normal funcionamento da célula (Evans, 2000). O  $O_2^{\bullet-}$  pode sofrer dismutação, espontaneamente ou por ação enzimática, formando  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  possui a capacidade de atravessar facilmente as membranas celulares, e é considerada a ROS menos reativa. A sua estabilidade depende, entre outros fatores, da presença de iões metálicos livres na sua proximidade, sendo que se pode comportar como um intermediário para a síntese de ROS mais reativas, nomeadamente do radical  $HO^{\bullet}$ , a partir da oxidação de metais de transição que se encontram na sua forma livre (Fridovich, 1995). O principal metal de transição responsável pela transformação do  $H_2O_2$  em  $HO^{\bullet}$  é o  $Fe^{2+}$ , através da reação de Fenton, na qual o  $Fe^{2+}$  reage com o  $H_2O_2$ , formando  $HO^{\bullet}$ . O radical  $HO^{\bullet}$  possui uma elevada reatividade para com as biomoléculas adjacentes, sendo inclusivamente a ROS que mais danos causa no DNA, bem como a responsável por iniciar o processo de peroxidação lipídica, ao retirar um átomo de hidrogénio de uma cadeia polinsaturada de um lípido presente nas membranas celulares (Droge, 2002; Lee *et al.*, 2004).

### **1.3. Mecanismos de Defesa Antioxidante**

O elevado potencial de toxicidade do oxigénio e a sua grande utilização por parte dos organismos aeróbios, levou a que estes desenvolvessem uma diversidade de mecanismos de

defesa antioxidante com o objetivo de proteger as suas células dos efeitos nocivos das ROS (Banerjee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que atrasa significativamente, ou inibe, a oxidação dos potenciais substratos pelas ROS (Halliwell, 1991). Os antioxidantes possuem a capacidade de fornecer elétrons e/ou átomos de hidrogénio às ROS, sem se transformarem em moléculas instáveis (Powers *et al.*, 1999).

Os mecanismos de defesa antioxidante, existentes nos diferentes tecidos, compreendem mecanismo enzimáticos e não enzimáticos, e podem ser classificados em função do seu mecanismo de ação (antioxidantes de prevenção, de interceção e de reparação) (Ferreira *et al.*, 2007), da sua localização orgânica (antioxidantes intracelulares e extracelulares) e da sua proveniência (através da dieta, antioxidantes exógenos ou através da síntese endógena, antioxidantes endógenos) (Ferreira e Abreu, 2007).

Os antioxidantes de prevenção são aqueles que criam condições favoráveis para evitar a formação de ROS, como as proteínas que se ligam aos iões metálicos de transição, prevenindo a sua presença na forma livre, ou as enzimas responsáveis pela manutenção do equilíbrio redox da célula e pela redução de antioxidantes de interceção previamente oxidados. Enquanto os antioxidantes de interceção são aqueles que reagem diretamente com as ROS e as transformam em substâncias menos reativas ou não reativas, impedindo que reajam com as estruturas celulares. Os antioxidantes de reparação, por sua vez, favorecem a remoção dos danos moleculares causados pelas ROS e a reconstituição da estrutura e homeostasia celular (Ferreira *et al.*, 2007).

A capacidade antioxidante de um organismo depende não só da ação específica de cada mecanismo de defesa antioxidante, mas também da cooperação entre os mesmos. A taxa de produção de ROS e a quantidade de danos oxidativos induzidos pelas mesmas estão dependentes da capacidade de defesa dos diferentes agentes antioxidantes (Sen, 2001).

### **1.3.1. Mecanismos enzimáticos**

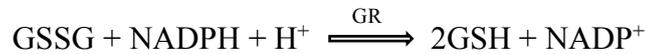
No que respeita aos mecanismos enzimáticos, as principais enzimas antioxidantes que podem ser encontradas no organismo são a glutathiona peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (Powers *et al.*, 2004).

A GPx encontra-se na mitocôndria e no citosol, e tem um papel determinante nos mamíferos, no que diz respeito ao processo de neutralização das ROS (Mota *et al.*, 2004), pois

apresenta um papel muito ativo na remoção celular do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de outros hidroperóxidos orgânicos, utilizando a glutatona reduzida (GSH) como dador de elétrons/hidrogénios, formando a glutatona oxidada (GSSG) e água (Powers *et al.*, 1999).



Uma vez que a GSH é oxidada pela GPx, convertendo-se em GSSG, existe a necessidade de as células regenerarem a GSH. Esta reação é catalisada pela enzima glutatona redutase (GR), que utiliza a Nicotinamida Adenina-dinucleótido Fosfato (NADPH) como cofator, transformando a GSSG novamente em GSH (Powers *et al.*, 1999).



Relativamente à SOD, é de salientar a existência, nos mamíferos, de três isoenzimas: a citosólica (Cu,Zn-SOD ou SOD1), a mitocondrial (Mn-SOD ou SOD2) e uma forma extracelular da Cu,Zn-SOD (SOD3) (Fridovich, 1995). A SOD constitui a primeira defesa contra os radicais O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, atuando como enzima catalisadora da dismutação do radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxigénio (Powers *et al.*, 1999).



A CAT é uma enzima presente na maioria dos organismos aeróbios, estando a maior parte da sua atividade localizada nos peroxissomas (Halliwell, 1991). Esta enzima é responsável pela conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular em água e oxigénio (Powers *et al.*, 1999).



### **1.3.2. Mecanismos não enzimáticos**

Relativamente aos mecanismos não enzimáticos, as principais substâncias antioxidantes que podem ser encontradas no organismo são a GSH, a Vitamina E, a Vitamina C, os carotenóides e os flavonóides (Powers *et al.*, 2004).

A GSH é um tripéptido de baixo peso molecular composto por glutamato, cisteína e glicina, que atua como um quelante de radicais livres, quer reagindo diretamente com estes, quer indiretamente como cofator de enzimas antioxidantes (Ferreira e Abreu, 2007).

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel que, por se encontrar nas membranas, previne mais facilmente a peroxidação lipídica, e pode ser encontrada sob várias formas, das quais a  $\alpha$ -tocoferol é a forma mais ativa em humanos. A vitamina E reage com as ROS, formando radicais menos reativos (Fang *et al.*, 2002; Hensley *et al.*, 2004).

A vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel que se encontra no citosol, e que funciona como um forte agente redutor de ROS. Contudo, em elevadas concentrações, pode exercer efeitos pró-oxidantes na presença de metais de transição, formando ROS (Rietjens *et al.*, 2002).

Os carotenóides e os flavonóides são compostos bioativos provenientes de diferentes partes das plantas que, quando ingeridos através da dieta, apresentam efeitos antioxidantes (Ferreira e Abreu, 2007).

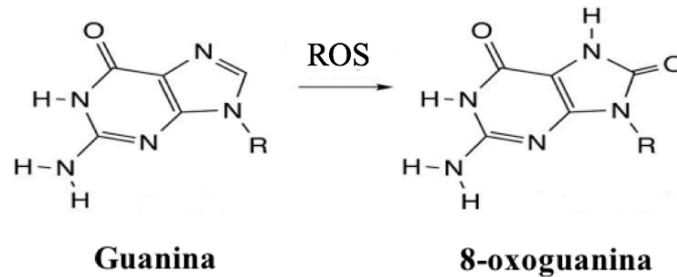
### **1.4. Danos Oxidativos no DNA**

As ROS podem reagir com várias macromoléculas, nomeadamente com o DNA, desencadeando a formação de danos (Cadet e Wagner, 2013), os quais têm sido alvo de vários estudos nos últimos 30 anos.

Os danos no DNA induzidos pelas ROS incluem as modificações das bases, nomeadamente a sua oxidação, a formação de sítios apurínicos/apirimidínicos (AP), de quebras simples e duplas nas cadeias, e ainda de ligações cruzadas (Friedberg *et al.*, 2006).

A oxidação das bases induz a formação de danos oxidativos no DNA celular, e representa a maior causa de danos no DNA (Krokan e Bjoras, 2013). De facto, estima-se que ocorra a formação de 10000 bases oxidadas por dia em cada célula, sendo que existem diferentes tipos de bases oxidadas, com uma frequência de ocorrência e um potencial mutagénico distintos (Wilson e Bohr, 2007).

A guanina é particularmente suscetível à oxidação mediada pelas ROS. O principal produto de oxidação da guanina (G) é a 8-oxoguanina (8-oxoG) (Figura 2) (David *et al.*, 2007). A 8-oxoG é muito abundante e como tal, a sua presença é frequentemente utilizada como biomarcador de danos oxidativos no DNA celular (Klaunig e Kamendulis, 2004).



**Figura 2** - Conversão da Guanina em 8-oxoguanina após oxidação mediada pelas ROS (Adaptado de Lanier e Williams, 2017).

A 8-oxoG pode parear com a citosina (C), na conformação *anti*. Por outro lado, na conformação *syn* tem a capacidade de mimetizar funcionalmente uma timina (T), podendo parear erroneamente com a adenina (A). Se este dano não for corretamente reparado, pode ocorrer uma mutação pontual do tipo transversão, na qual ocorre a troca de G:C para T:A (David *et al.*, 2007).

Os danos oxidativos no DNA celular desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese, sendo que o seu potencial efeito mutagênico e citotóxico depende determinantemente da eficácia dos mecanismos de reparação do DNA existentes na célula (Marnett, 2000; Bjelland e Seeberg, 2003; Klaunig e Kamendulis, 2004).

### **1.5. Mecanismos de Reparação do DNA**

Os mecanismos de defesa antioxidante desempenham um papel de extrema importância ao neutralizar os potenciais agentes mutagênicos formados em situações de stresse oxidativo, antes mesmo que estes induzam a formação de danos no DNA. No entanto, os danos no DNA podem acabar mesmo por se formar, sendo necessária a ativação de mecanismos de reparação, para que os danos no DNA não persistam (David *et al.*, 2007; Wilson e Bohr, 2007; Krokan e Bjoras, 2013; Wallace, 2014).

Existem diferentes vias envolvidas na reparação de danos oxidativos no DNA celular, nomeadamente a reparação por reversão direta, a reparação por excisão de bases (BER), a reparação por excisão de nucleótidos (NER), a reparação por excisão após reconhecimento de erros de emparelhamento (*mismatch*), e a reparação de quebras de cadeia dupla, por recombinação homóloga (HR) ou por junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (Wood

*et al.*, 2001; Gros *et al.*, 2003; Friedberg *et al.*, 2006; Almeida e Sobol, 2007; David *et al.*, 2007).

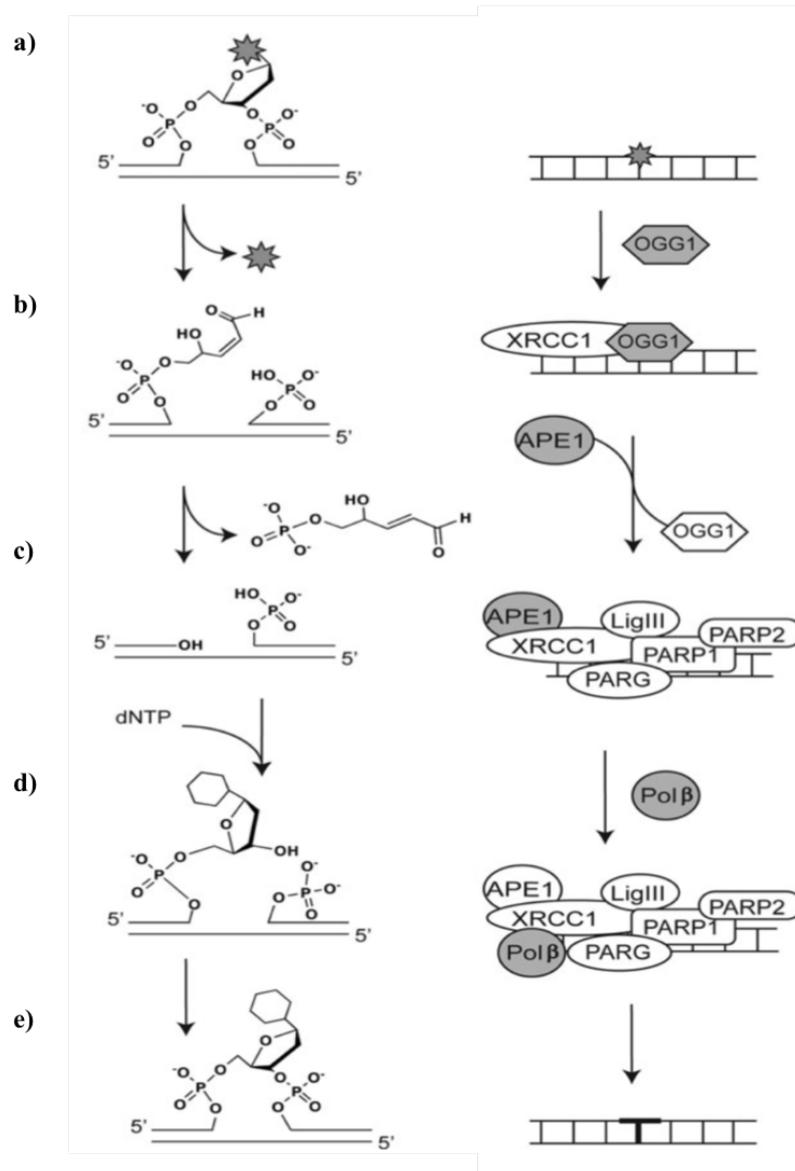
### **1.5.1. Via de reparação por excisão de bases (BER)**

A via de reparação por excisão de bases (BER) desempenha um papel essencial ao estar envolvida na reparação de uma grande parte dos danos induzidos pelas ROS no DNA celular, que de outra forma resultariam na formação de mutações e/ou num bloqueio da replicação e consequente morte celular. Esta via está envolvida na reparação de bases modificadas, de sítios AP, e de quebras simples nas cadeias de DNA (Friedberg *et al.*, 2006; Almeida e Sobol, 2007; David *et al.*, 2007).

A reparação de danos oxidativos através da via BER consiste em três etapas principais, nomeadamente o reconhecimento/excisão do dano, a formação de uma quebra de cadeia simples no DNA, e a síntese/ligação do DNA (Almeida e Sobol, 2007). Contudo, os complexos de proteínas intervenientes no processo variam, dependendo do tipo de dano inicial, bem como da composição química dos intermediários de reparação, que surgem após a excisão do dano do DNA, mediada por uma glicosilase (Svilar *et al.*, 2011). Desta forma, Svilar e seus colaboradores (2011) propuseram a existência de três mecanismos de reparação através da via de BER, nomeadamente um dos mecanismos através do qual a base modificada pode ser excisada por uma DNA glicosilase monofuncional, e outros dois mecanismos através dos quais a base é excisada por uma DNA glicosilase bifuncional, isto é, uma glicosilase com atividade  $\beta$ -liase associada, podendo ocorrer neste caso,  $\beta$ -eliminação, quando mediada pela 8-oxoguanina DNA glicosilase 1 (OGG1) ou  $\beta,\delta$ -eliminação, quando mediada pela *nei like* DNA glicosilase 1 (NEIL1).

O mecanismo mais predominante na reparação de danos oxidativos ocorre por  $\beta$ -eliminação, e é iniciado pela enzima OGG1. Esta reconhece e catalisa a excisão da 8-oxoG, formando um sítio AP, e subsequentemente também hidrolisa a ligação fosfodiéster do sítio AP, resultando na formação de uma quebra de cadeia simples no DNA. Esta quebra na cadeia é caracterizada pela existência de uma extremidade 3' ligada a um aldeído insaturado, que necessita de ser processada, para se formar uma extremidade 3'OH convencional e permitir a posterior síntese de DNA. Desta forma, a OGG1 recruta a proteína *X-ray repair cross-complementing 1* (XRCC1), que funciona como um esqueleto molecular, ao coordenar os múltiplos componentes enzimáticos do processo de reparação. O complexo XRCC1-OGG1-

DNA é reconhecido pela endonuclease AP 1 (APE1), que ao se ligar, promove a libertação da OGG1, e remove a extremidade 3' não convencional. Posteriormente, a quebra simples na cadeia de DNA é reconhecida pelo complexo de proteínas XRCC1-APE1-DNA Ligase III (LigIII) e pelo complexo de poli (ADP-ribose) polimerase 1 e 2 e poli (ADP-ribose) glicohidrolase (PARP1-PARP2-PARG), promovendo o recrutamento da polimerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ), que é responsável pela incorporação de nucleótidos de DNA, concluindo o processo de reparação (Figura 3) (Svilar *et al.*, 2011).



**Figura 3** - Via de reparação por excisão de bases (BER). Etapas do processo de reparação (esquerda): **a)** base modificada no DNA; **b)** reconhecimento e excisão da base modificada; **c)** formação de uma quebra de cadeia simples no DNA; **d)** síntese de DNA **e)** ligação dos locais de corte. Proteínas intermediárias do processo de reparação (direita) (Adaptado de Svilar *et al.*, 2011).

