

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Pneumológicas**

Cássia Cinara da Costa

**AVALIAÇÃO DO DANO E DO REPARO DE DNA ANTES  
E DEPOIS DO TESTE DA CAMINHADA DOS SEIS MINUTOS EM  
PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR  
OBSTRUTIVA CRÔNICA ( DPOC)**

Porto Alegre, 2008

Cássia Cinara da Costa

**Avaliação do dano e do reparo de DNA antes e depois do teste da caminhada dos seis minutos em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica ( DPOC)**

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas.

Orientador: Dr. Paulo José Zimmermann Teixeira

Co Orientador: Dr Sharbel Maluf

**Porto Alegre, 2008**

Costa, Cássia Cinara da

Avaliação do dano e do reparo de DNA antes e depois do teste da caminhada dos seis minutos em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) / Cássia Cinara da Costa. – 2008.

74 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

“Orientador: Prof. Dr. Paulo José Zimmermann Teixeira”.

Inclui bibliografia.

1. Pulmões – Doenças obstrutivas. 2. Teste cometa. 3. Teste da caminhada de seis minutos. I. Título.

CDU 616.24

**Cássia Cinara da Costa**

**AVALIAÇÃO DO DANO E DO REPARO DE DNA ANTES E DEPOIS DO TESTE DA  
CAMINHADA DOS SEIS MINUTOS EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA  
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA ( DPOC)**

Tese apresentada para obtenção do Título de  
Doutor à Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós Graduação em Ciências Pneumológicas.

**Porto Alegre, 11 de dezembro de 2007.**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese  
elaborada por Cássia Cinara da Costa, como requisito parcial da  
obtenção do grau de Doutor em Ciências Pneumológicas.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Paulo de Tarso Roth Dalcin (UFRGS)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Michelsen de Andrade (FEEVALE)

---

Prof. Dr. Denizar Mello da Costa (PUC)

---

Prof. Dr. Paulo José Zimmermann Teixeira (UFRGS)

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu esposo Fernando, pela paciência e ajuda em todas as horas em que tudo parecia impossível.

Aos meus pais, Gilberto e Clari que entenderam a minha ausência em alguns momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que de uma forma contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente a toda a equipe da reabilitação pulmonar, ao laboratório da Biomedicina.

Agradeço também especialmente ao meu orientador Dr. Paulo José Zimmermann Teixeira, ao meu Co-Orientador, Dr. Sharbel Maluf e ao Dr. Luciano Basso da Silva.

## RESUMO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença inflamatória com participação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos CD8, associada a estímulos oxidantes diretamente nas estruturas pulmonares, causada mais comumente pelo tabagismo. Recentemente foi demonstrado que o teste de caminhada dos seis minutos (TC6) é capaz de aumentar a inflamação e gerar o aumento de espécies reativas de oxigênio. O presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis de dano e reparo de DNA em portadores de DPOC, quando submetidos ao TC6. Para avaliar o dano de DNA, amostras de sangue periférico foram coletadas antes e imediatamente após o TC6. Para avaliar a capacidade de reparo, foi analisada uma amostra coletada 48 horas após o TC6. Todas as amostras foram processadas pela técnica do cometa. Vinte e sete pacientes portadores de DPOC foram avaliados, sendo 59% homens. A média de idade foi de  $64,7 \pm 8,4$  anos. A média do VEF1 foi de  $40,3\% \pm 18,4\%$  do previsto, com relação média de VEF1/CVF de  $52,5\% \pm 11,9\%$ . Todos fumaram em média  $36,7 \pm 17,0$  anos, uma média de  $48,1 \pm 37,5$  maços/ano. As médias das variáveis obtidas no início e no final do TC6 foram: SpO<sub>2</sub> ( $92,0 \pm 4,5$  vs.  $91,4 \pm 4,6$ ), percepção da dispnéia pela escala de BORG ( $1,2 \pm 1,0$  vs.  $2,4 \pm 1,7$ ) e a distância percorrida foi em média de  $380,1 \pm 84,4$  m. As taxas médias de dano de DNA antes do TC6 ( $27,9 \pm 19,2$ ) e imediatamente após ( $29,6 \pm 29,6$ ) não apresentaram diferenças significativas ( $p=0,904$ ). A análise realizada 48 horas após o TC6 demonstrou uma redução não significativa deste dano ( $18,3 \pm 13,0$ ,  $p=0,099$ ). Conclui-se neste estudo que o esforço físico realizado durante o TC6 não provoca aumento imediato nas taxas de dano de DNA, nem estimula os mecanismos de reparo do DNA em portadores de DPOC.

**PALAVRAS CHAVE:** DPOC, Teste do Cometa, Teste da Caminhada dos Seis Minutos.

## Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease is an inflammatory disease in which macrophages, neutrophils and CD8 T lymphocytes play an important role. It is associated with direct oxidant stimuli of lung structures, which are most frequently triggered by smoking. A recent study showed that the 6-minute walk test (6MWT) increases inflammation and reactive oxygen species. This study evaluated DNA damage and repair in patients with COPD that took the 6MWT. To evaluate DNA damage, peripheral blood samples were collected before and immediately after 6MWT. To evaluate repair, a sample was collected 48 hours after the 6MWT. All samples were prepared for the comet assay. Twenty-seven patients with COPD were evaluated; 59% were men and mean age was  $64.7 \pm 8.4$ . Mean FEV1 was  $40.3\% \pm 18.4\%$  of predicted value, and mean FEV1/FVC was  $52.5\% \pm 11.9\%$ . Mean values before and after 6MWT were: SpO<sub>2</sub> =  $92.0 \pm 4.5$  vs.  $91.4 \pm 4.6$ ; Borg score for dyspnea =  $1.2 \pm 1.0$  vs.  $2.4 \pm 1.7$ ; and mean distance walked –  $380.1 \pm 84.4$  m. Mean DNA damage values before ( $27.9 \pm 19.2$ ) and immediately after ( $29.6 \pm 29.6$ ) 6MWT were not significantly different ( $p = 0.904$ ). The analysis performed 48 hours after 6MWT showed a nonsignificant reduction of damage ( $18.3 \pm 13.0$ ;  $p = 0.099$ ). *Conclusions* The physical effort during 6MWT did not cause an immediate increase in DNA damage, and did not stimulate DNA repair mechanisms in patients with COPD.

**Key Words:** Pulmonary Disease, Chronic Obstructive; comet assay; DNA damage.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ALAT-Associação Latino-Americana de Tórax  
ATS- American Thoracic Society  
CO<sub>2</sub>- Gás Carbônico  
CRF- Capacidade Funcional Residual  
DNA- Ácido Desoxirribonucléico  
DPOC- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica  
FNT- Fator de Necrose Tumoral  
FNT  $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$   
GOLD- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease  
GSTP1- Glutathione S transferase P1  
IL - Interleucina  
IMC- Índice de Massa Corpórea  
LBA- Lavado Broncoalveolar  
LPO- Peroxidação Lipídica  
MRC- Medical Research Council  
Mrna- Ácido Ribonucléico Mensageiro  
NO- Óxido Nítrico  
NF-KB- Fator Nuclear de Transcrição  
OH- Radical Hidroxila  
OMS- Organização Mundial da Saúde  
PaCO<sub>2</sub>- Pressão Arterial de Gás Carbônico  
ROS- Espécies Reativa de Oxigênio  
RP- Reabilitação Pulmonar  
SCGE- Single Cell Gel Electrophoresis Assay  
SpO<sub>2</sub> - Saturação Periférica de Oxigênio  
TC6-Teste de Caminhada dos Seis Minutos  
VA- Via Aérea  
VEF<sub>1</sub> -Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo

VRE-Volume de Reserva Expiratório

VO<sub>2</sub>-Consumo de Oxigênio

## LISTA DE SÍMBOLOS

m- Metros

min- Minutos

ml- Mililitros

%- Porcentagem

>- Maior que

<-Menor que

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 EMBASAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
2.1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC) .....	18
2.2 ALTERAÇÕES DOS MÚSCULOS RESPIRATÓRIOS E ESQUELÉTICOS NO DPOC .....	19
2.3 DESNUTRIÇÃO .....	22
2.4 INTOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO .....	23
2.5 BASE ESTRUTURAL E CELULAR NO DPOC.....	24
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	26
2.7 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO DPOC .....	27
<b>2.7.1 Peróxido de hidrogênio .....</b>	<b>27</b>
<b>2.7.2 Óxido nítrico exalado .....</b>	<b>28</b>
<b>2.7.3 Produtos da peroxidação lipídica (LPO).....</b>	<b>28</b>
2.8 FATORES GENÉTICOS .....	29
2.9 DANO DO DNA .....	30
2.10 REPARAÇÃO DO DNA .....	31
<b>2.11 Teste da caminhada dos seis minutos .....</b>	<b>32</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>35</b>
3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	35
3.2 ANÁLISE DO DANO DE DNA.....	36
<b>4 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>
<b>5 O teste da caminhada dos seis minutos não causa dano significativo no dna de portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica ( DPOC) .....</b>	<b>45</b>
<b>6 The 6-minute walk test does not induce significant DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease .....</b>	<b>56</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>67</b>

**8.1 Anexo A ..... 67**  
**8.2 Anexo B..... 69**

## 1 INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma enfermidade respiratória prevenível e tratável, que se caracteriza pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo, que não é totalmente reversível. A obstrução do fluxo aéreo é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos, causados primariamente pelo tabagismo.

O processo inflamatório crônico pode produzir alterações nos brônquios (bronquite crônica), bronquíolos (bronquiolite obliterante) e parênquima pulmonar (enfisema pulmonar), onde a predominância destas alterações é variável em cada indivíduo, tendo relação com os sintomas apresentados (II CONSENSO BRASILEIRO DE DPOC, 2004).

A DPOC se desenvolve após a exposição prolongada dos brônquios (condutos que levam o ar para dentro dos pulmões) às substâncias tóxicas contidas na fumaça inalada do cigarro, porém apenas 20% de fumantes desenvolvem a doença devido provavelmente a uma suscetibilidade genética caracterizada por uma instabilidade genética ( SIAFAKAS, 1999)

O fato do tabagismo ser o principal fator de risco para DPOC faz com que sua prevalência varie conforme o consumo tabágico. Em 2000, a Organização Mundial da Saúde contabilizou 2,74 milhões de morte em todo o mundo por DPOC, estimando existirem hoje 1.1 bilhão de fumantes com uma estimativa de que em 2025 existam 1.6 bilhão (www.goldcopd.com). No Brasil, o consumo de cigarros registrados no ano de 1989 foi de 162,3 bilhões de unidades. Ao menos 32 400 mortes anualmente são atribuíveis ao fumo no Brasil. Onde no ano de 2003 foi a quinta causa de internamento no sistema único de saúde, em maiores de 40 anos , com 196.698 internações com um custo de aproximadamente 72 milhões de reais. O projeto PLATINO, recentemente realizado com o objetivo de avaliar a prevalência de DPOC na América Latina, demonstrou que a prevalência em São Paulo variou de 6 a 15% dependendo do critério funcional utilizado ( JARDIM et al., 2004).

O tratamento dos pacientes com DPOC baseia-se em: cessação do tabagismo, broncodilatador inalatório, corticóide, oxigenioterapia, antibioticoterapia nas agudizações e reabilitação pulmonar.

Por outro lado, a limitação funcional determinada pela doença faz com que a qualidade de vida destas pessoas seja drasticamente modificada. Ocorre a perda da autonomia de viver. Atividades do dia a dia tais como: tomar banho, fazer a barba, fazer compras etc... ficam prejudicadas.

Os Programas de Reabilitação Pulmonar tem o objetivo, através da melhora do condicionamento físico que é conquistado, propiciar a inclusão social e às vezes até profissional, uma vez que todos os estudos realizados apontam melhora absoluta da qualidade de vida dos pacientes portadores de DPOC. Este tipo de tratamento consiste em um conjunto de técnicas destinadas a desenvolver no todo ou em parte, as habilidades do indivíduo no curso de doenças pulmonares crônica, encabeçadas por treinamento físico, após o paciente ter sido submetido a uma série de avaliações que medirão o grau de disfunção, limitação ao exercício e comprometimento da qualidade de vida (NORMANDIM, 2002).

O teste da caminhada dos seis minutos é utilizado como um instrumento para mensurar a capacidade de andar destes pacientes. Consiste em observar a tolerância do paciente e as alterações cardiorrespiratórias ocorridas durante o esforço. Deve ser realizado em uma superfície plana, em percurso retilíneo de no mínimo vinte e cinco metros durante seis minutos, monitorando a saturação de oxigênio, frequência respiratória, frequência cardíaca e do grau de dispnéia (Escala de BORG). O teste é encerrado quando o paciente completa os seis minutos propostos inicialmente, ou se precisar, por algum motivo interrompe-lo. As mesmas aferições realizadas antes do teste são feitas imediatamente após seu término (SILVA e cols., 2000). Este tem sido preconizado e utilizado nos programas de reabilitação, uma vez que as provas funcionais realizadas com o paciente em repouso podem subestimar a capacidade de exercício do paciente (GARROT, 2000).

Troosters T. et al., (2002) observaram que o valor do consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) durante o teste de caminhada dos seis minutos foi comparável com aquele alcançado no pico do exercício incremental no cicloergômetro num grupo de pacientes com DPOC. Estes mesmos autores evidenciaram em outro estudo com portadores de DPOC, que a velocidade da caminhada durante o teste de seis minutos não difere da velocidade máxima medida no teste incremental.

O DNA das células sofre influências de substâncias tóxicas chamadas agentes mutagênicos. Nos indivíduos portadores de DPOC, o cigarro aumenta o dano no DNA, isto é,

epidemiologicamente evidenciado causado pela exposição ocupacional causada pelo hábito de fumar.

O DNA também sofre danos pelo excesso de atividade física, que provavelmente serão reparados, em até 24 horas após o exercício. Estes reparos variam de acordo com as condições físicas prévias dos indivíduos (MALUF, 2004).

O dano de DNA causado pelo hábito de fumar, pela idade e por outros fatores foi examinado em linfócitos do sangue periférico de 100 indivíduos saudáveis, habitantes de Pisa (Itália). O comprimento de migração do DNA mostrou-se significativamente aumentado em indivíduos fumantes, sendo que o efeito do cigarro foi mais significativo nas mulheres. Não foi encontrada diferença significativa entre indivíduos de diferentes idades. A análise do dano do DNA nos pacientes com DPOC é de extrema importância uma vez que já apresentam um dano anterior provocado pelo hábito de fumar (ERDTMANN; HENRIQUES; SILVA, 1999; SIAFAKAS, 1999).

A técnica de eletroforese em célula única (SCGE - single cell gel electrophoresis), ou eletroforese em microgel ou ainda técnica do cometa, é uma técnica rápida e sensível para medir sítios sensíveis ao pH básico (alcali-lábeis) e quebras no DNA de células de mamíferos (Singh et al., 1988; O'Neill et al., 1993). A técnica do cometa é uma nova maneira de medir lesões no DNA pela migração de fragmentos, detectando, principalmente, quebra de cadeias simples (BETTI et al., 1994).

Considerando o conhecimento já existente de que o tabagismo danifica o DNA e também que o exercício extenuante é outro fator sabidamente danificador de DNA, propõem-se avaliar este dano em pacientes portadores de DPOC submetidos ao teste de caminhada, situação considerada de exercício extremo neste grupo de indivíduos, além de observar a capacidade de reparação deste DNA 48 horas após o teste de caminhada. A utilização do teste do cometa pré e pós o teste de caminhada dos seis minutos e 48 horas após, analisará o dano no DNA que este procedimento pode causar neste paciente, bem como sua capacidade de reparo.

Já foi demonstrado que após o teste da caminhada dos seis minutos ocorre um aumento do estresse oxidativo (HANNEKE et al., 2006). Sabendo que as espécies reativas de oxigênio podem, ao penetrar na célula, determinar dano de DNA e que portadores de DPOC já têm este dano aumentado quando comparado com indivíduos normais (MALUF et al., 2007), foi elaborada a hipótese de que pacientes portadores de DPOC ao serem submetidos ao teste da

caminhada dos seis minutos poderiam apresentar aumento no dano de DNA. Tendo como o objetivo deste trabalho avaliar o dano de DNA antes e depois da caminhada dos seis minutos em pacientes portadores de DPOC.

