Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas

Dáversom Bordin Canterle

ESTRESSE OXIDATIVO E DANO DE DNA EM SANGUE PERIFÉRICO PRÉ E PÓS TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO EM PACIENTES PORTADORES DE DPOC

Porto Alegre, 2012

Dáversom Bordin Canterle

ESTRESSE OXIDATIVO E DANO DE DNA EM SANGUE PERIFÉRICO PRÉ E PÓS TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO EM PACIENTES PORTADORES DE 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: Prof. Dr. Paulo José Zimermann Teixeira

Porto Alegre, 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Bordin Canterle, Dáversom
ESTRESSE OXIDATIVO E DANO DE DNA EM SANGUE PERIFÉRICO PRÉ E PÓS TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO EM PACIENTES PORTADORES DE DPOC / Dáversom Bordin Canterle. -- 2012.
64 f.

Orientador: Paulo José Zimemann Teixeira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. DPOC. 2. DNA. 3. Estresse oxidativo. 4. Exercício. I. Zimemann Teixeira, Paulo José, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Helio Silvestre Canterle e Lourdes Maria Bordin Canterle, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram direita e indiretamente, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Paulo José Zimermann Teixeira, pelo incentivo e atenção desprendida; aos meus pais, Helio Silvestre Canterle e Lourdes Maria Bordin Canterle, por estarem sempre ao meu lado e servindo como exemplo de dedicação; à equipe de trabalho do LAPEX da UFRGS, em especial ao Prof. Dr. Alvaro Reischak de Oliveira; ao Laboratório de Fisiologia da UFRGS, em especial ao Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr. Também gostaria de agradecer à Universidade Feevale, LEAFEES, em especial Profa. Dra. Cássia Cinara da Costa e Prof. Me. Rafael Machado de Souza. Aos meus colaboradores nas aplicações dos testes: André Lopes, Max Schaun, Karla Poersch, Jocelito Martins, Ivy Reichert, Thiago Brites Freitas, Roberta Passos Palazzo, Prof. Dr. Danilo C. Berton, Juliano Castilho, Pietro Merola. Agradeço, ainda, aos pacientes e indivíduos controles do estudo que realizaram os testes.

RESUMO

Introdução: A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) caracteriza-se por obstrução do fluxo aéreo e uma inflamação crônica, demonstrando manifestações sistêmicas que repercutem com a diminuição da capacidade de exercício e piora da qualidade de vida. As alterações do metabolismo celular e molecular, assim como as respostas de defesa e reparo celular estão associadas à gênese da DPOC e pioram com o exercício. **Objetivo**: O objetivo foi avaliar nos pacientes com DPOC e controles o estresse oxidativo e o dano de DNA pré e pós-aplicação do teste de ergoespirometria e correlacionando-os com o pico do VO_2. **Métodos**: Estudo antes e depois, controlado com análise de indivíduos com DPOC (n=27) e controles sem DPOC (n=15), de ambos os sexos, com idade média de 62 anos, que realizaram o teste de ergoespirometria e coletaram amostras de sangue antes e depois. Foram analisados o estresse oxidativo pela lipoperoxidação lipídica e sistema Glutationa; e o dano de DNA pelo Teste Cometa. **Resultados**: No estresse oxidativo (GSH, GSSG, GSSG/GSH, Lipoperoxidação) e no dano de DNA (células com dano) pré e pós, o exercício máximo em indivíduos com DPOC e controles saudáveis foram: [GSH (DPOC: 1413 ± 927 vs. 1213 ± 575; p=0,469); (Controle: 2271 ± 951 vs. 2050 ± 871; p=0,120)]; [GSSG (DPOC: 393 ± 135 vs. 530 ± 223; p=0,001); (Controle: 448,72 ± 131 vs. 444,16 ± 103; p=0,897)]; [GSSG/GSH (DPOC: 0,39 ± 0,27 vs. 0,55 ± 0,45; p=0,005); (Controle: 0,24 ± 0,17 vs. 0,27 ± 0,17; p=0,156)]; [Lipoperoxidação (DPOC: 1,34 ± 0,23 vs. 1.41 ± 0,29; p=0,155); (Controle: 1,38 ± 0,18 vs. 1,43 ± 0,32; p=0,431)]; [células com dano (DPOC: 23 ± 50,3 vs. 29 ± 56,6; p=0,005); (Controle: 7,33 ± 5 vs. 16,2 ± 4; p=0,035)]. Quando comparados os DPOC com controles, foi possível observar resultado significativo entre GSSG (p=0,01) e dano de DNA (p=0,035). **Conclusão**: O estresse oxidativo e o dano de DNA modificam-se de forma significativa depois do exercício máximo em pacientes com DPOC, porém, nos controles, a diferença foi significativa apenas com o dano de DNA. Houve correlação significativa entre o pico do VO_2 com o estresse oxidativo e o dano de DNA, demonstrando que quanto menor a capacidade aeróbica maior o estresse oxidativo e o dano de DNA em pacientes com DPOC.

Palavras-chave: DNA. DPOC. Estresse oxidativo. Exercício.

ABSTRACT

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by airflow obstruction and chronic inflammation with systemic repercussions as decreased exercising capacity and worse quality of life. Cellular and molecular alterations, as well as cell defense and repair mechanisms, are related to the genesis of COPD and worsen with exercise. **Aim**: The aim was to evaluate oxidative stress and DNA damage before and after ergospirometry in patients with COPD and control subjects correlating it with peak VO_2. **Methods**: A semi-experimental study with control group analyzing patients with COPD (n=27) and controls without COPD (n=15) of both genders, with mean age of 62 years that performed ergospirometry test and collected blood samples before and after the test. Oxidative stress was analyzed using the lipid peroxidation and the Glutathione system; DNA damage by the Comet Assay. **Results**: During oxidative stress (GSH, GSSG, GSSG/GSH, and lipid peroxidation) and (damaged cells) before and after maximal stress test were: [GSH (DPOC: 1413 ± 927 vs. 1213 ± 575; p=0.469); (Controls: 2271 ± 951vs. 2050 ± 871; p=0.120)]; [GSSG (DPOC: 393 ± 135 vs. 530 ± 223; p=0.001); (Controls: 448.72 ± 131 vs. 444.16 ± 103; p=0.897)]; [GSSG/GSH (DPOC: 0.39 ± 0.27 vs. 0.55 ± 0.45; p=0.005); (Controls: 0.24 ± 0.17 vs. 0.27 ± 0.17; p=0.156)]; [Lipid peroxidation (DPOC: 1.34 ± 0.23 vs. 1.41 ± 0.29; p=0.155); (Controls: 1.38 ± 0.18 vs. 1.43 ± 0.32; p=0.431)]; [damaged cells (DPOC: 23± 50.3 vs. 29± 56.6; p=0.005); (Controls: 7.33 ± 5 vs. 16.2 ± 4; p=0.035)]. When compared COPD to controls it was possible to observe a significant result between GSSG (p = 0.01) and DNA damage (p = 0.035). **Conclusion**: Oxidative stress and DNA damage changed significantly after maximal exercise in patients with COPD; however, in controls the difference was significant only with DNA damage. There was significant correlation between VO_2 peak and oxidative stress and DNA damage demonstrating that the lower the aerobic capacity, the higher the oxidative stress and DNA damage in COPD patients.

Keywords: DNA. COPD. Oxidative Stress. Exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (Tese)	Mecanismo desencadeador da limitação do fluxo aéreo.....	18
Figura 2 (Tese)	O efeito do estresse oxidativo na perda do músculo esquelético na DPOC.....	18
Figura 3 (Tese)	Fisiopatologia das manifestações sistêmicas e locais da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.....	19
Figura 4 (Tese)	Ciclo vicioso da DPOC e progressão da doença.....	19
Figura 5 (Tese)	Mecanismos de lesão pulmonar pelo tabagismo.....	20
Figura 6 (Tese)	Ilustração das etapas da técnica do cometa.....	25
Figura 7 (Tese)	Linfócitos processados pela técnica Cometa. A: classe 0 (nenhum dano detectado), B: classe 1, C:classe 2, D:classe 3, E: classe 4 (índice crescente de dano de DNA).....	25
Figura 8 (Tese)	Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O).....	26
Figura 9 (Tese)	Via de formação dos EROS.....	27
Figura 10 (Tese)	Ciclo vicioso do estresse oxidativo.....	28
Figura 11 (Tese)	Modelo da função desempenhada pelos radicais livres na célula (oxidantes/antioxidantes).....	28
Figura 12 (Artigo)	Correlação do pico do VO_2 com o estresse oxidativo em pacientes com DPOC.....	62

LISTA TABELAS

Tabela 1 (Tese)	Classificação espirométrica da DPOC Gravidade baseada no VEF_1 pós-broncodilatador.....	17
Tabela 2 (Artigo)	Características basais dos indivíduos.....	60
Tabela 3 (Artigo)	Diferenças dos marcadores de estresse oxidativo e dano de DNA pré e pós exercício máximo em pacientes com DPOC e controles sem DPOC.....	61
Tabela 4 (Artigo)	Correlações do Estresse oxidativo e do Dano de DNA com outras variáveis.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive lung Disease

TC6 – Teste de Caminhada de Seis Minutos

VEF_1 – Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo

CVF – Capacidade Vital Forçada

GSH – Glutationa (reduzida)

GSSG – Dissulfeto de Glutationa (oxidada)

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

ERNS – Especies reativas de Nitrogênio

DNA - Ácido desoxirribonucleico

CAT - Catalase

Fe^{2+} - Íon ferroso

GPX– Glutationa peroxidase

GR – Glutationa redutase

HOCl – Ácido hipocloroso

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

MDA – Malondialdeído

NADP – Niconinamida adenina dinucleotídeo fosfato

O_2^- - Radical superóxido

OH^-- Radical hidroxil

$ONOO^-$ - Peróxinitrito

RLs – Radicais livres

SOD – Superóxido dismutase

VO_2máx– Consumo máximo de oxigênio

HPLC – Cromatografia líquida de alta precisão

MDA – Malondialdeido

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

REDOX – Equilíbrio entre oxidantes (GSSG) / antioxidantes (GSH)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. REVISÃO DA LITERATURA 14
2.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) 14
2.1.1 Conceito 14
2.1.2 Epidemiologia 15
2.1.3 Diagnóstico e classificação da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica 16
2.1.4 Patogênese e fisiopatologia da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica 17
2.1.5 Tratamento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica 21
2.1.6 Exercício físico na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica 21
2.2 Dano de DNA 23
2.3 Estresse oxidativo 25
3. OBJETIVOS 31
3.1 Objetivo geral 31
3.2 Objetivos específicos 31
4. HIPÓTESES 32
5. ARTIGO CIENTÍFICO LINGUA PORTUGUESA 41
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 64

1. INTRODUÇÃO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma doença prevenível e tratável, caracterizada pela limitação ao fluxo aéreo, que é persistente e usualmente progressiva, associada a uma inflamação crônica dos pulmões por partículas nocivas e gases (1). A DPOC tem como principal causa o tabagismo, porém, do total de fumantes, cerca de 25% desenvolvem a DPOC (2). Os principais sintomas são a dispneia, tosse, presença de secreção nas vias aéreas com expectoração crônica e limitação ao exercício (1,3).

No Brasil, 15,8% da população acima de 40 anos é portadora da DPOC. A menor incidência na América Latina foi encontrada na cidade do México, com 7,8%, e a maior foi em Montevidéu, com 19,7% (4).

Diversas alterações fisiopatológicas ocorrem nesta doença. Entre tais alterações, pode-se citar: resistência aumentada das vias aéreas, ventilação ineficiente, anormalidade das trocas gasosas, desvantagem mecânica dos músculos respiratórios e redução significativa da força muscular, diminuição no número de mitocôndrias, de enzimas oxidativas e de fibras tipo I. Além disso, ocorre redução da capilaridade, aumento da hipoxemia, aumento da hipercapnia, distúrbios eletrolíticos, alterações inflamatórias, miopatia, desnutrição e aumento no estresse oxidativo, que tendem a se agravar com a progressão da doença, gerando limitações importantes nas Atividades da Vida Diária (AVD) e na qualidade de vida (5, 6). As realizações de tarefas simples podem estar prejudicadas devido à limitação ventilatória e à disfunção muscular. A limitação ventilatória é avaliada pela espirometria, imprescindível para diagnosticar e classificar a doença; a disfunção muscular pode ser avaliada através de testes máximos e submáximos de exercício, respeitando-se a especificidade de cada teste (7, 8, 9, 10).

Assim, o teste de caminhada de seis minutos (TC6) pode ser utilizado para avaliar a capacidade submáxima do exercício. O teste de ergoespirometria, por sua vez, é utilizado para avaliar o exercício máximo (11, 12, 13).

Os indivíduos com DPOC expostos ao exercício reagem de forma diferente, quando comparados aos indivíduos normais, o que pode ser observado pelas

variáveis fisiológicas do exercício ou por alterações metabólicas e celulares, que podem ser avaliadas pelo estresse oxidativo e pelo dano de DNA (14, 15).

O estresse oxidativo e a inflamação, induzidos pela exposição à fumaça do cigarro, partículas e gases nocivos, assim como o exercício intenso, geram o dano de DNA nas células, que tendem a ser reparadas em até 24 horas. Existem mecanismos de reparo para os danos causados nas células, que são defesas do organismo, entretanto alguns indivíduos reagem de forma diferente, justificando que, algumas pessoas podem, ou não, desenvolver a doença (16).

A associação entre o hábito tabágico e o dano de DNA nas mulheres é significativa, já a idade não possui correlação expressiva. Assim, os pacientes com DPOC apresentam dano de DNA relacionado à doença. Ressalta-se que o hábito de fumar irá potencializar esse efeito (16,17,18).

Para Mercken et al. (2005) (19), o exercício pode induzir o estresse oxidativo, o qual pode aumentar com maior intensidade e duração. O sistema de defesa antioxidante deve estar em equilíbrio com o sistema oxidante. Caso ele não esteja, as espécies reativas de oxigênio (EROS) podem gerar dano de DNA. Sobre esses mecanismos ainda restam dúvidas quanto ao comportamento do estresse oxidativo entre as doenças e os diferentes tipos de exercício, em especial aqueles aplicados aos indivíduos com DPOC.

Na gênese da DPOC, o dano de DNA e o estresse oxidativo possuem devida importância e devem ser conhecidos, a fim de ser traçado o plano de tratamento, principalmente o relacionado aos exercícios. A adequação das intensidades e dos tipos de exercícios deve ser de forma individualizada, para não induzir o estresse a ponto de gerar dano de DNA. Assim, a presente investigação abordou, em indivíduos com DPOC e controles saudáveis, o exercício máximo, que possui com maior consumo de O_2 a liberação de espécies reativas de oxigênio. Espera-se que melhor condicionamento e consumo de oxigênio possa resultar em menor estresse oxidativo e dano no DNA.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

2.1.1 Conceito

A DPOC é uma enfermidade respiratória prevenível e tratável. Ela caracteriza-se pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo, que não é totalmente reversível, tanto espontaneamente como por meio de medicamentos, por se tratar de uma doença com modificações estruturais presentes nos pulmões, tanto nas vias aéreas quanto no parênquima. Essa limitação ao fluxo aéreo é causada por uma combinação de doença das vias aéreas (Bronquite) e a destruição do parênquima (Enfisema), sendo que a contribuição relativa de cada componente varia de pessoa para pessoa (1,20, 21).