De notar que após a remoção da extremidade 3' não convencional, a via de BER pode seguir uma de duas subvias diferentes, a *short-patch*, na qual ocorre apenas a substituição de um nucleótido, ou a *long-patch*, onde são substituídos dois a treze nucleótidos, sendo que a primeira é mais comum (Krokan e Bjoras, 2013).

A OGG1, considerada uma enzima fundamental na prevenção dos danos oxidativos (David *et al.*, 2007), é codificada pelo gene humano 8-oxoguanina DNA glicosilase 1 (*hOGG1*), que se localiza no braço curto do cromossoma 3, na região 3p25.3. Existem vários polimorfismos identificados neste gene, mas o mais analisado é um SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) na posição 1245 no exão 7, que resulta na substituição de um aminoácido serina (Ser) por um aminoácido cisteína (Cys), no resíduo 326 (Ser326Cys) (Boiteux e Radicella, 2000). Alguns estudos epidemiológicos sugerem que os indivíduos portadores do alelo mutante (Cys) estão associados a uma atividade enzimática da OGG1 reduzida, o que significa que possuem uma menor capacidade de excisão da 8-oxoG e conseqüentemente uma menor capacidade de reparação do DNA (Bravard *et al.*, 2009; Kershaw e Hodges, 2012; Simonelli *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014).

### **1.6. Biomonitorização Humana**

A biomonitorização humana é uma atividade sistemática, contínua ou repetitiva, que visa a colheita de amostras biológicas para análise de concentrações de poluentes, metabolitos ou parâmetros específicos de efeito biológico não adverso, com o objetivo de avaliar a exposição e o risco para a saúde em indivíduos expostos, comparando os dados observados com os níveis de referência e, se necessário, levar a ações corretivas (Angerer *et al.*, 2006). Esta avaliação requer a colheita de uma matriz biológica adequada, de fácil acesso, em quantidade suficiente para procedimentos de rotina, e preferencialmente com um impacto mínimo para o indivíduo. O sangue e a urina são as matrizes mais utilizadas (Angerer *et al.*, 2007).

Um biomarcador pode ser definido como uma característica biológica que pode ser medida de forma objetiva e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, de processos patogênicos ou de respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. Na prática, os biomarcadores podem ser medidos através de várias metodologias (Strimbu e Tavel, 2010).

### 1.6.1. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa, também designado por *Single Cell Gel Electrophoresis*, é um método simples, versátil e sensível, que permite detetar quebras no DNA, em células eucarióticas (McKelvey-Martin *et al.*, 1993).

O ensaio divide-se em várias etapas. Inicialmente as células são incorporadas em agarose, sobre uma lâmina de microscópio previamente revestida de agarose, seguindo-se a etapa de lise celular, a qual promove a dissolução das membranas celulares e nucleares, formando nucleóides, compostos por *loops* de DNA superenrolado ligados a uma matriz nuclear. Na etapa de desnaturação, a existência de quebras na cadeia do DNA vai provocar o relaxamento dos *loops* de DNA, permitindo que estes migrem no sentido do ânodo, quando expostos a um campo elétrico (eletroforese), assumindo uma aparência semelhante à cauda de um cometa. Os cometas são visualizados ao microscópio de fluorescência após a coloração com um corante adequado (Collins *et al.*, 1997). Assim, é possível quantificar os danos no DNA, uma vez que quanto maior o número de quebras nas cadeias do DNA, maior é a quantidade de DNA na cauda do cometa (Collins *et al.*, 2008).

Ao longo dos anos, foram feitas diversas alterações ao protocolo original (Ostling e Johanson, 1987). A alteração do pH da solução de desnaturação do DNA (Singh *et al.*, 1988) permitiu aumentar a sensibilidade do ensaio do cometa que, sob condições alcalinas (pH>13), deteta quebras simples e duplas nas cadeias do DNA, locais de reparação incompletos e sítios álcali-lábeis (Burlinson *et al.*, 2007). Entre outras alterações, destacam-se também as que permitiram a deteção de danos específicos no DNA, ou a possibilidade de estimar a capacidade de reparação do DNA (Collins, 2004).

A oxidação de bases no DNA pode ocorrer a uma frequência similar à das quebras nas cadeias do DNA (Collins *et al.*, 2008), pelo que após a etapa de lise celular, se podem utilizar enzimas de reparação que detetam danos específicos no DNA, nomeadamente a formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG) que deteta purinas oxidadas como a 8-oxoG. (Azqueta *et al.*, 2013).

O ensaio de reparação do DNA *in vitro*, baseado no ensaio do cometa, estima a atividade enzimática de um extrato celular incubado na presença de um substrato que contém danos induzidos no DNA, específicos para a via de reparação em estudo. As enzimas de reparação contidas no extrato reconhecem os danos, originando quebras nas cadeias do DNA, detetadas através do ensaio do cometa (Gaivao *et al.*, 2009; Azqueta *et al.*, 2014).

O ensaio do cometa tem sido muito utilizado em testes de genotoxicidade, estudos de biomonitorização humana e de ecogenotoxicologia, tanto em investigação básica como em investigação aplicada (Azqueta e Collins, 2014), sendo que a elevada sensibilidade na deteção de baixos níveis de danos no DNA, o facto de requerer um baixo número de células por amostras, a extensa aplicabilidade e os baixos custos implicados constituem as principais vantagens da utilização deste método (Tice *et al.*, 2000). Uma limitação prática deste ensaio é o número de amostras que podem ser analisadas em simultâneo, uma vez que o formato convencional é realizado com dois géis por lâmina. Assim, desenvolveram-se outros formatos que permitem a análise de um maior número de amostras em simultâneo (Shaposhnikov *et al.*, 2010; Gutzkow *et al.*, 2013).

Os linfócitos isolados a partir de sangue total são muito utilizados no ensaio do cometa, uma vez que podem ser obtidos em grande número, não requerem cultura celular, são diploides e se encontram quase todos na mesma fase do ciclo celular (G0) (Collins *et al.*, 2008). Os danos genéticos observados em linfócitos refletem danos semelhantes às células dos tecidos alvo, uma vez que estes circulam por todo o corpo (Dusinska e Collins, 2008). Além dos linfócitos, o ensaio pode ser realizado em sangue total, em células epiteliais bucais, em espermatozoides, entre outras células (Costa e Teixeira, 2014).

### **1.6.2. Marcadores genéticos**

Um marcador genético é definido como qualquer *locus* referente a um fenótipo, a uma proteína ou a um fragmento de DNA, cuja presença num conjunto de genótipos se manifesta como polimórfica, sendo suscetível de ser utilizado, em combinação com outros marcadores, como característico de um determinado genótipo (O'Brien, 1990).

Os marcadores genéticos podem classificar-se em três grupos: morfológicos, cromossómicos e moleculares. Os marcadores moleculares podem ainda dividir-se em marcadores bioquímicos e marcadores de DNA (Matos, 2006).

#### **1.6.2.1. Marcadores de DNA**

Os marcadores de DNA pretendem detetar diferenças nucleotídicas ao nível da sequência de DNA e podem ser obtidos mediante hibridação de DNA, como os *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLPs), ou a partir da técnica da reação em cadeia da polimerase

(PCR), como os *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPDs), os *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLPS), os *Simple Sequence Repeats* (SSRs), entre outros (Matos, 2006).

Os avanços na biologia molecular levaram ao desenvolvimento de novas técnicas, as quais permitiram desenvolver um grande número de marcadores de DNA, e estudar, de formas muito diversas, os polimorfismos ao nível do DNA (Matos, 2006).

#### **1.6.2.1.1. PCR-RFLP**

A técnica de PCR tem como base a propriedade do DNA poder ser desnaturado quando se encontra numa solução líquida, a uma temperatura elevada, e replicado na presença de uma polimerase termoestável e de *primers* adequados, permitindo a amplificação *in vitro* de um fragmento ou sequência compreendida entre dois *primers*, sempre que estes se localizem em posições antiparalelas (Mullis *et al.*, 1986). O aumento exponencial do número de cópias de DNA é realizado em termocicladores, mediante um programa cíclico de: desnaturação do DNA molde (92-95 °C), etapa na qual as ligações de hidrogénio entre as duas cadeias complementares de DNA se rompem e a dupla cadeia é aberta para permitir que atue a polimerase; de hibridação dos *primers* (25-65 °C), na qual estes se ligam às suas sequências complementares; e de extensão (72 °C), etapa na qual os *primers* usam a cadeia com a qual hibridaram como molde, ocorrendo síntese de DNA, mediada pela polimerase. Esta técnica revelou-se essencial em muitas áreas da biologia, na medida em que permitiu desenvolver uma série de métodos para a obtenção de marcadores moleculares baseados na variabilidade existente nas sequências de DNA (Powledge, 2004).

Os RFLPs constituem marcadores moleculares cuja deteção depende da existência de variações nucleotídicas, em locais de restrição reconhecidos por endonucleases específicas (Griffiths *et al.*, 2000). A variação é detetada em função dos diferentes tamanhos dos fragmentos de DNA digeridos, que hibridam com a sonda, sendo que os fragmentos de diferentes dimensões se devem a alterações na sequência alvo reconhecidas pelas endonucleases de restrição ou a uma inserção ou deleção que afeta a zona de reconhecimento da sonda, detetando-se, assim, polimorfismos entre os genótipos estudados. A natureza codominante e a quantidade de DNA requerida constituem as principais vantagens da utilização de RFLPs. Em contrapartida, o investimento económico e de tempo limitam a sua utilização (Matos, 2006).

A análise genética baseada nas técnicas de PCR-RFLP combina a metodologia utilizada na técnica de PCR com a metodologia utilizada na técnica de marcadores RFLPs e é amplamente utilizada em estudos que têm como objetivo a genotipagem de SNPs (Rasmussen, 2012). O primeiro passo na análise por PCR-RFLP é a amplificação do fragmento de DNA que contém o polimorfismo. Em seguida efetua-se a restrição do fragmento amplificado por uma endonuclease de restrição adequada, sendo que a presença ou ausência do local de restrição reconhecido pela enzima resulta na formação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. A identificação do polimorfismo é depois feita por resolução dos fragmentos de restrição em gel de agarose. A metodologia de PCR-RFLP é sensível e não requer equipamentos avançados nem de elevado custo, no entanto a análise genética é relativamente demorada, uma vez que implica a realização de várias etapas (Ota *et al.*, 2007).

## **Capítulo 2 – Objetivos**



## **2. Objetivos**

O presente trabalho teve como objetivo estudar a possível influência de um polimorfismo genético no gene *hOGG1* (Ser326Cys), no dano e na capacidade de reparação do DNA em humanos, em resposta a 16 semanas de exercício físico combinado. Para tal, pretendeu-se:

- Avaliar o efeito do exercício físico nos danos basais do DNA, nomeadamente nas quebras nas cadeias do DNA (DNA SBs), e nos danos oxidativos (*FPG-sensitive sites*), bem como na capacidade de reparação por excisão de bases do DNA, através da atividade da enzima OGG1, utilizando o ensaio do cometa, realizado em linfócitos humanos;
- Determinar o polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1* através da metodologia PCR-RFLP, extraíndo DNA a partir de sangue total;
- Relacionar o efeito do exercício físico nos danos e na capacidade de reparação do DNA com o polimorfismo *hOGG1* Ser326Cys.



## **Capítulo 3 – Materiais e Métodos**



### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Amostra**

O estudo realizado foi efetuado em humanos voluntários no projeto “O papel do exercício físico na redução dos danos de DNA em linfócitos humanos: possível influência do stress oxidativo e da capacidade de reparação do DNA”, realizado no Departamento de Ciências do Desporto, Exercício e Saúde da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. A amostra foi constituída por 56 indivíduos caucasianos, 29 do sexo masculino e 27 do sexo feminino, saudáveis e com idades entre os 40 e os 75 anos. Todos os participantes foram submetidos a 16 semanas de exercício físico combinado.

Antes da inclusão no estudo, os indivíduos foram cuidadosamente avaliados através de um questionário médico, e sujeitos a uma entrevista individual, na qual foram administrados questionários (Anexo 1). Os critérios de inclusão compreenderam indivíduos com idade igual ou superior a 40 anos, e sem qualquer condição de saúde que pudesse interferir com o desempenho na prova de exercício cardiorrespiratória. Relativamente aos critérios de exclusão, estes compreenderam implantes de próteses metálicas, pacemakers artificiais, indivíduos que necessitem de ajuda para se movimentarem, e doenças metabólicas ou endócrinas que afetem o sistema músculo-esquelético.

Os procedimentos experimentais foram aprovados na sequência da Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial, e foram realizados com a aprovação do Comité de Ética do Centro de Investigação em Desporto, Saúde e Desenvolvimento Humano, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (referência nº 052012). Foi obtido o consentimento informado, por escrito, de cada participante, permitindo a utilização dos dados obtidos neste projeto.

Os participantes foram submetidos a uma avaliação antropométrica e à colheita de amostras de sangue, antes e após as 16 semanas de exercício físico.

##### **3.1.1. Avaliação antropométrica**

A altura (cm) e o peso corporal total (kg) dos indivíduos foram avaliados de acordo com as normas internacionais de avaliação antropométrica. A altura foi aferida através de um estadiómetro (Cabral, modelo 14) com uma escala de 0,10 cm, e o peso foi aferido utilizando

uma balança digital (Philips, HF 351/00) com aproximação de 0,1 kg. Enquanto as medições foram efetuadas, os indivíduos removeram os sapatos e as meias, usando apenas calções e *t-shirt*.

Posteriormente calculou-se o índice de massa corporal (IMC) de cada indivíduo, através da divisão do peso, em quilogramas, pelo quadrado da altura, em metros ( $\text{kg/m}^2$ ) (WHO, 2000).

### **3.1.2. Colheita de amostras de sangue**

A cada indivíduo colheu-se, por venipuntura, uma amostra de aproximadamente 10 mL de sangue venoso. As amostras foram colhidas em condições de jejum, entre as 08:30 e as 10:00 horas, para tubos de ensaio com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Vacutainer®). Para evitar a possível influência da atividade física nas variáveis analisadas, os indivíduos foram informados para não praticarem atividade física moderada ou intensa nas 24 horas precedentes à colheita.

O processamento das amostras foi realizado cerca de 1 hora e 30 minutos após a colheita. A um tubo de ensaio com sangue total retiraram-se cerca de 300  $\mu\text{L}$  e transferiram-se para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, o qual foi armazenado a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , e utilizado para posterior extração de DNA genómico. O restante volume da amostra foi utilizado para realizar o isolamento de linfócitos.

#### **3.1.2.1. Isolamento de linfócitos**

Adicionaram-se 9 mL de tampão fosfato-salino (PBS) (Gibco™, Life Technologies) (a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ), a 9 mL da amostra de sangue, previamente obtida, e homogeneizou-se. Adicionaram-se 18 mL de Lymphoprep™ a um tubo de centrífuga de 50 mL de fundo cónico, no qual posteriormente se resvalou a amostra. Centrifugou-se durante 20 minutos a 700  $\text{xg}$ , obtendo-se diferentes fases de separação. Removeu-se o anel de linfócitos com uma pipeta de Pasteur e transferiu-se para um tubo de centrífuga de 15 mL contendo 10 mL de PBS (a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ). Homogeneizou-se, e centrifugou-se durante 10 minutos a 2000  $\text{xg}$ . Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 10 mL de PBS (a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ).

A solução de linfócitos foi dividida em dois tubos, assim transferiram-se 125  $\mu\text{L}$  para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, para posterior utilização no ensaio do cometa *in vivo*, e o

restante volume para um tubo de centrífuga de 15 mL, para posterior utilização no ensaio de reparação por excisão de bases do DNA *in vitro*. As amostras foram armazenadas a -80 °C.

### **3.1.3. Exercício físico**

Os indivíduos realizaram um programa de exercício físico combinado (exercício de força combinado com exercício aeróbio) ao longo de 16 semanas, com 3 sessões por semana, cada sessão com a duração de 60 a 75 minutos, em dias não consecutivos. Cada sessão foi dividida em três componentes: 25 a 30 minutos de exercício aeróbio, 30 a 35 minutos de exercício de força, e 5 a 10 minutos de alongamentos e retorno à calma. O exercício aeróbio consistiu em exercícios tais como: caminhada, corrida, bicicleta, remo e elíptica, a uma intensidade progressiva entre 55 e 75% da frequência cardíaca de reserva. Os exercícios de força consistiram em: supino, prensa de pernas, extensão e flexão de pernas, *latissimus*, abdominais e flexão de braços, a uma intensidade entre 65 a 75% de uma repetição máxima. Os indivíduos realizaram 2 séries de 10 a 15 repetições nas primeiras quatro semanas, e 3 séries de 10 a 15 repetições nas semanas seguintes. No final de cada sessão realizaram-se alongamentos.

Para assegurar os efeitos do programa de exercício, foi obrigatória uma assiduidade superior a 75%.