## 2. EMBASAMENTO TEÓRICO

### 2.1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC)

A DPOC é uma enfermidade respiratória que pode ser prevenida e tratada e com comprometimento extra-pulmonar significativo, o que pode contribuir para a severidade do estado de cada paciente. O componente pulmonar caracteriza-se pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo, que não é totalmente reversível. Esta obstrução é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos, causados primariamente pelo tabagismo (CELLI, 2006, II CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DPOC, 2004; GOLD, 2006).

O fumo é a principal causa da DPOC, sendo que de 15% a 20% dos fumantes apresentam a doença e cerca de 90% dos indivíduos que desenvolvem a doença eram fumantes. Porém, existem outros fatores de risco individuais como: deficiência  $\alpha$ -1 anti-tripsina, hiper-responsividade brônquica, desnutrição, prematuridade, deficiência de glutathione transferase, suscetibilidade genética além dos fatores externos que podem contribuir para o aparecimento do DPOC tais como a poeira ocupacional, irritantes químicos, fumaça de lenha, infecções respiratórias graves na infância, condição sócio-econômica (GOLD, 2006; SANDFORD, SILVERAN, 2002; WOUTERS; CREUTZBERG; SCHOLS, 2002).

Portadores de DPOC relatam como principais sintomas a fadiga e a dispnéia que podem ser verificados pelo aumento do consumo de oxigênio ( $VO_2$ ), da ventilação pulmonar (VE) e da produção de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ). Esses parâmetros aparecem inicialmente diante de esforços moderados, mas, à medida que a doença progride, piora a intensidade, aparecendo a partir de esforços mínimos, como: pentear os cabelos, trocar de roupa, ou ainda, cuidar da higiene pessoal (REGUEIRO et al., 2006).

A dispnéia é o sintoma mais debilitante em portadores de DPOC, presente em todos os pacientes, principalmente durante a exacerbação da sua doença. Vários fatores fisiopatológicos contribuem para a piora da dispnéia. Entre eles está o aumento da carga mecânica intrínseca nos músculos inspiratórios, a restrição mecânica da parede torácica, a fadiga dos músculos

inspiratórios, o aumento da demanda ventilatória, a anormalidade nas trocas gasosas, a hiperinsuflação torácica e efeitos cardiovasculares. O alívio da dispnéia é um importante alvo no tratamento da doença, sendo esta parcialmente reversível. A percepção da dispnéia modifica-se entre pacientes com o mesmo estágio da doença e é influenciada por fatores psicossociais. Pode ser medida através de questionários padronizados, como o Medical Research Council (MRC), bem como através da escala de BORG (BESTALL et al., 1999; GOSSELINK, 2005; MAHLER; GUYATT; JONES, 1998; PLATA, 2007).

Em 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em 2,74 milhões as mortes por DPOC em todo o mundo, além do aumento do número de tabagistas de 1,1 bilhões para 1,6 bilhões. Em países onde a renda é baixa e média, o crescimento é alarmante. Em 1990, a DPOC estava classificada como a 6ª doença em termos de impacto global; estima-se que em 2020 ela venha ocupar a 3ª posição. Atualmente é a 4ª causa de morte nos EUA (atrás das doenças cardíacas, do câncer e da doença cerebrovascular) (CHAPMAN, et al. 2006; GOLD, 2005; MANNINO et al., 2006).

O estudo PLATINO, realizado pela Associação Latino Americana de Tórax (ALAT) na cidade de São Paulo, encontrou que a prevalência de DPOC foi de 15,8% na população com idade igual ou superior a 40 anos. No Rio Grande do Sul, foi realizado um estudo na cidade de Pelotas, onde foi identificada uma prevalência de 12,5 % na população adulta, sendo maior em homens, idosos, pacientes com menor grau de escolaridade, menor índice de massa corporal, maior exposição à fumaça do cigarro e na população de cor branca (MENEZES et al., 2005).

## 2.2 ALTERAÇÕES DOS MÚSCULOS RESPIRATÓRIOS E ESQUELÉTICOS NO DPOC

A alteração da mecânica pulmonar é originada pela obstrução brônquica, que ocasiona o deslocamento do ponto de igual pressão para as vias aéreas (VA), que não possuem cartilagens, favorecendo o aprisionamento de ar. Cronicamente, este processo fisiopatológico tende a levar à hiperinsuflação pulmonar, o que inicialmente reduzirá a capacidade física diante de grandes esforços e, posteriormente, mesmo quando o paciente estiver em situação de repouso. Existem evidências de que a hiperinsuflação pulmonar resulta em adaptações estruturais dos músculos da caixa torácica, principalmente do diafragma (CARVALHO; BRUNETO; PAULIN, 2003).

A hiperinsuflação estática ocorre devido à diminuição da elasticidade decorrente da destruição do tecido elástico pulmonar. Já a hiperinsuflação dinâmica está relacionada com o

grau de limitação do fluxo aéreo e com o tempo disponível para a expiração. Porém, em ambas, a respiração permanece comprometida por dois mecanismos restritivos, a redução da capacidade inspiratória e o aumento do trabalho respiratório. A diminuição de capacidade dos músculos respiratórios que gera pressão intratorácica negativa deve-se aos seguintes mecanismos: piora da relação comprimento-tensão, diminuição da zona de aposição, diminuição da curvatura do diafragma e alteração do arranjo crural e costal do diafragma (LAGHI, TOBIM, 2003).

A maior demanda inspiratória ocorre porque a pressão da musculatura inspiratória durante a fase passiva expiratória é três vezes maior do que em um indivíduo saudável, resultando em maior consumo energético e menor eficiência. Existem algumas anormalidades das vias aéreas que também contribuem para o aumento da tensão dos músculos respiratórios, tais como: a resistência ao fluxo inspiratório ser quatro vezes maior e ocorrer a perda da elasticidade pulmonar, o aumento da ventilação máxima em 50%, o aumento da constante de tempo e a frequência (LAGHI, TOBIN, 2003).

A diminuição no número de mitocôndrias, de enzimas oxidativas, das fibras tipo I (61% para 46%) e da capilaridade acontecem em resposta a uma maior demanda dos músculos respiratórios. Ocorrem também alterações funcionais multifacetadas, envolvendo modificações metabólicas complexas como a hipoxemia, hipercapnia, distúrbios eletrolíticos, alterações inflamatórias, miopatia por esteróide, “cor pulmonale”, desnutrição e aumento no estresse oxidativo (BARREIRO et al., 2005; LEVINE et al., 1997; LEVINE et al., 2002; SIN, MAN, 2006; WOUTERS; CREUTZBERG; SCHOLS, 2002).

Em decorrência da descaracterização da arquitetura do diafragma (rebaixamento e aplainamento), faz-se necessário o recrutamento progressivo de novos músculos acessórios, pois é necessária a manutenção da contração durante todo o ciclo, levando ao aumento do consumo energético, do trabalho respiratório, à diminuição do aporte sangüíneo e à fadiga ou falência funcional. O músculo diafragma também sofre uma alteração em relação as suas fibras. Há nesse caso, um aumento de fibras do tipo I que se relacionam com a severidade da doença (BARREIRO et al., 2005; OROZCO-LEVI et al., 1999).

A musculatura intercostal é menos efetiva devido à horizontalização das costelas e ao aumento da impedância da caixa torácica em relação ao diafragma. De acordo com a lei de Laplace, o aumento no raio da curvatura leva ao aumento da tensão passiva do diafragma e à

diminuição na pressão trans-diafragmática (3,5%), sendo menos importante que a alteração do comprimento de fibra do diafragma (LAGHI, TOBIN, 2003).

Além destas alterações da caixa torácica e dos músculos respiratórios, os portadores de DPOC apresentam também adaptações de musculatura periférica, principalmente de membros inferiores, corroborando para diminuição da força e a *endurance*, provavelmente por interação entre fatores locais e sistêmicos, sendo altamente dependente da função específica do músculo (BARREIRO et al., 2005).

A perda de massa muscular em pacientes com DPOC está associada à diminuição da força dos músculos periféricos, piorando a qualidade de vida, gerando substancial aumento do risco de mortalidade, independente dos tradicionais fatores como a função pulmonar, idade e permanência do hábito tabágico (DEBIGARÉ; CÔTÉ; MALTAIS, 2001; SIN, MAN, 2006).

Estudos utilizando biópsias do músculo quadríceps verificaram uma significativa redução de fibra tipo I e um aumento de fibra tipo II, o que provavelmente contribuía para a fadiga e a redução da *endurance* muscular observada em portadores de DPOC. Além disso, microscopicamente, estes músculos apresentam mudanças inflamatórias, o que contribui para aceleradas apoptoses (AGUSTI, et al., 2004; MADOR, BOZAKANAT, 2001).

Os efeitos crônicos dos mediadores inflamatórios podem ser também responsabilizados pela disfunção muscular, em particular dos músculos respiratórios que são mais suscetíveis à formação de espécies de oxigênio reativo (ROS) (REID, 2001).

Dentre os possíveis mecanismos de disfunção muscular, a falta de condicionamento físico é o maior contribuinte, pois estes pacientes geralmente têm um estilo de vida extremamente sedentário. Com isto, seus músculos atrofiam, diminuem a capilaridade vascular e a concentração das enzimas aeróbicas. Outros fatores que contribuem para a disfunção muscular são: a redução dos níveis de hormônios anabólicos (hormônio de crescimento), a utilização de corticóides (miopatia), a hipoxemia, a hipercapnia e a desnutrição (CASABURI, 2000).

### 2.3 DESNUTRIÇÃO

A DPOC está associada a alterações no mecanismo de resposta inflamatória, acompanhada de elevação dos níveis sanguíneos de IL-6 e IL-8, FNT-  $\alpha$  e proteína C reativa; além de manifestações clínicas sistêmicas, como a perda de peso, diminuição de força, de massa muscular e de tecido (BROEKHUIZEN et al., 2005; DEBIGARÉ; CÔTÉ; MALTAIS, 2001; JONES, AGUSTI, 2006; WOUTERS; CREUTZBERG; SCHOLS, 2002).

A relação entre inflamação sistêmica e perda de peso no paciente com DPOC pode ser parcialmente explicado pelo aumento do FNT, considerado um mediador de caquexia em várias condições clínicas. O FNT-  $\alpha$  é a citocina mais estudada da super família do FNT, sendo fundamental na indução inflamatória em fumantes. Porém, este processo inflamatório persiste mesmo depois da cessação do fumo, sendo considerado o maior determinante na perda de peso em portadores de DPOC, atingindo 20 a 30% dos doentes estáveis e podendo chegar à proporção de 50% daqueles hospitalizados (MUKHOPADHYAY; HOIDAL; MUKHERJEE, 2006; VERNOOY et al., 2002).

O aumento dos níveis plasmáticos de FNT- $\alpha$  geram uma diminuição de proteínas contráteis no músculo, por diminuição do anabolismo muscular, tendo como efeito secundário a anorexia, o catabolismo muscular e, conseqüentemente, a diminuição da contração muscular (EID, et al., 2001; REID; LANGNERGREN; WESTERBLAD, 2002; LI, et al., 2000; SCHOLS et al., 1996).

O hipermetabolismo contribui para a perda de peso e para a atrofia muscular. O total de energia utilizada diariamente está aumentado, tanto no repouso quanto em atividade. Há igualmente um aumento no consumo de oxigênio para respirar e uma diminuição da efetividade dos músculos esqueléticos periféricos. Outro evento importante é a apoptose, um mecanismo que provavelmente contribui para a redução de células musculares, pois há uma correlação inversa entre o grau de apoptose e o índice de massa corporal (FERREIRA, 2003; TAKABATAKE, et al., 2000).

A desnutrição tem um impacto negativo na condição clínica de pacientes com DPOC, pois a nutrição e a ventilação estão relativamente unidas. O oxigênio e os nutrientes são fundamentais no processo de respiração e na suplementação de energia para as atividades de vida diária (DEBIGARÉ, CÔTÉ. MALTAIS, 2001).

A perda de peso está associada com o aumento de mortalidade independentemente do grau de obstrução ao fluxo aéreo. A perda de massa gorda resulta também em disfunção muscular periférica, diminuição da capacidade de exercício e piora da qualidade de vida destes pacientes (DOURADO et al, 2006; LAGHI, TOBIN, 2003; MACNEE, 2005).

## 2.4 INTOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO

Pitta et al.(2006), em um estudo, demonstraram que os portadores de DPOC não andam mais do que 30 minutos por dia e, portanto, não atingem a atividade física mínima recomendada pelas diretrizes do *American College of Sports Medicine* (1995). A inatividade está, portanto, relacionada com a maior taxa de mortalidade.

O estilo de vida sedentário é o primeiro potencial fator para a disfunção muscular e para a intolerância ao exercício. Além disso, a dispnéia e a fadiga muscular, ambos resultantes da interação da limitação ventilatória com as anormalidades na exalação de gases, da disfunção muscular periférica e da disfunção cardíaca contribuem ainda mais para essa intolerância. A ansiedade e a motivação do paciente também têm sido apontadas como fatores que podem influenciar na intolerância ao exercício (MAESTRU, 2004; SIN, MAN, 2006).

Em alguns pacientes, ocorre uma piora da hiperinsuflação que resulta em um aumento do trabalho respiratório e em sobrecarga para os músculos respiratórios, o que intensifica a sensação de desconforto para respirar. A intensidade do exercício é outro fator determinante, pois se sabe que a intolerância pode ser secundária à sobrecarga da musculatura, visto que os exercícios extenuantes aumentam o estresse oxidativo (HEUNKS, 1999; TROOSTERS et al., 2006).

A utilização crônica de altas doses de corticoesteróides inalatórios pode estar diretamente associada com o desenvolvimento de fraqueza muscular; bem como o aumento dos mediadores inflamatórios, principalmente durante as exacerbações da doença (TROOSTERS et al., 2006). Assim, enquanto nos indivíduos saudáveis a limitação ao exercício físico normalmente acontece em consequência ao descondicionamento do sistema cardiocirculatório, nos portadores de DPOC esta limitação se dá pela insuficiência do sistema respiratório, da fraqueza e da limitação muscular (HEUNKS, 1999).

## 2.5 BASE ESTRUTURAL E CELULAR NO DPOC

Estudos recentes demonstram que a DPOC é caracterizada pela inflamação crônica associada com alterações dos componentes celulares do pulmão, evidenciada através dos níveis de mediadores inflamatórios circulantes e dos marcadores de estresse oxidativo. As células inflamatórias, uma vez recrutadas para o espaço aéreo, tornam-se ativas e geram ROS em resposta a um nível suficiente de estímulo (BARNES, 2003; CREUTZBERG; RAHMAN; WOUTERS, 2003; SCHOLS, 2002).

Os portadores de DPOC têm um número elevado de células inflamatórias, entretanto, a relação entre estas células, a seqüência com que elas aparecem e a sua persistência, ainda permanecem desconhecidas. Mas se sabe que o processo inflamatório e a intensidade deste se correlacionam com a gravidade da doença (MANNINO, et al., 2006; PINTO-PLATA et al., 2007; SAETTA et al, 2001; SZULAKOWSKI et al., 2006).

O processo inflamatório crônico associa-se com o aumento de múltiplos genes associados à reações inflamatórias: citocinas, quimiorreceptores e moléculas de adesão. Muitos destes genes são regulados pelo fator nuclear de transcrição (NF- $\kappa$ B) o qual está aumentado em pacientes com DPOC e fumantes, ativados por citocinas pró inflamatórias e pelo estresse oxidativo (BARNES, 2006; GARY, STEVEN, 2003; SZULAKOWSKI et al., 2006).