Para o II Consenso Brasileiro sobre DPOC (2004) (22), essa obstrução do fluxo aéreo é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos, causada primariamente pelo tabagismo, conceito este que se mantém atualmente. Embora a doença comprometa os pulmões, ela também produz consequências sistêmicas significativas. Assim, a DPOC deve ser considerada uma doença pulmonar, que apresenta comorbidades significativas que devem ser levadas em conta, tornando necessária uma avaliação abrangente para determinar a gravidade e, consequentemente, direcionar para um tratamento adequado (1).

A DPOC tem uma história variável e nem todos os indivíduos seguem o mesmo curso. Uma das características mais marcantes da história natural da doença é a ocorrência de períodos de exacerbação, caracterizados pela piora aguda dos sintomas de dispneia, tosse e/ou expectoração, acima das variações normais do dia a dia, normalmente acompanhadas de piora da função pulmonar. Além disso, é geralmente uma doença que se agrava com o passar do tempo, principalmente se permanecer a exposição do paciente a agentes nocivos (1).

2.1.2 Epidemiologia

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Ressalta-se que, em países de baixa e média renda, neste início do século XXI, é a sexta causa principal de morte e incapacidade, sendo que muitas das pessoas que sofrem com essa doença morrem prematuras devido à ela ou às suas complicações (23). Conforme Celli e MacNee (24), na década de 1990, a DPOC ocupava o 12° lugar como causa de incapacidade em relação à idade. A estimativa é que, em 2020, ela poderá ocupar o 5°lugar em relação às causas de incapacidade e o 3° lugar como causa de morte no mundo. Estima-se que a DPOC é a 11ª causa de doença no mundo e acredita-se que, em 2030, passará para 7ª causa (25).

A América Latina é uma região que está passando, de forma rápida, por uma transição demográfica e epidemiológica, gerando o aumento de doenças crônicas como resultado do envelhecimento de sua população.O cenário da América Latina é também motivo de preocupação, dada a altas taxas de consumo de tabaco, o principal fator de risco para a DPOC no mundo. Esse dado é importante, pois a prevalência da DPOC é significativamente maior em fumantes e ex-fumantes do que em não fumantes, naqueles com mais de 40 anos e em homens, segundo estudos realizados em 28 países entre 1990 e 2004 (26).

No Projeto Latino-Americano de Investigação de Doença Pulmonar Obstrutiva (PLATINO) foram examinadas cinco cidades de cinco países, Cidade do México (México), Santiago (Chile), Montevidéu (Uruguai), Caracas (Venezuela) e São Paulo (Brasil), quanto a prevalência da limitação do fluxo de ar pós-broncodilatador (DPOC) entre pessoas acima de 40 anos de idade. A prevalência da DPOC variou de 5,6% nas mulheres da Cidade do México para 27,2% nos homens da cidade de Montevidéu. No Brasil, estimou-se aproximadamente 15,8% de portadores de DPOC, e a prevalência da DPOC combinada entre os cinco países foram de 14,3% sendo 18,9% em homens e 11,3% em mulheres (27).

Segundo dados do DATASUS, a morbidade da DPOC no Brasil, avaliada em hospitais no ano de 2008, somou 9110 casos (28) e, em 2011, chegou a 10686, correspondendo a um aumento de 17%, nos números de internações no período de

3 anos (29). No entanto, o índice de mortalidade no Brasil por enfisema pulmonar (Categoria CID-10 J43) reduziu 28%, de 5660 óbitos em 1996 (30) para 4069 óbitos em 2009 (31) e 4419, em 2010. Houve um decréscimo de 48% no número de óbitos por bronquite crônica (Categoria CID-10 J42), passando de 763 casos em 1996 (32) para 391 em 2009 e 419 em 2010 (33).

As estimativas atuais da prevalência de DPOC no mundo ficam dependentes de falhas de diagnósticos da doença, porém, se acredita que aproximadamente 210 milhões de pessoas sejam acometidas pela doença. A doença afeta a vida produtiva de trabalhadores, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), havendo uma perda anual de 27.700 anos de produtividade (25).

2.1.3 Diagnóstico e classificação da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Conforme o conceito da doença, relacionado às alterações pulmonares, para ser efetivo no diagnóstico, é importante a análise da função pulmonar, a qual servirá também para classificar a gravidade. O Radiograma de Tórax (RX) e a Tomografia Computadorizada (TC) não são usualmente empregados no diagnóstico da DPOC, porém podem ser incluídos como alternativa diagnóstica e verificação de possíveis comorbidades associadas à doença. Assim, a história da doença e o exame físico representam parte integrante de um diagnóstico bem realizado.

A DPOC é uma doença sistêmica que acaba por dificultar o diagnóstico e subestimar o número de indivíduos que a possuem. Considerar a gravidade da DPOC é importante para o estabelecimento do prognóstico dos pacientes (1, 34). No entanto, a doença é classificada em quatro estágios de gravidade espirométrica (Tabela 1), Estágio 1: DPOC Leve; Estágio 2: DPOC Moderada; Estágio 3: DPOC grave; Estágio 4: DPOC Muito Grave, com base nos valores previstos do VEF_1, mensurados na espirometria (34). A quinta categoria - "Estádio” (GOLD) 0: Em Risco", - que apareceu no relatório de 2001 já não está incluída como um grau funcional da DPOC, pois não há evidência de que indivíduos que estão dentro da definição de "Risco" (tosse crônica e produção de expectoração, espirometria normal) necessariamente progridam para estádio I (GOLD 1), DPOC Leve (1).

Segundo o grupo de estudo GOLD (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) (2011), a DPOC é definida, do ponto de vista de função pulmonar, na

relação VEF_1/CVF < 70%. Além da diminuição da VEF_1 e da relação VEF_1/CVF, outras alterações comumente encontradas são o aumento do volume residual e da capacidade residual funcional, aumento da capacidade pulmonar total e redução da capacidade vital.

Tabela 1: Classificação espirométrica da DPOC
Gravidade baseada no VEF_1 pós-broncodilatador

Estágio da DPOC	**Função Pulmonar**
Estágio 1: DPOC Leve	VEF_1/CVF <70%, mas VEF_1 ≥80% previsto
Estágio 2: DPOC Moderada	50%≤VEF_1<80% previsto
Estágio 3: DPOC Grave	30% ≤VEF_1 <50% previsto
Estágio 4: DPOC Muito Grave	VEF_1 < 30% previsto ou VEF_1< 50% previsto associado à insuficiência respiratória crônica

VEF_1 – Volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF – Capacidade Vital Forçada.
Fonte: GOLD, 2011 (1)

2.1.4 Patogênese e fisiopatologia da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

A DPOC é caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas, com excesso de produtos oxidativos, que causa mudanças estruturais e estreitamento das pequenas vias aéreas. Destruições do parênquima pulmonar, derivadas dos processos inflamatórios, levam à perda de anexos alveolares das pequenas vias aéreas e diminuem o recolhimento elástico pulmonar, que, por sua vez, causam alterações que diminuem a capacidade das vias aéreas permanecerem abertas durante a expiração, caracterizando o sinal de queda do VEF_1 (1, 35) (Figura 1).

As alterações inflamatórias nos pulmões acarretam hipersecreção, disfunção muco ciliar e a hiperinsuflação pulmonar, redução das trocas gasosas, hipertensão pulmonar e, no coração, o *cor pulmonale*. Todas as alterações, com o curso da doença, ficam evidentes durante o exercício físico e, posteriormente, com o repouso (36). A doença também gera manifestações sistêmicas com alteração da capacidade física e perda da massa muscular progressiva (37, 38, 39) (Figura 2, Figura 3).

Figura 1 - Mecanismo desencadeador da limitação do fluxo aéreo
Fonte: GOLD, 2011 (1)

Figura 2 - O efeito do estresse oxidativo na perda do músculo esquelético na DPOC.
Fonte: Boots AW,Haenen GRMM,Bast A,Oxidant metabolism in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Eur Respir J 2003; 22: Suppl. 46, 14s–27s (39).

A limitação da capacidade física cria um círculo vicioso que compromete a execução das Atividades da Vida Diária (AVD), interferindo, consequentemente, na qualidade de vida (figura 4) (5, 40).

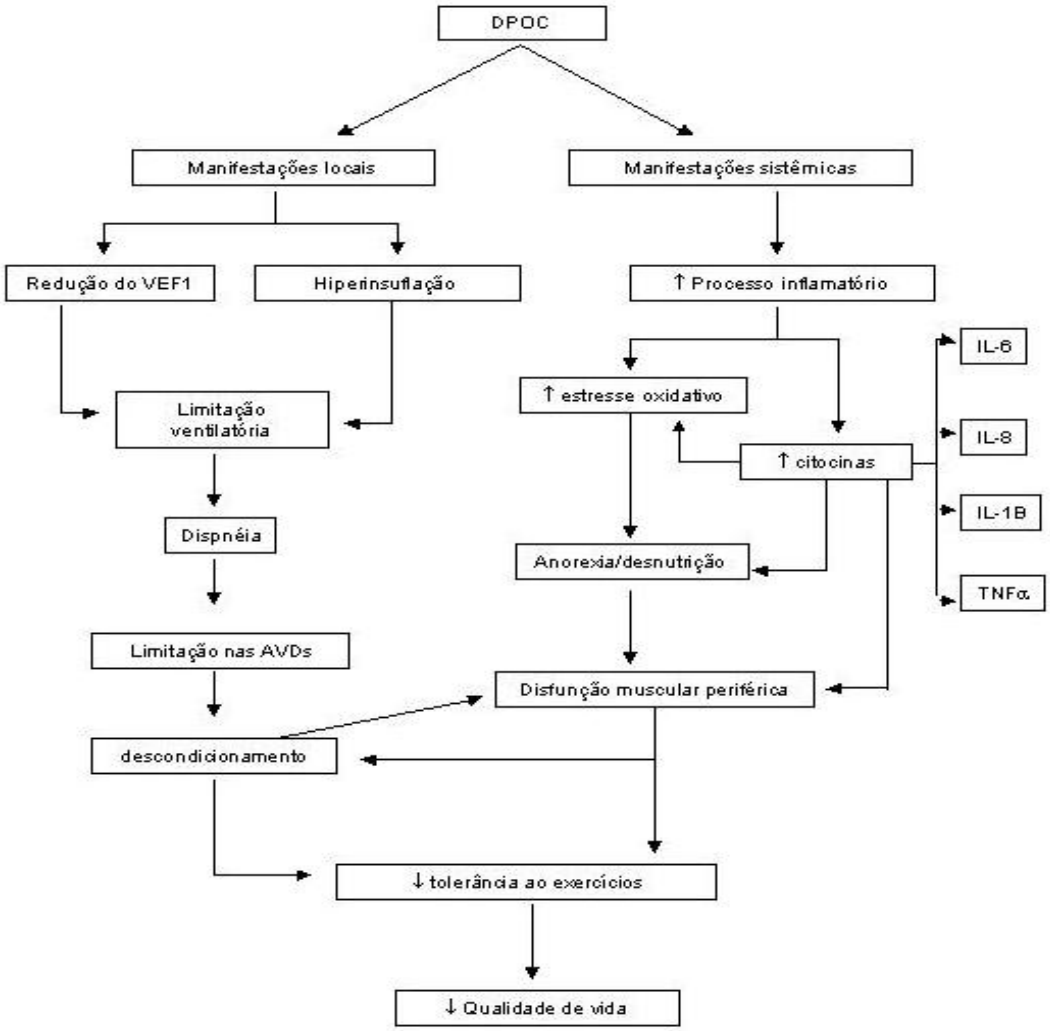

Figura 3 - Fisiopatologia das manifestações sistêmicas e locais da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
Fonte: Dourado et al., 2006 (38).

Figura 4 – Ciclo vicioso da DPOC e progressão da doença (modificado)
Fonte: Cooper CB. The connection between Chronic Obstructive Pulmonary Disease symptoms and hyperinflation and its impact on exercise and function. Am J Med. 2006;119 (10 Suppl 1):21-31 (41).

Os mediadores envolvidos no processo de controle da inflamação são as citocinas, fatores quimiotáticos e oxidantes, tendo como mediadores o fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α), Leucotrienos B4 (LTB4) e Interleucina-B (IL-8). Esses são característicos da DPOC e podem ser diferentes em outras doenças, como por exemplo, a asma (42,43).

A principal causa da DPOC está associada ao hábito de fumar. A fumaça de cigarro estimula a via aérea a produzir macrófagos, neutrófilos e monócitos alveolares, que captam as partículas de fumo e liberam substâncias quimiotáticas, estimulando o processo inflamatório e a sua perpetuação (44, 45,46). Todo esse processo gera estresse oxidativo e/ou redução da capacidade antioxidante em pacientes tabagistas com DPOC (47). Assim, ocorre inibição dos mecanismos protetores pulmonares, com a alfa 1-antitripsina, que é um inibidor da elastase pulmonar e a antileucoprotease, que é inibidora do muco brônquico de baixo peso molecular (37, 48). Além de o muco estar sendo produzido de forma diferente, ele também se acumula na via aérea com mais facilidade, devido à alteração da atividade muco ciliar, propiciando a colonização e a atuação dos oxidantes, que lesam a via aérea, levando a DPOC ao longo dos anos (46, 49) (Figura 5).

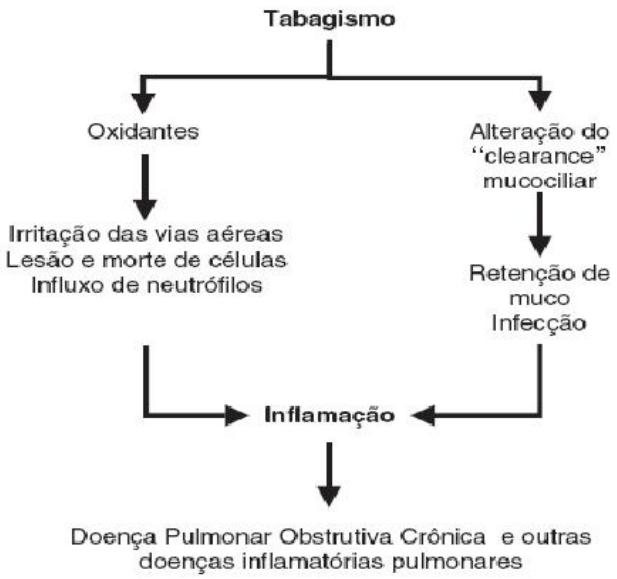

Figura 5 – Mecanismos de lesão pulmonar pelo tabagismo.
Fonte: Torres BS, Godoy I. (45)

2.1.5 Tratamento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

O tratamento possui como ponto fundamental a broncodilatação e consequente redução da hiperinsuflação, o que permite, entre outros aspectos, melhor capacidade para executar as atividades da vida diária. Em um sentido mais amplo, os objetivos do tratamento são: reduzir as exacerbações, melhorar a capacidade de exercício, melhorar a percepção do esforço, melhorar a qualidade de vida e reduzir a mortalidade. Enquanto as opções de tratamento medicamentoso têm proporcionado reduzir a dispneia e as exacerbações, os programas de reabilitação pulmonar com uma abordagem multidisciplinar têm acrescentado aos medicamentos maior efetividade no que diz respeito a reduzir a dispneia, a reduzir as internações hospitalares e consultas não planejadas, melhorando a execução das atividades de vida diária e, possivelmente, auxiliando na redução da mortalidade (1,50,51).