### **3.2. Ensaio do Cometa**

O ensaio do cometa *in vivo* permitiu avaliar qual o efeito do exercício físico nos danos basais do DNA, nomeadamente nas quebras nas cadeias do DNA (DNA SBs), e nos danos oxidativos (*FPG-sensitive sites*) através da atividade da enzima FPG. Enquanto que o ensaio de reparação por excisão de bases do DNA *in vitro*, baseado no ensaio do cometa, permitiu avaliar o efeito do exercício físico na capacidade de reparação do DNA, através da atividade da enzima OGG1. Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos descritos por Collins e Dusinska (2002), e por Gaivao e seus colaboradores (2009), respetivamente, com pequenas modificações introduzidas.

As lâminas utilizadas ao longo do ensaio foram preparadas com 24 horas de antecedência. Estas foram submersas, na vertical, numa solução de agarose *normal melting point* (NMP) (Gibco™, Life Technologies) a 1% (p/v), preparada com água destilada, e mantida a uma

temperatura de 40 °C. Limpou-se uma das faces e deixou-se secar à temperatura ambiente, na posição horizontal. Identificaram-se as lâminas.

### **3.2.1. Ensaio do cometa *in vivo***

#### **3.2.1.1. Incorporação das células em agarose**

Adicionaram-se 100 µL da solução de linfócitos a um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, e centrifugou-se a 200 xg, durante 3 minutos, a 4 °C. Removeu-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o *pellet* em 280 µL de solução de agarose *low melting point* (LMP) (Gibco™, Life Technologies) a 1% (p/v), preparada com PBS, a 37 °C. Retiraram-se 140 µL, e em cada lâmina pré-revestida anteriormente, repartiu-se o volume por duas gotas de 70 µL cada. Cobriu-se cada gota com uma lamela 18 x 18 mm, e incubou-se durante 5 minutos, a 4 °C. Removeram-se as lamelas cuidadosamente, após a solidificação dos géis.

O número recomendado de células num gel é de cerca de  $2 \times 10^4$  (Collins, 2004). Uma vez que o protocolo descrito se encontra estandardizado para o número recomendado de células num gel, não foi efetuada contagem de células.

De notar que foram necessárias duas lâminas por amostra, uma para avaliar os danos basais do DNA e outra para incubação com a enzima FPG, para avaliar os danos oxidativos. Cada lâmina contém dois géis.

#### **3.2.1.2. Lise**

As lâminas foram colocadas, na vertical, em tinas de coloração, com 1 mL de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich) e 100 mL de solução de lise (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris base, ajustado a pH 10 com 10 M NaOH, a 4°C), e mantidas no escuro durante pelo menos 1 hora, a 4 °C.

#### **3.2.1.3. Tratamento enzimático**

Nesta etapa, uma das duas lâminas correspondentes a cada amostra sofre ação enzimática pela enzima FPG (fornecida por A. R. Collins).

Retiraram-se as lâminas do tampão de lise, e efetuaram-se três lavagens sucessivas de 5 minutos cada, com tampão F (40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA, ajustado a pH 8 com 6 M KOH, a 4°C), a uma temperatura de 4 °C.

Efetuuou-se a diluição da enzima FPG em tampão F (10 µL de solução de enzima em 300 µL de tampão F), e adicionaram-se 50 µL de solução enzimática, ou de tampão F no caso das lâminas relativas ao controlo, a cada gel. Cobriram-se os géis com lamelas 22 x 22 mm. Colocaram-se as lâminas em câmara húmida, e incubou-se durante 30 minutos, a 37 °C. De seguida, retiraram-se as lâminas da estufa, e cuidadosamente, removeram-se as lamelas dos géis.

#### **3.2.1.4. Tratamento alcalino**

Colocaram-se as lâminas numa tina de eletroforese horizontal, que continha solução de eletroforese (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, dissolvidos em água destilada, pH>13), durante 40 minutos, a uma temperatura de 4 °C, no escuro.

#### **3.2.1.5. Eletroforese**

Ligou-se a tina de eletroforese a um conversor configurado a uma voltagem constante de 25 V e 300 mA (0,8 V/cm), durante 30 minutos, a 4 °C.

#### **3.2.1.6. Neutralização**

Retiraram-se as lâminas da tina de eletroforese, e colocaram-se em tinas de coloração. Procedeu-se à lavagem das lâminas com PBS, durante 10 minutos, a uma temperatura de 4 °C. De seguida, repetiu-se o processo de lavagem com água destilada, a 4 °C, durante 10 minutos. Retiraram-se as lâminas, e deixaram-se secar à temperatura ambiente.

#### **3.2.1.7. Coloração**

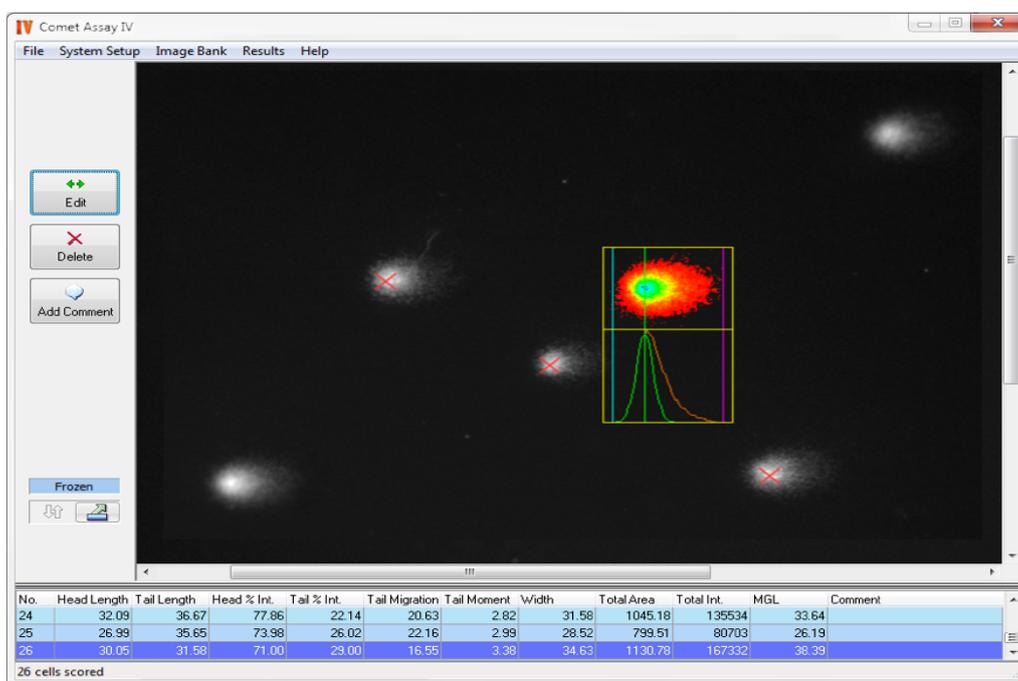
Adicionaram-se 20 µL de brometo de etídio (BrEt) (20 µg/mL) (Sigma Chemical Co.) a cada gel, e cobriu-se com uma lamela 22 x 22 mm, imediatamente antes da visualização ao microscópio.

**3.2.1.8. Visualização ao microscópio de fluorescência e Análise**

Visualizaram-se as lâminas ao microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse E400, equipado com um filtro G-2A (Nikon), adequado para o brometo de etídio. Utilizou-se a objetiva de 40x.

Analisaram-se, aleatoriamente, 50 cometas por gel, através do *software* Comet Assay IV™ (Perceptive Instruments) (Figura 4). Dentro dos diferentes parâmetros calculados pelo *software*, o parâmetro escolhido para análise foi a percentagem de DNA na cauda do cometa, ou *tail intensity* (% TI), uma vez que existe uma relação linear com a frequência de quebras no DNA, e utiliza uma medida quantitativa de 0 a 100% (Collins, 2004).

Os danos basais (DNA SBs) correspondem ao cálculo da média de todos os valores de % TI obtidos pelo *software* para cada amostra. Enquanto que os danos oxidativos (*FPG-sensitive sites*) são calculados através da subtração do valor obtido para os danos basais ao cálculo da média de todos os valores de % TI obtidos pelo *software* relativos ao tratamento enzimático com FPG para cada amostra (Collins *et al.*, 2008).



**Figura 4** - Imagem representativa do funcionamento do *software* Comet Assay IV™ (Perceptive Instruments).

### **3.2.2. Ensaio de reparação por excisão de bases do DNA *in vitro***

#### **3.2.2.1. Preparação do extrato**

A capacidade de reparação do DNA foi estudada em extratos enzimáticos obtidos a partir dos linfócitos de cada indivíduo, através da atividade da enzima OGG1, que é a principal enzima responsável pela excisão da 8-oxoG, na via de reparação por excisão de bases.

Ressuspendeu-se a solução obtida após o isolamento de linfócitos, e centrifugou-se a 700 xg, durante 10 minutos, a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 10 mL de tampão A (45 mM HEPES, 0,4 M KCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 10% glicerol (v/v), ajustado a pH 7,8 com 6 M KOH), diluído 3 vezes, e efetuou-se a contagem do número de células. Centrifugou-se a 700 xg, durante 5 minutos, a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 20 µL de tampão A por cada 10<sup>6</sup> de células, e dividiu-se a suspensão celular em alíquotas de 50 µL. Congelaram-se as alíquotas em nitrogénio líquido, e armazenaram-se a -80 °C.

No dia em que se realizou o ensaio os extratos foram descongelados, e adicionaram-se 12 µL de solução de tampão A com 1% de Triton<sup>TM</sup> X-100 (Sigma-Aldrich), por cada 50 µL de amostra. Incubou-se no gelo, durante 5 minutos. Centrifugou-se a 14000 xg, durante 5 minutos, a 4 °C. Adicionaram-se 50 µL de sobrenadante a 4 volumes (200 µL) de tampão F. Ressuspendeu-se e manteve-se no gelo até à etapa de reação.

De notar que foi preparada uma solução de controlo negativo, semelhante ao extrato, mas sem células, com 50 µL de tampão A, 12 µL de solução de tampão A com 1% de Triton<sup>TM</sup> X-100 (Sigma-Aldrich), e 200 µL de tampão F.

#### **3.2.2.2. Preparação do substrato**

Utilizou-se uma linha celular aderente de adenocarcinoma de colón humano, Caco-2 (CLS, AG, Eppelheim, Alemanha), mantida em meio de cultura (DMEM, suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10% (v/v) de soro fetal bovino, 200 U/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina), a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram manipuladas numa câmara de fluxo laminar de classe II (Faster, BH-EN 2004).

As células Caco-2 foram semeadas em placas para cultura de células com 12 poços a uma densidade de 10<sup>5</sup> células/mL. Após atingirem uma confluência de cerca de 80 a 90%, descartou-

se o meio, e lavaram-se as células com PBS. De forma a induzir danos oxidativos no DNA, as células subconfluentes foram submetidas a um tratamento com paraquato (8  $\mu\text{M}$ ) (Sigma Chemical Co.), durante 24 horas, a 37 °C. A concentração de paraquato foi escolhida após terem sido realizados vários ensaios utilizando diferentes concentrações, tendo por base o estudo efetuado por Dusinska e seus colaboradores (1998).

Decorrido o tempo de exposição ao paraquato, este foi removido, e efetuou-se a lavagem das células com PBS e posterior desagregação das células com 1 mL de solução de tripsina-EDTA a 0,05% (v/v), durante cerca de 5 minutos, a 37 °C. De seguida, adicionou-se 1 mL de meio de cultura com soro, com o objetivo de inativar a tripsina. Transferiram-se as células para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.

De notar a que a par do substrato exposto ao paraquato, foi também preparado um substrato não exposto ao paraquato, para ser utilizado como controlo.

### **3.2.2.3. Incorporação das células em agarose e Lise do substrato**

As células obtidas na preparação do substrato foram centrifugadas durante 5 minutos, a 200 xg. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de PBS. Centrifugou-se novamente a 200 xg, durante 5 minutos. Removeu-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o *pellet* em 280  $\mu\text{L}$  de solução de agarose LMP (Gibco™, Life Technologies) a 1% (p/v), preparada com PBS, a 37 °C. A restante metodologia utilizada foi igual à descrita na secção 3.2.1.1. e 3.2.1.2..

De notar que foram realizadas réplicas, o que implicou a utilização de duas lâminas por amostra.

### **3.2.2.4. Reação**

Retiraram-se as lâminas do tampão de lise, e efetuaram-se três lavagens sucessivas de 5 minutos cada, com tampão F, a uma temperatura de 4 °C.

A etapa de reação corresponde à incubação do extrato enzimático na presença do substrato. Assim, adicionaram-se 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático de OGG1, ou de solução controlo no caso das lâminas relativas ao controlo, a cada gel. A restante metodologia utilizada foi igual à descrita na secção 3.2.1.3..

A metodologia utilizada nas restantes etapas corresponde à metodologia descrita anteriormente, da secção 3.2.1.4. até à secção 3.2.1.8..

A capacidade de reparação do DNA foi calculada de acordo com Soares e seus colaboradores (2015a), representada pela fórmula:

$$\text{Atividade OGG1} = (\text{Extrato} - \text{Controlo 1}) - (\text{Controlo 2} - \text{Controlo 1}),$$

na qual a atividade da enzima OGG1 é expressa em % TI. Os valores obtidos correspondem ao cálculo da média de todos os valores de % TI obtidos pelo *software* para cada amostra, ou controlo. Assim o extrato representa o extrato enzimático de OGG1 incubado com o substrato exposto ao paraquato (paraquato/extrato), o controlo 1 representa a solução controlo incubada com o substrato não exposto ao paraquato (sem paraquato/tampão), e o controlo 2 representa a solução controlo incubada com o substrato exposto ao paraquato (paraquato/tampão).

### **3.3. Marcadores Moleculares**

#### **3.3.1. Extração de DNA genómico**

A extração de DNA genómico a partir de sangue total foi efetuada utilizando o *kit* NZY Blood gDNA Isolation (NZYTech), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante, com pequenas modificações introduzidas de forma a otimizar a extração.

##### **3.3.1.1. Lise celular**

Pipetaram-se 200 µL de sangue total para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, previamente identificado. Adicionaram-se 25 µL da solução de Proteinase K.

De seguida, adicionaram-se 200 µL de tampão NBL e agitou-se vigorosamente no vórtex. Incubou-se a 70 °C, durante 20 minutos.

##### **3.3.1.2. Remoção do RNA**

Adicionaram-se 20 µL da solução de RNase A (20 mg/ml). Ressuspendeu-se e incubou-se durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

### **3.3.1.3. Adição de etanol**

Adicionaram-se 210  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto e misturou-se de imediato, por inversão, para se obter uma solução homogénea.

### **3.3.1.4. Ligação do DNA**

Pipetaram-se 650  $\mu\text{L}$  da mistura obtida anteriormente e aplicou-se à coluna (NZYSpin Blood Column), colocada num tubo coletor de 2 mL. Centrifugou-se durante 1 minuto à velocidade máxima. Descartou-se e transferiu-se a coluna para um novo tubo coletor.

### **3.3.1.5. Lavagem da membrana de sílica**

Adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de tampão NW1 à coluna. Centrifugou-se durante 1 minuto à velocidade máxima. Descartou-se e transferiu-se a coluna para um novo tubo coletor.

Adicionaram-se 600  $\mu\text{L}$  de tampão NW2 à coluna, e incubou-se durante 2 minutos, à temperatura ambiente. Centrifugou-se durante 1 minuto à velocidade máxima. Descartou-se a fase líquida contida no tubo coletor.

### **3.3.1.6. Secagem da membrana de sílica**

Reinseriu-se a coluna no tubo coletor vazio e centrifugou-se durante 3 minutos à velocidade máxima

### **3.3.1.7. Eluição do DNA**

Inseriu-se a coluna seca num tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, previamente identificado, e adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de tampão NE, previamente aquecido a 70 °C, diretamente na membrana da coluna. Incubou-se durante 2 minutos à temperatura ambiente e de seguida, centrifugou-se durante 2 minutos à velocidade máxima.

Descartou-se a coluna e armazenou-se o DNA genómico em solução a 4 °C.

### **3.3.2. Análise quantitativa e qualitativa do DNA extraído**

A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000, utilizando 1 µL de amostra. Determinou-se a absorvância a um comprimento de onda de 260 nm ( $A_{260}$ ) e 280 nm ( $A_{280}$ ), em cada uma das amostras. A determinação da absorvância a 260 nm permitiu a quantificação do DNA, efetuada seguindo a fórmula  $I(A_{260})=50 \mu\text{g/mL}$ . A razão  $A_{260}/A_{280}$  permitiu estimar a pureza do DNA, sendo que valores entre 1,8 e 2,0 são indicadores de pureza, e valores inferiores ou superiores indicam que ocorreu contaminação.

Paralelamente, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), com o objetivo de comprovar a integridade e a qualidade do DNA.

Foram feitas diluições das amostras de DNA a 5 ng/µL, em alíquotas de 200 µL. Armazenaram-se as amostras a -20 °C.