As células inflamatórias predominantes modificam-se durante a doença estável e durante suas agudizações. No estágio moderado, a mucosa brônquica do portador de DPOC é colonizada com o linfócito T, particularmente CD8<sup>+</sup> e os macrófagos, que são as células inflamatórias predominantes. Estas células secretam uma variedade de substâncias que incluem: metabólitos do ácido aracônico, tromboxano A<sub>2</sub>, prostaglandinas E<sub>2</sub> e D<sub>2</sub>, leucotrieno B<sub>4</sub>, ROS, citocinas inflamatórias, TNF- $\alpha$ , fator inibitório do macrófago, metabólitos do oxigênio – ânion superóxido, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e radical hidroxila (OH<sup>-</sup>); enzimas – metaloproteinases, elastases; e óxido nítrico (NO), além de fatores quimiotáticos que contraem a musculatura lisa, ativam glândulas mucosas e as proteínas da matriz extracelular (BARNES; PAUWELS; SHAPIRO, 2003; BOER, 2002; DI STEFANO et al., 2004; DONNELL, et al, 2006).

Os marcadores de inflamação neutrofílica (mieloperoxidase, IL-8 e FNT- $\alpha$ ) migram da circulação para o epitélio brônquico das vias aéreas nas exacerbações e estão relacionados com

o aumento da secreção brônquica e a diminuição do VEF<sub>1</sub>%, com a subsequente destruição alveolar, seguida da piora no alçapamento de ar, o que eleva o risco de internações. Pacientes hospitalizados com agudização da doença apresentam mudanças significativas nos níveis de citocinas sistêmicas, que se correlacionam com os sintomas e com a função pulmonar, porém estes mediadores declinam uma semana depois (DENTENER et al., 2006; PLATA et al., 2007).

Na via aérea central, a limitação do fluxo aéreo está associada com aumento de macrófagos e de linfócitos T na sua parede e de neutrófilos no lúmen, sugerindo a passagem seletiva. Este mecanismo ainda não foi esclarecido, mas pode ser explicado pelo desequilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias, principalmente a interleucina 10 (IL-10), sendo esta a citocina responsável pela diminuição da resposta inflamatória; a interleucina 8 (IL-8) promove a quimiotaxia do neutrófilo e o FNT que ativa a adesão molecular (BARNES, 2006; DENTENER et al, 2006; MUKHERJEE; HOIDAL; MUKHOPADHYAY, 2006; TERAMOTO, 2005).

Estudos indicam que o início da inflamação e o FNT-  $\alpha$  são capazes de estimular o estresse oxidativo em vários tecidos e células, pois o FNT-  $\alpha$  é responsável pela amplificação da resposta inflamatória (BAST; BOOTS; HAENEEN, 2003; BOER, 2002; CARNEVALI et al., 2003; DENTENER, 2006; DONNELL, et al, 2006).

Outras células encontradas nas vias aéreas destes pacientes são os eosinófilos, até então, diretamente relacionados com a asma. Em contrapartida existem também vários trabalhos que enfatizam a eosinofilia nas exacerbações da DPOC, com níveis similares aos pacientes asmáticos. Esses estudos demonstram que a presença dos eosinófilos na DPOC pode ser um fator inflamatório comum com a asma (DI STEFANO et al., 2004; O DONNELL et al., 2006; LAPA e SILVA, 2006; SALAMONE et al., 2001).

Os neutrófilos são células abundantes no sangue, mas praticamente ausente nos tecidos pulmonares em pessoas saudáveis. São responsáveis pela amplificação e perpetuação do processo inflamatório como fonte geradora de ROS. Na DPOC, o corticosteróide prolonga a sobrevivência destas células, mantendo o processo neutrofílico pulmonar; contudo, estimula a fagocitose dos macrófagos em até três vezes mais. Outro fator que diminui a apoptose dos neutrófilos é a persistência da hipóxia celular, muito freqüente em DPOC graves, situação na qual estas células são predominantes. Há também uma hipótese de que os neutrófilos são os responsáveis pela perpetuação do desequilíbrio entre proteases e anti-proteases no parênquima

pulmonar (DI STEFANO et al, 2004; MACNEE, 2005; O DONNELL et al., 2006; RUFINO, LAPA e SILVA, 2006; SALAMONE et al, 2001).

Noguera et al. (1998) realizaram um estudo e demonstraram que fumantes, que desenvolvem a DPOC, têm um aumento das ROS liberadas através da circulação pelos neutrófilos, quando comparados com fumantes que não desenvolvem a doença. Isto sugere que o aumento do número destas células inflamatórias tem uma relação com o desenvolvimento da doença.

Leanderson e Tagesson (1994) observaram que os neutrófilos podem causar dano oxidativo no DNA nas células epiteliais alveolares devido à formação das ROS, principalmente em pacientes fumantes, sugerindo que o recrutamento de células inflamatórias causa dano oxidativo no DNA das células pulmonares.

## 2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

A via aérea está exposta a altos níveis de oxidantes ambientais, como: tabagismo, exposição ocupacional, poluição intra e extra-domiciliar que estimulam a produção de anti-oxidantes extracelulares para que ocorra o equilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes, suficiente para evitar o desenvolvimento da doença. Porém, na ocorrência de uma doença nas vias aéreas, como a DPOC, existe um desequilíbrio destes fatores, gerando o estresse oxidativo (BOWLER; CRAPO; RUSSELL, 2002; KARADAG et al., 2004; MACNEE, 2005).

O estresse oxidativo ocorre quando as ROS são produzidas em excesso a partir dos mecanismos de defesa dos anti-oxidantes, com conseqüências prejudiciais que incluem danos de lipídios, de proteínas e de DNA (BARNES, 2006; BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003; BOOTS; HAENEEN; BAST, 2003; CARNEVALI et al., 2003; CASELLA et al., 2006; RAHMAN, 2003).

O fumo contém mais de 1.017 partículas e muitas são produtos oxidantes, incluindo óxidos de nitrogênio, radicais orgânicos livres e aldeídos, o que favorece o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão, como os macrófagos alveolares que são estimulados a produzir ROS e a liberar outros mediadores, atraindo os neutrófilos e outras células inflamatórias (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003; BAST; HAENEN; DOELMAN, 1991; RUFINO, SILVA e LAPA, 2006).

BOWLER, CRAPO e RUSSELL (2002) e RAHMAN (2003) estudaram o papel das ROS na resposta inflamatória que ocorre tanto nas vias aéreas periféricas como nas centrais de pacientes com DPOC. Concluíram que as ROS tem como efeito um aumento da resposta inflamatória, podendo causar lesão direta ou induzir a reações metabólicas secundárias, as quais podemos citar: alteração no remodelamento da matriz extra-celular, apoptose, respiração mitocondrial, proliferação celular, manutenção do surfactante, resposta no reparo celular e modulação imune do pulmão.

Desta forma, o estresse oxidativo pode aumentar a expressão dos genes tanto pró como anti-inflamatórios. Entretanto, existindo equilíbrio entre os genes e os níveis de glutathione em resposta às ROS, o processo inflamatório pode ocorrer como efeito de proteção celular. Caso contrário, ocorrerá o desenvolvimento da lesão pulmonar (PIERROU, et al, 2006; RAHMAN, 2003; TERAMOTO et al., 2005).

## 2.7 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO DPOC

Existem vários marcadores de estresse oxidativo que podem ser identificados em portadores de DPOC e detectados durante a respiração, como o aumento do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) exalado. Particularmente durante a agudização, podem ser detectados de maneira sistêmica e pulmonar, medidos por níveis de peroxidação lipídica (LPO) e degradação de produtos da matriz extracelular no sangue periférico ou no lavado broncoalveolar (LBA) (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS; MACNEE, 2005; PIERROU et al., 2006; VAART et al., 2004).

### 2.7.1 Peróxido de hidrogênio

O  $H_2O_2$  é exalado durante a respiração e reflete diretamente a produção de oxidantes pulmonares. Nos pacientes com DPOC e fumantes, estes níveis estão elevados quando comparados com indivíduos saudáveis e ex-fumantes. Durante as exacerbações, os níveis de  $H_2O_2$  mantêm-se elevados, sendo uma parte, originada do aumento da liberação de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) pelos macrófagos, que estão presentes em um número até cinco vezes maior nos fumantes (BOOTS; HAENEEN; BAST, 2003).

Mercken et al., (2005) demonstraram em seu estudo com portadores de DPOC, um aumento significativo do  $H_2O_2$  depois de exercícios com intensidades diferentes, detectando um aumento das ROS, sugerindo que o exercício induzia ao estresse oxidativo e poderia ser relacionado tanto com a intensidade, quanto com a duração deste. Esse fato poderia ser atribuído à diferença no recrutamento da ventilação pulmonar entre exercícios máximo e submáximo.

### **2.7.2 Óxido nítrico exalado**

O gás óxido nítrico (ON) é produzido no pulmão por sintase de ON (NOS) que existe em duas formas: cNOS e Inos. O último pode ser induzido por estímulo inflamatório pulmonar e refletir na inflamação da VA. Conseqüentemente, os níveis de ON exalado são considerados marcadores de inflamação da VA e uma medida indireta de estresse oxidativo. Estudos demonstram níveis elevados de ON exalado em pacientes com DPOC e fumantes se comparados com não fumantes e pessoas saudáveis (BOOTS; HAENEEN; BAST, 2003).

### **2.7.3 Produtos da peroxidação lipídica (LPO)**

O LPO pode ter um papel importante como sinalizador de eventos nos mecanismos moleculares, principalmente relacionado à inflamação pulmonar em portadores de DPOC. Entretanto, a origem do aumento destes níveis de LPO nesta doença estão incertas. Trata-se do resultado de um processo pulmonar associado com a ativação de macrófagos alveolares, neutrófilos ou causada pela reação contínua de LPO no parênquima, alvéolos ou via aérea, induzido pela inalação de oxidantes oriundos do cigarro (BOOTS; HAENEEN; BAST, 2003; RAHMAN, 2003;). Os níveis de LPO estão aumentados em pacientes com DPOC, principalmente durante as exacerbações. Além disso, esses níveis apresentam correlação negativa com um marcador de função pulmonar ( $VEF_1$ ) (BOOTS; HAENEN; BAST, 2003; MACNEE, 2005; RAHMAN, 2003).

Um estudo realizado por Heunks et al. (1999), utilizando um protocolo de exercício físico extenuante para portadores DPOC graves, demonstrou que este tipo de atividade física resulta em dano do tecido, mediado por radicais livres, observado através do aumento de LPO no plasma, consituindo-se este num ótimo marcador de estresse oxidativo.

## 2.8 FATORES GENÉTICOS

O DNA é um polímero, de apenas quatro subunidades (A-C-G-T), sendo encontrado em todos os seres vivos. A espécie humana, em sua evolução, expõe-se a uma infinidade de genotóxicos pela ingestão de alimentos, bebidas (contaminantes, naturais da dieta), pela inalação de fumaças e irradiações do meio ambiente. A exposição a agentes genotóxicos em nosso meio ambiente pode causar uma variedade de efeitos sobre a saúde humana. Alguns expressam-se imediatamente, enquanto outros podem levar anos para se manifestar (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Existem fatores intrínsecos e extrínsecos que podem influenciar na mutação do DNA, os quais interagem com a vida desde sua origem. As suas concentrações mudaram ao longo da evolução, e as espécies sobreviventes adaptaram-se a essas mudanças. Algumas são difíceis de eliminar, como as radiações naturais e a presença do oxigênio, mas, conhecendo adequadamente o risco, podemos reduzir seus efeitos, como os da fumaça do cigarro e da nicotina, reduzindo assim as mutações, pela eliminação da fonte. Além destes agentes ambientais, que podem ser chamados de extrínsecos, existem também os erros, mudanças intrínsecas à composição química da molécula de DNA (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Alguns estudos genéticos realizados com portadores de DPOC sugerem que os polimorfismos genéticos em genes de enzimas metabolizadoras de genotóxicos podem ter um papel individual na suscetibilidade de oxidantes pulmonares e no desenvolvimento da doença. O primeiro passo desse metabolismo é a alteração dos componentes do pulmão em um mecanismo protetor importante, responsável pela manutenção do estresse oxidativo (TERAMOTO, 2005; SAMARA et al., 2005).

A nicotina é a substância do tabaco responsável pelo desenvolvimento e manutenção do tabagismo. Em humanos, a nicotina é oxidada para cotidina e posteriormente para trans-3-hidroxicotidina pela enzima de fase I CYP2A6. A mutação de ponto no exon três (alelo CYP2A6) e a deleção do gene CYP2A6 resulta em pouca ou nenhuma atividade enzimática. Os indivíduos com este fenótipo são incapazes de metabolizar nicotina, fumam menos cigarros por dia e são menos suscetíveis a desenvolverem a dependência química que indivíduos sem mutação ou com duplicação do gene. O polimorfismo genético do exon 5 de fumantes com

glutathione S – transferase P1 (GSTP1) está associado ao desenvolvimento de DPOC em fumantes (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003; TERAMOTO, 2005).

Indivíduos que são portadores do alelo CYP2A6\* 1X2 (duplicação gênica) expressam atividade enzimática maior. A nicotina é metabolizada mais rapidamente, fumam mais cigarros para poderem manter os níveis de nicotina, que produz a sensação de prazer associada à droga. Eles se tornam dependentes mais rapidamente e estão, portanto, mais expostos a xenobióticos tóxicos. Dessa forma, é evidente o papel dos xenobióticos e a sua relação com o desequilíbrio anti-oxidante na patogênese da DPOC, pois se trata de uma doença que pode ser influenciada por fatores ambientais, genéticos, integração genótipo-ambiente-toxicidade e pela exposição ambiental (SANDFORD, SILVERMAN, 2002; SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

## 2.9 DANO DO DNA

Existem fatores não ocupacionais que podem influenciar no dano do DNA; a idade é um deles, pois afeta significativamente a frequência de mutações nas células humanas em homens e mulheres. O aumento das mutações com a idade pode ser devido ao acúmulo de DNA lesado e não reparado e/ou à diminuição na capacidade de reparação do DNA (BOLOGNESI et al., 1999; MALUF, 2004).

O hábito de fumar também pode alterar a frequência de mutações, pois causa uma variedade de problemas. Linfócitos de fumantes mostram um aumento significativo de cromossomos dicêntricos, anéis e trocas cromatídicas, o que indica uma forte correlação entre a atividade carcinogênica e a mutagênica do cigarro. O fumo, através de seus radicais livres e oxidantes, causa dano no DNA, sendo esta lesão dose dependente (BORISH, 1987; PRYOR, 1992). O cigarro contém componentes químicos que podem contribuir para a citotoxicidade e carcinogênese (BARNES, 2006). Isso pode ser verificado através de testes para medir a quebra da cadeia de DNA.

Kim et al (2004) realizaram um estudo em que células pulmonares fetais foram expostas à fumaça do cigarro. Foi, então, detectada quebra na cadeia do DNA. Em algumas células, iniciou-se um mecanismo de reparo e sobrevivência destas células de acordo com o tempo de exposição das mesmas.

Outro fator que pode influenciar o dano de DNA é o nível de atividade física. Exercícios físicos extenuantes levam ao estresse oxidativo, podendo causar lesões no DNA, as quais devem ser reparadas em até 72 horas depois do exercício. As condições físicas do indivíduo parecem influenciar nos níveis dessas lesões (MALUF, 2004).

## 2.10 REPARAÇÃO DO DNA

Todos os sistemas de vida existentes hoje são altamente organizados e programados para a sobrevivência, e todos têm a capacidade de detectar e corrigir erros/ mutações que ocorrem no seu DNA. Para controlar as mutações, existe o sistema de reparação que consegue corrigir a maior parte desses erros, sob controle da seleção natural (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Populações expostas a agentes mutagênicos têm uma determinada capacidade de reparar o DNA danificado, que é herdada e variável na população. Devido a isto, os indivíduos são mais ou menos sensíveis, no que diz respeito à manutenção da estabilidade do genoma, podendo apresentar uma frequência elevada de alterações genéticas sem estar, aparentemente, expostos a agentes mutagênicos ou estando sob uma forma de exposição em níveis muito baixos, de agentes comumente encontrados no meio ambiente.