2.1.6 Exercício físico na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

O exercício físico é parte integrante dos programas de reabilitação pulmonar para os pacientes com DPOC, e possui evidência “A” no tratamento, segundo consensos sobre a doença (1,52).

Existem diversos protocolos para a realização do exercício que podem ser avaliados, envolvendo a especificidade de cada um, baseado no treinamento da força muscular e na resistência. O treinamento de resistência através da rota metabólica aeróbia é fundamental para indivíduos com DPOC (53, 54, 55).

As adaptações fisiológicas no exercício encontram-se alteradas em indivíduos com DPOC, demonstrando reduzido condicionamento físico pelo baixo consumo de oxigênio, redistribuição do fluxo sanguíneo alterado, maior acúmulo de lactato no músculo e hiperinsuflação dinâmica (49, 52, 53, 54). Também existe na doença a predominância do metabolismo glicolítico e pobre, ao invés do oxidativo. Essas alterações são limitantes do exercício (55), assim como, a ansiedade e a baixa motivação do paciente (56).

As adaptações fisiológicas com treinamento levam durante o exercício à diminuição da frequência cardíaca, que representa para os pacientes com DPOC melhor condicionamento físico. Representa também melhor extração de oxigênio

pelo músculo e maior resistência (57,58), mantendo-se por maior tempo em melhores condições.

Em uma metanálise realizada recentemente, avaliou-se qual é a melhor intensidade de exercício e o melhor tipo de exercício para pacientes com DPOC. Os estudos não demonstraram superioridade quanto à intensidade, definindo qual traz melhores benefícios na capacidade de exercício, qualidade de vida e melhora dos sintomas. Os autores justificam que faltam trabalhos para definir resultados. Analisando o tipo de exercício, intervalados e contínuos, não foi identificada diferença de um tipo sobre o outro (59).

A avaliação da capacidade de exercício na DPOC pode ser realizada através de testes já descritos na literatura, que devem respeitar a fisiologia do exercício e a fisiopatologia da doença. A aplicação dos testes na DPOC é diferente da aplicação em pessoas normais. Os principais testes utilizados são: o Teste de Caminhada de Seis Minutos (TC6) e o Teste de Ergoespirometria (TE) com protocolo incremental. Através deles, são obtidas as variáveis fisiológicas do exercício, como por exemplo, frequência cardíaca máxima e o VO_2 máximo e de pico, assim como, distâncias percorridas. Esses possuem caráter padrão ouro para predizer desempenho e intolerância no exercício, porém as limitações ventilatórias na DPOC e a dificuldade em atingir o platô no teste de ergoespirometria proporcionam a utilização do VO_2 de pico, que é considerado equivalente ao VO_2 máximo (59, 60, 61).

O teste de ergoespirometria avalia a interação entre os sistemas respiratório, cardiovascular e muscular, predizendo, através do consumo máximo de oxigênio (VO_2), o prognóstico dos pacientes, e este é melhor que as avaliações da função respiratória e cardíaca em repouso (62). A realização deste teste também é importante na reabilitação pulmonar para prescrição ou não prescrição do exercício (60). O objetivo do teste é avaliar a capacidade de exercícios e os seus riscos. As avaliações realizadas antes de expor os indivíduos aos testes requer treinamento de um profissional habilitado, porque, segundo ACSM (American College of Sports Medicine) (62), existem contraindicações absolutas na realização do teste e prescrição do exercício, como por exemplo, infarto agudo do miocárdio, angina instável, insuficiência cardíaca congestiva, estenose aórtica severa, ou relativas como: PAD de repouso > 115mmHg ou PAS de repouso > 200mmHg, cardiopatia valvular moderada, anormalidade eletrolíticas, doença metabólica descontrolada. Os principais ergômetros utilizados para o teste são a bicicleta e a esteira (63-67).

O Teste da Caminhada de seis minutos (TC6) possui um objetivo semelhante ao teste de ergoespirometria, porém é um teste simples que exige poucos recursos para sua realização. Ele apresenta boa correlação com a sobrevida dos pacientes, com o VO_2 avaliado no teste de ergoespirometria e com as atividades de vida diária (68, 69). Para sua realização, é necessário um corredor plano de pelo menos 30 metros, um cronômetro para monitorar o tempo de 6 minutos, monitorização da frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão arterial, saturação de oxigênio, percepção do esforço e registro da distância percorrida, principalmente no início e no final do teste (68). O aprendizado para realização do teste de caminhada pode modificar os seus resultados. Por esse motivo, recomenda-se a realização de dois testes em curto período de tempo, a fim de se certificar que os resultados obtidos não possam ser influenciados pelo aprendizado, principalmente para fins de pesquisa (70). Os testes de caminhada vêm sendo utilizados de forma crescente, com a finalidade de determinar a relação entre a aptidão física e o consumo máximo de oxigênio, propiciando uma análise global dos sistemas respiratório, cardíaco e metabólico (71). Conforme Neder (72), avaliar a capacidade de exercício ao longo do tempo proporciona verificação da progressão da doença e verificação da evolução do tratamento.

2.2 Dano de DNA

O dano de DNA é induzido pelo estresse oxidativo, que é gerado pelo desequilíbrio entre oxidandantes/antioxidantes. Na DPOC, o processo inflamatório crônico estimula a liberação de espécies reativas de oxigênio pelas células inflamatórias no sistema respiratório e no sangue, capazes de realizar danos a membrana celular, proteínas e DNA. O tabagismo, que é o principal fator etiológico da DPOC, potencializa o estresse oxidativo, devido as mais de 4 mil substâncias tóxicas inaladas, que induzem, consequentemente, ao dano de DNA (73, 74). Em um estudo realizado por Ceylan (75), foi possível verificar relação entre o hábito de fumar e o aumento do dano de DNA na DPOC.

Em um estudo recente realizado com pacientes com DPOC fumantes, em análise do material genético do tecido pulmonar, constatou-se que a quebra das moléculas de DNA está relacionada ao estresse oxidativo, o que contribui para a

patogênese da DPOC pela indução da apoptose e respostas pró-inflamatórias (76). Outro estudo comparou a intensidade do dano de DNA e a instabilidade da molécula em diferentes doenças como a DPOC, bronquiectasias, fumantes sem DPOC e indivíduos saudáveis, demonstrando que a DPOC teve maior intensidade de dano e instabilidade. Esse resultado pode estar associado a maior estresse oxidativo na DPOC e à alteração da capacidade de reparo do tecido pulmonar pelos mecanismos antioxidantes (77). A idade avançada e o exercício extenuante também podem ser fatores relacionados ao dano de DNA, devido à alteração dos mecanismos de reparo expostos a essas condições (78,79).

O exercício analisado como indutor do estresse oxidativo foi verificado em dois momentos, acima do limiar de lactato e abaixo do limiar de lactato. Através de biopsia do músculo da coxa pela avaliação do DNA mitocondrial na DPOC com parada com controles sem DPOC, foi verificado que os exercícios acima do limiar danificam o DNA mitocondrial com dano maior na DPOC. provavelmente por maior estresse oxidativo gerado pela doença e pelo processo inflamatório crônico (79). Neste estudo, não foi utilizado o Teste Cometa para avaliar o dano de DNA, porém essa técnica mostra-se eficaz no processo de verificação dos linfócitos em outros estudos (80, 81).

O Teste Cometa ou SCGE (Single Cell Gel Eletrophoresis Assay), que avalia o dano na célula, caracteriza-se por genotoxidade capaz de detectar danos do DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalares e oxidantes, de forma quantitativa. Trata-se de uma metodologia simples, barata, rápida, sensível para medir quebra e reparo no DNA de células individualizadas. A técnica é usada para investigar o efeito de EROS no DNA e permite a avaliação de um grande número de pessoas (80). As etapas da técnica são ilustradas na Figura 6.

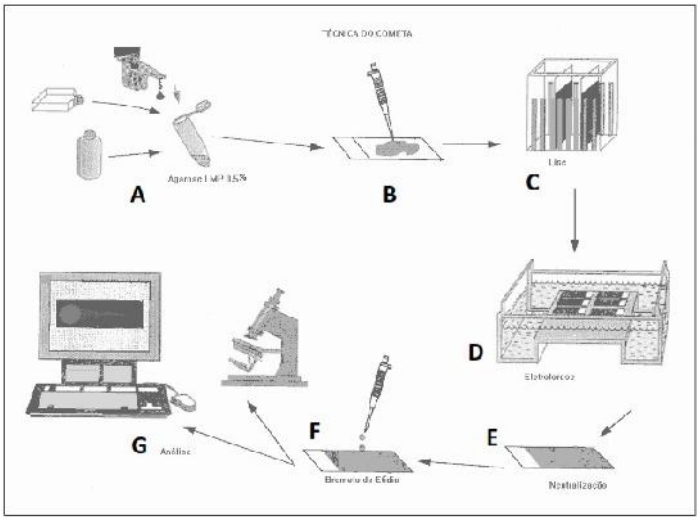

Figura 6: Ilustração das etapas da Técnica do Cometa: (A) Sangue periférico acrescido de agarose LMP (Law melting point); (B) Aplicação sobre lâmina em solução de lise; (D) Eletroforese em tampão alcalino; (E) Neutralização das lâminas; (F) Coloração; (G) Análise.
Fonte: Singh NP, Mccoy T, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988; 175: 184–92. (81)

Através dessa técnica, o dano de DNA é visualizado de forma individual na célula, sob forma de aumento na migração de material genético a partir do núcleo (“cauda” do cometa) (Figura 7). O mecanismo da técnica relaciona-se à organização super-helicoidal do DNA, a qual se torna relaxada em função de processos de quebras, podendo formar estruturas alongadas a partir da eletroforese (16).

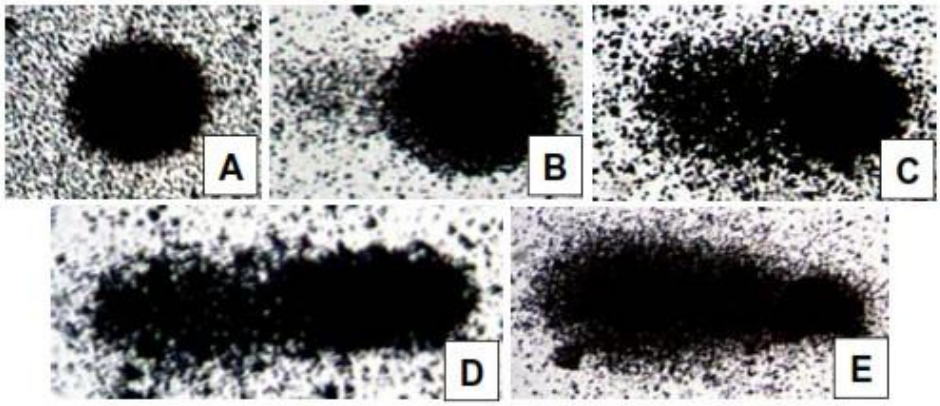

Figura 7: Linfócitos processados pela técnica Cometa. A: classe 0 (nenhum dano detectado), B: classe 1, C:classe 2, D:classe 3, E: classe 4 (índice crescente de dano de DNA).

2.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo pode ser considerado o antecessor do dano de DNA e está ligado ao desequilíbrio dos mecanismos oxidante (radicais livres)/antioxidante.

Radicais Livres (RLs) ou Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados com excessiva reatividade química. Sua reatividade resulta da necessidade de captar um elétron (82). Os radicais são produzidos naturalmente em nosso organismo e exercem papel importante na homeostasia (83). Esses RLs subtraem elétrons de outras moléculas, justificando o efeito deletério dos lipídios e proteínas. Novas moléculas de DNA não podem ser sintetizadas para substituir as danificadas (84). As EROS são encontradas em todos os sistemas biológicos que usam o oxigênio, que sofre redução tetravante com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O. Nesse processo, existe a utilização de 95 a 98% do oxigênio total do O_2 consumido pela célula e 2 a 5% é reduzido univalentemente, dando início à formação dos RLs: Superóxido (O_2^-), Radical hidroxila (OH), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (85). Esses são formados na mitocôndria, e a reatividade é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (Figura 8).

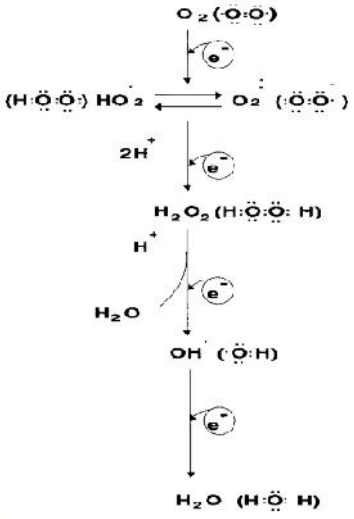

Figura 8–Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies de O_2 são formadas no processo.
Fonte: Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Ass Med Bras 1997; 43(1): 61-68 (85).

O óxido nítrico pode reagir com O_2^- formando Peroxinitrito (ONOO-). O ONOO- é um intermediário estável que pode se decompor em um poderoso oxidante, com reatividade similar ao radical hidroxila (OH) (86).

A presença de ferro na forma livre ou ligado ao grupamento heme de determinadas proteínas pode converter o O_2^- e H_2O_2, pela reação de Fenton, em radical hidroxila (OH), uma das espécies mais reativas que se conhece (Figura 9). Essa, quando produzida próximo ao DNA e a este estiver fixado um metal, poderá

gerar modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando a dano do DNA. Também pode iniciar oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (85).

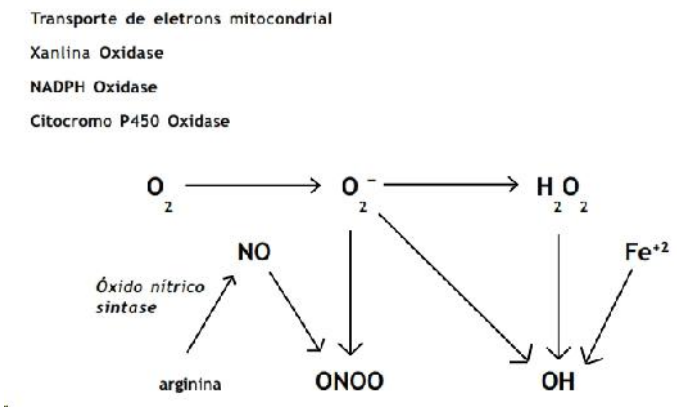

Figura 9 – Via de formação dos EROS.
Fonte: Essig DA, Nosek TM. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive species. Can J Appl Physiol 1997; 22(5): 409-428 (87).

O sistema de defesa antioxidante tem como objetivo proteger a ação deletéria das EROS, e é dividido em dois grandes grupos: sistema enzimático e não enzimático. O sistema enzimático é constituído por quatro enzimas principais: Glutationa (GSH), Glutationa Peroxidase (GPX), Glutationa Redutase (GR); Superóxido Dismutase (SOD); Catalase (CAT). Essas estão distribuídas tanto no citossol (aproximadamente 45%), quanto na mitocôndria (aproximadamente 55%). Os antioxidantes não enzimáticos constituem-se em um grande grupo, que é formado por vitaminas A, (alfa-tocoferol) E, (ascorbato) C e de forma importante a glutationa (GSH). As vitaminas A e E encontram-se inseridas na membrana, enquanto que a vitamina C é hidrossolúvel e atua no citossol (73, 75, 85).