### **3.3.3. PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*)**

O polimorfismo genético no gene *hOGG1* (Ser326Cys) foi determinado através da metodologia PCR-RFLP, tendo por base o protocolo descrito por Shen e colaboradores (2007), com pequenas modificações introduzidas.

Num volume final de 25 µL por reação, misturaram-se 5 µL de DNA genómico (5 ng/µL), 1 µL de cada *primer* (10 µM) (*OGG1\_F* 5'- ACTGTCACTAGTCTCACCAG -3' e *OGG1\_R* 5'- TGAATTCGGAAGGTCCTTGGGGAT -3'), 12,5 µL de DFS-Taq Master Mix (Frlabo) e 5,5 µL de água destilada ultrapura (Qiagen).

A reação de amplificação realizou-se num termociclador Veriti™ 96-Well (Applied Biosystems), seguindo o programa:

- Ciclo inicial de desnaturação de 2 minutos, a 94 °C;
- 40 ciclos constituídos por três fases distintas:
  - Desnaturação a 94 °C, durante 15 segundos;
  - Hibridação a 60 °C, durante 30 segundos;
  - Extensão a 72 °C, durante 35 segundos;
- Ciclo terminal de extensão de 10 minutos, a 72 °C.

Após a reação de amplificação, confirmou-se através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), a presença de um fragmento com 200 pb. O produto de amplificação foi conservado a -20 °C até à sua digestão com a enzima de restrição adequada.

Na restrição enzimática, misturaram-se 5 µL do produto de amplificação, 23 µL de água destilada ultrapura (Qiagen), 2 µL de tampão G e 1,5 µL (15 U) de enzima de restrição *Fnu4HI* (Thermo Scientific). Agitou-se no vórtex e fez-se um *spin down* durante alguns segundos. Incubou-se a 37 °C, durante 24 horas.

### **3.3.3.1. Resolução dos produtos de restrição em géis de agarose**

A separação dos fragmentos de DNA resultantes da restrição enzimática foi efetuada mediante eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v), com uma voltagem constante de 80 V, durante 2 horas. O tampão de eletroforese utilizado foi o TBE (0,089 M Tris base, 0,089 M Ácido bórico a pH 8,3, 2 mM EDTA). Utilizou-se um tampão para a deposição das amostras constituído por glicerol, azul de bromofenol e TBE 10x.

Para visualização dos fragmentos separados na eletroforese, os géis foram corados numa solução de brometo de etídio (Sigma Chemical Co.) (500 mL dH<sub>2</sub>O/40 µL de BrEt), que se intercala entre as cadeias de DNA, emitindo fluorescência quando exposto a raios UV, permitindo a visualização das bandas no gel. Realizou-se a captação da imagem com o Molecular Imager<sup>®</sup> Gel DOC<sup>™</sup> XR+, através do *software* Image Lab<sup>™</sup> (Bio-Rad).

O tamanho dos fragmentos de DNA foi calculado em função da sua migração, quando comparada com a migração dos fragmentos do marcador de peso molecular GeneRuler<sup>™</sup> 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), cujo tamanho dos fragmentos é conhecido (3000, 2000, 1500, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200 e 100 pb).

## **3.4. Análise Estatística**

Os dados obtidos foram analisados no programa IBM<sup>®</sup> SPSS Statistics<sup>®</sup>, versão 24.0.

A caracterização geral da amostra foi realizada através de análise univariada.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade das variáveis numéricas, nomeadamente do IMC, DNA SBs, *FPG-sensitive sites* e Reparação, tendo em conta a dimensão da amostra (n=56). A diferença entre as médias, em variáveis normais, foi verificada através do teste T para amostras emparelhadas. Enquanto que em variáveis não normais, a

diferença entre as médias foi verificada através dos testes não paramétricos de Wilcoxon e dos Sinais.

A distribuição dos fatores sociodemográficos entre os grupos de polimorfismos genéticos no gene *hOGG1* (Ser326Cys) foi avaliada através do teste do qui-quadrado de Pearson para variáveis categóricas.

Utilizaram-se os testes não paramétricos de Wilcoxon e dos Sinais para comparar os valores obtidos para as variáveis numéricas antes e após as 16 semanas de exercício físico, em cada um dos grupos de polimorfismos, uma vez que as variáveis em análise não cumpriram os requisitos da normalidade.

Com o objetivo de comparar as variáveis numéricas entre os grupos de polimorfismos, antes e após as 16 semanas de exercício físico, utilizou-se o teste T para duas amostras independentes, sempre que a variável em análise cumpriu os requisitos da normalidade. Caso contrário, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

A correlação de Spearman foi utilizada para verificar a associação entre as variáveis numéricas, em cada um dos grupos de polimorfismos, antes e após as 16 semanas de exercício físico.

Todos os testes de inferência estatística foram realizados para um nível de significância de 0,05 (Pestana e Gageiro, 2014).



# **Capítulo 4 – Resultados e Análise de** **Resultados**



#### 4. Resultados e Análise de Resultados

A caracterização da amostra, realizada através de análise univariada, encontra-se na Tabela 1. A amostra foi constituída por 56 indivíduos caucasianos, 27 do sexo feminino (48,2%) e 29 do sexo masculino (51,8%), cuja média de idades era de 55,9 e respetivo desvio padrão (DP) 10,3. A amostra foi dividida em duas faixas etárias, uma constituída por 44 indivíduos com idade inferior a 65 anos (78,6%), e outra constituída por 12 indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos (21,4%).

**Tabela 1** - Caracterização da amostra.

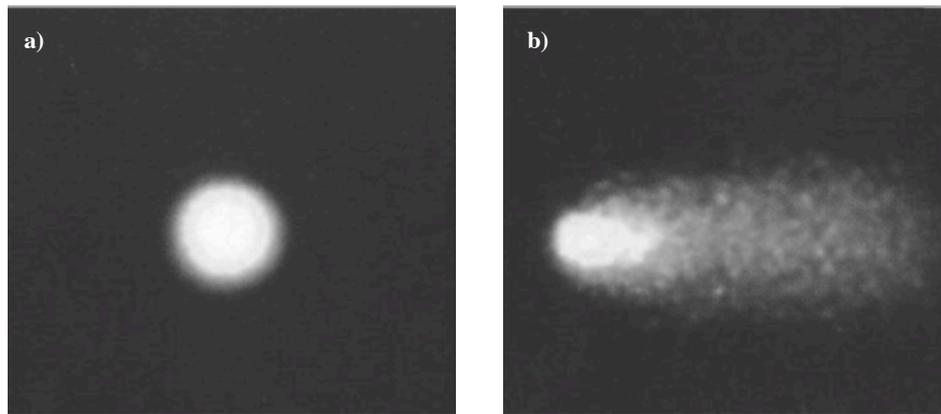
	<b>n (%)</b>	<b>média ± DP</b>
<b>Total</b>	56	-
<b>Sexo</b>		
Feminino	27 (48,2%)	-
Masculino	29 (51,8%)	-
<b>Idade</b>	-	55,9 ± 10,3
<b>Faixa Etária</b>		
< 65	44 (78,6%)	-
≥ 65	12 (21,4%)	-

Os participantes foram submetidos a 16 semanas de exercício físico combinado, tendo sido efetuada uma avaliação antropométrica e colheita de amostras de sangue, antes e após esta intervenção.

O ensaio do cometa *in vivo* possibilitou avaliar qual o efeito do exercício físico nos danos basais do DNA, particularmente nas quebras nas cadeias do DNA (DNA SBs), e nos danos oxidativos (*FPG-sensitive sites*). O ensaio de reparação por excisão de bases do DNA *in vitro*,

baseado no ensaio do cometa, possibilitou avaliar o efeito do exercício físico na capacidade de reparação do DNA.

Os ensaios foram realizados em linfócitos isolados a partir de amostras de sangue. Na Figura 5 podem observar-se imagens de cometas representativos de diferentes níveis de danos no DNA, obtidas através do *software* Comet Assay IV™ (Perceptive Instruments).



**Figura 6** - Imagens de cometas obtidos através do ensaio do cometa, realizado em linfócitos humanos: **a)** baixos níveis de danos no DNA; **b)** elevados níveis de danos no DNA.

A normalidade das variáveis numéricas, nomeadamente do IMC, DNA SBs, *FPG-sensitive sites* e Reparação, foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk.

O IMC expresso em  $\text{kg}/\text{m}^2$  relativo à amostra total era inicialmente de  $28,3 \pm 4,16$ . Após as 16 semanas de exercício físico o IMC aumentou para  $28,4 \pm 4,10$ , sendo que este aumento não foi significativo ( $p=0,320$ ). A diferença entre as médias foi verificada através do teste T para amostras emparelhadas.

Na Tabela 2 é possível analisar os valores obtidos para as variáveis DNA SBs, *FPG-sensitive sites* e Reparação, antes e após as 16 semanas de exercício físico. Os valores obtidos através da realização do ensaio do cometa, expressos em % TI, são relativos à amostra total e estão apresentados sobre a forma de média e respetivo DP.

Verifica-se que após as 16 semanas de exercício físico houve uma diminuição significativa ( $p<0,001$ ) dos danos basais do DNA (DNA SBs) e dos danos oxidativos (*FPG-sensitive sites*). Relativamente à capacidade de reparação do DNA houve igualmente uma diminuição, ainda

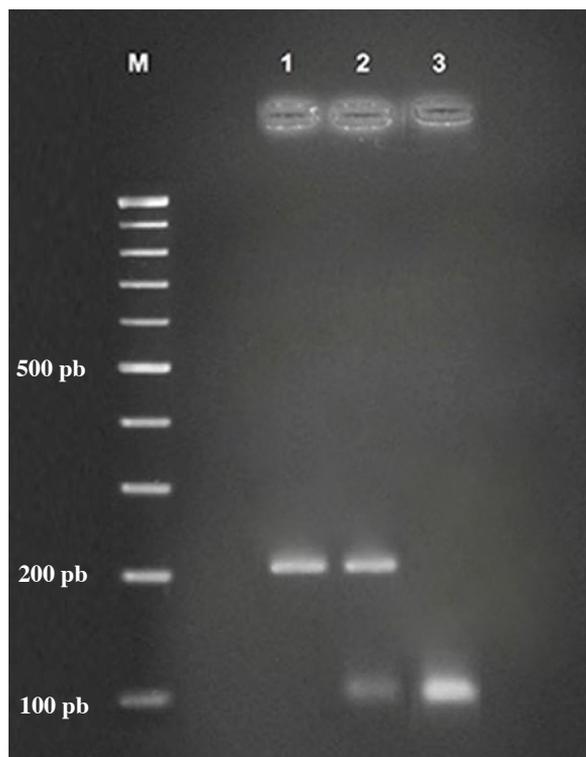
que não significativa ( $p=1$ ). De notar que a diferença entre as médias para as variáveis DNA SBs e Reparação foi verificada através do teste não paramétrico dos Sinais, enquanto que para a variável *FPG-sensitive sites* se utilizou o teste não paramétrico de Wilcoxon.

**Tabela 2** - Efeito do exercício físico nas variáveis obtidas através da realização do ensaio do cometa na amostra total.

	Antes (média $\pm$ DP)	Após (média $\pm$ DP)	P
DNA SBs (% TI)	4,39 $\pm$ 4,03	2,21 $\pm$ 1,63	<0,001
<i>FPG-sensitive sites</i> (% TI)	3,03 $\pm$ 2,32	1,73 $\pm$ 1,53	<0,001
Reparação (% TI)	4,76 $\pm$ 6,67	3,81 $\pm$ 3,29	1

O polimorfismo genético no gene *hOGG1* (Ser326Cys) foi determinado através da metodologia PCR-RFLP.

A enzima de restrição *Fnu4HI* clivou o DNA na sequência 5'-GCNGC-3'. O tamanho dos fragmentos de DNA obtidos foi calculado em função da sua migração, quando comparada com a migração dos fragmentos do marcador de peso molecular, cujo tamanho é conhecido. Os indivíduos homozigóticos Ser/Ser apresentavam uma banda intacta com 200 pb, enquanto que os indivíduos homozigóticos Cys/Cys apresentavam uma banda com 100 pb. Os indivíduos heterozigóticos Ser/Cys apresentavam ambas as bandas (200 pb e 100 pb). Na Figura 6 pode observar-se o resultado representativo da análise por PCR-RFLP.



**Figura 6** - Resultado representativo da análise por PCR-RFLP do polimorfismo genético no gene *hOGG1* (Ser326Cys): **1)** Homozigótico Ser/Ser; **2)** Heterozigótico Ser/Cys; **3)** Homozigótico Cys/Cys; **M)** Marcador de peso molecular.

Na Tabela 3 é possível verificar a distribuição dos genótipos e a frequência dos alelos em estudo na amostra. O número de indivíduos homozigóticos Ser/Ser foi de 35 (62,5%), enquanto que o número de indivíduos heterozigóticos Ser/Cys foi de 18 (32,1%), e de indivíduos homozigóticos Cys/Cys foi de 3 (5,40%). A frequência do alelo Ser foi 78,6% (n=88), enquanto que a frequência do alelo Cys foi 21,4% (n=24).

**Tabela 3** - Distribuição dos genótipos e frequência dos alelos de acordo com o polimorfismo *hOGG1* Ser326Cys na amostra.

	<b>Polimorfismo <i>hOGG1</i> Ser326Cys</b>	<b>n (%)</b>
<b>Genótipos</b>	Ser/Ser	35 (62,5%)
	Ser/Cys	18 (32,1%)
	Cys/Cys	3 (5,40%)
<b>Alelos</b>	Ser	88 (78,6%)
	Cys	24 (21,4%)

Os indivíduos homozigóticos Ser/Ser constituíram o grupo *wild-type*, enquanto que os restantes indivíduos, os heterozigóticos Ser/Cys e os homozigóticos Cys/Cys, constituíram o grupo mutante.

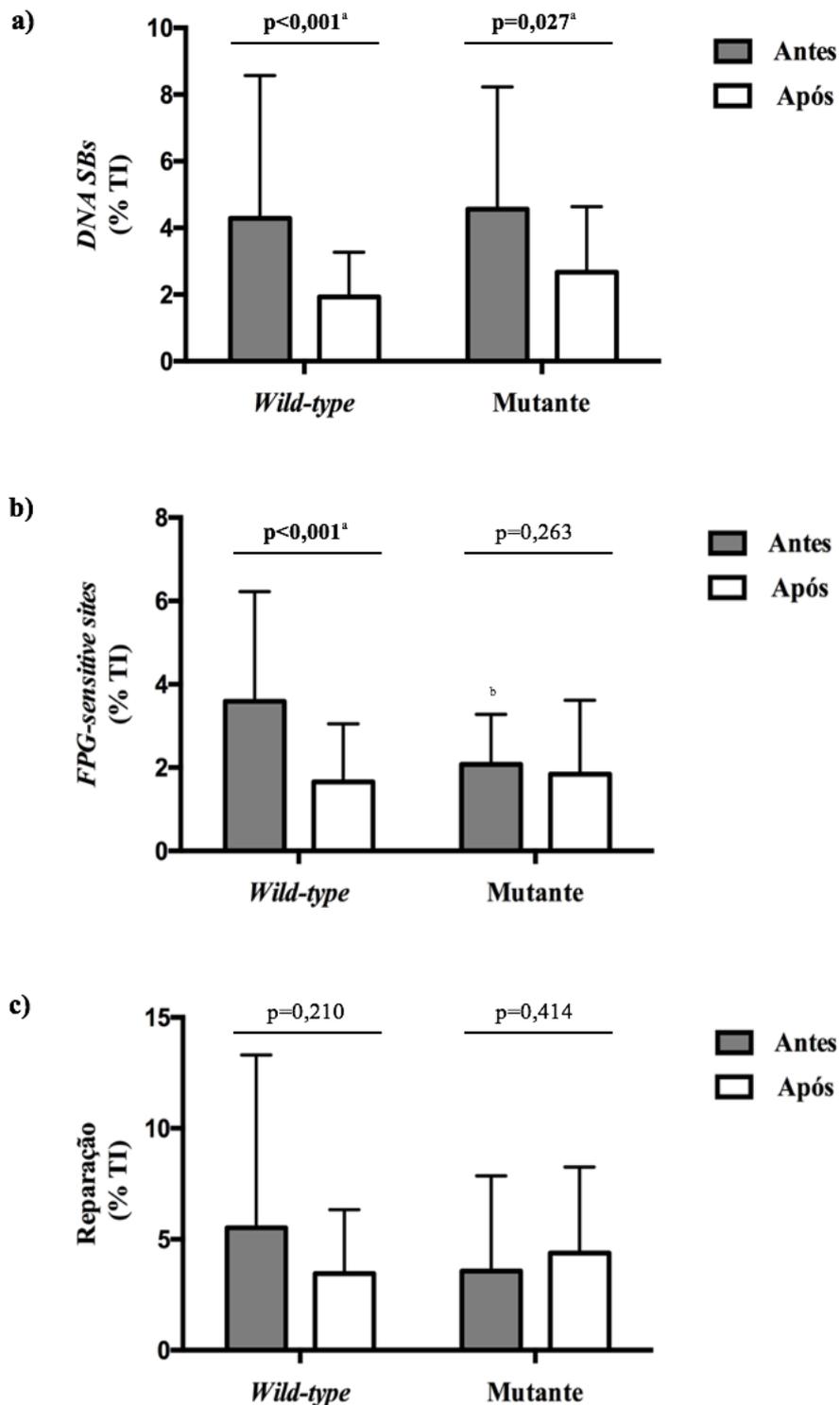
A distribuição de fatores sociodemográficos, como o sexo e a faixa etária, entre os grupos *wild-type* e mutante, foi avaliada através do teste do qui-quadrado de Pearson para variáveis categóricas.