O teste do cometa ou SINGLE CELL GEL ELETROPHORESIS ASSAY (SCGE) é um teste de genotoxicidade (agentes que causam mudança no genoma) capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes, demonstrando bastante sensibilidade e rapidez de resultados e baixo custo.

Segundo BETTI et al (1994), a técnica do cometa é uma maneira de medir lesões no DNA pela migração de fragmentos, detectando, principalmente, quebras de cadeias simples. O dano pode ser causado pelo hábito de fumar, pela idade e por outros fatores. De acordo com um estudo realizado por BETTI et al (1994) em que foi examinado linfócitos do sangue periférico de 100 indivíduos saudáveis, o comprimento de migração do DNA mostrou-se significativamente aumentado em indivíduos fumantes, sendo que o efeito do cigarro foi mais significativo em mulheres. Na observação no microscópio, os núcleos contendo o DNA intacto são redondos, enquanto, nas células lesadas, observa-se migração de DNA para fora do núcleo, apresentando forma similar a um “cometa”, o que originou a nomenclatura do teste.

A técnica de eletroforese em célula única SCGE é uma técnica rápida e sensível para medir sítios sensíveis ao pH básico (alcali-lábeis) e quebras no DNA de células de mamíferos (SINGH et al.,1988; O'NEILL et al.,1993). Ostling e Johanson descreveram o método pela primeira vez em 1984. As células eram colocadas em agarose, expostas a um agente mutagênico e submetidas à eletroforese. Desta maneira, observou-se uma espécie de cauda, que se formava nas células danificadas. Essa cauda é formada pelo DNA solto do núcleo, por quebras de cadeia simples ou dupla, e seu comprimento é diretamente proporcional à quantidade de DNA danificado.

Singh et al. (1988) introduziram condições alcalinas à técnica, produzindo quebras de cadeia simples de DNA em sítios alcali-lábeis. As condições alcalinas da técnica causam a separação do pareamento entre as bases, podendo, assim, a descontinuidade de cadeia simples ser detectada. Em pH neutro, a continuidade da dupla hélice não é afetada por uma quebra de cadeia simples ocasional. Porém, quebras de cadeia simples podem ter uma profunda influência no comportamento do DNA, já que a molécula de DNA, no núcleo, encontra-se super-enrolada e firmemente empacotada, e tais quebras liberam o enrolamento e induzem ao relaxamento da estrutura do DNA (MCKELVEY-MARTIN et al., 1993).

A principal limitação deste método é não ser um teste de mutagênese, pois o dano pode ser reparado ou ser muito sensível, o que exige cautela, além de um bom controle para a análise das conclusões; o tempo decorrido entre a exposição ao mutágeno e o tempo de preparação das lâminas, até a lise, deve ser curto (24h no máximo), pois o reparo inicia imediatamente.

Mercken et al.(2005) realizaram um estudo com portadores de DPOC utilizando o teste do cometa e verificaram que estes pacientes apresentam um aumento do dano no DNA imediatamente após realizarem protocolos de testes de exercícios máximo e submáximo.

## 2.11. TESTE DE CAMINHADA DOS SEIS MINUTOS

A medida do nível de atividade e da tolerância ao exercício de um indivíduo pode ser utilizada para identificar limitações funcionais, bem como quantificar o reflexo da doença sobre as atividades da vida diária e a subsequente qualidade de vida. Além disso, também é útil para prever o prognóstico da doença, permitindo uma prescrição segura de exercício, e para a avaliação de vários tratamentos (ROGERS, 2003).

O teste clínico de esforço visa diagnosticar a presença e a gravidade da doença, estabelecer a função cardiorrespiratória do indivíduo e avaliar o desempenho da reabilitação fisioterapêutica (ROBERGS et al., 2002).

O teste da caminhada dos seis minutos (TC6) é um teste simples, através do qual se observa a tolerância do paciente e as alterações cardiorrespiratórias ocorridas durante o esforço. O teste inclui medidas objetivas que demonstram a integridade das capacidades funcionais do paciente. Este deve ser realizado em uma superfície plana, em percurso retilíneo de no mínimo trinta metros de comprimento, durante seis minutos, com monitorização de saturação de oxigênio, da frequência respiratória, da frequência cardíaca e do grau de dispnéia. A mensuração da dispnéia deve ser realizada através de escalas ou índices que procuram situar o seu grau em um determinado momento, preferencialmente a escala de BORG (0 a 10) (ATS, 2002; TROOSTERS et al., 2005). Antes de iniciar o exercício, devem ser coletados os seguintes dados: frequência cardíaca, frequência respiratória, escore de dispnéia, saturação de oxigênio, avaliação da dor em membros inferiores e aferição da pressão arterial. Inicia-se a caminhada de esforço máximo com estimulação pelo técnico a cada minuto, utilizando as frases padronizadas.

O teste é encerrado quando o paciente completar os seis minutos propostos inicialmente, ou caso necessite, por algum motivo, ser interrompido antes. As mesmas aferições realizadas antes do teste são feitas imediatamente após seu término (ATS, 2002; RODRIGUES; VIEGAS; LIMA, 2002).

Existem alguns fatores que podem contribuir para um pior desempenho do TC6, tais como: idade avançada, sexo feminino, sobrepeso, corredor curto, déficit cognitivo que podem reduzir a distância percorrida. Por outro lado, pacientes com alta motivação, sexo masculino, membros inferiores longos e a suplementação de oxigênio, podem contribuir para um melhor desempenho (ATS, 2002).

O TC6 é o mais utilizado e validado, além de ser bem tolerado por portadores de DPOC, fazendo parte do índice multidimensional denominado BODE (índice de massa corporal, obstrução do fluxo aéreo, intensidade da dispnéia e capacidade de exercício), sendo melhor preditor de mortalidade do que o VEF1% isoladamente (CELLI et al., 2004).

As respostas fisiológicas deste teste em pacientes com DPOC foram descritas em estudos prévios e por isso, considerado por alguns autores como sendo um teste de exercício máximo ou submáximo. Troosters T. et al., (2002), observaram que o valor do consumo máximo

de oxigênio (VO<sub>2</sub>) e a velocidade da caminhada no TC6 foram comparáveis com os resultados alcançados no pico do exercício incremental no cicloergômetro em portadores de DPOC, demonstrando que o TC6 poderia ser considerado um teste de exercício máximo. No entanto, todos estes estudos são unânimes em concluir que o teste pode refletir melhor o nível de exercício funcional das atividades físicas diárias destes pacientes podendo significar um nível de atividade máxima para alguns e submáxima para outros (CELLI et al., 2004; HANNEKE et al., 2006; ROSA et al., 2006; TROOSTERS T, 2002).

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA**

O estudo caracteriza-se por um estudo prospectivo onde foram incluídos 27 (vinte e sete) portadores de DPOC encaminhados ao programa de reabilitação pulmonar do Centro Universitário Feevale, os quais foram submetidos ao TC6 como parte da avaliação para ingresso no programa. O diagnóstico de DPOC foi realizado de acordo com o GOLD (Global Initiative for Chronic Obstrutive Lung Disease) utilizando história clínica, exame físico e a confirmação da obstrução do fluxo aéreo através da razão do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) pela capacidade vital forçada (CVF) inferior a 70% do previsto. Todos os pacientes incluídos no estudo apresentavam DPOC de moderado a grave definido por um  $VEF1 < 60\%$  do valor previsto após o uso de broncodilatador. Como critérios de exclusão: pacientes com sinais de agudização da doença e ou comorbidades que impedissem de realizar atividade física. Todos os pacientes responderam ao questionário de saúde pessoal publicado pela International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC). O TC6 foi realizado segundo critérios da ATS, o corredor onde o teste foi executado tinha 48 m. As amostras de sangue foram coletadas antes, imediatamente após e 48 horas após a realização do TC6. Caso ocorresse alguma instabilidade clínica durante a realização do TC6, o mesmo era interrompido e repetido num outro dia. Ao término do teste, à distância percorrida foi aferida através de uma fita métrica em metros.

Todos os pacientes completaram o teste e nenhum utilizou oxigênio durante a execução do mesmo. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Centro Universitário e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os dados da amostra estão expressos em médias e desvio padrão. As diferenças entre as variáveis foram avaliadas utilizando o teste de Wilcoxon. Os dados foram analisados pelo programa SPSS 12.0.

### 3.2 ANÁLISE DO DANO DE DNA

O teste do cometa foi realizado de acordo com o protocolo de preparação e análise. As lâminas foram preparadas, adicionando 300ml de uma solução de agarose a uma lâmina e deixando a agarose solidificar (5-30 minutos a 4°C). A mistura de 5 µl de sangue total com 95 µl de agarose especial (low-melting-point agarose) foi adicionada a lâmina; uma lamínula foi imediatamente adicionada e as lâminas foram mantidas sob refrigeração durante 5 minutos, até que a cobertura de agarose com as células, solidificassem. Após, a lamínula foi cuidadosamente retirada e a lâmina mergulhada dentro de uma solução de lise gelada (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.2, 1% Triton X-100 e 10% DMSO). Após 24 horas, as lâminas foram removidas delicadamente da solução lítica e o excesso de líquido removido das bordas e da face inferior da lâmina. As lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese e preenchidas por uma solução tampão alcalina, fresca, para eletroforese (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, pH > 13). O líquido cobriu as lâminas, que foram deixadas na bandeja por 20 minutos antes de ligar a força. A eletroforese foi realizada a 25 V e 300 mA (~0.95 V/cm) por 20 minutos. As etapas acima foram realizadas sob a luz vermelha para evitar a indução de danos de DNA. Após a eletroforese, as lâminas foram removidas delicadamente da cuba, e o tampão neutralizador (0.4 M Tris, pH 7.5) foi acrescentado às lâminas três vezes, deixando cada vez, por 5 minutos. As lâminas foram enxaguadas 3 vezes com água destilada, secas no ar, no mínimo por 24 horas, e então coradas pela prata de acordo com Nadin et al. (2001). Para a avaliação dos danos do DNA, 100 células por indivíduo foram analisadas sob um microscópio ótico com uma ampliação de 200 X. As células foram contadas visualmente de acordo com a intensidade da cauda em cinco classes, de não danificado = 0, até muito danificado = 4. Conseqüentemente, a contagem total por indivíduo variou de 0 (nenhum dano) a 400 (dano máximo).

#### 4 REFERÊNCIAS

- AGUSTI A, MORLA M, SAUELA J, et al. NF-kappa $\beta$  activation and iNos upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax*. 2004;59:483-7.
- American Thoracic Society. ATS Statement: Guidelines for the Six-Minute Walk Test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166:111-117.
- American Thoracic Society / European Respiratory Society Statement on Pulmonary Rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006: 173; 1390-1413.
- BARREIRO E, GEA J, COROMINAS, JM, HUSSAIN SN. Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Cell Mol. Biol.*2003; 29: 771-78.
- BARREIRO E, PUENTE LB, MINGUELLA J, COROMINAS MJ, SERRANO S, HUSSAN NAS, GEA J. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:1116-24.
- BARNES PJ. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Eng J Med* 2000; 343(4):269-80.
- BARNES PJ. Reduced histone deacetylase in COPD. *Chest* 2006; 129:151-55.
- BARNES PJ, SHAPIRO SD, PAUWELS, RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular e cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003;22:672-88.
- BAST A, HAENEN GR, DOELMAM CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med*.1991; 91 (3C):2S-13S.
- BESTALL JC, PAUL EA, GARROD R, et al. Usefulness of the Medical research Council (MRC) dyspnea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 199; 54:581-86.
- BETTI CT, DAVINI L, GIANNESI N, LOPRIENO E BARALE R. Microgel electrophoresis assay (Comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research* 1994 307:323-333.
- BOER WI. Cytokinas and Therapy in COPD. A promising combination? *Chest* 2002;121:209 (S)-18(S).
- BOLOGNESI C, LANDO C, FORNI A, LANDINI E, SCARPATO R, MIGLIORE L, BONASSI S. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age and Ageing* 1999; 28:393-97.
- BOOTS AW, HAENEM GRMM., BAST, A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003; 22 (S)14-27.

BORISH ET, PRYOR WA, VENUGOPAL S, DEUTSCH WA. DNA synthesis is blocked by cigarette tar-induced DNA single-strand breaks. *Carcinogenesis* 1987;8:1517-22.

BOWLER RP, CRAPO JD, RUSSELL P. Oxidative Stress in Airways. *Am J Resp Crit Care Med* 2002, 166 (S): 38-43.

BROEKHUIZEN R, WOUTERS EFM, CREUTZBERG EC, SCHOLS AMWJ. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 2006; 61:17-22.

BUFFELS J, DEGRYSE J, HEYRMAN J. Office spirometry significantly improves early detection of COPD in general practice- The DIDASCO study. *CHEST* 2004; 125: 1394-99.

CARNEVALI S, PETRUZZELLI S, LONGONI B, VANACORE R, BARALE R, CIPOLLINI M, SCATENA F, PAGGIARO P, CELI A, GIUNTINI C. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2003; 284:955-63.

CASABURI R. Skeletal Muscle Function in COPD. *Chest* 2000; 117:267S-71S.

CASAS A, VILARO J, RABINOVICH RA, MAYER AF, VALERA JL, BERTONI E. Encouraged six minute walking test reflects “maximal” sustainable exercise performance in COPD patients. *Eur Resp J.* 2002; 20: 285.

CASELLA M, MINIATI M, MONTI S, MINICHILLI F, BIANCHI F, SIMI S. No evidence of chromosome damage in chronic obstructive pulmonary disease. *Mutagenesis* 2006; 21:167-71.

CELI B. COPD, Inflammation and its modulation by phosphodiesterase 4 inhibitors: time to look beyond the VEF1. *Chest* 2006; 129:5-6.

CELLI RB, COTE GC, MARTIN MJ, CASANOVA C, OCA MM, MENDEZ AR, PLARA PV, CABRAL JH. The body-Mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl Med* 2004; 350:1005-12.

CHAPMAN KR, MANNINO DM, SORIANO JB, VERMEIRE PA, BUIST AS, THUN MJ, CONNELL C, JEMAL A, LEE TA, MIRAVITLLES M, ALDINGTON S, BEASLEY R. Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27: 188-207.

DEBIGARÉ R, CÔTÉ C, MALTAIS F. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 2001; 164: 1712-17.

DENTENER MA, LOUIS R, CLOOTS RHE, HENKET M, WOUTERS EFM. Differences in local versus systemic TNF- $\alpha$  production in COPD: inhibitory effect of hyaluronan on LPS induced blood cell TNF- $\alpha$  release. *Thorax* 2006; 61:478-84.

DI STEFANO A, CARAMORI G, RICCIARDOLO FLM, CAPELLI A, ADCOCK IM, DONNER CF. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin Exp. Allergy* 2004; 34: 1156-67.

DONNELL RO, BREEN D, WILSON S, DJUKANOVIC R. Inflammatory cell in the airways in COPD, *Thorax* 2006; 61: 448-54.

DOURADO ZV, TANNI SE, VALE SA, FAGANELLO MM, SANCHEZ FF, GODOY I. Manifestações Sistêmicas na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2006; 32 (2): 161-71.

EID AA, IONESCU AA, NIXON SL, JENKINS LV, MATTHEWS SB, GRIFFITHS LT, SHALE JD. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1414-18.

FERGUSON TG. Why does the lung hyperinflate? *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3: 176-179. [http< www.atsjournals.org>](http://www.atsjournals.org). Acesso em: mai. , 2006.

FERREIRA I. Chronic obstructive pulmonary disease and malnutrition: why are we not winning this battle? *Jornal de Pneumologia.* 2003; 29: 107-15.

GALLEGO MC, SAMANIEGO J, ALONSO J, SANCHÉZ A, CARRIZO S, MARTIN JM. Disnea en la EPOC: relación de la escala MRC con la disnea inducida en las pruebas de marcha y de ejercicio cardiopulmonar máximo. *Arch Bronconeumol* 2002;38:112-16.

GARROT R. ET AL. Development and validation of a standardized measure of activity of daily living in patients with severe COPD: the London Chest Activity of Daily of Living scale (LCADL). *Respir Med.* 2000; 94:589-696.