O estresse oxidativo na DPOC induz a uma inflamação que perpetua o estresse oxidativo, formando um ciclo vicioso (Figura 10).

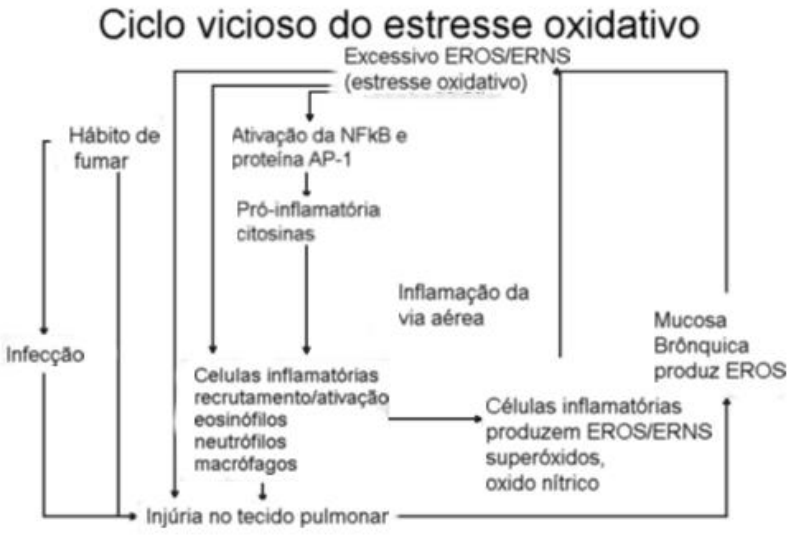

Figura 10 – Ciclo vicioso do estresse oxidativo
Fonte: Lee W, Thomas PS. Oxidative stress in COPD and its measurement through exhaled breath Condensate. Clinical and Translational Science 2009;2(2):150-155.(88)

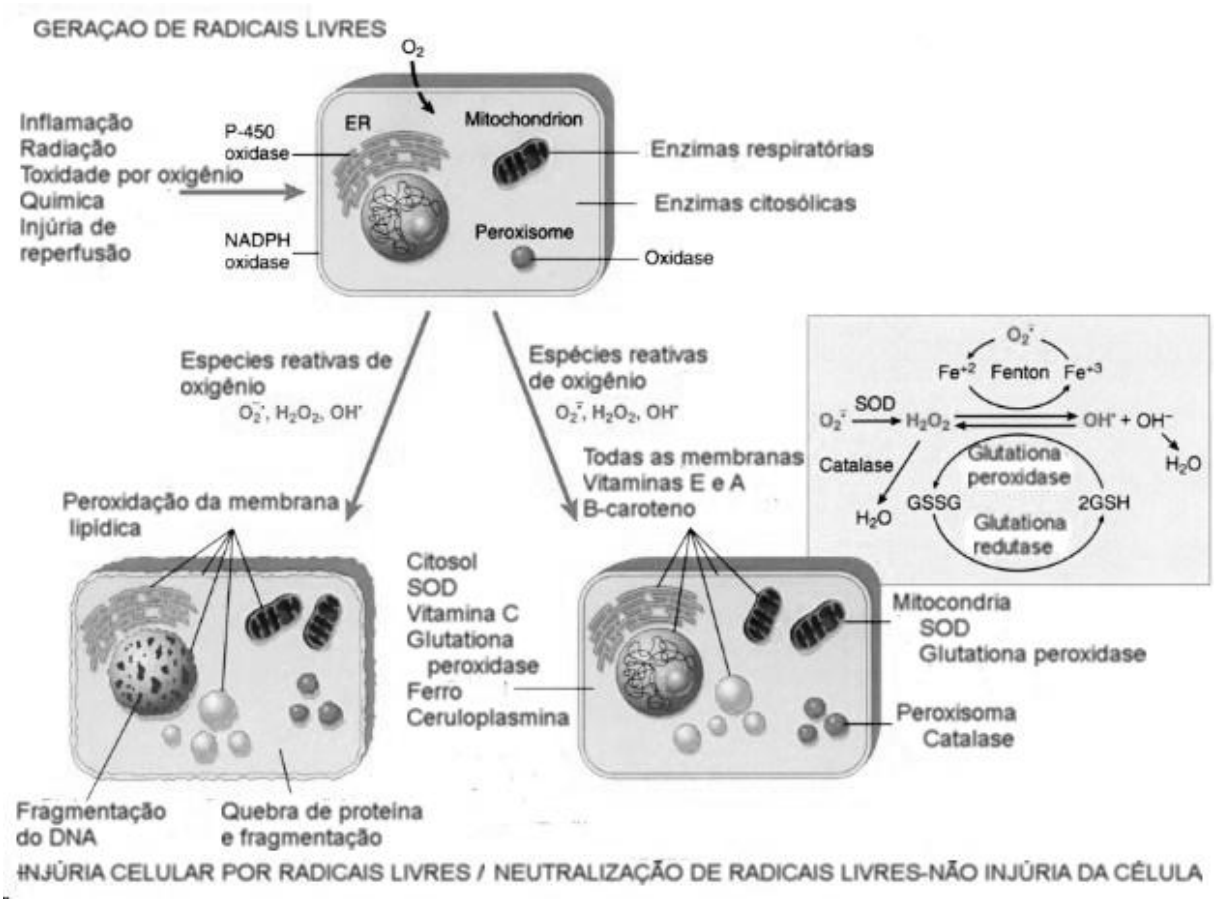

Figura 11 – Modelo da função desempenhada pelos radicais livres na célula (oxidantes/antioxidantes)
Fonte: Fausto *et al.*, 2005 (89)

Os RLs de maior importância biológica são os radicais superóxido (O_2^-), que são formados pela adição de um elétron ao oxigênio molecular, tornando-o altamente reativo (equação1), o radical Hidroxil (OH^-), formado principalmente pela

reação do peróxido de hidrogênio com metais de transição (equação 2) e o NO. Não-radicais derivados do oxigênio, assim como o ozônio e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são mais reativos que o oxigênio. A reação de RLs, por exemplo, através de derivados oxidantes, geram o H_2O_2, o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Figura 9) (equação 3) e o ácido hipocloroso (HOCl), que contribuem para o estresse oxidativo, devido ao fato de apresentarem ainda maior toxidade do que os RLs originais (84,90).

(1) $O_2 + e^- = O_2^-$

(2) $Fe^{2+} + H_2O_2 = Fe^{3+} + OH + OH^-$

(3) EROS $(O_2^-) \rightarrow NO + O_2^- \rightarrow ONOO$

Os neutrófilos e macrófagos eliminam agentes invasores (antígenos), e pertencem ao sistema imunológico. Assim, os neutrófilos, podem produzir O_2^- através do sistema da Nicotiamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida (NADPH) oxidase (equação 4) (91).

(4) $2O_2 + NADPH \xrightarrow{NADPH-Oxidase} 2O_2^- + NADP^+ + H^+$

O elaborado sistema de defesa antioxidante consiste em um composto de enzimas como: a SOD, que catalisa a dismutação do O_2^- e a formação de H_2O_2 (equação 5) (92), a Catalase (CAT), que converte H_2O_2 em água e O_2 (reação 6) (89, 93) e a Glutationa Peroxidase (GPX), que reduz principalmente H_2O_2 utilizando GSH como doador de elétrons, formando dissulfeto de Glutationa (GSSG) e duas moléculas de água (reação 7) (84, 91, 93) (Figura 11).

(5) $2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$

(6) $2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$

(7) $H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GP_X} GSSG + 2H_2O$

Os antioxidantes não enzimáticos, incluindo as vitaminas A, C e E, glutationa (GSH), ubiquinona e flavanóides (94), intra ou extracelulares, evitam a oxidação e servem como redutores de agentes antioxidantes que foram oxidados (95, 96). Esses podem ser alterados pelo estado nutricional, treinamento, envelhecimento e exercício físico (92).

A detecção direta das EROS em sistemas biológicos é difícil, devido as suas baixas concentrações e alta velocidade de reação. Os métodos para verificação da atividade das EROS ocorre de forma indireta, pela quantidade de enzimas aferidas nas técnicas capazes de detectar a SOD, CAT, GPX, GR e/ou GSH e GSSG e os substratos das reações (aldeídos-MDA), observados em tecidos, sangue e outros

fluidos. As dosagens de Glutationa Oxidada (GSSG) são verificadas pelo cálculo da razão GSSG/GSH, que representa o estado REDOX , considerado o equilíbrio entre o sistema de defesa oxidante e antioxidante, sendo esta uma forma para verificar um possível desequilíbrio entre os sistemas e provável estresse oxidativo (17, 85).

O estresse oxidativo está aumentado na DPOC comparado a pessoas normais, principalmente pelo aumento do H_2O_2 durante o exercício e, consequentemente, pelo aumento das EROS (19). As EROS alteram o remodelamento da matriz extracelular, apoptose, respiração mitocondrial, proliferação celular, manutenção do surfactante e defesa antiprotease (73), sendo esses fatores relacionados à patogênese da doença (97).

Quando a Glutationa Oxidada (GSSG) está aumentada e a Glutationa Reduzida (GSH) está diminuída, a relação das duas (GSSG/GSH) representa um estado de estresse oxidativo e quanto maior o valor dessa relação maior o estado do estresse (97).

O exercício físico vem sendo descrito como um indutor do estresse oxidativo (85, 98, 99, 100) e o treinamento pode ser capaz de aumentar a atividade dos agentes antioxidantes (endógeno e exógeno) (90). Um estudo avaliou o estresse oxidativo em pessoas treinadas e não treinadas em um mesmo tipo de exercício. Concluiu-se que os indivíduos treinados, quando comparados com os não treinados, possuem maior atividade antioxidante e, por consequência, menor estresse oxidativo (100).

Em um estudo que analisou indivíduos idosos ativos e sedentários, foi possível verificar que os indivíduos ativos possuem, após o exercício, maior estresse oxidativo pela técnica de verificação dos níveis de Malondialdeido (MDA), que é um produto da oxidação e Glutationa Peroxidase (GPX), que é um agente antioxidante. Também foi analisado o dano de DNA, pelo Teste Cometa, onde foi verificado que o dano existiu em ambos os grupos, porém sem diferença significativa. O fato de o estresse oxidativo ser maior nos ativos também pode estar relacionado à capacidade de realizar maior esforço e ao tipo de exercício, demonstrando que é importante o planejamento do treinamento (101).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar o estresse oxidativo e o dano de DNA induzido pelo teste de esforço máximo em pacientes com DPOC e controles.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar no teste de esforço máximo, pacientes com DPOC e os controles sem DPOC, pelo estresse oxidativo e o dano de DNA;
- avaliar a associação entre o estresse oxidativo e o dano de DNA pela gravidade espirométrica da DPOC;
- relacionar o estresse oxidativo e o dano de DNA com o pico de VO_2 e a distância percorrida no teste de caminhada de 6 minutos.

4. HIPÓTESES

Os portadores da DPOC apresentam maior estresse oxidativo e dano de DNA quando submetidos ao teste de esforço máximo, comparados aos indivíduos de mesma faixa etária sem a doença.

Existe correlação entre o pico de VO_2 , no exercício máximo, e o estresse oxidativo e o dano de DNA.

Existe correlação entre a distância obtida no teste de caminhada e o estresse oxidativo e o dano de DNA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GOLD, Global Initiative Obstruction Lung Disease, Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, updated 2011. Disponível em <http://www.goldcopd.com>Acesso em: 11 de setembro de 2011.

2. Lokke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P Vestbo J. Developing COPD: a25 year follow up study of the general population. Thorax 2006; 61(11):935-9.

3. O'Donnell DE. Hyperinflation, dyspnea, and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc 2006; 3: 180-84.

4. Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muino A, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the Platino study): a prevalence study. Lancet 2005; 366: 1875-81.

5. Regueiro EMG. et al. Análise da demanda metabólica e ventilatória durante a execução de Atividades de Vida Diária em indivíduos com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. Rev. Latino-am Enfermagem 2006; 14(1) 41-47.

6. Barreiro E, Puente LB, Minguella J, Coromina MJ, Serrano S,Hussan NAS, Gea J. Oxidative stress and respiratory muscule dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171:1116-24.

7. Jenkins, SC. 6-Minute walk test in patients with COPD: clinical applications in pulmonary rehabilitation. Physiotherapy 2007; 93: 175-182.

8. Pires, DLVA., et al. Efeitos do treinamento físico e muscular respiratório em pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) grave submetidos à BiPAP. Rev. Bras. Fisioter 2003; 9(7): 69-76.

9. O'Donnell DE, Laaveneziana P. Physiology and consequences of lung hyperinsuflation in COPD. Eu Respir Rer 2006; 15 (100): 61-67.

10. Agusti AG. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc 2005; 2(4):367-70

11. Marino, DM. et al. Teste de caminhada de seis minutos na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica com diferentes graus de obstrução. Rev Bras Med Esport 2007; 13(2) 103-106.

12. Cesar, MC. et al. Novos indicadores auxiliares no diagnóstico diferencial da limitação funcional cardiorrespiratória de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e insuficiência cardíaca congestiva. Arq Bras Cardiol 2003; 80(5): 521-525.

13. Guimarães, JI. Normatização de técnicas e equipamentos para realização de

exames em Ergometria e Ergoespirometria. Arq Bras Cardiol 2003; 80:458-464.

14. 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.

15. Hanneke AC. Six-minute walking-induced systemic inflammation and oxidative stress in muscle-wasted COPD patients. Chest; 2007; 131:439-445.

16. 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.

17. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G. Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A. Microsatellite DNA Instability in COPD. Chest 1999; 116; 47-51.

18. Bolognesi C, Lando C, Forni A, Landini E, Scarpato R, Migliore L, Bonassi S. Cromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequncy in peripheral blood lymphocytes. Age and Ageing 1999; 28:393-97.

19. Mercken ME, Hageman J, Schols MWJA, Akkermans AM, Nast A. Rehabilitation Decreases exercise-induces oxidative stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med 2005; 172:994-1001.

20. Barnes PJ. Immunology of asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Nat. Rev. Immunol 2008; 8: 183-192.

21. Figueiredo AB., et al. Exarcebação da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. Medicina 2010; 43(3): 223-230.

22. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica DPOC. J Bras Pneumol 2004; 30(Suppl 5):S1 S42.

23. Lopez AD. et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. The Lancet 2006; 367: 1747-1757.

24. Celli BR, Macnee W. Standars for diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. Eur Respir J 2004; 23(6): 932-946

25. Fletcher MJ et al. COPD Uncovered: an international survey on the impact of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [COPD] on a working age population. BMC Public Health 2011,11:612. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/11/612>. Acesso em: 9 jun 2012.

26. Halbert RJ. et al. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. Eur Respir J 2006; 28(3): 523-532.

27. Menezes AMB. et al. Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part II. Burden of chronic obstructive lung disease in Latin America: the PLATINO study. Int J Tuberc Lung Dis 2008; 12(7): 709–712.

28. DATASUS, Ministério da Saúde. Dados de morbidade hospitalar sobre DPOC ano 2008. Disponível em: < http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def > Acesso em: 16 out. 2011.)