O grupo *wild-type* era constituído por 60% de indivíduos do sexo masculino e 40% do sexo feminino. Enquanto que o grupo mutante era constituído por 38,1% de indivíduos do sexo masculino e 61,9% do sexo feminino ( $p=0,112$ ).

Relativamente à faixa etária, o grupo *wild-type* era constituído por 77,1% de indivíduos com idade inferior a 65 anos e 22,9% de indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos. Enquanto que o grupo mutante era constituído por 81% de indivíduos com idade inferior a 65 anos e 19% de indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos ( $p=0,737$ ).

Uma vez que os valores de  $p$  foram superiores a 0,05, foi possível concluir que a distribuição dos fatores sociodemográficos entre os grupos *wild-type* e mutante era homogénea.

Na Figura 7 pode observar-se o efeito das 16 semanas de exercício físico nas variáveis DNA SBs, *FPG-sensitive sites* e Reparação, nos grupos *wild-type* e mutante. Os valores destas variáveis são expressos em % TI, e estão apresentados sobre a forma de média  $\pm$  DP.



**Figura 7** - Efeito do exercício físico nas variáveis obtidas através da realização do ensaio do cometa (média  $\pm$  DP) nos grupos *wild-type* (homozigóticos Ser/Ser) e mutante (heterozigóticos Ser/Cys e homozigóticos Cys/Cys): **a)** DNA SBs expressa em % TI; **b)** FPG-sensitive sites expressa em % TI; **c)** Reparação expressa em % TI. <sup>a</sup>Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) antes e após as 16 semanas de exercício físico em cada grupo, analisadas através do teste dos Sinais e do teste de Wilcoxon. <sup>b</sup>Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, antes e após as 16 semanas de exercício físico, analisadas através do teste T para 2 amostras independentes e do teste de Mann-Whitney.

É possível observar que ocorreu uma diminuição significativa dos danos basais do DNA (DNA SBs), após as 16 semanas de exercício físico, em ambos os grupos. No grupo *wild-type* inicialmente o valor era de  $4,29 \pm 4,28$ , e posteriormente diminuiu para  $1,93 \pm 1,34$  ( $p < 0,001$ ). Enquanto que no grupo mutante o valor inicial era de  $4,56 \pm 3,67$  e diminuiu para  $2,67 \pm 1,97$  ( $p = 0,027$ ).

Relativamente aos danos oxidativos (*FPG-sensitive sites*) é também possível observar que ocorreu uma diminuição em ambos os grupos, após as 16 semanas de exercício físico, sendo que as diferenças são estatisticamente significativas apenas no grupo *wild-type* ( $p < 0,001$ ). Inicialmente o valor era de  $3,59 \pm 2,63$ , e posteriormente diminuiu para  $1,66 \pm 1,39$ .

No que diz respeito à capacidade de reparação do DNA verificou-se uma diminuição no grupo *wild-type*, após a prática de exercício físico. Enquanto que no grupo mutante se verificou o oposto, ou seja, após as 16 semanas de exercício físico a capacidade de reparação do DNA aumentou. Contudo não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em ambos os grupos.

De notar que se realizou ainda a comparação entre os grupos *wild-type* e mutante nas variáveis em estudo, antes e após as 16 semanas de exercício físico, e que se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no que diz respeito à variável de dano oxidativo (*FPG-sensitive sites*) ( $p = 0,006$ ), antes das 16 semanas de exercício físico.

Nas Tabelas 4 e 5 é possível verificar a associação entre as variáveis em estudo nos grupos *wild-type* e mutante, antes e após as 16 semanas de exercício físico, respetivamente. Esta associação foi verificada através da correlação de Spearman.

Após as 16 semanas de exercício físico verifica-se que no grupo *wild-type* existe uma correlação negativa ( $r = -0,399$ ) estatisticamente significativa ( $p = 0,020$ ) entre os danos basais do DNA (DNA SBs) e a Reparação, o que significa que à medida que a capacidade de reparação do DNA diminuiu, os danos basais do DNA tendem a aumentar. De notar que a correlação entre estas duas variáveis é fraca, uma vez que o valor de  $r$  foi  $-0,399$ .

Relativamente às restantes variáveis em estudo, não se verificam outras associações estatisticamente significativas.

## Capítulo 4 – Resultados e Análise de Resultados

**Tabela 4** - Correlações entre as variáveis em estudo nos grupos *wild-type* e mutante, antes das 16 semanas de exercício físico.

			DNA SBs (% TI)	FPG-sensitive sites (% TI)	Reparação (% TI)
<i>Wild-type</i>	DNA SBs (% TI)	r	-	0,054	0,230
	FPG-sensitive sites (% TI)	r	0,054	-	0,151
	Reparação (% TI)	r	0,230	0,151	-
Mutante	DNA SBs (% TI)	r	-	0,358	-0,121
	FPG-sensitive sites (% TI)	r	0,358	-	0,146
	Reparação (% TI)	r	-0,121	0,146	-

**Tabela 5** - Correlações entre as variáveis em estudo nos grupos *wild-type* e mutante, após as 16 semanas de exercício físico.

			DNA SBs (% TI)	FPG-sensitive sites (% TI)	Reparação (% TI)
<i>Wild-type</i>	DNA SBs (% TI)	r	-	0,158	<b>-0,399*</b>
	FPG-sensitive sites (% TI)	r	0,158	-	-0,115
	Reparação (% TI)	r	<b>-0,399*</b>	-0,115	-
Mutante	DNA SBs (% TI)	r	-	-0,212	-0,229
	FPG-sensitive sites (% TI)	r	-0,212	-	-0,229
	Reparação (% TI)	r	-0,229	-0,229	-

\* p<0,05

## **Capítulo 5 – Discussão**



## **5. Discussão**

A prática regular de exercício físico reduz o risco de doenças associadas ao estilo de vida (Yan *et al.*, 2011; Bassil e Gougeon, 2013; Lacza e Radak, 2013; Mellett e Bousquet, 2013; Strasser, 2013), aumenta a esperança média de vida (Carter *et al.*, 2007) e aumenta significativamente a qualidade de vida, sobretudo nos idosos (Brovold *et al.*, 2013; Frazzitta *et al.*, 2013). Por outro lado, a inatividade física encontra-se associada ao aparecimento de várias doenças, que acarretam elevados prejuízos para os sistemas de saúde de diversos países (Ding *et al.*, 2016).

Os efeitos do exercício físico são sistémicos e complexos (Radak *et al.*, 2008a), sendo que dependem do nível de treino dos indivíduos, das características do exercício, como tipo, intensidade, duração, volume e frequência (Kemi *et al.*, 2005; Matsuo *et al.*, 2014), e da eventual formação de ROS, associada a níveis elevados de 8-oxoG no DNA, peroxidação lipídica e carbonilação em resíduos de aminoácidos (Radak *et al.*, 2001).

Nos últimos 25 anos, o ensaio do cometa tornou-se um método de excelência no que diz respeito à avaliação do efeito do exercício físico nos danos do DNA (Davison, 2016).

O ensaio do cometa, sob condições alcalinas (pH>13), deteta quebras simples e duplas nas cadeias do DNA, locais de reparação incompletos e sítios álcali-lábeis em células eucarióticas (Burlinson *et al.*, 2007). A oxidação de bases no DNA pode ocorrer a uma frequência similar à das quebras nas cadeias do DNA (Collins *et al.*, 2008), pelo que a utilização de enzimas de reparação que detetam danos específicos no DNA, nomeadamente a FPG que deteta purinas oxidadas como a 8-oxoG, permitiu aumentar a sensibilidade do ensaio (Azqueta *et al.*, 2013).

A maioria dos estudos realizados através da realização do ensaio do cometa, tem-se centrado nos efeitos agudos do exercício físico nos danos basais (Hartmann *et al.*, 1994; Niess *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 1998; Mars *et al.*, 1998; Niess *et al.*, 1998; Palazzetti *et al.*, 2003; Mastaloudis *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Davison *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2006; Wierzba *et al.*, 2006; Reichhold *et al.*, 2009; Fogarty *et al.*, 2011; Fogarty *et al.*, 2013a; Fogarty *et al.*, 2013b; Gray *et al.*, 2014) e também nos danos oxidativos do DNA (Hartmann *et al.*, 1998; Moller *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2001; Briviba *et al.*, 2005; Tanimura *et al.*, 2008; Tanimura *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2010), concluindo que os exercícios de alta intensidade, de curta ou longa duração, causam um aumento dos danos no DNA.

A existência de danos no DNA é o primeiro passo para a ocorrência de mutações, cuja persistência depende determinantemente dos mecanismos de reparação do DNA. A 8-oxoG é o

biomarcador de dano oxidativo no DNA mais frequentemente utilizado, sendo que esta base oxidada pode ser excisada do DNA pela OGG1, através da via de reparação por excisão de bases (Wilson *et al.*, 2003).

O ensaio de reparação do DNA *in vitro*, baseado no ensaio do cometa, estima a atividade enzimática de um extrato celular incubado na presença de um substrato que contém danos induzidos no DNA, específicos para a via de reparação em estudo. As enzimas de reparação contidas no extrato reconhecem e eliminam os danos, originando quebras nas cadeias do DNA, detetadas através do ensaio do cometa (Gaivao *et al.*, 2009; Azqueta *et al.*, 2014).

No presente estudo, o efeito das 16 semanas de exercício físico combinado nos danos e na capacidade de reparação do DNA foi avaliado nos linfócitos dos indivíduos em estudo, através da realização do ensaio do cometa. O ensaio do cometa *in vivo* permitiu avaliar o efeito do exercício físico nos danos basais do DNA, nomeadamente nas quebras nas cadeias do DNA (DNA SBs), e nos danos oxidativos (*FPG-sensitive sites*) através da atividade da enzima FPG. Enquanto que o ensaio de reparação por excisão de bases do DNA *in vitro*, baseado no ensaio do cometa, permitiu avaliar qual o efeito do exercício físico na capacidade de reparação do DNA, através da atividade da enzima OGG1. O protocolo de exercícios utilizado seguiu as diretrizes recomendadas pelo Colégio Americano de Medicina Desportiva (Chodzko-Zajko *et al.*, 2009; Garber *et al.*, 2011).

Com base nos resultados obtidos, após a realização do ensaio do cometa, é possível verificar na Tabela 2 que houve uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) dos danos basais e dos danos oxidativos no DNA, em resposta ao exercício físico regular. A capacidade de reparação do DNA também diminuiu, ainda que não significativamente ( $p = 1$ ).

Os níveis moderados de ROS produzidos durante a prática de exercício físico regular podem ser responsáveis por alterações sistémicas que levam o organismo a adaptar-se (Radak *et al.*, 2008a). Esta adaptação proporciona níveis de proteção elevados, resultando num aumento da atividade de enzimas antioxidantes e de reparação do DNA, em baixos níveis de danos oxidativos e em níveis aumentados de resistência ao stresse oxidativo (Alessio e Goldfarb, 1988; Radak *et al.*, 2000; Radak *et al.*, 2002).

Existem vários estudos acerca das alterações subjacentes à prática de exercício físico regular. Os resultados obtidos em estudos relativos aos efeitos crónicos do exercício físico nos danos e na capacidade de reparação do DNA em ratos reúnem uma maior consensualidade. Um estudo levado a cabo por Nakamoto e seus colaboradores (2007) em ratos idosos com 21 meses de idade concluiu que após 2 meses de corrida regular numa passadeira ocorreu uma redução

significativa dos níveis de 8-oxoG no DNA nuclear e mitocondrial do fígado, acompanhada por uma sobrerregulação da OGG1 no núcleo. Enquanto que Radak e seus colaboradores (2007), num estudo semelhante, constataram que ocorreu um aumento da atividade da OGG1 no núcleo das fibras musculares vermelhas, e uma diminuição no núcleo das fibras musculares brancas e na mitocôndria de ambas as fibras musculares, indicando que a regulação da OGG1 no núcleo e na mitocôndria, bem como em diferentes tecidos, pode ocorrer de forma diferenciada como resultado da prática de exercício físico regular. Siu e a sua equipa realizaram um estudo em ratos com 2 meses de idade e após a prática de exercício físico regular durante 8 e 20 semanas concluíram que ocorreu um aumento da resistência a danos induzidos no DNA dos linfócitos. Os resultados obtidos às 8 semanas foram atribuídos a uma expressão elevada de enzimas antioxidantes, enquanto que a resistência conferida pela prática de exercício físico regular durante períodos mais longos foi atribuída à expressão elevada e conjunta de enzimas antioxidantes e de reparação (Siu *et al.*, 2011).

Por outro lado, os estudos realizados em humanos são pouco consensuais. Huang e seus colaboradores (2014) realizaram um estudo em mulheres jovens sedentárias e comprovaram que 12 semanas de prática regular de Tai-Chi resultaram num aumento dos níveis de OGG1, sem alteração dos níveis de 8-oxoG no plasma. Uma investigação semelhante à efetuada no presente estudo numa amostra constituída por 31 indivíduos saudáveis do sexo masculino, com idades entre os 40 e os 74 anos, submetida a 16 semanas de exercício físico combinado constatou que a par dos resultados obtidos no presente estudo, ocorreu uma diminuição significativa dos danos basais e dos danos oxidativos no DNA, bem como uma diminuição não significativa da capacidade de reparação do DNA. De notar que também foi verificado um aumento da capacidade antioxidante e uma diminuição dos níveis de peroxidação lipídica (Soares *et al.*, 2015b). Enquanto que um estudo realizado em idosos institucionalizados, com idades entre os 65 e os 98 anos, submetidos a 6 meses de exercício físico de força concluiu que ainda que tenha ocorrido um aumento significativo dos danos no DNA, ocorreu um aumento da resistência a danos induzidos no DNA, confirmado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Franzke *et al.*, 2015).

A diminuição significativa dos danos no DNA, em resposta às 16 semanas de exercício físico combinado, no presente estudo, pode dever-se ao aumento da resistência ao stresse oxidativo e/ou aumento da atividade de enzimas antioxidantes, fundamentado(s) pelos baixos níveis de ROS produzidos durante a prática de exercício físico regular, na medida em que a capacidade de reparação do DNA, estimada através da atividade da enzima OGG1, diminuiu.

O gene *hOGG1* é responsável por codificar a enzima OGG1 e tem sido alvo de vários estudos que comprovam que a presença de polimorfismos genéticos pode aumentar a suscetibilidade a danos no DNA. O polimorfismo Ser326Cys encontra-se entre os mais analisados e, embora os resultados sejam inconsistentes, os indivíduos portadores do alelo mutante (Cys) estão associados a uma atividade enzimática da OGG1 reduzida (Bravard *et al.*, 2009; Kershaw e Hodges, 2012; Simonelli *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014).

A análise genética baseada na técnica de PCR-RFLP combina a metodologia utilizada na técnica de PCR com a metodologia utilizada na técnica de marcadores RFLP e é amplamente utilizada em estudos que têm como objetivo a genotipagem de SNPs (Rasmussen, 2012).

Dada a não existência de estudos relativamente aos efeitos crônicos do exercício físico regular no DNA, considerando as características individuais da população, nomeadamente polimorfismos que possam afetar estes efeitos, determinou-se o polimorfismo genético no gene *hOGG1* (Ser326Cys) através da metodologia PCR-RFLP. A distribuição dos genótipos e a frequência dos alelos em estudo na amostra (Tabela 3) encontra-se em concordância com a frequência verificada noutros estudos realizados em indivíduos caucasianos (Bagryantseva *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2012; Majsterek *et al.*, 2012). Assim, com o objetivo de estudar qual o efeito das 16 semanas de exercício físico combinado nos danos e na capacidade de reparação do DNA em humanos considerando o polimorfismo genético no gene *hOGG1* (Ser326Cys), dividiu-se a amostra em 2 grupos, o grupo *wild-type* (n=35), constituído pelos indivíduos homocigóticos Ser/Ser e o grupo mutante (n=21), constituído pelos restantes indivíduos, os heterocigóticos Ser/Cys e os homocigóticos Cys/Cys.