GARY PG, STEVEN B. Acquired somatic mutations in the molecular pathogenesis of COPD. *Trends* 2003; 24: 71-76.

GOSSELINK R. Dyspnea: from physiology to treatment. *European Respiratory Society.* 2005; april45-54.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease- COPD up date 2005. [http< www.goldcopd.com>](http://www.goldcopd.com). Acesso em: mar., 2006.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease- COPD up date 2006. [http< www.goldcopd.com>](http://www.goldcopd.com). Acesso em: apr., 2007.

GUTIERREZ BAO. Tradução para o Português e Descrição do Processo de Validação do “Seattle Obstructive Lung Disease Questionnaire”, Dissertação Apresentada à Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para Obtenção do Título de Mestre em Enfermagem, São Paulo 2000.

HANNEKE AC. Six-Minute Walking-Induced Systemic Inflammation and Oxidative Stress in Muscle-Wasted COPD Patients. *Chest*; 2007; 131:439-445.

HEUNKS MAL, VINA J, VAN HERWAARDEN LAC, FOLGERING TMH, GIMENO A, DEKHUIJZEN PNR. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J. Physiol.* 1999; 46; 1697-704.

- ICHINOSE M, SUGIURA H., YAMAGATA S, KOARAI A, SHIARTO, K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 162: 701-06.
- JONE PW, AGUSTI AGN. Outcomes and markers in the assessment of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27: 822-32.
- KANAZAWA H, YOSHIKAWA M. Elevated Oxidative Stress and Reciprocal Reduction of Vascular Endothelial Growth Factor Levels with Severity of COPD. *Chest* 2005; 128:3191-97.
- KARADAG F. KARUL BA, CILDAG O. et al. Determinants of BMI in patients with COPD. *Respirology* 2004, 9: 70-75.
- KHARITONOV SA, BARNES, P J. Nitric oxide, nitrotyrosine and nitric oxide modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Allergy Asthma Rep* 2003; 3: 121-29.
- KIM H, LIU X, KOBAYASHI T, CONNER H, KOHYAMA T, WEN F, FANG Q, ABE S, BITTERMAN P, RENNARD S. Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell. Mol. Biol.* 2004; 31:483-90.
- KREUZER H, MAASEY A. Uma Visão Geral da Biologia Molecular In. *Engenharia Genética e Biotécnica*. São Paulo; Os Fundamentos, 2000.
- LAGHI F, TOBIN JM. Disorders of the respiratory muscle. *Am J Resp Crit Care Med* 2003; 168: 10-48.
- LEANDERSON P, TAGESSON C. Cigarette tar promotes neutrophil- induced DNA damage in culture lung cells. *Environ. Res.* 1994; 64:103-11.
- LEUNG SYA, CHAN KK, SYKES K, CHAN SK. Reability, validity and responsiveness of a 2-min walk test to assess exercise capacity of COPD patients. *Chest* 2006; 130:119-25.
- LEVINE S, KAISER L, LEFEROVICH J, TIKUNOV B. Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1997; 337:1799-1806.
- LEVINE S, NGUYEN T, KAISER LR, SHRAGER JB. Evaluating respiratory muscle adaptations: a new approach. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1418-19.
- LI X, MOODY MR, ENGEL D, WALKER S, CLUBB FJ JR, et al. Cardiac specific overexpression of tumor factor  $\alpha$  causes oxidative stress and contractive dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation* 2000; 102:1690-96.
- MACNEE W. Pulmonary and systemic oxidant/ antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:50-60.
- MADOR MJ, BOZKANAT E. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2001;2:216-24.
- MAESTRU PL. Exercise-based assessments in respiratory medicine. *ERS* 2004;175-180.

MAHLER D, GUYATT GH, JONES PW. Clinical measurement of dyspnea. In : Mahler D, ed Dyspnea. New York, Marcel Dekker, 1998; pp.149-198.

MALUF SW. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clínica Chimica Acta*, 2004; 347:15-24.

MALUF SW, Mergener M, Dalcanale L, Costa CC, Pollo T, Kayser M, da Silva LB, Pra D, Teixeira PJZ. DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutation Research* 2007, 626(1-2):180-184.

MANNINO DM, WATT G, HOLE D, GILLIS C, HART, C, MCCONNACHIE A, SMITH, DG, UPTON M, HAWTHORNE, V, SIN DD, MAN SFP, EEDEN VS, MAPEL DW, VESTBO J. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27:627-43.

MENEZES BMA, JARDIM JR, PADILLA RP, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet* 2005; 366:1875-81.

MERCKEN ME, HAGEMAN J, SCHOLS MWJA, AKKERMANS AM, BAST A. Rehabilitation Decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:994-1001.

MUKHOPADHYAY S, HOIDAL JR, MUKHERJEE KT. Role of TNF-  $\alpha$  in pulmonary pathophysiology *Respiratory Research* 2006; 7:1-9.

MCKELVEY-MARTIN VJ, GREEN MHL, SCHMEZER P, POOL-ZOBEL BL, DE MÉO MP, COLLINS A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research* 1993; 288:47-63.

NIKOLAOS M, TZORTZAKI EG, BOUROS D, SPANDIDIO D. ET AL. Instabilidade do microsatellite DNA no COPD. *Mutation Research*, 2005; 319:129-134.

NOGUERA A, BUSQUES X, SAULETA J, VILLAVARDE JM, MAC NEE W, AGUSTI AG. Expression of adhesion molecules and G proteins circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1664-68.

O'DONNELL R, BREEN D, WILSON S, DJUKANOVIC R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax* 2006; 61:448-54.

O'DONNELL ED, REVILL MS, WEBB AK. Dynamic hyperinflation and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:770-77.

OLIVEIRA CTM. Efeitos a curto prazo de um programa multidisciplinar de reabilitação pulmonar em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2004.

O'NEILL KL, FAIRBAIRN DW, STANDING MD. Analysis of single-cell gel electrophoresis using laser-scanning microscopy. *Mutation Research*, 1993; 319:129-134.

OROZCO-LEVI M, GEA J, LLORETA JL, FELEZ M, MINGUELLA J, SERRANO S, BRONQUETAS JM. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 13:371-78.

OSTLING O E JOHANSON KJ. Microelectroforetic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 123 (1):291-298.

PLATA MPV, LIVNAT G, GIRISH M, CABRAL H, MASDIN P, LINACRE P, DEW R, KENNEY L, CELLI B. Systemic Cytocines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD. *Chest* 2007; 131:37-43.

PETTY LT. COPD in perspective. *Thorax* 2005; 121:116 S-120S.

PIERROU S, BROBERG P, O'DONNELL R, PAWTOWSKI, K, VIRTALA R, LINDQVIST E, RICHTER A. et al. Expression of genes involved in oxidative stress responses in airway epithelial cells of COPD smokers. *AJRCCM* 2006.

PINTO-PLATA V, TOSO J, LEE K. et al. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax* 2007, 62:595-601.

PITTA F, TROOSTERS T, PROBST SV, LUCAS S, DECRAMER M, GOSSELINK. Possíveis conseqüências de não se atingir a mínima atividade física diária recomendada em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol* 2006; 32 (4):301-8.

PRYOR WA. Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastic: the use of electron spin resonance. *Free Radic.Biol. Med.* 1992; 13:659-76.

RAHMAN I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung disease. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2003; 36: 95-119.

REID MB. COPD as a muscle disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1101-05.

REID MB, LANNERGREN J, WESTERBLAD H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ : involvement of muscle myofilaments. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:479-84.

REGUEIRO, E. M. G. et al. Análise da demanda metabólica e ventilatória durante execução de atividades de vida diária em indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* v. 14 n. 1. Ribeirão Preto, 2006.

RICCIARDOLO FLM, CARAMORI G, ITO K, CAPELLI A, BRUN P, ABATANGELO G, PAPI A, CHUNG KF, ADCOCK I et al. Nitrosative stress in the bronchial mucosa of severe chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 116: 1028-35.

- RICCIARDOLO FLM, DI STEFANO A, SABATINE F, FOLKERTS G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *European J. of Pharmacology* 2006; 533:240-52.
- ROBERGS RA, ROBERSTS SO. *Princípios Fundamentais de Fisiologia do Exercício para aptidão, Desempenho e Saúde*. São Paulo; PHORTE Editora, 2002.
- RODRIGUES LS, VIEGAS AAC, LIMA T. Efetividade da Reabilitação Pulmonar como Tratamento Coadjuvante da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. *J Pneumol* 2002; 28(2) 1-10.
- ROGERS D, PRASAD AS, DOULL I. Exercise testing in children with cystic fibrosis. *J R Soc Med*. 2003; 96(S 43): 23-39.
- ROSA VF, CAMELIER FA, MAYER AM, JARDIM JR. Avaliação da Capacidade de Exercício em Portadores de doença Pulmonar Obstrutiva Crônica: Comparação com Teste da Caminhada com carga progressiva com Teste da Caminhada com Acompanhamento *J Pneumol* 2006; 32 (5): 106-13.
- RUFINO R, SILVA E LAPA RJ. Bases celulares e bioquímica da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Brás Pneumol*.2006; 32(3):241-8.
- SAETTA M, TURATO G, MAESTRELLI P, FABBRI M. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med*, 2001; 163:1304-09.
- SALAMONE G, GIORDANO M., TREVANI S, GAMBERALI R, VERMEULEN M., SCHETTINNI J. et al. Promotion of neutrophils apoptosis by TNF-alpha. *J. Immunol*. 2001; 166 (5):3476-83.
- SAMARA K, ZERVOU M, SIAFAKAS MN, TZORTZAKI GE. Microsatellite DNA instability in begin lung diseases.<http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 05 de ago de 2005.
- SANDFORD AJ, SILVERMAN EK. Chronic obstructive pulmonary disease 1: suscetptibility factors for COPD the genotype-environment interaction. *Thorax* 2002; 57 736-41.
- SCHOLS AM, BUURMAN WA, STAAL AJ, DENTENER MA, WOUTERS EF. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1996; 51:819-24.
- SIAFAKAS NM, TZORTZAKI EG, SOURVINOS G, BOUROS D, TZANAKIS N, KAFATOS A. Microsatellite DNA Instability in COPD. *Chest*. 1999; 116; 47-51.
- SILVA J, ERDTMANN B, HENRIQUES PJA. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- SIN DD, MAN SFP. Skeletal muscle weakness, reduced exercise tolerance, and COPD: is systemic inflammation the missing link? *Thorax* 2006; 61:1-3. EDITORIAL

SINDERBY C, SPAHIJA J, BECK J, KAMINSKI D, YAN S, COMTOIS N, SLIWINSKI P. Diaphragm activation during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1637-41.

SINGH NP, MC COY MT, TICE RR, SCHINEIDER EL. A Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*1999; 175: 184-191.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC- 2004. *J Pneumol* 2004; 30( 5):S1-S2.

SUTHERLAND RE, CHERNIACK REUBEN M. Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Eng J Med* 2004; 350: 2689-97.

SZULAKOWSKI P, CROWTHER AJL, JIMÉNEZ AL, DONALDSON K, MAYER R, LEONARD TB, MACNEE W, DROST EM. The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patient with chronic obstructive pulmonary disease *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;174:41-50.

TAKABATAKE N, NAKAMURA H, ABE S, INOUE S, HINO T, SAITO H, YUKI H, KATO S, TOMOIKE, H. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor- $\alpha$  system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J. Respir. Crit Care Med.* 2000;161:1179-84.

TERAMOTO S, ISHI T, YAMOTO H, YAMAGUCHI Y, MATSUSE T, MOLFINO N. Xenobiotic enzymes and genetics of COPD. *Chest* 2005;127: 408-09.

TROOSTERS T, VILARO J, RABINOVICH R. et al. Physical responses to the 6-min walk test in patients with COPD. *Eur Respir J* 2002; 20:564-569.

TROOSTERS T, CASABURI R. GOSSELINK G, DECRAMER M. Pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. State of the art. *Am J Resp Crit Care Med* 2005; 172:19-38.

VAART H, POSTAM DS, TIMENS W, TEN HACKEN NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004; 59:713-21.

VERNOOY HJ, KÜÇÜKAYCAN M, JACOBS AJ, CHAVANNES HN, BUURMAN AW, DENTENER AM, WOUTERS FME. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1218-24.

WOUTERS FME, CREUTZBERG CE, SCHOLS JWMA. Systemic Effects in COPD. *CHEST* 2002; 121:27S-130S.

## **O TESTE DA CAMINHADA DOS SEIS MINUTOS NÃO CAUSA DANO SIGNIFICATIVO NO DNA DE PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC)**

Cássia C.da Costa, Luciane Dalcanalle, Luciano Basso da Silva, Daversom B. Canterle, Tiago Pollo, Sharbel W.Maluf, Paulo J.Z.Teixeira.

### RESUMO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença inflamatória com participação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos CD8, associada a estímulos oxidantes diretamente nas estruturas pulmonares, causada mais comumente pelo tabagismo. Recentemente foi demonstrado que o teste de caminhada dos seis minutos (TC6) é capaz de aumentar a inflamação e gerar o aumento de espécies reativas de oxigênio. O presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis de dano e reparo de DNA em portadores de DPOC, quando submetidos ao TC6. Para avaliar o dano de DNA, amostras de sangue periférico foram coletadas antes e imediatamente após o TC6. Para avaliar a capacidade de reparo, foi analisada uma amostra coletada 48 horas após o TC6. Todas as amostras foram processadas pela técnica do cometa. Vinte e sete pacientes portadores de DPOC foram avaliados, sendo 59% homens. A média de idade foi de  $64,7 \pm 8,4$  anos. A média do VEF1 foi de  $40,3\% \pm 18,4\%$  do previsto, com relação média de VEF1/CVF de  $52,5\% \pm 11,9\%$ . Todos fumaram em média  $36,7 \pm 17,0$  anos, uma média de  $48,1 \pm 37,5$  maços/ano. As médias das variáveis obtidas no início e no final do TC6 foram: SpO<sub>2</sub> ( $92,0 \pm 4,5$  vs.  $91,4 \pm 4,6$ ), percepção da dispnéia pela escala de BORG ( $1,2 \pm 1,0$  vs.  $2,4 \pm 1,7$ ) e a distância percorrida foi em média de  $380,1 \pm 84,4$  m. As taxas médias de dano de DNA antes do TC6 ( $27,9 \pm 19,2$ ) e imediatamente após ( $29,6 \pm 29,6$ ) não apresentaram diferenças significativas ( $p=0,904$ ). A análise realizada 48 horas após o TC6 demonstrou uma redução não significativa deste dano ( $18,3 \pm 13,0$ ,  $p=0,099$ ). Conclui-se neste estudo que o esforço físico realizado durante o TC6 não provoca aumento imediato nas taxas de dano de DNA, nem estimula os mecanismos de reparo do DNA em portadores de DPOC.

PALAVRAS CHAVE: DPOC, Teste do Cometa, Teste da Caminhada dos Seis Minutos

## INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é definida como doença respiratória passível de prevenção e tratamento, caracterizada por obstrução do fluxo aéreo que não é totalmente reversível e resulta de um processo inflamatório local e sistêmico (1,2). A principal causa desta doença é o fumo, cuja fumaça contém mais de 1.017 partículas, muitas delas oxidantes (3, 4,5).

A patogênese e as manifestações clínicas da DPOC não estão restritas à inflamação e ao remodelamento estrutural pulmonar, mas existem manifestações sistêmicas que podem ser evidenciadas através da perda de peso e da atrofia muscular. A interação entre a perda de peso e a atrofia muscular provavelmente resulta de uma alteração do perfil inflamatório, demonstrado através do aumento dos níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ), que determina uma diminuição de proteínas contráteis no músculo. Tanto a anorexia como o FNT- $\alpha$  diminuem o conteúdo de RNA mensageiro, o que determina uma redução dos níveis de proteína e, conseqüentemente, uma rápida perda de massa muscular. Nos fumantes, o FNT-  $\alpha$  é fundamental na indução inflamatória e resulta na quebra do tecido conectivo, que persiste mesmo depois da cessação do tabagismo nos indivíduos portadores de DPOC (6, 7, 8, 9). A manutenção desta inflamação crônica está associada com alterações dos componentes celulares do parênquima pulmonar, dos níveis de mediadores inflamatórios circulantes, bem como de marcadores de estresse oxidativo (10, 11, 12,13).