29. DATASUS, Ministério da Saúde. Dados de morbidade hospitalar sobre DPOC ano 2011. Disponível em: < http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def > Acesso em: 16 out. 2011.

30. DATASUS, Ministério da Saúde. Dados de mortalidade enfisema pulmonar ano 1996. Disponível em: < http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def > Acesso em: 16 out. 2011.

31. DATASUS, Ministério da Saúde. Dados de mortalidade enfisema pulmonar ano 2009. Disponível em: < http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def > Acesso em: 16 out. 2011.

32. DATASUS, Ministério da Saúde. Dados de mortalidade bronquite crônica ano 1996. Disponível em: < http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def > Acesso em: 16 out. 2011.

33. DATASUS, Ministério da Saúde. Dados de mortalidade bronquite crônica ano 2009. Disponível em: < http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def > Acesso em: 16 out. 2011.)

34. Celli BR et al. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. Eur. Respir. J2004; 23: 932–946.

35. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med 2000; 343(4):269-80.

36. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. Lancet 2004; 56 (4): 515-548.

37. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. Eur J Pharmacol 2001; 429 (1-3): 195-207.

38. Dourado VZ, Tanni SE, Vale SA, Faganello MM, Sanchez FF, Godoy I. Manifestações sistêmicas na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. J Bras Pneumol 2006; 32(2): 161-171.

39. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A,Oxidant metabolism in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Eur Respir J 2003; 22: Suppl. 46, 14s–27s

40. Rodrigues SL,Viegas, CA de A,Lima T. Efetividade da reabilitação pulmonar como tratamento coadjuvante da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. J. Bras Pneumol 2002; 28(2) 65-70.

41. Cooper CB. The connection between Chronic Obstructive Pulmonary Disease symptoms and hyperinflation and its impact on exercise and function. Am J Med 2006;119(10 Suppl 1):21-31.

42. Koechlin C, Couilard A, Cristol JP, Chanez P, Hayot M, Le Gallaisz D, Préfaut D. Does systemic inflammation trigger local exercise-induced oxidative stress in COPD? Eur Respir J 2004; 23: 538-544.

43. Couillard A, Koechlin C, Cristol JP, Varray A, Prefaut C. Evidence of local exercise-induced systemic oxidative stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease patients. Eur Respir J 2002; 20: 1123-1129.

44. Moerloose et al. Shortterm cigarette smoke exposure enhances allergic airway inflamation in mice. Am J. Respir Crit Care Med 2005; 172:168-172.

45. Torres BS, Godoy I. Doenças tabaco-relacionadas. In: Diretrizes para a Cessação do tabagismo. J Bras Pneumol 2004; 30 (supl 2): S19-S29.

46. Fabbri LM, Luppi F, Beghé B, Rabe K. Update in Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2005. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173: 1056-1065.

47. Rahman I. Oxidative stress in pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: cellular and molecular mechanisms. Cell Biochem Biophys 2005; 43(1): 167-88.

48. Wouters EFM, Groenewwgen KH, Dentener MA, Vernooy JHJ. Systemic inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: the role of exacerbation. Proc Am Thorac Soc 2007; 4: 626-634.

49. Celli B, MacNee W. Standards for diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. Eur Respir J 2004; 23:1-15.

50. Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Visum K. Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate Chronic Obstructive Pulmonary Disease: a randomized controlled trial. Lancet 1999; 353: 1819-1823.

51. Celli B, Golstein R, Jardin J, Knobil K. Future perspective in COPD. Respir Med 2005; 99:S1-S48.

52. Mador MJ, Bozkanat E. Skeletal muscle dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Respir Rev 2001; 2:216-224.

53. Bernad S, Whittom F, Leblan P, Jobin J, Belleau R. Berube C, Carrier G, Maltais F. Aerobic and strenght training in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159: 896-901.

54. Dourado VZ, Godoy I. Recondicionamento muscular na DPOC: principais intervenções e novas tendências. Rev Bras Med do Esport 2004; 10(4): 331-334.

55. Cooper CB. Exercise in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: limitations and rehabilitation. Med Sci Sports 2001; 33: 643-646.

56. Kim HC, Mofarrahi M, Hussain SN. Skeletal muscle dysfunction in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2008; 3 (4): 637-58.

57. Malaguti C, Nery LE, Dal Corso S, Nápolis L, De Fuccio MB, Castro M, et al. Scaling skeletal muscle funcion to mass in patients with moderate-to severe COPD. Eur J Apysiol 2006; 98(5): 482-488.

58. Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, et al. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Thorax 2007; 62(2): 115-120.

59. Zainuldin R, Mackey MG, Alison JA. Optimal intensity and type of leg exercise training for people with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Cochrane Database Syst Rev. 2011 9;(11):CD008008.

60. Maestro PL. Exercise-based assessments in respiratory medicine ERS 2004; 175-180.

61. ATS/ERS – American Thoracic Society / European Respiratory Society statement on pulmonary rehabilitation. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173 (12): 1390-1413.

62. ACSM – American College of Sports Medicine. Prova de esforço e prescrição de exercício. 5° Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

63. Pitta F, Troosters T, Spruit MA, Decramer PM, Gosselink R. Characteristics of physical activities in daly life in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171(9): 972-977.

64. ZuWallack R. The nonpharmacologic treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: advances in our understanding of pulmonary rehabilitation. Proc Am Thorac Soc 2007; 4:549-553.

65. Palange P, Ward SA, Carlsen KH et al. Recomendações sobre o uso dos

testes de exercício na prática clínica. Rev Port Pneumol 2007; 13(4): 628-632.

66. Neder JA, Nery LE. Teste de exercício cardiopulmonar. J Pneumol 2002; 28 (3): S166-S206.

67. Herdy, AH,Uhlendorf, D. Valores de referência para o teste cardiopulmonar para homens e mulheres sedentários e ativos. Arq Bras Cardiol 2011; 96(1): 54-59.

68. American Thoracic Society. ATS Statement: Guidelines for the six-minute walk test. Am J Respir Crit Care Med 2002; 166: 111-117.

69. Marino DM, Marrara KT, Di Lorenzo VAP, Jamami M. Teste de caminhada de seis minutos na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica com diferentes graus de obstrução. Rev Bras Med Esporte 2007; 13(2): 103-106.

70. Rodrigues SL, Mendes HF, Viegas CAA. Teste de caminhada de seis minutos: estudo do efeito do aprendizado em portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. J Bras Pneumol 2004; 30(2): 121-125.

71. Morales-Blanhir, JE. et al. Teste de caminhada de seis minutos: uma ferramenta valiosa na avaliação do comprometimento pulmonar. J Bras Pneumol 2011; 37(1):110-117.

72. Neder JA.Teste da caminhada de seis minutos na doença respiratória crônica: Simples de realizar, nem sempre fácil de interpretar. J Bras Pneumol 2011; 37(1): 1-3.

73. Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussem H, Page CP, Postma D, Saetta M. Pulmonary biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Resp Crit Med 2006; 174: 6-14.

74. Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung disease. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 2003; 36(1): 95-109.

75. Ceylan E, Kocyigit A, Gencer M, Aksoy N, Selek S. Increased DNA damage in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease who had once smoke or been exposed to biomass. Respir Med 2006; 100(7): 1270-6.

76. Aoshiba K, Zhou F, Tsuji T, Nagai A. DNA damage as a molecular link in the pathogenesis of COPD in smokers. Eur Respir J. 2012;39(6):1368-76.

77. Tzortzaki EG, Dimakou K, Neofytou E, Tsikritsaki K, Samara K, Avgousti M, Amargianitakis V, Gousiou A, Menikou S, Siafakas NM. Oxidative DNA damage and somatic mutations: a link to the molecular pathogenesis of chronic inflammatory airway diseases.Chest 2012;141(5):1243-50.

78. 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.

79. Puente-Maestu L, Lázaro A, Tejedor A, Camaño S, Fuentes M, Cuervo M, Navarro BO, Agustí A.Effects of exercise on mitochondrial DNA content in skeletal muscle of patients with COPD. Thorax 2011;66(2):121-7.

80. Dusinska M, Collins A. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. Mutagenesis 2008, 23: 191–205.

81. Singh NP, Mccoy T, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988; 175: 184–92.

82. Asmus K. Free radical chemistry. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise Amsterdan: Elsevier; 2000.

83. Schneider C, Oliveira A. Radicais livres de oxigênio e exercício mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. Rev Bras Med Esporte. 2004;10:308-313.

84. Christopher M. Exercise-associated oxidative stress. Clinical techniques in equine practice 2003; 2:278-291.

85. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Ass Med Bras 1997; 43(1): 61-68.

86. Beckman JS, Beckman T, Freeman B. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci 1990; 87:1620-1624.

87. Essig DA, Nosek TM. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive species. Can J Appl Physiol 1997; 22(5): 409-428.

88. Lee W, Thomas PS. Oxidative stress in COPD and its measurement through exhaled breath Condensate. Clinical and Translational Science 2009; 2(2):150-155.

89. Fausto N, Kumar V, Abbas AK. Robbins & Cotran, Patologia: Bases patológicas das doenças. 7. ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

90. Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E. Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. Exerc Immunol Rev 1999; 5: 22-56.

91. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. Sports Med 2006; 36(4): 327-58.

92. Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidante vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. Sports Med 1996; 21(3):213-38.

93. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. Free Radic Res

Commun 190;9(1): 1-32.

94. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology 2003; 189(1-2):41-54.

95. Herrling T, Jung K, Fuchs J. Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. Spectrochim Acta A Mol Biomal Spectrosc 2006; 63(4): 840-5.

96. Kean RB, Spitsin SV, Mikheeva T, Scott GS, Hooper DC. The peroxynitrite scavenger uric acid prevents inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity. J Immunol. 2000; 165(11): 6511-8.

97. Leanderson P, Tagesson C. Cigarette tar promoters neutrophil-induced DNA damage in culture lung cells. Environ Res 1994; 64: 103-11.

98. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? Am J Clin Nutr 2000; 72 (2 Suppl): 637S-46S.

99. Mercken EM, Gosker HR, Rutten EP, Wouters EF, Bast A, Hageman GJ, Schols AM. Systemic and pulmonary oxidative stress after single-leg exercise in COPD. Chest 2009; 136:1291-1300.

100. Schneider CD, Barp J, Ribeiro JL, Bello-Klein A, Oliveira AR. Oxidative stress after three different intensities of running. Can J Appl Physiol 2005; 30(6): 723-34.

101. Mergener M, Martins MR, Antunes MV, Nakamoto H, Takahashi R, Yasuda K, et al. Oxidative stress and DNA damage in older adults that do exercises regularly. Clin Biochem 2009; 42 (16-17): 1648-53.

5. ARTIGO CIENTÍFICO LINGUA PORTUGUESA

ESTRESSE OXIDATIVO E DANO DE DNA EM SANGUE PERIFÉRICO PRÉ E PÓS TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO EM PACIENTES PORTADORES DE DPOC

OXIDATIVE STRESS AND DNA DAMAGE IN PERIPHERAL BLOOD BEFORE AND AFTER MAXIMAL EXERCISE STRESS TEST IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Dáversom Bordin Canterle[1,2], Maximiliano Isoppo Schaun[3], Karla Poersch[1], Roberta Passos Palazzo[5], Ivy Reichert[2], Alvaro Reischak de Oliveira[3], Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.[3], Danilo Cortozi Berton[1,5], Sharbel Weidner Maluf[5], Paulo José Zimermann Teixeira[1,2,4]

[1] Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, RS, Brasil.
[2] Universidade Feevale – Instituto de Ciências da Saúde, Novo Hamburgo, RS, Brasil.
[3] Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Laboratório de Pesquisa do Exercício (Lapex) e Fisiologia, Porto Alegre, RS, Brasil.
[4] Fundação Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre – Pavilhão Pereira Filho - Santa Casa de Porto Alegre, RS, Brasil.
[5] Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo

Introdução: A DPOC caracteriza-se pela obstrução do fluxo aéreo e pela inflamação crônica, demonstrando manifestações sistêmicas que repercutem com a diminuição da capacidade de exercício e a piora da qualidade de vida. As alterações do metabolismo celular e molecular, assim como as respostas de defesa e reparo celular estão associadas à gênese da DPOC e pioram com o exercício. **Objetivo**: O objetivo foi avaliar nos pacientes com DPOC e controles o estresse oxidativo e o dano de DNA pré e pós teste de ergoespirometria e correlacionar com o pico da VO_2. **Métodos**: Estudo antes e depois, controlado com análise de indivíduos com DPOC (n=27) e controles sem DPOC (n=15), de ambos os sexos, com idade média de 62 anos, que realizaram o teste de ergoespirometria e coletaram amostras de sangue antes e depois. Foi analisado o estresse oxidativo pela Lipoperoxidação lipídica e o sistema glutationa; e o dano de DNA pelo Teste Cometa. **Resultados**: No estresse oxidativo (GSH, GSSG, GSSG/GSH, Lipoperoxidação) e o dano de DNA (células com dano) pré e pós exercício máximo em indivíduos com DPOC e controles saudáveis foram: [GSH (DPOC: 1413 ± 927 vs. 1213 ± 575; p=0,469); (Controle: 2271 ± 951 vs. 2050 ± 871; p=0,120)]; [GSSG (DPOC: 393 ± 135 vs. 530 ± 223; p=0,001); (Controle: 448.72 ± 131 vs. 444.16 ± 103; p=0,897)]; [GSSG/GSH (DPOC: 0,39 ± 0,27 vs. 0,55 ± 0,45; p=0,005); (Controle: 0,24 ± 0,17 vs. 0,27 ± 0,17; p=0,156)]; [Lipoperoxidação (DPOC: 1,34 ± 0,23 vs. 1,41 ± 0,29; p=0,155); (Controle: 1,38 ± 0,18 vs. 1,43 ± 0,32; p=0,431)]; [células com dano (DPOC: 23± 50,3 vs. 29± 56.6; p=0,005); (Controle: 7,33 ± 5 vs. 16,2 ± 4; p=0,035)]. Quando comparados os DPOC com controles, foi possível observar o resultado significativo entre GSSG (p=0,01) e dano de DNA (p=0,035). **Conclusão**: O estresse oxidativo e o dano de DNA modificam-se de forma significativa depois do exercício máximo em pacientes com DPOC, porém, nos controles, a diferença foi significativa apenas com o dano de DNA. Houve correlação significativa entre o pico do VO_2 com o estresse oxidativo e o dano de DNA, demonstrando que quanto menor a capacidade aeróbica maior o estresse oxidativo e o dano de DNA em pacientes com DPOC.

Palavras-chave: DNA. DPOC. Estresse oxidativo. Exercício.

Introdução

A DPOC, sendo uma doença inflamatória crônica com repercussões sistêmicas, estimula a produção de mediadores inflamatórios, que estimulam o estresse oxidativo e, consequentemente, o dano de DNA (1,2). O poder antioxidante da GSH protege o sistema pulmonar. No momento em que ocorre o desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção da Glutationa Oxidada (GSSG), caracteriza-se o estresse oxidativo, cuja magnitude pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH, resultando em potencial dano celular. O aumento do estresse oxidativo em pacientes portadores da DPOC ocorre pelo desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. O aumento dos oxidantes está associado ao aumento de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), que são liberadas pelas células inflamatórias recrutadas no parênquima pulmonar (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócito T citotóxico). Os mediadores inflamatórios, tais como: citocinas e fatores de crescimento, determinam um efeito nocivo, incluindo dano nos lipídios, proteínas, no DNA e destruição do parênquima pulmonar (1, 2).