Com base nos resultados obtidos, é possível verificar na Figura 7 que no grupo *wild-type*, após as 16 semanas de exercício físico combinado, ocorreu uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) dos danos basais e dos danos oxidativos no DNA, bem como uma diminuição, ainda que não significativa, da capacidade de reparação do DNA. Enquanto que no grupo mutante ocorreu uma diminuição significativa ( $p = 0,027$ ) dos danos basais no DNA, uma diminuição dos danos oxidativos e um aumento da capacidade de reparação do DNA, ambos não significativos. Relativamente à comparação entre os grupos *wild-type* e mutante, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,006$ ) para a variável de dano oxidativo, antes das 16 semanas de exercício físico. Verificou-se ainda existir uma correlação negativa fraca ( $r = -0,399$ ), estatisticamente significativa ( $p = 0,020$ ), entre os danos basais no DNA e a capacidade de reparação do DNA no grupo *wild-type*, após as 16 semanas de exercício físico combinado (Tabela 5).

A redução da atividade enzimática da OGG1, codificada pelos indivíduos portadores do alelo mutante (Cys), sob condições de elevado stresse oxidativo, resulta no aumento da suscetibilidade a danos no DNA e na diminuição da capacidade de reparação do DNA (Kershaw e Hodges, 2012). Existem evidências de que as modificações pós-traducionais como a nitrosilação (Tang *et al.*, 2012), a fosforilação (Hu *et al.*, 2005), a acetilação (Bhakat *et al.*, 2006), a ubiquitinação (Fantini *et al.*, 2013) e as modificações redox (Bravard *et al.*, 2009) são responsáveis por modular a atividade catalítica da enzima OGG1.

O exercício físico, segundo estudos realizados, aumenta a atividade da enzima OGG1 (Radak *et al.*, 2002; Radak *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003; Nakamoto *et al.*, 2007; Radak *et al.*, 2007; Radak *et al.*, 2009). A atividade enzimática da OGG1, essencialmente regulada através da acetilação mediada pelo complexo p300/CBP, predominantemente nas lisinas 338 e 341 (Bhakat *et al.*, 2006), tem sido alvo de alguns estudos relacionados com os efeitos inerentes à prática de exercício físico regular, na medida em que a atividade de excisão da enzima OGG1 acetilada é superior comparativamente à atividade da OGG1 desacetilada (Szczesny *et al.*, 2004). Koltai e seus colaboradores (2011) realizaram um estudo em ratos com diferentes idades e concluíram que o exercício físico aumenta os níveis de acetilação da OGG1, sendo que a acetilação diminui drasticamente com o envelhecimento, razão pela qual existe um aumento dos níveis de 8-oxoG no hipocampo de ratos idosos. Enquanto que Radak e a sua equipa concluíram que o exercício físico aumenta os níveis de acetilação da OGG1, levando a uma diminuição dos níveis de 8-oxoG no músculo esquelético de indivíduos fisicamente ativos (Radak *et al.*, 2011). A reparação do DNA, através do aumento da atividade da OGG1, parece ser uma ferramenta importante pela qual o exercício físico regular mantém a integridade do DNA, reduzindo a incidência de doenças associadas ao stresse oxidativo (Rogers *et al.*, 2008).

A média de idades da amostra em estudo é de 55,9 anos, sendo que a amostra foi dividida em duas faixas etárias de acordo com a classificação estabelecida pelas Nações Unidas (1982), uma faixa etária constituída por 44 indivíduos com idade inferior a 65 anos e outra por 12 indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos.

O aumento dos danos oxidativos, especialmente no último quarto de vida, deve-se provavelmente a uma combinação entre o aumento dos níveis de produção de ROS (Jackson, 2011; Csiszar *et al.*, 2012) e a diminuição da capacidade de reparação do DNA (Koltai *et al.*, 2011; Gregg *et al.*, 2012). No entanto, o aumento dos danos no DNA associados ao envelhecimento pode ser atenuado pela prática de exercício físico regular (Radak *et al.*, 2008b). Cash e a sua equipa concluíram que a capacidade de reparação do DNA estava positivamente

associada com a atividade física, em adultos com idades entre os 50 e os 76 anos (Cash *et al.*, 2014). Enquanto que Mota e seus colaboradores(2010), reportaram uma menor produção de ROS e uma diminuição dos danos no DNA em indivíduos com elevada atividade física, concluindo que esta parece desempenhar um papel fundamental na atenuação do processo de envelhecimento biológico.

A 8-oxoG parece desempenhar um papel fisiológico importante (Radak e Boldogh, 2010). Um estudo realizado em ratos concluiu que a inflamação induzida através de lipopolissacarídeos foi mais tolerada pelos ratos *knockout* para a enzima OGG1, do que pelos ratos *wild-type*. A ausência da enzima OGG1, resultou em níveis aumentados de 8-oxoG, ao reduzir a excisão da mesma do DNA, o que proporcionou uma maior resistência à inflamação. Assim, a correlação inversa entre a atividade da OGG1 neste modelo de inflamação sugere que baixas quantidades de 8-oxoG podem ter um efeito benéfico (Mabley *et al.*, 2005). A oxidação da guanina pode também ser importante na transformação da heterocromatina em eucromatina (Radak e Boldogh, 2010), sendo que a 8-oxoG pode formar um complexo com a OGG1 ativando pequenas GTPases e consequentemente a sinalização celular a jusante (Boldogh *et al.*, 2012; Ba *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014; Aguilera-Aguirre *et al.*, 2015). Os possíveis efeitos do exercício físico na formação do complexo 8-oxoG-OGG1 e na sinalização celular associada encontram-se ainda sob investigação.

Os resultados obtidos através de estudos do efeito do exercício físico regular sugerem que um nível moderado de stresse oxidativo pode aumentar ligeiramente os níveis de certos marcadores de danos oxidativos sem comprometer a função celular, sendo este aumento inclusivamente necessário para iniciar uma resposta adaptativa baseada num conjunto de alterações sistémicas que ocorrem no organismo. No presente estudo, o efeito das 16 semanas de exercício físico combinado na capacidade de reparação do DNA foi diferente nos grupos *wild-type* e mutante. A diminuição da capacidade de reparação do DNA, após o exercício físico regular, no grupo *wild-type*, pode dever-se ao facto deste grupo ser constituído por um maior número de indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos, sendo que inclusivamente os danos oxidativos eram anteriormente mais elevados que no grupo mutante. Enquanto que o aumento da capacidade de reparação, após o exercício físico regular, no grupo mutante, pode dever-se ao facto da enzima OGG1 ter sofrido modificações pós-traducionais, induzidas pelo exercício físico e responsáveis pelo aumento da atividade da enzima. De notar que a associação que existe entre os indivíduos portadores do alelo mutante (Cys) e uma menor atividade de excisão da 8-oxoG pela OGG1 só foi verificada sob condições de elevado stresse oxidativo,

assim os resultados obtidos após as 16 semanas de exercício físico corroboram a teoria de que o exercício físico regular é responsável por produzir níveis moderados de ROS.

Relativamente ao IMC, a média da amostra total era inicialmente de  $28,3 \pm 4,16 \text{ kg/m}^2$ , e após as 16 semanas de exercício físico aumentou para  $28,4 \pm 4,10 \text{ kg/m}^2$ , sendo que a diferença observada não foi significativa ( $p=0,320$ ). De acordo com a classificação estabelecida pela OMS (2000) para adultos maiores de 18 anos, a amostra em estudo encontrava-se com excesso de peso, uma vez que a média do IMC era superior a  $25,0 \text{ kg/m}^2$ , em ambos os momentos. Um estudo realizado em Portugal, com cerca de 9500 participantes com mais de 18 anos, verificou que a média do IMC era de  $26,4 \pm 3,7 \text{ kg/m}^2$ , sendo que os indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos tinham uma maior prevalência de excesso de peso comparativamente aos indivíduos com idades entre os 18 e os 64 anos (Sardinha *et al.*, 2012), concluindo que a prevalência de excesso de peso aumenta com a idade (McGee, 2005; Pasco *et al.*, 2012).

Este estudo é pioneiro no que diz respeito aos efeitos do exercício físico regular nos danos e na capacidade de reparação do DNA em humanos, considerando o polimorfismo genético no gene *hOGG1* (Ser326Cys). Os resultados obtidos sugerem que o polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1* pode ter influência ao nível dos danos e da capacidade de reparação do DNA em resposta a um programa de 16 semanas de exercício físico regular. Contudo, deve ser tido em consideração o tamanho da amostra ( $n=56$ ), o que contribui para uma diminuição da precisão na aplicação dos testes estatísticos, e o facto de não terem sido utilizadas variáveis relacionadas com os hábitos de cada indivíduo, nomeadamente os hábitos tabágicos e alimentares, uma vez que o consumo de tabaco constitui um grave risco para a saúde, na medida em que induz a formação de danos oxidativos no DNA, e diminuiu gradualmente a capacidade antioxidante e a capacidade de reparação do DNA (Besaratina *et al.*, 2001; Kulikowska-Karpinska e Czerw, 2015; Cao *et al.*, 2016), enquanto que uma dieta rica em frutas e vegetais reduz a formação de danos oxidativos no DNA, e aumenta a capacidade antioxidante e de reparação do DNA (Guarnieri *et al.*, 2008; Brevik *et al.*, 2011a; Brevik *et al.*, 2011b). Assim, o facto de os indivíduos que compõem a amostra serem ou não fumadores, e a quantidade de antioxidantes e vitaminas que ingerem diariamente, pode estar relacionada com uma resposta diferente ao programa de exercício físico regular.



## **Capítulo 6 – Conclusão**



## **6. Conclusão**

No presente estudo, o efeito do exercício físico nos danos e na capacidade de reparação do DNA em humanos com o polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1* foi avaliado através da realização do ensaio do cometa e subsequente determinação do polimorfismo através da técnica de PCR-RFLP. As metodologias utilizadas mostraram ser as adequadas, na medida em que a análise dos biomarcadores obtidos possibilitou alcançar os objetivos do estudo. Ainda que existam vários estudos acerca dos efeitos do exercício físico nos danos do DNA, este estudo é pioneiro no que diz respeito aos efeitos de um programa de exercício físico regular na capacidade de reparação do DNA considerando o polimorfismo *hOGG1* (Ser326Cys). Verificou-se que após as 16 semanas de exercício físico regular ocorreu uma diminuição dos danos no DNA e uma alteração da capacidade de reparação do DNA, em ambos os grupos de indivíduos. Com base nos resultados obtidos, pode-se colocar a hipótese de que o exercício físico regular, considerado uma componente chave de um estilo de vida saudável, tem efeitos benéficos ao nível do DNA.

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos seria importante determinar os polimorfismos de outros genes codificantes de proteínas intervenientes na via de reparação por excisão de bases do DNA, nomeadamente dos genes *APE1* e *XRCC1*, como também de genes que codificam proteínas intervenientes noutras vias de reparação do DNA, ou que estão envolvidos no metabolismo. Seria também importante avaliar a alteração da expressão destes genes e a sua contextualização com resultados ao nível bioquímico, morfológico e funcional, pois desta forma poder-se-ia verificar se da alteração da expressão génica resulta uma alteração ao nível proteico, se a esta variação estão associadas alterações consistentes com as funções dos genes em estudo e se ocorreu a perda de função das proteínas devido à alteração da expressão das subunidades que as compõem. De notar que a determinação da atividade antioxidante, a análise de biomarcadores de peroxidação lipídica, a realização do ensaio de reparação por excisão de nucleótidos do DNA *in vitro* ou da hibridação *in situ* fluorescente seriam, igualmente, um complemento valioso ao presente estudo.

Concluindo, os resultados deste estudo sugerem que o polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1* pode ter influência ao nível dos danos e da capacidade de reparação do DNA em resposta a um programa de exercício físico regular, constituindo esta uma primeira abordagem que requer confirmação, a fim de permitir a criação de um conjunto de recomendações para a

prescrição de exercício físico tendo em consideração as características individuais da população.

## **Capítulo 7– Bibliografía**



**7. Bibliografía**

- Aguilera-Aguirre, L., Hosoki, K., Bacsı, A., Radak, Z., Sur, S., Hegde, M. L., Tian, B., Saavedra-Molina, A., Brasier, A. R., Ba, X., Boldogh, I. (2015). Whole transcriptome analysis reveals a role for OGG1-initiated DNA repair signaling in airway remodeling. *Free Radic Biol Med*, 89, 20-33. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.007
- Alessio, H. M., Goldfarb, A. H. (1988). Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol (1985)*, 64(4), 1333-1336.
- Almeida, K. H., Sobol, R. W. (2007). A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)*, 6(6), 695-711. doi:10.1016/j.dnarep.2007.01.009
- Angerer, J., Bird, M. G., Burke, T. A., Doerrler, N. G., Needham, L., Robison, S. H., Sheldon, L., Zenick, H. (2006). Strategic biomonitoring initiatives: moving the science forward. *Toxicol Sci*, 93(1), 3-10. doi:10.1093/toxsci/kfl042
- Angerer, J., Ewers, U., Wilhelm, M. (2007). Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health*, 210(3-4), 201-228. doi:10.1016/j.ijheh.2007.01.024
- Azqueta, A., Arbillaga, L., Lopez de Cerain, A., Collins, A. (2013). Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis*, 28(3), 271-277. doi:10.1093/mutage/get002
- Azqueta, A., Collins, A. R. (2014). The Comet Assay: High Throughput Use of FPG. In L. Sierra & I. Gaivão (Eds.), *Genotoxicity and DNA Repair. Methods in Pharmacology and Toxicology* (pp. 199-217): Humana Press, New York, NY.
- Azqueta, A., Slyskova, J., Langie, S. A., O'Neill Gaivao, I., Collins, A. (2014). Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front Genet*, 5, 288. doi:10.3389/fgene.2014.00288
- Ba, X., Aguilera-Aguirre, L., Rashid, Q. T., Bacsı, A., Radak, Z., Sur, S., Hosoki, K., Hegde, M. L., Boldogh, I. (2014). The role of 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 in inflammation. *Int J Mol Sci*, 15(9), 16975-16997. doi:10.3390/ijms150916975
- Bagryantseva, Y., Novotna, B., Rossner, P., Jr., Chvatalova, I., Milcova, A., Svecova, V., Lnenickova, Z., Solansky, I., Sram, R. J. (2010). Oxidative damage to biological macromolecules in Prague bus drivers and garagemen: impact of air pollution and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett*, 199(1), 60-68. doi:10.1016/j.toxlet.2010.08.007
- Banerjee, A. K., Mandal, A., Chanda, D., Chakraborti, S. (2003). Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cell Biochem*, 253(1-2), 307-312.
- Bassil, M. S., Gougeon, R. (2013). Muscle protein anabolism in type 2 diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16(1), 83-88. doi:10.1097/MCO.0b013e32835a88ee
- Besaratinia, A., Van Schooten, F. J., Schilderman, P. A., De Kok, T. M., Haenen, G. R., Van Herwijnen, M. H., Van Agen, E., Pachen, D., Kleinjans, J. C. (2001). A multi-biomarker approach to study the effects of smoking on oxidative DNA damage and repair and antioxidative defense mechanisms. *Carcinogenesis*, 22(3), 395-401.
- Bhakat, K. K., Mokkalpati, S. K., Boldogh, I., Hazra, T. K., Mitra, S. (2006). Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo. *Mol Cell Biol*, 26(5), 1654-1665. doi:10.1128/MCB.26.5.1654-1665.2006
- Bjelland, S., Seeberg, E. (2003). Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res*, 531(1-2), 37-80.