Alguns estudos demonstraram que o estresse oxidativo é capaz de provocar danos ao DNA (14, 15, 16). Nosso grupo demonstrou recentemente que os indivíduos portadores de DPOC apresentam aumento do dano de DNA quando comparados com controles (17). Em outro estudo foi demonstrado que o exercício físico máximo e submáximo em cicloergômetro está associado a um aumento do estresse oxidativo e a um maior dano de DNA (18).

O teste da caminhada dos seis minutos (TC6) é utilizado como um instrumento para mensurar a capacidade de exercício e consiste em observar a tolerância e as alterações cardiorrespiratórias do paciente ocorridas durante o esforço (19). Troosters et al. (2002) observaram que o valor do consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) durante o TC6 era comparável com aquele alcançado no pico do exercício incremental no cicloergômetro em um grupo de pacientes

com DPOC. Estes mesmos autores evidenciaram, em outro estudo com portadores de DPOC, que a velocidade da caminhada durante o teste de seis minutos não diferia da velocidade máxima medida no teste incremental. Um estudo recente (20) demonstrou que, após o TC6, aumenta o processo inflamatório e as espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, ao realizar um teste de caminhada, os portadores de DPOC estariam submetidos a um exercício intenso, com maior potencial de causar dano no DNA.

Este estudo analisou os níveis de dano genético e de reparo no sangue periférico de pacientes com DPOC submetidos ao TC6.

## MATERIAS E MÉTODOS

Vinte e sete portadores de DPOC encaminhados ao programa de reabilitação pulmonar do Centro Universitário Feevale foram submetidos ao TC6 como parte da avaliação para ingresso no programa. O diagnóstico de DPOC foi realizado de acordo com o GOLD (21) (Global Initiative for Chronic Obstrutive Lung Disease) utilizando história clínica, exame físico e a confirmação da obstrução do fluxo aéreo através da razão do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) pela capacidade vital forçada (CVF) inferior a 70% do previsto. Todos os pacientes incluídos no estudo apresentavam DPOC de moderado a grave definido por um  $VEF1 < 60\%$  do valor previsto após o uso de broncodilatador. Pacientes com sinais de agudização da doença e comorbidades que impedissem de realizar atividade física foram excluídos do estudo. Todos os pacientes responderam ao questionário de saúde pessoal publicado pela International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC) (22). O TC6 foi realizado segundo critérios da ATS (23), o corredor onde o teste foi executado tinha 48 m. As amostras de sangue foram coletadas antes, imediatamente após e 48 horas após a realização do TC6. Caso ocorresse alguma instabilidade clínica durante a realização do TC6, o mesmo era interrompido e repetido num outro dia. Ao término do teste, à distância percorrida foi aferida através de uma fita métrica em metros. Todos os pacientes completaram o teste e nenhum utilizou oxigênio durante a execução do mesmo. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Centro Universitário e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os dados da amostra estão expressos em médias e desvio padrão. As diferenças entre as variáveis foram avaliadas utilizando o teste de Wilcoxon. Os dados foram analisados pelo programa SPSS 12.0.

#### Análise do dano de DNA

O teste do cometa foi realizado de acordo com o protocolo de preparação e análise. As lâminas foram preparadas, adicionando 300ml de uma solução de agarose a uma lâmina e deixando a agarose solidificar (5-30 minutos a 4°C). A mistura de 5 µl de sangue total com 95 µl de agarose especial (low-melting-point agarose) foi adicionada a lâmina; uma lamínula foi imediatamente adicionada e as lâminas foram mantidas sob refrigeração durante 5 minutos, até que a cobertura de agarose com as células, solidificassem. Após, a lamínula foi cuidadosamente retirada e a lâmina mergulhada dentro de uma solução de lise gelada (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.2, 1% Triton X-100 e 10% DMSO). Após 24 horas, as lâminas foram removidas delicadamente da solução lítica e o excesso de líquido removido das bordas e da face inferior da lâmina. As lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese e preenchidas por uma solução tampão alcalina, fresca, para eletroforese (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, pH > 13). O líquido cobriu as lâminas, que foram deixadas na bandeja por 20 minutos antes de ligar a força. A eletroforese foi realizada a 25 V e 300 mA (~0.95 V/cm) por 20 minutos. As etapas acima foram realizadas sob a luz vermelha para evitar a indução de danos de DNA. Após a eletroforese, as lâminas foram removidas delicadamente da cuba, e o tampão neutralizador (0.4 M Tris, pH 7.5) foi acrescentado às lâminas três vezes, deixando cada vez, por 5 minutos. As lâminas foram enxaguadas 3 vezes com água destilada, secas no ar, no mínimo por 24 horas, e então coradas pela prata de acordo com Nadin et al. (2001). Para a avaliação dos danos do DNA, 100 células por indivíduo foram analisadas sob um microscópio ótico com uma ampliação de 200 X. As células foram contadas visualmente de acordo com a intensidade da cauda em cinco classes, de não danificado = 0, até muito danificado = 4. Conseqüentemente, a contagem total por indivíduo variou de 0 (nenhum dano) a 400 (dano máximo).

## RESULTADOS

A maioria dos 27 pacientes incluídos eram homens, com idade média de 64,66 anos e com obstrução de fluxo aéreo de moderada a grave. Apenas dois pacientes ainda fumavam, sendo a maioria composta por ex-fumantes com média de  $48,06 \pm 37,53$  maços/ano. A tabela 1 demonstra as características basais dos pacientes.

Os valores dos testes do cometa estão demonstrados no gráfico 1, onde verificou-se uma média de  $27,9 \pm 19,17$ ;  $29,55 \pm 29,62$  e  $18,33 \pm 12,97$ , respectivamente: antes, imediatamente após e 48 horas da realização do TC6.

Na tabela 2 estão as variáveis aferidas durante o TC6, bem como a média da distância percorrida que foi de  $380,13 \pm 84,43$  m.

Tabela 1. Características basais de 27 portadores de DPOC

Características	Variáveis
Sexo	
Masculino	16 (59%)
Feminino	11 (41%)
Idade (anos)	$64,66 \pm 8,43$
Hábito Tabágico	
Maços/ano	$48,06 \pm 37,53$
Fumantes	2 (9%)
Ex-Fumantes	25(91%)
Função Pulmonar	
CVF %	$63,15 \pm 20,02$
VEF1%	$40,25 \pm 18,38$
VEF1/CVF%	$52,48 \pm 11,86$

Tabela 2: Variáveis Fisiológicas do Teste de Caminhada dos seis minutos

Variáveis do TC6	Média $\pm$ DP
Frequência cardíaca (bpm)	
Inicial	106,5 $\pm$ 19,43
Final	106,5 $\pm$ 20,22
Saturação periférica de O <sub>2</sub> (%)	
Inicial	92,03 $\pm$ 4,56
Final	91,44 $\pm$ 4,57
Escala de Borg	
Inicial	1,16 $\pm$ 0,97
Final	2,40 $\pm$ 1,74
Distância Percorrida (m)	380,13 $\pm$ 84,43

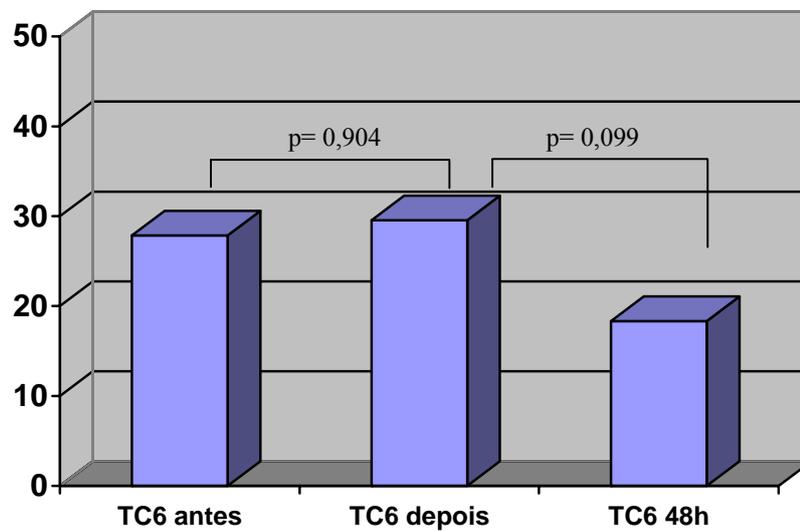


Fig 1. Intensidade do dano de DNA antes, após e 48 horas após o TC6 em portadores de DPOC.

## DISCUSSÃO

O fato mais relevante neste estudo é que o TC6 não aumentou de maneira significativa a intensidade do dano de DNA em pacientes portadores de DPOC, nem estimulou de maneira significativa os mecanismos de reparo do DNA 48 horas após o teste. Mercken *et al.* (2005) observaram aumento do dano de DNA e de marcadores moleculares de estresse oxidativo em pacientes com DPOC submetidos a exercício máximo e submáximo em cicloergômetro. Um fato importante no estudo destes autores é que o material também foi coletado imediatamente após os testes, indicando que os aumentos observados nos marcadores estudados foram induzidos pelo exercício. Uma provável justificativa para o achado do presente estudo seria o fato de o TC6 ser um tipo de exercício de baixa intensidade e curta duração, diferentemente daquele realizado no cicloergômetro. Ao contrário do que foi proposto por (18,27) Troosters et al (2002) o TC6 deveria ser considerado um teste submáximo, pois, segundo um estudo realizado por Hanneke et al (2007), os níveis de lactato e a frequência cardíaca foram significativamente menores depois do TC6, quando comparados com o teste cardiopulmonar máximo. Estes mesmos autores demonstraram que ocorre um aumento de inflamação sistêmica e estresse oxidativo após o TC6.

O TC6 submete o paciente a um exercício relativamente intenso, reproduzindo as atividades de vida diária (28,29). Velloso e Jardim (2006) demonstraram que a execução de atividades simples diárias representam um consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) de aproximadamente 50 a 60% do pico de oxigênio máximo e requerem um aumento da ventilação minuto de 60 a 70% da ventilação voluntária máxima. Sabendo-se que existe um maior estresse oxidativo, existiria a possibilidade de ocorrer um aumento significativo no dano de DNA, o que não foi demonstrado pelos pacientes por nós estudados.

O aumento do estresse oxidativo em pacientes portadores DPOC ocorre por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. O aumento dos oxidantes inalados está associado a um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são liberadas pelas células inflamatórias recrutadas no parênquima pulmonar (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócito T citotóxico) e que, ao liberarem mediadores inflamatórios tais como citocinas e

fatores de crescimento, resultam em um efeito nocivo, incluindo dano nos lipídios, proteínas e no DNA (30, 31, 32).

Os estudos que demonstraram um aumento nos níveis de dano de DNA após exercícios físicos foram realizados após exercícios de longa duração. Dentre as possíveis causas para não termos demonstrado um aumento significativo de dano, estaria o pouco tempo transcorrido da coleta basal até a segunda coleta após o teste. O TC6 é um exercício físico de curta duração, que poderia ter sido suficiente para gerar espécies reativas de oxigênio, mas não ter sido suficiente para a interação desses radicais com o DNA (33, 34, 35). Talvez uma coleta mais tardia demonstrasse esse dano de maneira significativa.

Embora a ativação de várias células inflamatórias esteja identificada na DPOC, sua real importância seqüencial no desenvolvimento da doença é ainda pouco conhecida (16, 30, 36-38). Além de provocar dano no tecido pulmonar, o aumento do processo inflamatório que ocorre de maneira sistêmica também pode provocar danos ao DNA, conforme demonstrado por estudos recentes (17, 39, 40).

As taxas de dano de DNA em pacientes portadores de DPOC submetidos ao TC6 não sofreram alterações imediatamente após a atividade física, nem ativaram de maneira significativa os mecanismos de reparo após 48 horas. Estudos adicionais devem ser conduzidos no sentido de elucidar um possível efeito genotóxico em períodos diferentes dos que foram avaliados neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- 1-Sin DD, Man SFP. Skeletal muscle weakness, reduced exercise tolerance, and COPD: is systemic inflammation the missing link? *Thorax* 2006, 61:1-3.
- 2- Eid AA, Ionescu AA, Nixon SL et al. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 64: 1414-1418.
- 3-Erdtmann B, Henriques PJA, Silva J. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- 4-American Thoracic Society/European Respiratory Society statement on pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173: 1390-1413.
- 5-Huijung K, Xiangde L, Kobayashi T. et al. Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, 31:483-490.

- 6-Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Eng J Med* 2000, 343(4):269-280.
- 7-Wouters FME, Creutzberg CE, Schols JWMA. Systemic effects in COPD. *Chest* 2002, 121:27S-130S.
- 8-Szulakowski P, Crowther AJL, Jiménez AL. et al. The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 2006, 174: 41-50.
- 9-Abdullah AE, Ionescu AA, Nixon SL. et al. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164:1414-1418.
- 10-Bowler RP, Crapo JD, Russell P. Oxidative stress in airways. *Am J Resp Crit Care Med* 2002, 166 (S): 38-43.
- 11-Karadag F. Karul BA, Cildag O. et al. Determinants of BMI in patients with COPD. *Respirology* 2004, 9: 70-75.
- 12-Kanazawa H, Yoshikawa J. Elevated oxidative stress and reciprocal reduction of vascular endothelial growth factor levels with severity of COPD. *Chest* 2005, 128:3191-3197.
- 13-O'Donnell R, Breen D, Wilson S. et al. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax* 2006, 61:448-454.
- 14- Pinto-Plata V, Toso J, Lee K. et al. Profiling serum biomarkers in patients with COPD : associations with clinical parameters. *Thorax* 2007, 62:595-601.
- 15-Boots AW, Haenem GRMM, Bast A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003, 22 (S)14-27.
- 16-MACNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005, 2:50-60.
- 17- Maluf SW, Mergener M, Dalcanalle L, Costa CC, Pollo T, Kayser M, da Silva LB, Pra D, Teixeira PJZ. DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutation Research* 2007, 626(1-2):180-184.
- 18- Mercken EM, Hageman GJ, Schols AMW. et al. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 172: 994-1001.
- 19-Troosters T, Vilaro J, Rabinovich R. et al. Physical responses to the 6-min walk test in patients with COPD. *Eur Respir J* 2002, 20:564-569.
- 20-Hanneke AC. Six-Minute walking-induced systemic inflammation and oxidative stress in muscle-wasted COPD patients. *Chest* 2007, 131:439-445.

- 21-Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategies for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. Update 2006. Available at: <http://www.goldcopd.com/>. Acesso em: mar. 09, 2007.
- 22-Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. ICPEMC Publication 14. Mutation 1998, 204:379-406.
- 23- American Thoracic Society - ATS. ATS Statement: Guidelines for the six-minute walk test. Am J Respir Crit Care Med 2002, 166: 111-117.
- 24-Tice RR, Agurell D, Anderson B. et al. Single Cell/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen 2000, 35: 206-221.
- 25-Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DA. Silver staining method for single-cell gel assay. J. Histochem Cytochem 2001, 49:1183-1186.
- 26-Betti C, Davini L, Giannessi N. et al. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. Mutation Research 1994, 307: 323-333.
- 27-Casas A, Vilaro J, Rabinovich R. Encouraged 6-min walking test indicatives maximum sustainable exercise in COPD patients. Chest 2005, 128:55-61.
- 28-Stefan P, Per B, O'Donnell R. et al. Expression of gene involved in oxidative stress in airway epithelial cells of COPD smokers. AJRCCM. [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org) dec. 2006.
- 29-Carter R, Holiday BD. 6-Minute walk work for assessment of functional capacity in patients with COPD. Chest 2003, 123:1408-1415.
- 30-Barnes PJ, Shapiro SD, Paulwes RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. Eur Respir J 2003, 22: 672-688.
- 31-Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung disease. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 2003, 36: 95-119.
- 32-Ricciardolo LMF, Stefano DIA, Federica S, Folkers G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. European Journal of Pharmacology 2006, 533:240-252.
- 33-Hartmann A, Plappert U, Raddatz K. et al.. Does physical activity induce DNA damage? Mutagenesis 1994, 9:269-272.
- 34- Niess AM, Hartmann A, Grünert-Fuchs M. et al. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. Int J Sports Med 1996, 17:397-403.
- 35-Vernooy H, Juçukaycan M, Jacobs AJ. et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive disease. Am J Respir Crit Care Med 2002, 166: 1218-1224.
- 36-Saetta M, Turato G, Maestrelli P. et al. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Resp Crit Care Med 2001, 163:1304-1309.