A doença apresenta sinais e sintomas característicos. Entre eles, menciona-se a dispneia, a limitação aos exercícios, decorrente da obstrução das vias aéreas e consequente hiperinsuflação, o que diminui as atividades da vida diária e piora a qualidade de vida (3).

Os exercícios físicos na reabilitação pulmonar desempenham papel importante no tratamento da doença, uma vez que, depois de deteriorada, a função respiratória modifica-se parcialmente com o tratamento medicamentoso (3). No entanto, ao exercitar-se, o paciente com DPOC estimula a melhor captação de oxigênio pelo músculo periférico, melhorando o VO_2 no pico de exercício, diminuindo o estresse oxidativo e o dano de DNA após a realização de testes máximos e submáximos, provocando, assim, a melhora da capacidade para realizar os exercícios (4). Sabe-se que os exercícios podem ter repercussões negativas, quando o treinamento não adequadamente realizado, conforme pode ser observado em estudos que demonstram que exercícios em pessoas sem doença, assim como com doença respiratória, podem aumentar o estresse oxidativo e o dano de DNA (5).

Assim, o estudo objetiva analisar, através do exercício máximo em esteira ergométrica, o estresse oxidativo e o dano de DNA e correlacioná-lo com o pico do

VO_2 e a distância do teste de caminhada de seis minutos.

Materiais e métodos

Delineamento

No estudo, antes e depois, controlado, foram selecionados 54 pacientes e fizeram parte da amostra 42 colaboradores, de ambos os sexos, com idade média de 62 anos. Eles realizaram o teste de esforço máximo,. Foram analisados 27 indivíduos ex-fumantes com DPOC estável, selecionados pré-realização de programa de reabilitação pulmonar, com volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) / capacidade vital forçada (CVF) <70%, com uma longa história de tabagismo (> 20 maços/ano) e 15 indivíduos, sem a DPOC, selecionados em grupo de terceira idade, não fumantes, utilizados como controles.

Foram excluídos indivíduos com DPOC que antes da realização do teste de ergoespirometria exacerbaram. Eles tiveram terapia por oxigênio em longo prazo, ou saturação de oxigênio < 88% em repouso, tratamento com corticoides orais e anti-histamínicos, ou outra doença que pudesse causar limitação ao exercício, assim como, todos que não aceitaram participar do estudo. Os controles sem a DPOC, que tinham doença interferindo no exercício ou a dificuldade em se adaptar à máscara facial do teste, foram excluídos.

Dois controles que não entraram na amostra foram perdidos por não apresentarem as características de inclusão e não conseguirem realizar o teste de espirometria. Nas amostras dos pacientes com DPOC, foram perdidos três pacientes por problemas técnicos da Técnica Cometa e sete pacientes por problemas de conservação das amostras do estresse oxidativo. Para a análise, foi coletado sangue na veia cubital anterior, por profissional habilitado, em um total de 8ml, dividido em dois frascos de 4ml heparinizados, antes e depois do teste de exercício.

As amostras para o estresse oxidativo foram conservadas refrigeradas por, no máximo, 40 minutos, até a sua centrifugação e colocação dos reagentes. Logo após, as amostras foram separadas e conservadas em freezer -80°C até o momento da análise. As amostras para a verificação do estresse oxidativo, sistema glutationa, foram analisadas (nas células de eritrócitos e a lipoperoxidação lipídica pelo teste xilenol laranja observado com amostras do plasma. Para a análise do dano de DNA,

o sangue manteve-se refrigerado por, no máximo, 2 horas, após utilizou-se o Teste Cometa, sendo analisados os linfócitos, conforme descrição a seguir.

Os procedimentos do estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e obedeceram a resolução do Conselho Nacional de Saúde, 196/1996, para pesquisas envolvendo seres humanos. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Procedimentos

Teste de Função Pulmonar

Espirometria foi realizada conforme critérios da *American Thoracic Society* (ATS), dos controles saudáveis com Espirômetro Portátil da marca Micro Medical, modelo MicroLab 3500 e para os pacientes com DPOC os resultados foram obtidos através de um sistema computadorizado (Jaeger, Alemanha), conforme recomendado pela ATS, expressos em valores absolutos e % do previsto. A capacidade de difusão pulmonar de monóxido de carbono (DLCO) foi medida por técnica de respiração única, e os volumes estáticos obtidos por pletismografia de corpo inteiro. Os valores observados foram comparados com os padrões brasileiros (6).

Teste de Caminhada

O teste foi realizado de acordo com os critérios definidos pela ATS (7). Os pacientes foram orientados a andar em seu ritmo mais rápido e a percorrer a maior distância possível durante 6 minutos, sob a supervisão de um fisioterapeuta. Os pacientes foram autorizados a parar e a descansar, se necessário, mas eram encorajados a prosseguir com a caminhada após a recuperação. A distância percorrida, SpO_2, FC foi registrada, e os pacientes classificaram sua falta de ar e fadiga de membros inferiores, usando a escala de Borg 0-10 ao final do teste.

Teste de Ergoespirometria

O Teste de Ergoespirometria foi realizado por um médico, obedecendo aos critérios estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia e Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (8, 9).

Os testes foram realizados sem esteira ergométrica (Inbramed® KT 10200). O consumo de oxigênio (VO_2mL/min); ventilação minuto (VE, L/min) e consumo de gás carbônico (VCO_2 mL/min) foram mensurados através de um analisador de gases computadorizado (MedGraphics Cardiorespiratory Diagnostic Systems, modelo CPX-D) e registrados a cada 15 segundos. A Frequência Cardíaca (FC, bpm) foi determinada a partir do intervalo RR do eletrocardiograma de 12 derivações e a Saturação Periférica de Oxigênio (SpO_2) por oximetria de pulso com o sensor colocado no terceiro dedo da mão esquerda. Foi utilizada máscara facial conectada ao sensor de fluxo (pneumotacômetro). A pressão arterial, a dispneia e a fadiga de membros inferiores (MsIs) dos indivíduos foi avaliada usando a escala de Borg 0-10 ao final do exercício. Durante o teste de ergoespirometria incremental para pacientes com DPOC, a velocidade foi aumentada em uma taxa constante (0,5-0,8 Km/h), após 2 minutos de caminhada leve (1,2 km /h) e grau de inclinação 2%, até o limite de tolerância do paciente.

O protocolo da esteira para os controles saudáveis começou com dois minutos de aquecimento, posteriormente, com aumento progressivo da velocidade a cada minuto de 0,5-1 km/h, até atingir 6 minutos e 6 km/h. Assim, mantinha-se a velocidade e iniciava-se a inclinação de 2% a cada minuto até o limite de tolerância do paciente.

Dano de DNA

Foram verificados os danos de DNA nos pacientes com DPOC e nos controles pelo mesmo avaliador e com a mesma metodologia do Teste Cometa.

O Teste Cometa foi realizado com a preparação das lâminas, colocando e adicionando 300ml de uma solução de agarose 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 à 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 se solidificasse. Na sequência, a

lamínula foi cuidadosamente retirada e a lâmina mergulhada em 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 coradas pela prata (10). Para a avaliação dos danos do DNA, 100 células por indivíduo foram analisadas pelo pesquisador 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. Consequentemente, a contagem total por indivíduo variou de 0 (nenhum dano) a 400 (dano máximo).

Estresse Oxidativo

Sistema Glutationa

Relação GSSG/GSH: as quantidades de glutationa reduzida (GSH) e dissulfeto de glutationa oxidada (GSSG) intracelulares, bem como a relação entre as concentrações desses dois metabólitos fornecem o índice do estado redox intracelular (11). Por isso, foram realizadas medidas de GSH e GSSG, nos eritrócitos obtidos do sangue periférico dos indivíduos com DPOC e saudáveis, sem doença, antes e depois da realização do teste de ergoespirometria. Para essas determinações, foi utilizada uma técnica adaptada (12), para determinação em leitora de microplacas a 415 nm. Eritrócitos coletados de amostras de sangue periférico foram imediatamente rompidos em 4 volumes de ácido metafosfórico a 5% (m/v), para análise cinético-espectrofotométrica pelo método de reciclagem com o

ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) e GSSG redutase (GR) (13). A acidificação previne a auto-oxidação da GSH, que ocorre rapidamente em pH superior a 7,0 (13, 14, 15).

Primeiramente, foi determinado o conteúdo de glutationa "total" (GSH+GSSG), medido em equivalentes de GSH pelo método da reciclagem com DTNB, que leva à oxidação estequiométrica da GSH em GSSG com formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e posterior restituição da GSH pela redução altamente específica com GSSG redutase (GR, EC 1.6.4.2) na presença de NADPH. A taxa de formação de TNB, proporcional à soma inicial de GSH e GSSG, foi, então, monitorada a 412nm ($£_{TNB}$= 13,6 $mM^{-1}.cm^{-1}$). Inicialmente, foram adicionados 10µL de amostra (em MPA 5%), 75µL de DTNB 14,1 mM em tampão fosfato de sódio 143mM (pH 7,5) e 10µL de NADPH 1,7 mM em $NaHCO_3$ 0,5%. A reação tem início com a adição de 10µL de GR. Sob agitação, as amostras foram analisadas espectrofotometricamente a 415nm, por cerca de 3min em um volume final de 105 µL em microplacas de 96 wells a 37°C, em leitora termostatizada (Bio-Rad modelo Benchmark, USA) com aquisição direta e processamento cinético automático. Para determinação do conteúdo de GSSG, alíquotas de 100 µL das mesmas amostras ensaiadas para GSH "total" foram retiradas para conjugação da GSH presente com N-etilmaleimida (NEM, Fluka) (12). Adicionou-se, então, 35 µL de NEM 200mM diretamente às amostras dissolvidas em MPA5%. Imediatamente após, a mistura foi neutralizada cuidadosamente sob agitação, até pH 5,5 pela adição de 20 µL de KOH 2M em tampão de ácido piperazina-N, N'-bis-(etanossulfônico) (PIPES, Boehringer, pKa=6,8 a 25°C, faixa de trabalho de 6,1 a 7,5) 0,3m. A retirada do excesso de NEM, que, em concentrações tão baixas quanto 10 µL, inibe o processo de dosagem da GSSG por reciclagem em até 30%, foi efetuada por lavagem com 500 µL de acetato de etila 3 vezes, sendo que o excesso de solvente foi evaporado em concentrador tipo SpeedVac (UNIEQUIPO) e por passagem em corrente de nitrogênio. Posteriormente, cerca de 10 µL de amostra foram ensaiados pelo método de reciclagem, como descrito para a GSH. A diferença entre os valores obtidos para glutationa "total"e GSSG fornece os valores dos conteúdos de GSH procurados:

[GSH]= GSH total -2[GSSG]

Lipoperoxidação (Xilenol Laranja)

A oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} na presença de lipoperóxidos e formação de complexos de Fe^{3+} com xilenol laranja (Xylenol orange, XO) foi mensurada, segundo a técnica descrita originalmente por Jiang ZY, et al.(1991) (14) e adaptada para plasma e soro por Arab K & Steghens JP (2004) (15). O plasma foi armazenado imediatamente após ter sido adicionado hidroxibutiltolueno (BHT) em uma concentração final de 4mM. As amostras foram colocadas imediatamente em gelo, a fim de evitar a ocorrência de interferentes. As amostras de plasma foram dosadas diretamente, após a determinação da concentração de proteínas. Foram realizadas diluições seriadas para a correta análise dos ensaios. O reagente de trabalho (RT-XO) para o ensaio foi composto por MeOH (metanol) 90% (v/v), Xilenol laranja (2mM, ácido o-cresolsulfonoftaleína-3,3'-bis-metilimino-diacético, sal tetrassódico), ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1M. BHT40mM, e $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6\ H_2O$ (sulfato ferroso amoniacal) 10mM. As amostras foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após esse período, 10 µL de amostra foram pipetadas em placas com 96wells com o reagente de trabalho (90µL). A placa foi incubada por mais 30 minutos a temperatura ambiente. Para o branco, utilizou-se o RX-XO. A seguir, foi realizada a leitura a 570nm, em ELISA.

Análise Estatística

O teste Kolmogorov-Smirnov (KS) foi utilizado para testar a normalidade das variáveis em estudo. Para a comparação das variáveis GSH, GSSG, Lipoperoxidação, pré e pós-teste de ergoespirometria, utilizou-se o teste paramétrico, t de Student para amostras dependentes. Na comparação do estresse oxidativo e o dano de DNA entre a classificação espirométrica da doença pela obstrução dos pacientes com DPOC, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. As variáveis GSSG/GSH e dano de DNA apresentaram sua distribuição anormal, sendo utilizado para comparar os resultados pré e pós teste de ergoespirometria, o teste não paramétrico Wilcoxon. Na correlação das variáveis do estresse oxidativo e do dano de DNA com as variáveis ergoespirométricas, utilizou-se o teste não paramétrico de Spearman. Para a análise, foi utilizado o programa estatístico SPSS, versão 18,0, considerando o nível de significância de $p \leq 0,05$.

Resultados

A caracterização da amostra (Tabela 2) foi composta de 43 pacientes, divididos em grupos com DPOC [27, 15 (55,5%) Homens e 12 (44,5%) Mulheres] e Controles [15, 2 (13%) Homens e 13 (86%) Mulheres]. Os valores médios obtidos em pacientes com DPOC e controles foram, respectivamente, para idade a (63 ± 8 vs. 61 ± 7; p=0,15) e IMC (24 ± 4 vs. 26 ± 4; p=0,05). Os valores de $VEF_{1,}$ CVF, VEF_1/CVF, Pico de $VO_{2,}$ FC Max no teste de ergoespirometria e a distância obtida em metros pelo TC6 estão descritos na Tabela 2 e demonstram diferenças significativas, quando comparados com indivíduos com DPOC e controles saudáveis ($p \leq 0.001$).

Os pacientes com DPOC foram classificados pela espirometria em quatro estágios de gravidade pelo VEF_1 (Estágio-1, 2, 3, 4): 1- 1 paciente (3,7%); 2 - 4 pacientes (14.8%); 3 – 13 (48,2%) e 4 - 9 (33,3%). A análise do dano de DNA (células lesadas) e do estresse oxidativo (GSH, GSSG, GSSG/GSH, Lipoperoxidação) demonstrou que existe diferença significativa entre os diferentes estágios da doença no estresse oxidativo para os valores de GSH (p=0,045), e tendência no dano de DNA (p=0,06).