- Boiteux, S., Radicella, J. P. (2000). The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*, 377(1), 1-8. doi:10.1006/abbi.2000.1773
- Boldogh, I., Hajas, G., Aguilera-Aguirre, L., Hegde, M. L., Radak, Z., Bacsi, A., Sur, S., Hazra, T. K., Mitra, S. (2012). Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine. *J Biol Chem*, 287(25), 20769-20773. doi:10.1074/jbc.C112.364620
- Bravard, A., Vacher, M., Moritz, E., Vaslin, L., Hall, J., Epe, B., Radicella, J. P. (2009). Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res*, 69(8), 3642-3649. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3943
- Brevik, A., Gaivao, I., Medin, T., Jorgensen, A., Piasek, A., Elilasson, J., Karlsen, A., Blomhoff, R., Veggan, T., Duttaroy, A. K., Collins, A. R. (2011a). Supplementation of a western diet with golden kiwifruits (*Actinidia chinensis* var. 'Hort 16A') effects on biomarkers of oxidation damage and antioxidant protection. *Nutr J*, 10, 54. doi:10.1186/1475-2891-10-54
- Brevik, A., Karlsen, A., Azqueta, A., Tirado, A. E., Blomhoff, R., Collins, A. (2011b). Both base excision repair and nucleotide excision repair in humans are influenced by nutritional factors. *Cell Biochem Funct*, 29(1), 36-42. doi:10.1002/cbf.1715
- Briviba, K., Watzl, B., Nickel, K., Kulling, S., Bos, K., Haertel, S., Rechkemmer, G., Bub, A. (2005). A half-marathon and a marathon run induce oxidative DNA damage, reduce antioxidant capacity to protect DNA against damage and modify immune function in hobby runners. *Redox Rep*, 10(6), 325-331. doi:10.1179/135100005X83716
- Brovold, T., Skelton, D. A., Bergland, A. (2013). Older adults recently discharged from the hospital: effect of aerobic interval exercise on health-related quality of life, physical fitness, and physical activity. *J Am Geriatr Soc*, 61(9), 1580-1585. doi:10.1111/jgs.12400
- Burlinson, B., Tice, R. R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S. Y., Collins, A. R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T. S., Nakajima, M., Sasaki, Y. F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., Hartmann, A., In Vivo Comet Assay Workgroup, p. o. t. F. I. W. o. G. T. (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res*, 627(1), 31-35. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.08.011
- Cadet, J., Wagner, J. R. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(2). doi:10.1101/cshperspect.a012559
- Cao, C., Lai, T., Li, M., Zhou, H., Lv, D., Deng, Z., Ying, S., Chen, Z., Li, W., Shen, H. (2016). Smoking-promoted oxidative DNA damage response is highly correlated to lung carcinogenesis. *Oncotarget*, 7(14), 18919-18926. doi:10.18632/oncotarget.7810
- Carter, C. S., Hofer, T., Seo, A. Y., Leeuwenburgh, C. (2007). Molecular mechanisms of life- and health-span extension: role of calorie restriction and exercise intervention. *Appl Physiol Nutr Metab*, 32(5), 954-966. doi:10.1139/H07-085
- Cash, S. W., Beresford, S. A., Vaughan, T. L., Heagerty, P. J., Bernstein, L., White, E., Neuhouser, M. L. (2014). Recent physical activity in relation to DNA damage and repair using the comet assay. *J Phys Act Health*, 11(4), 770-776. doi:10.1123/jpah.2012-0278
- Caspersen, C. J., Powell, K. E., Christenson, G. M. (1985). Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*, 100(2), 126-131.
- Chodzko-Zajko, W. J., Proctor, D. N., Fiatarone Singh, M. A., Minson, C. T., Nigg, C. R., Salem, G. J., Skinner, J. S. (2009). American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc*, 41(7), 1510-1530. doi:10.1249/MSS.0b013e3181a0c95c
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 26(3), 249-261. doi:10.1385/MB:26:3:249

- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*, 375(2), 183-193.
- Collins, A. R., Dusinska, M. (2002). Oxidation of cellular DNA measured with the comet assay. *Methods Mol Biol*, 186, 147-159. doi:10.1385/1-59259-173-6:147
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143-151. doi:10.1093/mutage/gem051
- Commission, E. (2014). *Special Eurobarometer 412 "Sport and physical activity"*. Retrieved from
- Costa, C., Teixeira, J. P. (2014). The Comet Assay In Vivo in Humans. In L. Sierra & I. Gaivão (Eds.), *Genotoxicity and DNA Repair. Methods in Pharmacology and Toxicology* (pp. 219-239): Humana Press, New York, NY.
- Csiszar, A., Podlutzky, A., Podlutzkaya, N., Sonntag, W. E., Merlin, S. Z., Philipp, E. E., Doyle, K., Davila, A., Recchia, F. A., Ballabh, P., Pinto, J. T., Ungvari, Z. (2012). Testing the oxidative stress hypothesis of aging in primate fibroblasts: is there a correlation between species longevity and cellular ROS production? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 67(8), 841-852. doi:10.1093/gerona/qlr216
- David, S. S., O'Shea, V. L., Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147), 941-950. doi:10.1038/nature05978
- Davison, G. W. (2016). Exercise and Oxidative Damage in Nucleoid DNA Quantified Using Single Cell Gel Electrophoresis: Present and Future Application. *Front Physiol*, 7, 249. doi:10.3389/fphys.2016.00249
- Davison, G. W., Hughes, C. M., Bell, R. A. (2005). Exercise and mononuclear cell DNA damage: the effects of antioxidant supplementation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 15(5), 480-492.
- Di Meo, S., Venditti, P. (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*, 10(1-2), 125-140. doi:10.1159/000046880
- Ding, D., Lawson, K. D., Kolbe-Alexander, T. L., Finkelstein, E. A., Katzmarzyk, P. T., van Mechelen, W., Pratt, M., Lancet Physical Activity Series 2 Executive, C. (2016). The economic burden of physical inactivity: a global analysis of major non-communicable diseases. *Lancet*, 388(10051), 1311-1324. doi:10.1016/S0140-6736(16)30383-X
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Dusinska, M., Collins, A. R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23(3), 191-205. doi:10.1093/mutage/gen007
- Dusinska, M., Kovacikova, Z., Vallova, B., Collins, A. (1998). Responses of alveolar macrophages and epithelial type II cells to oxidative DNA damage caused by paraquat. *Carcinogenesis*, 19(5), 809-812.
- Evans, W. J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr*, 72(2 Suppl), 647S-652S.
- Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- Fantini, D., Moritz, E., Auvre, F., Amouroux, R., Campalans, A., Epe, B., Bravard, A., Radicella, J. P. (2013). Rapid inactivation and proteasome-mediated degradation of OGG1 contribute to the synergistic effect of hyperthermia on genotoxic treatments. *DNA Repair (Amst)*, 12(3), 227-237. doi:10.1016/j.dnarep.2012.12.006
- Ferreira, F., Ferreira, R., Duarte, J. A. (2007). Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 7(2), 257-275.

- Ferreira, I. C. F. R., Abreu, R. M. V. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*, *IV*(2), 32-39.
- Fogarty, M. C., Devito, G., Hughes, C. M., Burke, G., Brown, J. C., McEneny, J., Brown, D., McClean, C., Davison, G. W. (2013a). Effects of alpha-lipoic acid on mtDNA damage after isolated muscle contractions. *Med Sci Sports Exerc*, *45*(8), 1469-1477. doi:10.1249/MSS.0b013e31828bf31e
- Fogarty, M. C., Hughes, C. M., Burke, G., Brown, J. C., Davison, G. W. (2013b). Acute and chronic watercress supplementation attenuates exercise-induced peripheral mononuclear cell DNA damage and lipid peroxidation. *Br J Nutr*, *109*(2), 293-301. doi:10.1017/S0007114512000992
- Fogarty, M. C., Hughes, C. M., Burke, G., Brown, J. C., Trinick, T. R., Duly, E., Bailey, D. M., Davison, G. W. (2011). Exercise-induced lipid peroxidation: Implications for deoxyribonucleic acid damage and systemic free radical generation. *Environ Mol Mutagen*, *52*(1), 35-42. doi:10.1002/em.20572
- Franzke, B., Halper, B., Hofmann, M., Oesen, S., Jandrasits, W., Baierl, A., Tosevska, A., Strasser, E. M., Wessner, B., Wagner, K. H., Vienna Active Ageing Study, G. (2015). The impact of six months strength training, nutritional supplementation or cognitive training on DNA damage in institutionalised elderly. *Mutagenesis*, *30*(1), 147-153. doi:10.1093/mutage/geu074
- Frazzitta, G., Balbi, P., Maestri, R., Bertotti, G., Boveri, N., Pezzoli, G. (2013). The beneficial role of intensive exercise on Parkinson disease progression. *Am J Phys Med Rehabil*, *92*(6), 523-532. doi:10.1097/PHM.0b013e31828cd254
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, *64*, 97-112. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
- Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci*, *893*, 13-18.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., Ellenberger, T. (2006). *DNA Repair and Mutagenesis*. (2nd ed.). Washington, DC: ASM Press.
- Gaivao, I., Piasek, A., Brevik, A., Shaposhnikov, S., Collins, A. R. (2009). Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol Toxicol*, *25*(1), 45-52. doi:10.1007/s10565-007-9047-5
- Garber, C. E., Blissmer, B., Deschenes, M. R., Franklin, B. A., Lamonte, M. J., Lee, I. M., Nieman, D. C., Swain, D. P., American College of Sports, M. (2011). American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc*, *43*(7), 1334-1359. doi:10.1249/MSS.0b013e318213fefb
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Tsikas, D., Rossi, R. (2009). Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci*, *46*(5-6), 241-281. doi:10.3109/10408360903142326
- Gray, P., Chappell, A., Jenkinson, A. M., Thies, F., Gray, S. R. (2014). Fish oil supplementation reduces markers of oxidative stress but not muscle soreness after eccentric exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, *24*(2), 206-214. doi:10.1123/ijnsnem.2013-0081
- Gregg, S. Q., Gutierrez, V., Robinson, A. R., Woodell, T., Nakao, A., Ross, M. A., Michalopoulos, G. K., Rigatti, L., Rothermel, C. E., Kamileri, I., Garinis, G. A., Stolz, D. B., Niedernhofer, L. J. (2012). A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology*, *55*(2), 609-621. doi:10.1002/hep.24713
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis* (7th ed.). New York: W. H. Freeman.

- Gros, L., Ishchenko, A. A., Saparbaev, M. (2003). Enzymology of repair of etheno-adducts. *Mutat Res*, 531(1-2), 219-229.
- Guarnieri, S., Loft, S., Riso, P., Porrini, M., Risom, L., Poulsen, H. E., Dragsted, L. O., Moller, P. (2008). DNA repair phenotype and dietary antioxidant supplementation. *Br J Nutr*, 99(5), 1018-1024. doi:10.1017/S0007114507842796
- Gutteridge, J. M., Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*, 899, 136-147.
- Gutzkow, K. B., Langleite, T. M., Meier, S., Graupner, A., Collins, A. R., Brunborg, G. (2013). High-throughput comet assay using 96 minigels. *Mutagenesis*, 28(3), 333-340. doi:10.1093/mutage/get012
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*, 91(3C), 14S-22S.
- Hartmann, A., Pfuhrer, S., Dennog, C., Germadnik, D., Pilger, A., Speit, G. (1998). Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei. *Free Radic Biol Med*, 24(2), 245-251.
- Hartmann, A., Plappert, U., Raddatz, K., Grunert-Fuchs, M., Speit, G. (1994). Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis*, 9(3), 269-272.
- Hensley, K., Benaksas, E. J., Bolli, R., Comp, P., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mou, S., Pye, Q. N., Stoddard, M. F., Wallis, G., Williamson, K. S., West, M., Wechter, W. J., Floyd, R. A. (2004). New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med*, 36(1), 1-15. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.10.009
- Hillman, C. H., Erickson, K. I., Kramer, A. F. (2008). Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 9(1), 58-65. doi:10.1038/nrn2298
- Hu, J., Imam, S. Z., Hashiguchi, K., de Souza-Pinto, N. C., Bohr, V. A. (2005). Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase (alpha-OGG1) modulates its function. *Nucleic Acids Res*, 33(10), 3271-3282. doi:10.1093/nar/gki636
- Huang, X. Y., Eungpinichpong, W., Silsirivanit, A., Nakmareong, S., Wu, X. H. (2014). Tai chi improves oxidative stress response and DNA damage/repair in young sedentary females. *J Phys Ther Sci*, 26(6), 825-829. doi:10.1589/jpts.26.825
- Jackson, M. J. (2011). Control of reactive oxygen species production in contracting skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal*, 15(9), 2477-2486. doi:10.1089/ars.2011.3976
- Jensen, A., Lohr, M., Eriksen, L., Gronbaek, M., Dorry, E., Loft, S., Moller, P. (2012). Influence of the OGG1 Ser326Cys polymorphism on oxidatively damaged DNA and repair activity. *Free Radic Biol Med*, 52(1), 118-125. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.038
- Kaur, M. P., Guggenheim, E. J., Pulisciano, C., Akbar, S., Kershaw, R. M., Hodges, N. J. (2014). Cellular accumulation of Cys326-OGG1 protein complexes under conditions of oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 447(1), 12-18. doi:10.1016/j.bbrc.2014.03.044
- Kemi, O. J., Haram, P. M., Loennechen, J. P., Osnes, J. B., Skomedal, T., Wisloff, U., Ellingsen, O. (2005). Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res*, 67(1), 161-172. doi:10.1016/j.cardiores.2005.03.010
- Kershaw, R. M., Hodges, N. J. (2012). Repair of oxidative DNA damage is delayed in the Ser326Cys polymorphic variant of the base excision repair protein OGG1. *Mutagenesis*, 27(4), 501-510. doi:10.1093/mutage/ges012

- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 239-267. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851
- Koltai, E., Zhao, Z., Lacza, Z., Cselenyak, A., Vacz, G., Nyakas, C., Boldogh, I., Ichinoseki-Sekine, N., Radak, Z. (2011). Combined exercise and insulin-like growth factor-1 supplementation induces neurogenesis in old rats, but do not attenuate age-associated DNA damage. *Rejuvenation Res*, 14(6), 585-596. doi:10.1089/rej.2011.1178
- Krokan, H. E., Bjoras, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4), a012583. doi:10.1101/cshperspect.a012583
- Kulikowska-Karpinska, E., Czerw, K. (2015). [Estimation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) concentration in the urine of cigarette smokers]. *Wiad Lek*, 68(1), 32-38.
- Lacza, G., Radak, Z. (2013). [Is physical activity an elixir?]. *Orv Hetil*, 154(20), 764-768. doi:10.1556/OH.2013.29616
- Lee, J., Koo, N., Min, D. B. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 21-33. doi:10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x
- Luo, J., Hosoki, K., Bacsı, A., Radak, Z., Hegde, M. L., Sur, S., Hazra, T. K., Brasier, A. R., Ba, X., Boldogh, I. (2014). 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated DNA repair is associated with Rho GTPase activation and alpha-smooth muscle actin polymerization. *Free Radic Biol Med*, 73, 430-438. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.030
- Mabley, J., Pacher, P., Deb, A., Wallace, R., Elder, R., Szabó, C. (2005). Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation. *The FASEB Journal*, 19(2), 290-292.
- Majsterek, I., Merecz, A., Sliwinska, A., Kosmalski, M., Kasznicki, J., Drzewoski, J. (2012). Role of Oxidative DNA Damage in Pathogenesis of Diabetic Neuropathy *International Journal of Medical and Health Sciences*, 6 10-25.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361-370.
- Mars, M., Govender, S., Weston, A., Naicker, V., Chuturgoon, A. (1998). High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun*, 249(2), 366-370. doi:10.1006/bbrc.1998.9156
- Mastaloudis, A., Yu, T. W., O'Donnell, R. P., Frei, B., Dashwood, R. H., Traber, M. G. (2004). Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med*, 36(8), 966-975. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.012
- Matos, M. (2006). *Detecção e localização de marcadores moleculares ligados a genes de tolerância ao alumínio em centeio (Secale cereale L.)*. (Tese de Doutoramento), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.
- Matsuo, T., Saotome, K., Seino, S., Eto, M., Shimojo, N., Matsushita, A., Iemitsu, M., Ohshima, H., Tanaka, K., Mukai, C. (2014). Low-volume, high-intensity, aerobic interval exercise for sedentary adults: VO(2)max, cardiac mass, and heart rate recovery. *Eur J Appl Physiol*, 114(9), 1963-1972. doi:10.1007/s00421-014-2917-7
- Mattson, M. P., Allison, D. B., Fontana, L., Harvie, M., Longo, V. D., Malaisse, W. J., Mosley, M., Notterpek, L., Ravussin, E., Scheer, F. A., Seyfried, T. N., Varady, K. A., Panda, S. (2014). Meal frequency and timing in health and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(47), 16647-16653. doi:10.1073/pnas.1413965111
- McGee, D. L. (2005). Body mass index and mortality: a meta-analysis based on person-level data from twenty-six observational studies. *Ann Epidemiol*, 15(2), 87-97. doi:10.1016/j.annepidem.2004.05.012
- McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P., Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res*, 288(1), 47-63.