37-Ruffino R, Silva LRJ. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2006, 32(3): 241-248.

38-Heunks AML, Vina J, Cees LA. et al. Xanthine oxidative is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive disease. *Am J Physiology* 1999, 277:1697-1704.

39-Ceylan E, Kocyigit A, Gencer M. et al. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive who had smoke or been exposed to biomass. *Respir Med* 2006, 100; 1270-1276.

40-Vaart H, Postma DS, Timens W. et al. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2003, 59:713-721.

**The 6-minute walk test does not induce significant DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease**

**ABSTRACT**

*Background* Chronic obstructive pulmonary disease is an inflammatory disease in which macrophages, neutrophils and CD8 T lymphocytes play an important role. It is associated with direct oxidant stimuli of lung structures, which are most frequently triggered by smoking. A recent study showed that the 6-minute walk test (6MWT) increases inflammation and reactive oxygen species. This study evaluated DNA damage and repair in patients with COPD that took the 6MWT.

*Methods* To evaluate DNA damage, peripheral blood samples were collected before and immediately after 6MWT. To evaluate repair, a sample was collected 48 hours after the 6MWT. All samples were prepared for the comet assay. Twenty-seven patients with COPD were evaluated; 59% were men and mean age was  $64.7 \pm 8.4$ .

*Results* Mean FEV1 was  $40.3\% \pm 18.4\%$  of predicted value, and mean FEV1/FVC was  $52.5\% \pm 11.9\%$ . Mean values before and after 6MWT were: SpO<sub>2</sub> =  $92.0 \pm 4.5$  vs.  $91.4 \pm 4.6$ ; Borg score for dyspnea =  $1.2 \pm 1.0$  vs.  $2.4 \pm 1.7$ ; and mean distance walked –  $380.1 \pm 84.4$  m. Mean DNA damage values before ( $27.9 \pm 19.2$ ) and immediately after ( $29.6 \pm 29.6$ ) 6MWT were not significantly different ( $p = 0.904$ ). The analysis performed 48 hours after 6MWT showed a nonsignificant reduction of damage ( $18.3 \pm 13.0$ ;  $p = 0.099$ ).

*Conclusions* The physical effort during 6MWT did not cause an immediate increase in DNA damage, and did not stimulate DNA repair mechanisms in patients with COPD.

**Key Words:** Pulmonary Disease, Chronic Obstructive; comet assay; DNA damage.

## INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a preventable and treatable respiratory disease characterized by chronic airflow obstruction that is not totally reversible and that results from local and systemic inflammatory processes.<sup>1,2</sup> The main cause of COPD is smoking, as cigarette smoke contains more than 1,017 particles, several of which are oxidants.<sup>3-5</sup>

COPD pathogenesis and clinical signs are not restricted to inflammation and structural lung remodeling; systemic signs, such as weight loss and muscle atrophy, are also evident. The interaction between weight loss and muscle atrophy may result from changes in the inflammatory profile: plasma levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) increase and lead to a decrease of the contractile proteins in muscle. Both anorexia and TNF- $\alpha$  decrease the content of messenger ribonucleic acid (RNA), which leads to a reduction in the levels of protein and, consequently, a rapid loss of skeletal muscle. In smokers, TNF- $\alpha$  induces inflammation, which results in the rupture of connective tissue that persists even after patients with COPD stop smoking.<sup>6-9</sup> The persistence of chronic inflammation is associated with changes in components of lung parenchyma cells, in levels of circulating inflammation mediators, and in markers of oxidative stress.<sup>10-13</sup>

Oxidative stress can cause DNA damage.<sup>14-16</sup> A recent study showed that people with COPD had greater levels of DNA damage than controls.<sup>17</sup> Another study reported that maximal and submaximal physical exercise in a cycle ergometer test was associated with an increase of oxidative stress and greater DNA damage.<sup>18</sup>

The 6-minute walk test (6MWT) is a tool to measure exercise capacity and to assess patients' tolerance to exercise and cardiorespiratory changes during physical effort.<sup>19</sup> Troosters et al. found that oxygen uptake (VO<sub>2</sub>) during the 6MWT was comparable to that reached at peak incremental cycling exercise in a group of patients with COPD.<sup>19</sup> The same authors, in another study with patients with COPD, found that walk speed during the 6MWT did not differ from the maximal speed in the incremental exercise test. A recent study<sup>20</sup> showed that inflammation and reactive oxygen species increased after 6MWT. According to these studies, patients with COPD

that take the 6MWT are submitted to intense exercise that may potentially cause greater DNA damage.

This study evaluated the levels of genetic damage and repair in the peripheral blood of patients with COPD that took the 6MWT.

## **METHODS AND MATERIALS**

Twenty-seven individuals with COPD referred to the pulmonary rehabilitation program of a university center took the 6MWT as part of their evaluation to join the program. COPD diagnoses were made according to the criteria established by the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD).<sup>21</sup> clinical history; physical examination; and confirmation of airflow obstruction, defined as the ratio of forced expiratory volume in one second to forced vital capacity (FEV1/FVC) lower than 70% of predicted value. All patients included in the study had moderate to severe COPD defined as FEV1 < 60% of predicted value after bronchodilator use. Patients with exacerbations and comorbidities that contraindicated physical activity were excluded from the study. All patients answered the personal health questionnaire published by the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC).<sup>22</sup>

The 6MWT was performed according to the American Thoracic Society (ATS) criteria.<sup>23</sup> Blood samples were collected before, immediately after and 48 hours after 6MWT. If any clinical instability was observed, the test was interrupted and repeated on a different day. At the end of the test, walked distance was measured with a meter measuring tape. All patients completed the test and no patient required oxygen during the test.

This study was approved by the Committee on Ethics and Research of the university center where it was conducted, and all patients signed and informed consent term.

The comet assay was performed according to the following preparation and analysis protocol. First, 300 ml of agarose solution was added to a slide, which was then kept at 4° C for 5 to 30 minutes for agarose to solidify. A mixture of 5 µl total blood and 95 µl low-melting-point agarose was added to the slide. A cover glass was immediately placed over it, and the slides were kept under refrigeration for 5 minutes for agarose, which contained the cells, to solidify. The cover glass was then carefully removed, and the slide was immersed in ice-cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.2, 1% Triton X-100 and 10%

DMSO). After 24 hours, the slides were gently removed from the lysing solution, and excess liquid was removed from the borders and underside. The slides were placed in the electrophoresis tank, and the tank was filled with a fresh alkaline buffer solution for electrophoresis (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, pH > 13). The solution covered the slides, which were left in the tank for 20 minutes before power was turned on. Electrophoresis was performed at 25 V and 300 mA (~0.95 V/cm) for 20 minutes. All procedures described above were performed under red light to prevent DNA damage<sup>24</sup>. After electrophoresis, the slides were gently removed from the tank, and a neutralizing buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) was added to the slides three times for 5 minutes each time. The slides were rinsed 3 times with distilled water, allowed to dry for at least 24 hours, and stained with silver according to the procedure described by Nadin et al. To evaluate DNA damage, 100 cells from each study participant were analyzed under light microscopy at 200 X magnification.<sup>25</sup> Cells were visually counted and classified according to tail intensity into 5 classes, from not damaged (0) to severely damaged (4). Therefore, total count for each participant could range from 0 (no damage) to 400 (maximum damage)<sup>26</sup>.

Data were described as means and standard deviations. The Wilcoxon test was used to evaluate differences between variables. The SPSS 12.0 software was used for data analysis.

## **RESULTS**

Most of the 27 patients were men, and mean age was 64.55 years. Airflow obstruction was moderate to severe. Only 2 patients still smoked; most were ex-smokers, and mean pack year was  $48.06 \pm 37.53$ . Table 1 shows patients' baseline characteristics.

Comet assay values are shown in graph 1. Mean values before, immediately after and 48 hours after 6MWT were  $7.9 \pm 19.17$ ,  $29.55 \pm 29.62$  and  $18.33 \pm 12.97$ .

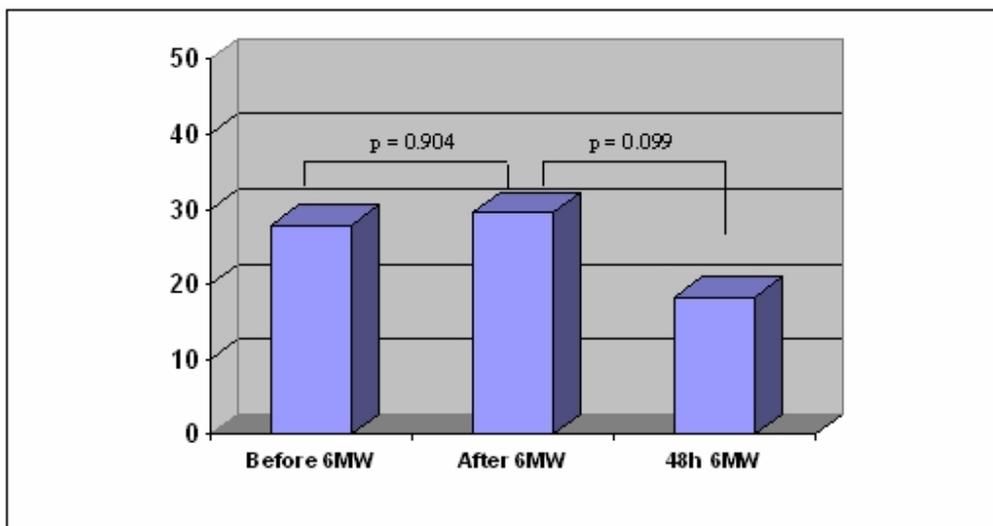
Table 2 shows the variables measured during 6MWT; mean distance walked was  $380.12 \pm 84.43$  m.

**Table 1.** Baseline characteristics of 27 patients with COPD

Characteristics	Variables
Sex	
Male	16 (59%)
Female	11 (41%)
Age (years)	64.66 ± 8.43
Smoking	
Pack year	48.06 ± 37.53
Smoker	2 (9%)
Ex-smoker	25(91%)
Pulmonary function	
FVC %	63.15 ± 20.02
VEF1%	40.25 ± 18.38
FEV1/FVC %	52.48 ±11.86

**Table 2.** Physiologic variables of the 6-minute walk test

6MWT variables	Mean ± SD
Heart beat (bpm)	
Initial	106.5 ±±19.43
Final	106.5 ± 20.22
Peripheral O <sub>2</sub> saturation (%)	
Initial	92.03 ± 4.56
Final	91.44 ± 4.57
Borg scores	
Initial	1.16± 0.97
Final	2.40 ±1.74
Distance walked (m)	380.13± 84.43



**Figure 1.** DNA damage before, after and 48 hours after 6MWT in patients with COPD

## DISCUSSION

The most relevant finding in this study was that 6MWT did not significantly increase DNA damage in patients with COPD, and did not significantly stimulate DNA repair mechanisms 48 hours after the test. Mercken et al. found an increase in DNA damage and molecular markers of oxidative stress in patients with COPD that underwent a maximal and submaximal cycle ergometer test.<sup>18</sup> One important factor in their study was that samples were also collected immediately after the tests, which indicated that the increases were induced by exercise. A probable explanation for the different findings in these studies may be the fact that 6MWT is a low-intensity and short-duration exercise, whereas a cycle ergometer test is not. Differently from what was suggested by Troosters et al.,<sup>19, 27</sup> 6MWT should be classified as submaximal exercise, as a study conducted by Hanneke et al.<sup>20</sup> showed that the levels of lactate and heart beat were significantly lower after 6MWT than after a maximal cardiopulmonary exercise testing. Hanneke et al.<sup>20</sup> also demonstrated that there was an increase in systemic inflammation and oxidative stress after the 6MWT.

The 6MWT submits patients to relatively intense exercise and is representative of activities of daily living.<sup>28,29</sup> showed that the oxygen uptake ( $VO_2$ ) in the performance of simple daily activities is about 50 to 60% of peak maximal oxygen, and that these activities require an increase of 60 to 70% of maximal voluntary ventilation in minute ventilation. If oxidative stress

is greater, a greater increase in DNA damage might be expected. Such an increase, however, was not found in the patients in our study.

The increase in oxidative stress in patients with COPD is caused by an oxidant/antioxidant imbalance. Greater amounts of inhaled oxidants are associated with an increase of reactive oxygen species (ROS), which are released by inflammatory cells recruited in the lung parenchyma (macrophages, neutrophils, eosinophils, cytotoxic T lymphocytes). Damage, which includes lipid, protein and DNA damage, occurs when these cells release inflammatory mediators, such as cytokines and growth factors.<sup>30-32</sup>

Studies that found greater DNA damage after physical exercise analyzed it after long-duration exercises. One of the possible explanations for the fact that we did not find a significant increase of damage may be the short interval between baseline collection and the second sample collection, made immediately after the test. The 6MWT is a short-duration exercise that may be long enough to generate ROS but not to reveal the interaction of these radicals with DNA.<sup>33-35</sup> If samples had been collected at a longer interval, damage might have been detected.

Although several inflammatory cells are activated in COPD, their actual sequential importance in the development of the disease is still unclear.<sup>16,30,36-38</sup> The increase of systemic inflammation may cause damage to lung tissues, and may also cause DNA damage, as reported by recent studies.<sup>17,39,40</sup>

The levels of DNA damage in patients with COPD that took the 6MWT did change significantly immediately after physical activity, and repair mechanisms were not significantly activated after 48 hours. Further studies should investigate possible genotoxic effects at time points other than those evaluated in this study.