Tabela 2

Na análise pré-teste de exercício, foi possível observar que os pacientes com DPOC apresentavam um dano de DNA significativamente maior do que os controles saudáveis. Quando analisados os danos de DNA pós-testes, ambos, pacientes com DPOC e controles, aumentaram o dano de maneira significativa, porém os portadores da DPOC mantinham níveis significativamente maiores de dano (DPOC pré 23 ± 50 vs. pós 29 ± 56; p=0,005); (Controle: pré 7,33 ± 5 vs. pós 16,2 ± 4; p=0,035)]. Quando avaliado o estresse oxidativo através da medida da glutationa oxidada (GSSG), esta foi significativamente maior nos pacientes com DPOC após o teste de exercício, não sendo observada esta alteração nos controles (DPOC: pré 393 ± 135 vs. pós 530 ± 223; p=0,001); (Controle: pré 448,72 ± 131 vs. pós 444,16 ± 103; p=0,897). No entanto, a comparação pós-teste dos pacientes com DPOC e controles demonstrou que os pacientes com DPOC apresentam maiores valores de

GSSG do que os controles. A análise da relação glutationa reduzida/oxidada, outro marcador de maior estresse oxidativo, era maior nos pacientes com DPOC pré-teste, aumentando de maneira significativa pós-teste, o que não foi observado nos controles (DPOC: 0,39± 0,27vs. 0,55 ± 0,45; p=0,005; Controle: 0,24 ± 0,17 vs. 0,27 ± 0,17; p=0,156). A comparação entre os indivíduos com DPOC e controles saudáveis pela medida da lipoperoxidação lipídica não foi significativa, porém ocorreu aumento dos valores em ambos os grupos após o teste de exercício (Tabela 3).

Tabela 3

Analisando a Tabela 4, foi possível verificar nos pacientes com DPOC uma correlação moderada negativa e significativa do dano de DNA com o VO_2 de pico (r=-0,38; p=0,03), indicando que quanto maior o consumo de oxigênio menor foi o dano de DNA. Da mesma maneira, observou-se uma correlação moderada negativa e significativa do GSH (r= -0,51; p=0,007), do GSSG (r= -0,44; p=0,02) e da lipoperoxidação (r= -0,47; p=0,01) com o VO_2 de pico, indicando que quanto maior o consumo de oxigênio, menor é o estresse oxidativo (Figura1). Também foi possível observar que quanto maior o VEF_1 e a DLCO, menor o estresse oxidativo, pois apresentavam correlações negativas significativas, mas correlações positivas significativas com o volume residual (r=0,56; p=0,004) e a percepção da dispneia pela escala de Borg (r=0,61; p=0,002) e também Borg para membros inferiores (r=0,44; p=0,03). Para a distância obtida no TC6, não foi possível verificar correlação significativa com o estresse oxidativo e o dano de DNA.

Uma correlação moderada e negativa do GSSG com VEF_1 (r=-0,38, p=0,04) indica que a elevação da GSSG demonstra desequilíbrio do estado REDOX. Em outras palavras, quanto maior o grau de obstrução do fluxo aéreo maior é o estresse oxidativo no exercício.

Figura 12

Tabela 4

Discussão

No presente estudo, foi possível verificar que os pacientes com DPOC, quando comparados com os controles sem DPOC, possuem o VO_2 de pico menor com, maior produção de EROS, pelo consumo de GSH catalisada pela enzima GPX para detoxificação das EROS e produção de GSSG, estresse oxidativo pela lipoperoxidação e maior dano de DNA pré e pós-teste de exercício máximo. Além disso, foi possível observar uma correlação negativa moderada e significativa do aumento de EROS pela detoxificação de H_2O_2 na produção de GSSG e do dano de DNA com o VO_2 de pico, demonstrando que quanto maior o VO_2 menor é a liberação de EROS e possível estresse oxidativo. Este maior estresse oxidativo e maior dano de DNA encontrados na DPOC são também secundários ao sedentarismo e à redução da capacidade física (16), que interfere no metabolismo oxidativo muscular (17) e na função da respiração mitocondrial, também contribuindo para a disfunção muscular em pacientes com hipóxia tecidual (18). Assim, o condicionamento físico realizado na reabilitação pulmonar para pacientes com DPOC ou o treinamento físico para indivíduos saudáveis, proporciona a diminuição das espécies reativas de oxigênio e, consequentemente, a diminuição do dano de DNA (19,20). Nossos resultados permitem inferir que quanto maior o condicionamento físico menor será o estresse durante o exercício.

No estudo de Mercken et al. (2005) (19), que avaliou o exercício máximo e submáximo em bicicleta ergométrica, antes e depois da reabilitação pulmonar, analisando o estresse oxidativo e o dano de DNA, foi possível observar alterações nestas variáveis semelhantes as observadas em nosso estudo. No entanto, não utilizamos a bicicleta ergométrica, mas a esteira, que identifica respostas mais fisiológicas, uma vez que a caminhada representa parte importante para as atividades de vida diária e, caminhar mais mantém a independência associada à qualidade de vida nos pacientes com DPOC (21). Também deve ser ressaltado que utilizamos métodos diferentes para analisar o estresse oxidativo. O sangue, que manifesta as alterações sistêmicas, foi avaliado por duas células: os eritrócitos (sistema glutationa - medida que garante aferição indireta do estresse oxidativo, demonstrando maior produção de EROS, através do sistema antioxidante mais importante e a lipoperoxidação plasmática, medida direta de danos a lipídeos pela produção de espécies reativas de oxigênio) e os linfócitos (Teste Cometa para

avaliar o dano de DNA). Ainda no estudo de Mercken, a análise foi realizada com a identificação do malondialdeído (MDA) no plasma e na urina, porém esta técnica, apesar de ser muito utilizada, é pouco específica e, segundo o estudo de Jiang (14, 15), parece subestimar a peroxidação lipídica comparada com a técnica do xilenol laranja. Importante ressaltar que, para identificação do estresse oxidativo em nosso estudo, utilizamos o teste xilenol laranja, que identifica de forma mais sensível o resíduo da oxidação da membrana lipídica das células (lipoperoxidação lipídica), indicando o estresse oxidativo.

Sobre os marcadores de estresse oxidativo, segundo alguns estudos, eles podem ser observados por diferentes técnicas, umas mais sensíveis e outras mais específicas. A técnica utilizada por nosso estudo, o xilenol laranja, apresenta especificidade para identificação das modificações celulares por oxidação de lipídios durante o exercício, superior às dosagens de MDA pela técnica de TBARS, que é mais sensível, demonstrando resíduos que podem não representar o oxidação da membrana lipídica (15). Outras técnicas, por sua vez, são mais sensíveis e específicas, como por exemplo, a medida de 8-isoprostanos plasmáticos. Essa aferição torna-se inviável pelo custo, considerando que não traz um grande diferencial aos resultados encontrados da lipoperoxidação e pela pequena quantidade encontrada no plasma.

Um estudo comparou as técnicas que avaliam a lipoperoxidação de formas diferentes, por TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e por HPLC (Cromatografia líquida de alta precisão), comparadas em pacientes com DPOC, assim como, pessoas sem DPOC. Os resultados demonstram que essa técnica HPLC apresenta na DPOC preferência por segurança, especificidade e reprodutibilidade, mesmo sendo um equipamento de valor elevado para alguns laboratórios (22).

Não utilizamos a dosagem de MDA por HPLC, porém encontramos resultados após o exercício com Xilenol Laranja, que são comparados às demais técnicas na verificação da oxidação de lipídios. Essa técnica é simples e de baixo custo, se comparada com as demais técnicas. A análise do estado REDOX, do estresse oxidativo e do dano de DNA complementam-se na avaliação dos lesões nas membranas celulares. Já que, a alteração do estado REDOX pode levar ao estresse oxidativo, que por sua vez, pode causar dano.

Interessante evidenciar que existe uma correlação inversa entre a GSH e o VEF_1 e a DLCO, semelhante ao VO_2 de pico. Isso significa que, à medida que piora a obstrução do fluxo aéreo e a difusão, maiores são os valores do GSH, indicando que existe um desbalanço na conversão da GSH em GPX, para detoxificação de H_2O_2. Assim, é possível verificar que os pacientes com DPOC com pior grau funcional têm maior produção de EROS e, por isso, o aumento de GSH, que é um substrato antioxidante. Por outro lado, à medida que o volume residual aumenta, indicando maior hiperinsuflação no repouso, maior são os valores da GSH, denotando também maior produção de EROS e, consequente, estresse oxidativo.

Ao analisarmos o desbalanço do estado REDOX, através do sistema glutationa pela relação da glutationa oxidada pela glutationa reduzida (GSSG/GSH), observamos que pacientes com DPOC possuem maior estresse oxidativo, pela lipoperoxidação, em repouso e após o exercício, quando comparado com indivíduos saudáveis (23). O estudo de Goldfarb AH et al. (2005) (24) analisou as dosagens no sangue de GSH total, GSH reduzida, GSSG oxidada, MDA e carbonilas de 18 mulheres saudáveis não treinadas, que realizaram exercício excêntrico de cotovelo, sendo 9 com suplementação e 9 com placebo. Constatamos, no exercício excêntrico, achados de estresse oxidativo e do desbalanço do sistema antioxidante, semelhantes aos encontrados em nosso estudo após o exercício, além de redução do estresse oxidativo pela suplementação.

Para outro estudo, realizado com 15 indivíduos jovens saudáveis que realizaram exercício em bicicleta ergométrica, foi analisado o sistema glutationa, observando exercícios aeróbicos com resultados equivalentes de oxidação da GSH pelos EROS gerado no exercício, aumentando os valores de GSSG e a relação GSSG/GSH (25). O exercício intenso pode reduzir os valores GSH e aumentar os valores de GSSG, demonstrando que existe maior produção de EROS e a conversão da glutationa reduzida para oxidada, reduzindo, posteriormente, de novo a glutationa, um mecanismo que representa o equilíbrio dos antioxidantes para inativação dos EROS que podem gerar danos. Verificamos a mesma redução da glutationa reduzida após o exercício (Tabela 3) (26), indicando que o sistema teve produção de EROS e a glutationa reduzida (GSH) foi convertida em glutationa oxidada (GSSG) e consequente detoxificação do H_2O_2.

Um trabalho realizado por Mercken et al. (2009) (27) analisou o estresse oxidativo sistêmico e pulmonar após o exercício. Em tal estudo, observou-se que a

relação GSSG/GSH está aumentada em pacientes com DPOC comparado com os controles, concluindo que existe um aumento do estresse oxidativo pulmonar e sistêmico na DPOC, sem que se possa concluir sobre a evidência de que o exercício possa aumentar a inflamação sistêmica.

Observamos em nosso estudo resultados que corroboram os encontrados, devido à alteração do potencial REDOX (GSSG/GSH), que controla os radicais livres formados no exercício intenso (Tabela 3). O exercício realizado com intensidade moderada, sob forma de treinamento, é capaz de modular a inflamação e diminuir a atividade dos monócitos e macrófagos, assim como o NF-kB, que é também, um mediador da resposta inflamatória (28). Essa evidência confirma a importância do exercício na DPOC, já que ela também é uma doença inflamatória. A inflamação está ligada ao aumento das EROS, mas o exercício não aumenta a inflamação, mas as EROS que aumentam o estresse oxidativo, com resultados semelhantes àqueles encontrados por Mercken et al (2009) (27).

O exercício máximo é capaz de gerar as alterações, porém estudos que relacionam o exercício submáximo, como o TC6, podem não induzir o dano de DNA, devido a esse produzir menos lactato pelo músculo e menor frequência cardíaca máxima no final, quando comparado com teste máximo (29) e, consequentemente, menor quantidade de espécies reativas de oxigênio. Já o exercício realizado acima de 80% do VO_2 máximo predito causa lipoperoxidação significativa e um possível dano de DNA (30). Em nossa pesquisa, não houve correlação do dano de DNA e o estresse oxidativo, com a distância obtida no teste de caminhada de seis minutos em pacientes com a DPOC, talvez pelas características fisiológicas obtidas no teste, que geram menos EROS. Na avaliação da percepção do esforço foi possível verificar que quanto maior a percepção menor é o estresse. Isso pode ocorrer devido a maior capacidade de exercício dos indivíduos, que expõem os mecanismos de adaptação da DPOC ao exercício, aumentando a capacidade antioxidante, hiperinsulflando no exercício máximo, parando mais provavelmente por disfunção ventilatória do que muscular, fazendo não interagir estresse, dano e reparo, celular e tecidual (31, 32).

O exercício máximo realizado em esteira ergométrica em pessoas saudáveis induz o dano de DNA e o estresse oxidativo. Esse resultado também foi encontrado em nosso estudo (31,32), assim como, em indivíduos com DPOC (2, 4, 33). Outro estudo recente que analisa quebra da dupla fita do DNA por técnica diferente da

observada pelo Teste Cometa, que foi utilizado em nosso estudo, interpreta a quebra por histonas 2AX fosforiladas (yH2AX) e ATM (Ataxia Telangiectasia Mutado) fosforilado e substrato fosforilado da proteína-1 de construção p53. Esta pesquisa teve como objetivo identificar a diferença da quebra do DNA entre a DPOC, fumantes assintomáticos e não fumantes, além de, relacionar com a patogênese da doença. Os resultados encontrados foram de que o estresse oxidativo parece contribuir para a patogênese da DPOC pela indução de apoptose, senescência celular e respostas pró-inflamatórias.

Nosso estudo, que avaliou o dano de forma diferente, também verifica os mesmos achados referentes aos danos no DNA em pacientes com DPOC, na condição de repouso, aumentada quando comparada a indivíduos normais (34). Outras técnicas também demonstram resultados semelhantes àqueles observados em nosso estudo, conforme foi verificado analisando o escarro e o sangue periférico no marcador específico de dano oxidativo ao DNA, o 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), observados por Tzortzaki EG et al. (2012) (35).

A importância do exercício máximo e o conhecimento dos biomarcadores de estresse oxidativo são fundamentais para prescrever o exercício de maneira correta, tanto para pessoas sem doença quanto para aquelas com DPOC (25, 36). Na doença, que já possui o efeito deletério do estado REDOX, há alteração da modulação e redução dos efeitos de radicais livres, agentes oxidantes e da inflamação. Sendo assim, esses fatores podem causar um ciclo com diminuição da biossíntese da glutationa, remodelação da cromatina e da inflamação, que são importantes quando estão funcionando para prevenção de exacerbações, normalmente presentes na DPOC (37).

Conclusões

Na amostra estudada, o estresse oxidativo e o dano de DNA aumentam depois do exercício máximo, sendo maior em pacientes com DPOC, com a tendência de aumentar com o piora espirométrica da doença. Quanto menor a capacidade aeróbica dos pacientes com DPOC maior será seu estresse oxidativo. Exercícios com baixa intensidade não se correlacionam ao estresse oxidativo e consequente ao dano de DNA.

Referências

1. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. Eur Respir J 2003; 22(4):672-88.

2. Cavalcante AGM, Bruin, PFC. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. J Bras Pneumol 2009; 35(12):1227-1237.

3. GOLD, Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, updated 2011. Disponível em <http://www.goldcopd.com>Acesso em: 11 de setembro de 2011.

4. Mercken ME, Hageman J, Schols MWJA, Akkermans AM, Nast A. Rehabilitation decreases exercise-induces oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2005; 172:994-1001.

5. Mergener M, Martins MR, Antunes MV, Nakamoto H, Takahashi R, Yasuda K, et al. Oxidative stress and DNA damage in older adults that do exercises regularly. Clin Biochem 2009; 42 (16-17): 1648-53.

6. Neder JA, Andreoni S, Castelo-filho A, et al. Reference values for lung function tests. I. Static volumes. Braz J Med Biol Res 1999; 32:703-17.

7. American Thoracic Society. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. Am J Respir Crit Care Med 2002; 166: 111-117.

8. III Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Teste Ergométrico. Arq Bras Cardiol 2010; 95 (5 supl.1): 1-26.