- Mellett, L. H., Bousquet, G. (2013). Cardiology patient page. Heart-healthy exercise. *Circulation*, 127(17), e571-572. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000880
- Moller, P., Loft, S., Lundby, C., Olsen, N. V. (2001). Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *FASEB J*, 15(7), 1181-1186.
- Morris, J. N., Crawford, M. D. (1958). Coronary heart disease and physical activity of work; evidence of a national necropsy survey. *Br Med J*, 2(5111), 1485-1496.
- Morris, J. N., Heady, J. A., Raffle, P. A., Roberts, C. G., Parks, J. W. (1953). Coronary heart-disease and physical activity of work. *Lancet*, 265(6795), 1053-1057; contd.
- Mota, M. P., P., F., Duarte, J. A. (2004). Teorias biológicas do envelhecimento. *Rev Port Ciênc Desp*, 4(1), 81-110.
- Mota, M. P., Peixoto, F. M., Soares, J. F., Figueiredo, P. A., Leitao, J. C., Gaivao, I., Duarte, J. A. (2010). Influence of aerobic fitness on age-related lymphocyte DNA damage in humans: relationship with mitochondria respiratory chain and hydrogen peroxide production. *Age (Dordr)*, 32(3), 337-346. doi:10.1007/s11357-010-9138-8
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273.
- Nakamoto, H., Kaneko, T., Tahara, S., Hayashi, E., Naito, H., Radak, Z., Goto, S. (2007). Regular exercise reduces 8-oxodG in the nuclear and mitochondrial DNA and modulates the DNA repair activity in the liver of old rats. *Exp Gerontol*, 42(4), 287-295. doi:10.1016/j.exger.2006.11.006
- Nations, U. (1982). *Provisional Guidelines on Standard International Age Classifications*. New York: UN.
- Niess, A. M., Baumann, M., Roecker, K., Horstmann, T., Mayer, F., Dickhuth, H. H. (1998). Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. *J Sports Med Phys Fitness*, 38(2), 111-115.
- Niess, A. M., Hartmann, A., Grunert-Fuchs, M., Poch, B., Speit, G. (1996). DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med*, 17(6), 397-403. doi:10.1055/s-2007-972868
- O'Brien, S. J. (1990). *Genetic Maps: Locus Maps of Complex Genomes* (5th ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ostling, O., Johanson, K. J. (1987). Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 52(5), 683-691.
- Ota, M., Fukushima, H., Kulski, J. K., Inoko, H. (2007). Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protoc*, 2(11), 2857-2864. doi:10.1038/nprot.2007.407
- Paffenbarger, R. S., Jr., Hyde, R. T., Wing, A. L., Hsieh, C. C. (1986). Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. *N Engl J Med*, 314(10), 605-613. doi:10.1056/NEJM198603063141003
- Palazzetti, S., Richard, M. J., Favier, A., Margaritis, I. (2003). Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol*, 28(4), 588-604.
- Pasco, J. A., Nicholson, G. C., Brennan, S. L., Kotowicz, M. A. (2012). Prevalence of obesity and the relationship between the body mass index and body fat: cross-sectional, population-based data. *PLoS One*, 7(1), e29580. doi:10.1371/journal.pone.0029580
- Pate, R. R., Pratt, M., Blair, S. N., Haskell, W. L., Macera, C. A., Bouchard, C., Buchner, D., Ettinger, W., Heath, G. W., King, A. C., et al. (1995). Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA*, 273(5), 402-407.

- Pestana, M. H., Gageiro, J. N. (2014). *Análise de Dados para Ciências Sociais – A Complementariedade do SPSS* (E. SÍLABO Ed.).
- Peters, E. M., Van Eden, M., Tyler, N., Ramautar, A., Chuturgoon, A. A. (2006). Prolonged exercise does not cause lymphocyte DNA damage or increased apoptosis in well-trained endurance athletes. *Eur J Appl Physiol*, 98(2), 124-131. doi:10.1007/s00421-006-0227-4
- Powers, S. K., DeRuisseau, K. C., Quindry, J., Hamilton, K. L. (2004). Dietary antioxidants and exercise. *J Sports Sci*, 22(1), 81-94. doi:10.1080/0264041031000140563
- Powers, S. K., Ji, L. L., Leeuwenburgh, C. (1999). Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc*, 31(7), 987-997.
- Powledge, T. M. (2004). The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ*, 28(1-4), 44-50. doi:10.1152/advan.00002.2004
- Radak, Z., Apor, P., Pucsok, J., Berkes, I., Ogonovszky, H., Pavlik, G., Nakamoto, H., Goto, S. (2003). Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. *Life Sci*, 72(14), 1627-1633.
- Radak, Z., Atalay, M., Jakus, J., Boldogh, I., Davies, K., Goto, S. (2009). Exercise improves import of 8-oxoguanine DNA glycosylase into the mitochondrial matrix of skeletal muscle and enhances the relative activity. *Free Radic Biol Med*, 46(2), 238-243. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.022
- Radak, Z., Boldogh, I. (2010). 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 49(4), 587-596. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.008
- Radak, Z., Bori, Z., Koltai, E., Fatouros, I. G., Jamurtas, A. Z., Douroudos, II, Terzis, G., Nikolaidis, M. G., Chatzinikolaou, A., Sovatzidis, A., Kumagai, S., Naito, H., Boldogh, I. (2011). Age-dependent changes in 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity are modulated by adaptive responses to physical exercise in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 51(2), 417-423. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.018
- Radak, Z., Chung, H. Y., Goto, S. (2008a). Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*, 44(2), 153-159. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029
- Radak, Z., Chung, H. Y., Koltai, E., Taylor, A. W., Goto, S. (2008b). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*, 7(1), 34-42. doi:10.1016/j.arr.2007.04.004
- Radak, Z., Ihasz, F., Koltai, E., Goto, S., Taylor, A. W., Boldogh, I. (2014). The redox-associated adaptive response of brain to physical exercise. *Free Radic Res*, 48(1), 84-92. doi:10.3109/10715762.2013.826352
- Radak, Z., Kumagai, S., Nakamoto, H., Goto, S. (2007). 8-Oxoguanosine and uracil repair of nuclear and mitochondrial DNA in red and white skeletal muscle of exercise-trained old rats. *J Appl Physiol* (1985), 102(4), 1696-1701. doi:10.1152/jappphysiol.01051.2006
- Radak, Z., Naito, H., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Cardozo-Pelaez, F., Goto, S. (2002). Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 445(2), 273-278. doi:10.1007/s00424-002-0918-6
- Radak, Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Pucsok, J., Nakamoto, H., Goto, S. (2000). Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys*, 376(2), 248-251. doi:10.1006/abbi.2000.1719
- Radak, Z., Taylor, A. W., Ohno, H., Goto, S. (2001). Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*, 7, 90-107.
- Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H., Atalay, M. (2013). Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal*, 18(10), 1208-1246. doi:10.1089/ars.2011.4498

- Rasmussen, H. B. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. In S. Magdeldin (Ed.), *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*: InTech.
- Reichhold, S., Neubauer, O., Hoelzl, C., Stadlmayr, B., Valentini, J., Ferk, F., Kundi, M., Knasmuller, S., Wagner, K. H. (2009). DNA damage in response to an Ironman triathlon. *Free Radic Res*, 43(8), 753-760. doi:10.1080/10715760903040628
- Rietjens, I. M., Boersma, M. G., Haan, L., Spenkeliink, B., Awad, H. M., Cnubben, N. H., van Zanden, J. J., Woude, H., Alink, G. M., Koeman, J. H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environ Toxicol Pharmacol*, 11(3-4), 321-333.
- Rogers, C. J., Colbert, L. H., Greiner, J. W., Perkins, S. N., Hursting, S. D. (2008). Physical activity and cancer prevention : pathways and targets for intervention. *Sports Med*, 38(4), 271-296.
- Sardinha, L. B., Santos, D. A., Silva, A. M., Coelho-e-Silva, M. J., Raimundo, A. M., Moreira, H., Santos, R., Vale, S., Baptista, F., Mota, J. (2012). Prevalence of overweight, obesity, and abdominal obesity in a representative sample of Portuguese adults. *PLoS One*, 7(10), e47883. doi:10.1371/journal.pone.0047883
- Sato, Y., Nanri, H., Ohta, M., Kasai, H., Ikeda, M. (2003). Increase of human MTH1 and decrease of 8-hydroxydeoxyguanosine in leukocyte DNA by acute and chronic exercise in healthy male subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 305(2), 333-338.
- Sen, C. K. (2001). Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Med*, 31(13), 891-908.
- Shaposhnikov, S., Azqueta, A., Henriksson, S., Meier, S., Gaivao, I., Huskisson, N. H., Smart, A., Brunborg, G., Nilsson, M., Collins, A. R. (2010). Twelve-gel slide format optimised for comet assay and fluorescent in situ hybridisation. *Toxicol Lett*, 195(1), 31-34. doi:10.1016/j.toxlet.2010.02.017
- Shen, J., Deininger, P., Hunt, J. D., Zhao, H. (2007). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Cancer*, 109(3), 574-580. doi:10.1002/cncr.22417
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 4, 180-183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002
- Simonelli, V., Camerini, S., Mazzei, F., Van Loon, B., Allione, A., D'Errico, M., Barone, F., Minoprio, A., Ricceri, F., Guarrera, S., Russo, A., Dalhus, B., Crescenzi, M., Hubscher, U., Bjoras, M., Matullo, G., Dogliotti, E. (2013). Genotype-phenotype analysis of S326C OGG1 polymorphism: a risk factor for oxidative pathologies. *Free Radic Biol Med*, 63, 401-409. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.031
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175(1), 184-191.
- Siu, P. M., Pei, X. M., Teng, B. T., Benzie, I. F., Ying, M., Wong, S. H. (2011). Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. *Exp Physiol*, 96(9), 889-906. doi:10.1113/expphysiol.2011.058396
- Soares, J. P., Silva, A. M., Fonseca, S., Oliveira, M. M., Peixoto, F., Gaivao, I., Mota, M. P. (2015a). How can age and lifestyle variables affect DNA damage, repair capacity and endogenous biomarkers of oxidative stress? *Exp Gerontol*, 62, 45-52. doi:10.1016/j.exger.2015.01.001
- Soares, J. P., Silva, A. M., Oliveira, M. M., Peixoto, F., Gaivao, I., Mota, M. P. (2015b). Effects of combined physical exercise training on DNA damage and repair capacity: role of oxidative stress changes. *Age (Dordr)*, 37(3), 9799. doi:10.1007/s11357-015-9799-4
- Strasser, B. (2013). Physical activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 1281, 141-159. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06785.x

- Strimbu, K., Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6), 463-466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177
- Svilar, D., Goellner, E. M., Almeida, K. H., Sobol, R. W. (2011). Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal*, 14(12), 2491-2507. doi:10.1089/ars.2010.3466
- Szczesny, B., Bhakat, K. K., Mitra, S., Boldogh, I. (2004). Age-dependent modulation of DNA repair enzymes by covalent modification and subcellular distribution. *Mech Ageing Dev*, 125(10-11), 755-765. doi:10.1016/j.mad.2004.07.005
- Tang, C. H., Wei, W., Liu, L. (2012). Regulation of DNA repair by S-nitrosylation. *Biochim Biophys Acta*, 1820(6), 730-735. doi:10.1016/j.bbagen.2011.04.014
- Tanimura, Y., Shimizu, K., Tanabe, K., Kono, I., Ajisaka, R. (2010). Effects of three consecutive days exercise on lymphocyte DNA damage in young men. *Eur J Appl Physiol*, 110(2), 307-314. doi:10.1007/s00421-010-1499-2
- Tanimura, Y., Shimizu, K., Tanabe, K., Otsuki, T., Yamauchi, R., Matsubara, Y., Iemitsu, M., Maeda, S., Ajisaka, R. (2008). Exercise-induced oxidative DNA damage and lymphocytopenia in sedentary young males. *Med Sci Sports Exerc*, 40(8), 1455-1462. doi:10.1249/MSS.0b013e31817242cf
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35(3), 206-221.
- Tonkonogi, M., Sahlin, K. (2002). Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev*, 30(3), 129-137.
- Tsai, K., Hsu, T. G., Hsu, K. M., Cheng, H., Liu, T. Y., Hsu, C. F., Kong, C. W. (2001). Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic Biol Med*, 31(11), 1465-1472.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Wagner, K. H., Reichhold, S., Holz, C., Knasmuller, S., Nics, L., Meisel, M., Neubauer, O. (2010). Well-trained, healthy triathletes experience no adverse health risks regarding oxidative stress and DNA damage by participating in an ultra-endurance event. *Toxicology*, 278(2), 211-216. doi:10.1016/j.tox.2009.09.006
- Wallace, S. S. (2014). Base excision repair: a critical player in many games. *DNA Repair (Amst)*, 19, 14-26. doi:10.1016/j.dnarep.2014.03.030
- Warburton, D. E., Nicol, C. W., Bredin, S. S. (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*, 174(6), 801-809. doi:10.1503/cmaj.051351
- WHO. (2000). *Obesity: preventing and managing the global epidemic*. Retrieved from
- WHO. (2010). *Global recommendations on physical activity for health*. Retrieved from
- Wierzba, T. H., Olek, R. A., Fedeli, D., Falcioni, G. (2006). Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 10, 115-131.
- Wilson, D. M., 3rd, Bohr, V. A. (2007). The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*, 6(4), 544-559. doi:10.1016/j.dnarep.2006.10.017
- Wilson, D. M., 3rd, Sofinowski, T. M., McNeill, D. R. (2003). Repair mechanisms for oxidative DNA damage. *Front Biosci*, 8, d963-981.

Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J., Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. *Science*, 291(5507), 1284-1289. doi:10.1126/science.1056154

Yan, Z., Okutsu, M., Akhtar, Y. N., Lira, V. A. (2011). Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*, 110(1), 264-274. doi:10.1152/jappphysiol.00993.2010

Zhang, M., Izumi, I., Kagamimori, S., Sokejima, S., Yamagami, T., Liu, Z., Qi, B. (2004). Role of taurine supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids*, 26(2), 203-207. doi:10.1007/s00726-003-0002-3



# **Anexos**



**Anexo 1 – Questionário administrado à amostra em estudo.**

Data \_\_\_\_\_ Código \_\_\_\_\_

**Questionário Demográfico**

NOME: \_\_\_\_\_

Morada: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Telemóvel \_\_\_\_\_

Email \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo (F/M) \_\_\_\_\_

Estado Civil:

Solteiro(a)	<input type="checkbox"/>	Casado(a) ou em União de facto	<input type="checkbox"/>
Viúvo(a)	<input type="checkbox"/>	Divorciado(a) ou Separado(a)	<input type="checkbox"/>

Habilitações literárias:

4ª Classe	<input type="checkbox"/>	9º ano (antigo 5º ano)	<input type="checkbox"/>	12º Ano	<input type="checkbox"/>
Ensino Superior	<input type="checkbox"/>				

Data \_\_\_\_\_

Código \_\_\_\_\_

### Questionário de Informação Médica

NOME _____	Idade _____	
Peso _____	Altura _____	Perímetro da Cintura _____
FC em repouso _____; _____; _____	Pressão Arterial _____; _____; _____	

#### Hábitos tabágicos

Fuma? _____	Quantos cigarros por dia? _____
Se não, já alguma vez fumou? _____	Quantos cigarros fumava por dia? _____
Durante quantos anos? _____	Há quanto tempo parou? _____

#### Consumo de bebidas alcoólicas

Consome bebidas alcoólicas? _____
Quantas bebidas consome por semana? <7 <input type="checkbox"/> 7 a 14 <input type="checkbox"/> >14 <input type="checkbox"/>

#### Medicação actual

Influência da medicação	Designação da medicação
Pressão arterial	
Frequência Cardíaca	
Metabolismo Lipídico	
Metabolismo Ósseo	
Outro	

#### Cirurgias Anteriores/Internamentos hospitalares

--

Como considera a sua saúde actual? \_\_\_\_\_

- 0 má
- 1 fraca
- 2 razoável
- 3 boa
- 4 muito boa

Data \_\_\_\_\_

Código \_\_\_\_\_

Comparando-se com as pessoas da sua idade, como acha a sua saúde? \_\_\_\_\_

- 0 não sabe
- 1 pior
- 2 idêntica
- 3 melhor

Que queixas de saúde teve nos últimos 6 meses?

<input type="checkbox"/>	<b>Gerais e inespecíficas</b>
<input type="checkbox"/>	<b>Aparelho respiratório</b>
<input type="checkbox"/>	<b>Aparelho digestivo</b>
<input type="checkbox"/>	<b>Cardiologia:</b>
<input type="checkbox"/>	<u>Dor no peito</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Ataque cardíaco</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Angina de Peito</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Hipertensão</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Frequência Cardíaca elevada</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Electrocardiograma anormal</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Tornozelos inchados</u>
<input type="checkbox"/>	<u>História familiar de doença coronária</u>
<input type="checkbox"/>	<b>Problemas Hormonais</b>
<input type="checkbox"/>	<u>Diabetes</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Doença da Tiróide</u>
<input type="checkbox"/>	<b>Ortopedia e reumatologia</b>
<input type="checkbox"/>	<u>Dores nas costas</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Dores articulares</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Ciática</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Lesões musculares</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Artrite reumatóide</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Artroses</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Fracturas</u>
<input type="checkbox"/>	<b>Neurologia</b>
<input type="checkbox"/>	<u>Doenças neurológica</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Cefaleias frequentes</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Perda de consciência</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Convulsões ou ataques</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Paralisia ou fraqueza muscular</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Tremores ou movimentos anormais</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Dificuldades de coordenação</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Dificuldades de memória</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Dificuldades na marcha</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Tonturas</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Dificuldades na fala</u>
<input type="checkbox"/>	<u>Visão dupla ou falta de memória</u>

Data \_\_\_\_\_

Código \_\_\_\_\_

### Aptidão para a actividade física

SIM	NÃO	
		1. Alguma vez algum médico lhe disse que tinha uma limitação cardíaca e recomendou apenas actividades supervisionadas por médicos?
		2. Quando faz actividade física dói-lhe o peito?
		3. Teve alguma dor no peito no último mês?
		4. Alguma vez (1 ou mais) perdeu a consciência ou caiu como resultado de tonturas ou vertigens?
		5. Tem problemas ósseos ou articulares que possam ser agravados pela actividade física?
		6. Alguma vez o médico receitou-lhe medicação para a pressão arterial ou coração?
		7. Está consciente de qualquer outra razão que o poderia impedir de fazer exercício sem supervisão médica?