## REFERENCES

- 1 Sin DD, Man SFP. Skeletal muscle weakness, reduced exercise tolerance, and COPD: is systemic inflammation the missing link? *Thorax* 2006; 61:1-3
- 2 Eid AA, Ionescu AA, Nixon SL, et al. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 64:1414-1418
- 3 Erdtmann B, Henriques PJA, Silva J. *Genética toxicológica*. 1st ed. Porto Alegre, IL: Alcance, 2003; 1-424

- 4 American Thoracic Society/European Respiratory Society statement on pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:1390-1413
- 5 Huijung K, Xiangde L, Kobayashi T. et al. Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:483-490
- 6 Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Eng J Med* 2000; 343:269-280
- 7 Wouters FME, Creutzberg CE, Schols JWMA. Systemic effects in COPD. *Chest* 2002; 121:27S-130S
- 8 Szulakowski P, Crowther AJL, Jiménez AL, et al. The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 2006; 174:41-50
- 9 Abdullah AE, Ionescu AA, Nixon SL, et al. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1414-1418
- 10 Bowler RP, Crapo JD, Russell P. Oxidative stress in airways. *Am J Resp Crit Care Med* 2002; 166:38S-43S
- 11 Karadag F, Karul BA, Cildag O, et al. Determinants of BMI in patients with COPD. *Respirology* 2004; 9:70-75
- 12 Kanazawa H, Yoshikawa J. Elevated oxidative stress and reciprocal reduction of vascular endothelial growth factor levels with severity of COPD. *Chest* 2005; 128:3191-3197
- 13 O'Donnell R, Breen D, Wilson S, et al. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax* 2006; 61:448-454
- 14 Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, et al. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax* 2007; 62:595-601
- 15 Boots AW, Haenem GRMM, Bast A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22:14S-27S
- 16 MAcNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:50-60
- 17 Maluf SW, Mergener M, Dalcanale L, et al. DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutat Res* 2007; 626:180-184
- 18 Mercken EM, Hageman GJ, Schols AMW, et al. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:994-1001
- 19 Troosters T, Vilaro J, Rabinovich R, et al. Physical responses to the 6-min walk test in patients with COPD. *Eur Respir J* 2002; 20:564-569

- 20 Hanneke AC. Six-Minute walking-induced systemic inflammation and oxidative stress in muscle-wasted COPD patients. *Chest* 2007; 131:439-445
- 21 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategies for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. Available at: <http://www.goldcopd.com/>. Update in: 2006; Last accessed in: March 9, 2007
- 22 Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. ICPEMC Publication 14. *Mutation* 1998; 204:379-406
- 23 American Thoracic Society - ATS. ATS Statement: Guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:111-117
- 24 Tice RR, Agurell D, Anderson B, et al. Single Cell/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35:206-221
- 25 Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DA. Silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 2001; 49:1183-1186
- 26 Betti C, Davini L, Giannessi N, et al. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 1994; 307:323-333
- 27 Casas A, Vilaro J, Rabinovich R. Encouraged 6-min walking test indicatives maximum sustainable exercise in COPD patients. *Chest* 2005; 128:55-61
- 28 Stefan P, Per B, O'Donnell R, et al. Expression of gene involved in oxidative stress in airway epithelial cells of COPD smokers. *AJRCCM*. Available at: [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org). Last accessed in: December 2006
- 29 Carter R, Holiday BD. 6-Minute walk work for assessment of functional capacity in patients with COPD. *Chest* 2003; 123:1408-1415
- 30 Barnes PJ, Shapiro SD, Paulwes RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22:672-688
- 31 Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung disease. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36:95-119
- 32 Ricciardolo LMF, Stefano DIA, Federica S, et al. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol* 2006; 533:240-252
- 33 Hartmann A, Plappert U, Raddatz K, et al. Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 1994; 9:269-272
- 34 Niess AM, Hartmann A, Grünert-Fuchs M, et al. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med* 1996; 17:397-403
- 35 Vernoooy H, Juçukaycan M, Jacobs AJ, et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1218-1224

- 36 Saetta M, Turato G, Maestrelli P, et al. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 2001; 163:1304-1309
- 37 Ruffino R, Silva LRJ. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol* 2006; 32:241-248
- 38 Heunks AML, Vina J, Cees LA, et al. Xanthine oxidative is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive disease. *Am J Physiology* 1999; 277:1697-1704
- 39 Ceylan E, Kocyigit A, Gencer M, et al. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive who had smoke or been exposed to biomass. *Respir Med* 2006; 100:1270-1276
- 40 Vaart H, Postma DS, Timens W, et al. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2003; 59:713-721

## **7 Conclusão**

Não houve alterações significativas nas taxas de dano de DNA nesta amostra de pacientes portadores de DPOC submetidos ao TC6, nem ocorreu ativação de maneira significativa dos mecanismos de reparo após 48 horas.

## **ANEXOS**

### **ANEXO A**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Senhor (a) está sendo convidado a participar de um estudo que irá avaliar a lesão causada no seu DNA antes e após a caminhada dos seis minutos. Você sabe que tem uma doença chamada Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e que, com o tempo, a falta de ar passou a impedi-lo de fazer o que antes fazia. Você cansa mais para atividades do dia-a-dia, tais como caminhar no plano, tomar banho, arrumar a casa, etc.

A reabilitação pulmonar é uma modalidade de tratamento que, através da união de vários profissionais (médico, fisioterapeuta, psicólogo, enfermeiro, educador físico, nutricionista), você passa a ter um atendimento completo e a entender melhor sua doença sob todos os aspectos em que ela possa atingi-lo. Dessa forma, durante três meses você, após realizar uma avaliação com todos estes profissionais, recebe um atendimento três vezes por semana visando a melhorar sua condição física. Você colherá sangue para alguns exames laboratoriais de rotina. São exames para avaliar sua condição de saúde e para avaliação do seu material genético, antes e após os exercícios, sempre que necessário. O objetivo destes exames no seu material genético é para saber como seu organismo recompõe-se do ponto de vista celular, após os exercícios físicos.

A sua participação neste estudo é importante, porque, através dele, juntaremos dados que comprovem que este tipo de tratamento melhora a qualidade de vida das pessoas com esta doença, bem como o que ocorre no seu organismo, quando realiza uma caminhada. Assim, teremos informações que poderão servir de base para que talvez um dia o governo disponibilize mais este tipo de tratamento para as pessoas portadoras de doença pulmonar crônica.

#### **Confidencialidade**

Os pacientes inscritos neste estudo têm direito à confidencialidade. Os relatórios da pesquisa serão codificados e separados ou completamente desvinculados dos nomes dos participantes. Desta forma, sua identidade será protegida, mantendo seu anonimato.

#### **Perguntas/Preocupações**

Se o (a) senhor (a) tiver alguma pergunta ou preocupação relacionada ao estudo, ou alguma dificuldade em realizar a reabilitação pulmonar, entre em contato, a qualquer momento, com o

Dr. Paulo Teixeira pelo telefone 9967 8585 ou com a Fisioterapeuta Cássia da Costa pelo telefone 92374808.

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado (a), estou ciente de que:

A natureza desta pesquisa foi explicada para mim por \_\_\_\_\_.

Eu aceito participar deste estudo.

Assinado (a) \_\_\_\_\_

Pesquisador \_\_\_\_\_

Testemunha \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_

## ANEXO B

---

### QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

---

(De acordo com modelo recomendado por: International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC) Mutation Research, 204:379-406, 1988)

---

Este questionário, assim como o estudo a ele relacionado, deve ser de seu interesse. A participação é espontânea e constatará destas informações gerais sobre saúde e dieta, mais uma coleta de sangue para estudo citogenético. O estudo consiste em uma avaliação de mutações nos cromossomos de cada participante. Mutações cromossômicas ocorrem normalmente nas células de todas as pessoas em nível bastante baixo, e são apontadas, entre outros efeitos, nos processos de envelhecimento e do câncer.

Trabalhadores em atividades de risco (por exemplo, radiologia, quimioterapia, ou aquelas atividades que fazem uso de óxido de etileno e outras), se não seguirem normas adequadas de segurança, podem aumentar a frequência de mutações cromossômicas em suas células. Este estudo poderá servir como sinal de alerta para prevenir e melhorar as condições de segurança. Caso não se encontrem diferenças entre trabalhadores de atividades de risco e outros de atividades diversas, poderemos concluir que os itens de segurança são efetivos neste aspecto. Isto servirá de estímulo para continuar tomando cuidados com a vida no local de trabalho.

Leia e responda cuidadosamente as seguintes questões. A informação dada por você não será associada com o seu nome, sendo conhecida apenas pelos pesquisadores associados a este estudo. As respostas deste questionário poderão ter influência direta na interpretação de nossos resultados. Por isso, contamos com sua cooperação em fornecer informações corretas.

Obrigado pelo seu interesse.

1. Nome: \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

2. Para ser preenchido pelo pesquisador: Código n.: \_\_\_\_\_ .

Essa folha será destacada das demais do questionário e arquivada.

Apenas o número do código será usado como identificação nas próximas páginas. Se espaços adicionais forem necessários para completar uma resposta, por favor, escreva atrás da página e identifique o complemento da resposta com o número da questão.

### HISTÓRIA PESSOAL

3. Data de hoje: \_\_\_\_\_.
4. Qual a sua idade? \_\_\_\_\_ (em anos).
5. Sexo:      ( ) Masculino                      ( ) Feminino
6. A qual grupo étnico você pertence:  
     ( ) Caucasiano      ( ) Negro      ( ) Chinês      ( ) Japonês  
     ( ) Outro. Qual? \_\_\_\_\_.
7. Qual o seu estado civil?  
     ( ) Casado      ( ) Solteiro      ( ) Separado      ( ) Divorciado      ( ) Viúvo
8. De quantos filhos você é pai natural (isto é, não inclua filhos adotados e de criação, e inclua filhos que mora separadamente)? \_\_\_\_\_

### HISTÓRIA OCUPACIONAL

9. Qual o seu local de trabalho? \_\_\_\_\_.
10. Há quanto tempo você trabalha neste local? \_\_\_\_\_.
11. Se há menos de dez anos, onde você trabalhou previamente e por quanto tempo?  
 \_\_\_\_\_.
12. Que tipo de trabalho você faz? \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

### EXPOSIÇÃO

13. Liste os agentes químicos (por exemplo, gases tóxicos, benzeno, chumbo, fármacos, agrotóxicos, etc.) ou físicos (radiação) a que você se expôs nos últimos 10 anos em seu trabalho.
- |                       |                        |
|-----------------------|------------------------|
| Nos últimos 12 meses: | Quantas vezes por mês: |
| _____                 | _____                  |
| _____                 | _____                  |
| _____                 | _____                  |
| Nos últimos 10 anos:  | Quantas vezes por mês: |
| _____                 | _____                  |
| _____                 | _____                  |
| _____                 | _____                  |
14. Liste os agentes químicos (agrotóxicos e outros que julgar necessário) ou físicos a que você se expôs nos últimos 10 anos fora de seu trabalho.
- |                       |                        |
|-----------------------|------------------------|
| Nos últimos 12 meses: | Quantas vezes por mês: |
| _____                 | _____                  |
| _____                 | _____                  |
| _____                 | _____                  |

Nos últimos 10 anos:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Quantas vezes por mês:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### HISTÓRIA DE FUMO

15. Alguma vez você fumou? ( ) Sim ( ) Não

Se não, passe para a questão 16. Se sim, continue:

a).- Quanto tempo você fumou? \_\_\_\_\_ (em anos)

b).- Você fuma atualmente? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, passe para a **15.c)**

Se não: Quando você parou de fumar? \_\_\_\_\_ (mês e ano).

c).- Você fuma cigarros? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, quantas carteiras por dia? ( ) Menos de ½ carteira

( ) ½ a 1 carteira

( ) Mais de 1 carteira, quantas? \_\_\_\_\_

Você fuma cigarros com filtro? ( ) Sim ( ) Não

Qual a sua marca usual? \_\_\_\_\_ .

d).- Você fuma charutos? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, quantos charutos por dia? ( ) 1 charuto

( ) 2 a 3 charutos

( ) 4 ou mais charutos. Quantos? \_\_\_\_\_

e).- Você fuma cachimbo? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, quantas vezes por dia? ( ) 1 vez

( ) 2 a 3 vezes

( ) 4 ou mais vezes. Quantas? \_\_\_\_\_

f).- O que você fumava no passado? ( ) Cigarros

( ) Charutos

( ) Cachimbo

g).- Você mastiga tabaco? ( ) Sim ( ) Não

### MEDICAMENTOS E DOENÇAS

16. Você tem tomado algum medicamento prescrito pelo médico no último ano (por exemplo, comprimidos para pressão, insulina, tranqüilizantes, relaxantes musculares, etc.)?

( ) Sim ( ) Não

Se sim, por favor, indique:

Período \_\_\_\_\_ .

**Tipo de medicamento: Dose: Quantos por dia: Início(mês): Término(mês):**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

17. Você tem tomado algum medicamento não prescrito por médico no último ano (por exemplo, aspirina, anti-ácidos, anti-histaminas, sedativos ou outras droga? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, por favor indique:

**Período** \_\_\_\_\_ :

**Tipo de medicamento:**      **Dose:**      **Quantos por dia:**      **Início(mês):**      **Término(mês):**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

18. Você toma ou tomou alguma vitamina nos últimos 6 meses?

( ) Sim      ( ) Não

Se sim, por favor indique:

**Tipo de vitamina:**      **Dose:**      **Quantas vezes por semana:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

19. a).- Você teve ou tem alguma dessas doenças?

Câncer	( ) Sim	( ) Não
Hepatite	( ) Sim	( ) Não
Mononucleose	( ) Sim	( ) Não
Herpes	( ) Sim	( ) Não
AIDS	( ) Sim	( ) Não
Meningite	( ) Sim	( ) Não
Infecção bacteriana ou viral	( ) Sim	( ) Não
Doença cardiovascular	( ) Sim	( ) Não
Diabete	( ) Sim	( ) Não
Outras doenças importantes	( ) Sim	( ) Não

b).-Se sim, indique abaixo:

<b>Doença:</b>	<b>Período da doença:</b>	<b>Tratamento:</b>
_____	_____	_____
_____	_____	_____

c).-Liste as vacinações que você recebeu nos últimos 12 meses.

<b>Vacina:</b>	<b>Data:</b>
_____	_____
_____	_____

d).-Liste os raios-X diagnósticos e terapêuticos, recebidos nos últimos 10 anos.

<b>Razão para o raio-X</b>	<b>Data(ano)</b>
_____	_____
_____	_____
_____	_____

e).-Você fez alguma cirurgia durante o último ano?

<b>Data:</b>	<b>Razão:</b>
_____	_____

f). -Dê as datas de quando você teve febre nos últimos 12 meses.

**Data(mês):**                    **Doença associada:**                    **Medicamento tomado:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### DIETAS

(deve refletir apenas os hábitos frequentes)

20. Você come apenas vegetais?                    ( )Sim                    ( )Não

21. Você come carne?                    ( )Sim                    ( )Não

a).-Se sim, com que frequência você come o seguinte:

	<b>Dias por semana :</b>			
	<b>1 a 2</b>	<b>3 a 4</b>	<b>5 a 6</b>	<b>todos dias</b>
Carne bovina	( )	( )	( )	( )
Peixe	( )	( )	( )	( )
Galinha	( )	( )	( )	( )
Porco	( )	( )	( )	( )
Outras	( )	( )	( )	( )

b).-Como você prefere sua carne?    ( )Mal passada    ( )No ponto    ( )Bem passada

22. Você usa adoçantes?                    ( )Sim                    ( )Não

Quantos por dia? \_\_\_\_\_

23. Você bebe refrigerantes?                    ( )Sim                    ( )Não

Quantos por dia? \_\_\_\_\_

24. Comente sobre sua dieta, caso ela tenha algo de especial (por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos, etc.).

\_\_\_\_\_

25. Você bebe café?                    ( )Sim                    ( )Não

Quantas xícaras pequenas por dia? \_\_\_\_\_

26. Você bebe chá?                    ( )Sim                    ( )Não

Quantas xícaras por dia? \_\_\_\_\_

27. Você toma chimarrão?                    ( )Sim                    ( )Não

Com que frequência? \_\_\_\_\_.

28. Você bebe cerveja?                    ( )Sim                    ( )Não

Se sim, por favor, indique sua média de consumo semanal:

- 1-6 garrafas por semana ou menos.  
 7-12 garrafas por semana.  
 13-24 garrafas por semana.  
 Mais de 24 garrafas por semana. Quantas? \_\_\_\_\_

29. Você bebe vinho?  Sim  Não

Se sim, por favor, indique sua média de consumo semanal:

- 1-4 copos por semana ou mais.  
 5-8 copos por semana.  
 9-16 copos por semana.  
 Mais de 16 copos por semana. Quantos? \_\_\_\_\_

30. Você bebe outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho)?

- Sim  Não

Se sim, qual ou quais? \_\_\_\_\_

.Por favor, indique sua média de consumo semanal:

- 1-4 copos por semana ou menos.  
 5-8 copos por semana.  
 9-16 copos por semana.  
 Mais de 16 copos por semana. Quantos? \_\_\_\_\_

### HISTÓRIA GENÉTICA

31. Você tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra desordem genética ou doença hereditária que tenha afetado seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos?

- Sim  Não

Se sim, por favor, especifique: \_\_\_\_\_

32. Você ou a sua esposa teve ou tem dificuldade para engravidar?

- Sim  Não

Se sim, por favor, especifique: \_\_\_\_\_

33. Você já teve um filho que tenha nascido prematuramente ou que tenha sido abortado?

- Sim  Não

34. Você tem um gêmeo idêntico vivo?  Sim  Não