9. Neder JA, Nery LE. Teste de Exercício Cardiopulmonar. J Bras Pneumol 2002; 28(Supl 3): S167-S206.

10. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DA. Silver staining method for single-cell gel assay. J Histochem Cytochem 2001; 49: 1183-1186.

11. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. Methods Enzymol 1981; 77:373-82.

12. Kolberg A, Rosa TG, Puhl MT, Scola G, da Rocha Janner D, Masliniewicz A, et al. Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. Cell Biochem Funct 2006; 24(1): 23-39.

13. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods Enzymol 1985; 113:548-55.

14. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe2+ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. Lipid 1991 Oct; 26(10): 853-6.

15. Arab K, Steghens JP. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. Anal Biochem 2004; 1; 325(1): 158-63.

16. Mador MJ, Bozkanat E. Skeletal muscle dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Respir Rev 2001; 2:216-224

17. Boots AW, Haenen GRMN, Bast A. Oxidant metabolism in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Eur Respir J 2003; S 46: 14s-27s

18. Rabinovich RA, Bastos R, Ardite E, Llinàs L, Orozco-Levi M, Gea J, Vilaró J, Barberà JÁ, Rodríguez-Roisin R, Fernández-Checa JC, Roca J. Mitochondrial dysfunction in COPD patients with low body mass index. Eur Respir J 2007; 29:643-650.

19. Mercken ME, Hageman J, Schols MWJA, Akkermans AM, Nast A. Rehabilitation decreases exercise-induces oxidative stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med 2005; 172:994-1001.

20. 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.

21. Pitta F, Troosters T, Spruit MA, Decramer PM, Gosselink R. Characteristics of physical activities in daly life in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171(9): 972-977.

22. Tug T, Karatas F, Terzi SM, Ozdemir N. Comparison of Serum Malondialdehyde Levels Determined by Two Different Methods in Patients with COPD: HPLC or TBARS Methods. Labmedicine 2005; 36(1): 41-44

23. Mastaloudis A, Yu TW, O'Donnell RP, Frei B, Dashwood RH Traber MG. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. Free Radic Biol Med 2004; 36:966-975.

24. Goldfarb AH, Bloomer RJ, McKenzie MJ. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. Med Sci Sports Exerc 2005; 37: 234-239.

25. Svensson MB, Eblom B Cotgreave IA, Norman B, Sjoberg B, Ekblom O, et al. Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabilism in man following controlled exercise and diet. Acta Physiol Scand 2002; 176(1): 43-56.

26. Margonis K, Fatouero IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Douroudos I, Chatzinikolaou A, Mitrakou A, Mastorakos G, Papassotiriou I, Taxildaris K,

Kouretas D. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: Implications for diagnosis. Free Radical Biology & Medicine 2007; 43: 901–910.

27. Mercken EM, Gosker HR, Rutten EP, Wouters EF, Bast A, Hageman GJ, Schols AM. Systemic and pulmonary oxidative stress after single-leg exercise in COPD. Chest 2009; 131: 1291-1300.

28. Zaldivar F, Wang-Rodriguez J, Nemet D, Schwindt C, Galassetti P, Mills PJ, et al. Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leucocytes. J Appl Physiol 2006; 100(4):1124-33

29. Hanneke AC. Six-Minute walking-induced systemic inflammation and oxidative stress in muscle-wasted COPD patients. Chest 2007; 131: 439-445.

30. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, Mckenzie MJ, Consitt LA. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. J Strength Cond Res 2005; 19: 276-285.

31. Hartmann A, Plappert U, Raddatz K. et al. Does physical activity induce DNA damage? Mutagenesis 1994; 9: 269-272.

32. Niess AM, Hartmann A, Grünert-Fuchs. Et al. DNA damage after exhaustive treadmill running in traind and untrained men. Int J Sports Med 1996; 17: 397-403.

33. Puente-Maestu L, Lázaro A, Tejedor A, Camaño S, Fuentes M, Cuervo M, Navarro BO, Agustí A.Effects of exercise on mitochondrial DNA content in skeletal muscle of patients with COPD. Thorax 2011; 66(2):121-7.

34. Aoshiba K, Zhou F, Tsuji T, Nagai A. DNA damage as a molecular link in the pathogenesis of COPD in smokers. Eur Respir J 2012; 39(6):1368-76.

35. Tzortzaki EG,Dimakou K, Neofytou E, Tsikritsaki K, Samara K, Avgousti M, Amargianitakis V, Gousiou A, Menikou S, Siafakas NM. Oxidative DNA damage and somatic mutations: a link to the molecular pathogenesis of chronic inflammatory airway diseases. Chest 2012; 141(5):1243-50.

36. Schneider C, Oliveira A. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. Rev Bras Med Esporte 2004; 10: 308-313.

37. Rahman I, Kinnula VL. Strategies to decrease ongoing oxidant burden in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Expert Rev Clin Pharmacol 2012; 5(3): 293-309.

Tabela 1. Características basais dos indivíduos

Variáveis	DPOC (n=27)	Controles (n=15)
Antropometria		
Idade, anos	63,8 ± 8,8	61,6 ± 7,14
Masculino/Feminino	13/15	2/13
IMC, $kg.m^{-2}$£	24,7 ± 4,6	26,8 ± 4 ‡
Função Pulmonar		
VEF_1, L (% pred)£	1 ± 0,44 (37,7 ± 17,4)	2,38 ± 5 (94 ± 14) ‡
CVF, L (% pred)£	2,29 ± 0,65 (67,7 ± 17)	3,14 ± 6 (98 ± 13) ‡
VEF_1/CVF£	0,42 ± 0,13	0,75 ± 4 ‡
CI, L (% pred)	1,42 ± 0,44 (65 ± 26,6)	-
CPT, L (% pred)	7,05 ± 1,68 (128,7 ± 20,93)	-
VR, L (% pred)	4,77 ± 1,54 (236,2 ± 77,73)	-
D_LCO, (% pred)	7,95 ± 5,21 (54,23 ± 26,02)	-
Pico de exercício		
$\dot{V}O_2$, ml/min£	1060 ± 333,6	1615 ± 363 ‡
$\dot{V}_E$, L£	32,7 ± 11,4	54,1 ± 12,9 ‡
$\dot{V}_E$/VVM£	0,96 ± 0,33	0,62 ± 0,15 ‡
SpO_2, (%)£	87,7 ± 5,3	95 ± 1,9
FC, (% pred)£	120,7 ± 15,6	95 ± 9,1 ‡
$\dot{V}O_2$/FC, ml/min/bpm£	8,1 ± 2	10,8 ± 2,7 ‡
Borg dispneia scores§	6 (4-10)	4 (0-10) ‡
Borg MsIs scores§	4 (0-10)	4,56 (0-10)
TC6 (metros)	412 ± 93	545 ± 62 ‡

Valores em médias ± DP com exceção dos sintomas (mínima e mediana)

Definição das abreviaturas: IMC= índice de massa corporal; VEF_1= volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF= capacidade vital forçada; CI= capacidade inspiratória; CPT= capacidade pulmonar total; VR= volume residual; D_LCO= capacidade de difusão de monóxido de carbono; $\dot{V}O_2$= consumo máximo de O_2; $\dot{V}E$= ventilação por minuto; VVM= ventilação voluntária máxima; SpO_2= saturação da hemoglabina por oximetria; FC= frequência cardíaca; bpm= batimentos por minutos

‡p< 0,05 comparação entre os grupos.

£ Teste t para amostras independentes

§ TesteMann-Whitney

Tabela 2. Diferenças dos marcadores de estresse oxidativo e dano de DNA pré e pós exercício máximo em pacientes com DPOC e controles sem DPOC

Variáveis	**DPOC (n=27)**		**Controles (n=15)**	
	Pré	**Pós**	**Pré**	**Pós**
Dano de DNA (cells)	23,12 ± 50,3	29,24 ± 56,6†	7,33 ± 5,83*	16,2 ± 4,60†‡
GSH (nmol/mL)	1413 ± 927	1213 ± 575	2271 ± 951*	2050 ± 871
GSSG (nmol/mL)	393 ± 135	530 ± 223†	448,72 ± 131	444,1 ± 103‡
GSSG/GSH (u.a.)	0,39 ± 0,27	0,55 ± 0,45†	0,24 ± 0,17*	0.,7 ± 0,17
Lipoperoxidação (µM/mg prot)	1,34 ± 0,23	1,41 ± 0,29	1,38 ± 0,18	1,43 ± 0,32

Valores em média ± DP.

Definição das abreviaturas: DNA=ácido desoxirribonucleico; GSH=Glutationa; GSSG= Disulfeto de glutationa; ua.=unidades arbitrárias * p< 0,05 comparação pré-exercício entre os grupos (Teste t de student pareado); †p< 0,05 comparação pré e pós-exercício intragrupos (Teste de wilcoxon); ‡p< 0,05 comparação entre os grupos (Teste de Mann-Whitney).

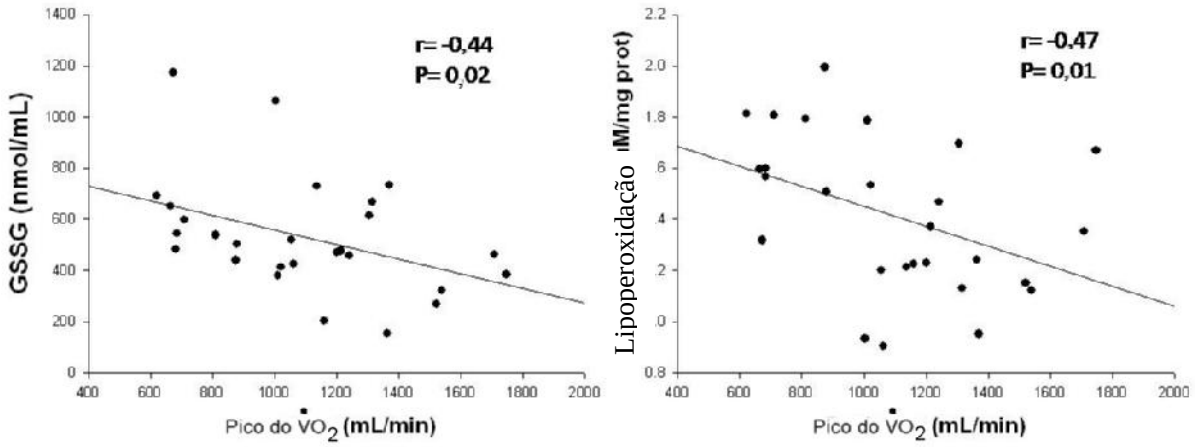

Figura 12. Correlação do VO_2 de pico com o estresse oxidativo em pacientes com DPOC.

Tabela 3. Correlações do Estresse oxidativo e do Dano de DNA com outras variáveis.

	Dano de DNA	**Estresse Oxidativo**			
	(células)	GSH (nmol/ml)	GSSG (nmol/ml)	GSSG/GSH (unidades arbitrárias)	Lipoperoxidação (µM/mg prot)
	r / p	r / p	r / p	r / p	r / p
DLCO(%)	0,03/0,87	**-0,46 / 0,02**	-0,31 / 0,14	0,07 / 0,73	-0,03 / 0,88
CPT(L)	-0,15/ 0,42	0,367 / 0,071	-0,04/ 0,83	-0,21 / 0,29	-0,14 / 0,48
VR (L)	0,04 / 0,83	**0,56 / 0,004**	0,31 / 0,13	-0,19 / 0,35	-0,06 / 0,77
VEF_1(L/s) (%)	0,33 / 0,72	**-0,36 / 0,06**	**-0,38 /0,04**	0,09 / 0,63	-0,26/ 0,18
SpO_2	0,27 / 0,15	0,19 / 0,36	0,02 / 0,91	-0,13 / 0,52	0,04 / 0,82
IMC(km/m^2)	0,3 / 0,84	0,23 / 0,24	-0,04 / 0,83	-0,27 / 0,17	-0,33 / 0,08
VO_2(ml/kg/min)	**-0,38 / 0,036**	**-0,51 / 0,007**	**-0,44 / 0,02**	0,29 / 0,14	**-0,47 / 0,01**
Borg(0-10)	**0,35 / 0,06**	**0,61 / 0,002**	0,19 / 0,36	**-0,61 / 0,002**	0,17 / 0,40
Borg MsIs(0-10)	0,23 / 0,22	**0,44 / 0,03**	-0,021 / 0,92	-0,16 / 0,43	**-0,38 / 0,06**
FCMáx (bpm)	-0,44 / 0,82	-0,144 / 0,50	0,17 / 0,42	0,29 / 0,16	0,17 / 0,42
TC6 (metros)	-0,15 / 0,42	-0,09 / 0,64	-0,10 / 0,64	0,08 / 0,70	-0,17 / 0,40

*Teste de correlação de Spearman

Definição das abreviações: DNA = ácido desoxirribonucleico; GSH = Glutationa reduzida; GSSG = Glutationa oxidada. IMC = Índice de massa corporal; VEF_1 = Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo; CVF = Capacidade Vital Forçada; VO_2 = Consumo máximo de oxigênio; FC = Frequência cardíaca máxima; Borg = percepção do esforço; TC6 = Teste de caminhada de seis minutos; bpm = batimentos por minuto; L/s = litros por segundo; MsIs = membros inferiores; r = valor de correlação; p = valor de significância.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A DPOC possui alterações importantes no estado REDOX, dos biomarcadores do estresse oxidativo e de dano de DNA, quando comparados com indivíduo controles saudáveis de mesma idade. Existem diferenças da doença que foram percebidas pela comparação da função pulmonar e da capacidade de exercício máximo (ergoespirometria) e submáximo (TC6). Quanto maior a gravidade de doença avaliada pelo VEF_1, maior é o estresse oxidativo e, consequentemente, do dano de DNA, durante o exercício máximo.

O exercício máximo induz o aparecimento dos biomarcadores de estresse oxidativo e do dano de DNA, maior nos pacientes com DPOC do que nos controles.

O estresse oxidativo correlaciona-se com o pico de VO_2 de forma negativa e significativa, demonstrando que quanto maior a capacidade aeróbica menor é o estresse oxidativo. Isso ocorre quando os pacientes com DPOC realizam exercício máximo.

Com relação ao índice de massa corporal, quanto maior o estresse oxidativo, menor é o índice de massa corporal dos pacientes com DPOC. A SpO_2 obtida no pico de exercício máximo dos pacientes com DPOC não se correlaciona com o estresse oxidativo e o dano de DNA.

Para os pacientes com DPOC, existe correlação significativa entre o estresse oxidativo e o dano com a função pulmonar, a capacidade máxima de exercício e a percepção de esforço pela dispneia.

Conforme os resultados, sugere-se que outros estudos possam avaliar a biópsia do músculo para a análise do estresse oxidativo e do dano de DNA, já que, ao avaliar essas modificações das células sanguíneas podemos ter interferência dos mecanismos protetores que agem rapidamente nos mecanismos de lesão dos lipídios, proteínas e DNA. Também outras técnicas podem ser utilizadas para verificar o estresse oxidativo e comparar com os nossos resultados, não só a peroxidação dos lipídios, mas também os resultados que geram a oxidação pela verificação de carbonilas e 8-isoprostanos plasmáticos. A melhor avaliação da associação do estresse oxidativo e do dano de DNA poderá no futuro estar aliado a outros parâmetros, podendo assim predizer a gravidade da doença e o prognóstico, como rotina na avaliação dos pacientes.