

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS

LUCIANE DALCANALE MOUSSALLE

**ANÁLISE DO DANO DE DNA EM SANGUE PERIFÉRICO COMO MEDIDA DE
DESFECHO DE UM PROGRAMA DE REABILITAÇÃO PULMONAR**

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE
2007

LUCIANE DALCANALE MOUSSALLE

**ANÁLISE DO DANO DE DNA EM SANGUE PERIFÉRICO COMO MEDIDA DE
DESFECHO DE UM PROGRAMA DE REABILITAÇÃO PULMONAR**

Tese apresentada
para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Pneumológicas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-graduação em Ciências Pneumológicas

Orientador: Prof.Dr.Paulo José Zimmermann Teixeira
Co-orientador : Prof.Dr.Sharbel Weidner Maluf

PORTO ALEGRE

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUCIANE DALCANALE MOUSSALLE

**ANÁLISE DO DANO DE DNA EM SANGUE PERIFÉRICO COMO MEDIDA DE
DESFECHO DE UM PROGRAMA DE REABILITAÇÃO PULMONAR**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS

Data da Aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

DEDICATÓRIA

Ao meu amor Mauren Mansur Moussalle,
aos meus pais Quiliano Dalcanale e Evanilde Marcelina Dalcanale,
a minha avó Vitalina Bordignon Pavan (in memoriam),
dedico-lhes esta conquista como forma de gratidão pelo amor, pela vida,
pelos exemplos de vida, pela compreensão nas horas de ausência,
pelo estímulo que sempre me deram,
e por sempre estarem ao meu lado.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a ajuda prestimosa de meu orientador Paulo José Zimmermann Teixeira,
de meu co-orientador Sharbel Weidner Maluf e de Luciano Basso Silva.

Agradeço a toda equipe do Programa de Reabilitação Pulmonar do Centro
Universitário Feevale.

Agradeço a todos os meus verdadeiros amigos que sempre estiveram comigo
e me incentivaram nos momentos de dúvidas.

Agradeço a Deus por mais este aprendizado.

***Impossível é apenas uma grande palavra
usada por gente fraca, que prefere
viver no mundo como está, em vez de
usar o poder que tem para mudá-lo.***

Impossível não é um fato.

É uma opinião.

Impossível não é uma declaração.

É um desafio.

Impossível é hipotético.

Impossível é temporário.

Impossible is Nothing!

Mohamed Ali

RESUMO

O aumento no número de células inflamatórias, a produção anormal de citocinas pró-inflamatórias e o desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a capacidade antioxidante geram alterações locais e sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), associada com disfunção e perda da massa muscular. A reabilitação pulmonar é uma modalidade de tratamento com evidência A, cujos desfechos são medidos através da melhora da capacidade de exercício físico e qualidade de vida, mas estudos recentes demonstram uma redução no estresse oxidativo induzido pelo exercício, o que potencialmente também reduziria o dano tecidual. A análise do dano de DNA em linfócitos de sangue periférico foi utilizada como possível medida de desfecho em 13 de 39 portadores de DPOC submetidos a um programa de reabilitação pulmonar (PRP) com duração de 4 meses. Todos os pacientes foram submetidos ao teste da caminhada dos seis minutos (TC6) e ao questionário de qualidade de vida Saint George (QQVSG), sendo que 13 pacientes coletaram sangue antes e depois do PRP para análise do dano de DNA pela técnica de micronúcleos. Do total de 39 portadores de DPOC, 69,23% eram do sexo masculino com idades de $63,33 \pm 8,60$ anos e média de VEF1 de $1,06 \pm 0,55$ L. Após o PRP, ocorreu aumento significativo na distância percorrida no TC6 ($366,84 \pm 108,42$ [pré PRP] vs. $400,76 \pm 94,55$ [pós PRP], $p=0,001$) e melhora em

todos os domínios do QQVSG (Sintomas: $47,05 \pm 21,28$ [pré PRP] vs. $35,28 \pm 16,92$ [pós PRP], $p=0,005$; Atividades: $62,84 \pm 27,07$ [pré PRP] vs. $56,02 \pm 24,09$ [pós PRP], $p=0,038$; Impacto: $33,30 \pm 18,71$ [pré PRP] vs. $19,97 \pm 12,11$ [pós PRP], $p<0,001$; Total: $49,41 \pm 21,99$ [pré PRP] vs. $37,61 \pm 18,96$ [pós PRP], $p<0,001$). Quanto à avaliação do dano genético, obteve-se uma diminuição estatisticamente significativa ($p=0,014$) na frequência de micronúcleos ($5,53 \pm 2,14$ [pré PRP] vs. $3,07 \pm 2,13$ [pós PRP]), o que não ocorreu na análise das pontes nucleoplasmáticas e buds nucleares ($1,15 \pm 0,89$ [pré PRP] vs. $0,76 \pm 1,01$ [pós PRP], $p=0,244$ e $1,69 \pm 1,43$ [pré PRP] vs. $1,69 \pm 2,13$ [pós PRP], $p=0,804$, respectivamente). A redução na frequência de micronúcleos demonstrou que o PRP não somente melhorou a qualidade de vida e o desempenho na capacidade de exercício, mas também foi capaz de reduzir o dano de DNA.

Descritores: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; Programa de Reabilitação Pulmonar; Instabilidade Genômica; Micronúcleo.

ABSTRACT

Pulmonary rehabilitation is a treatment supported by level A evidence, and its outcomes are measured by the improvement in physical exercise capacity and quality of life. The objective of this study is to investigate if pulmonary rehabilitation reduces DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease.

DNA damage in peripheral blood lymphocytes was used as an outcome measure in 13 of 39 patients with chronic obstructive pulmonary disease who underwent a 4-month pulmonary rehabilitation program. All patients underwent the 6-minute walk test and answered the Saint George's respiratory questionnaire to assess quality of life. Blood was collected from 13 patients before and after pulmonary rehabilitation program to analyze DNA damage using the micronucleus technique.

After pulmonary rehabilitation program, there was a significant increase in 6-minute walk distance and improvement in all the Saint George's respiratory questionnaire domains. The evaluation of genetic damage revealed a statistically significant decrease ($p = 0.014$) of micronucleus frequency. No significant differences were found in the analysis of nucleoplasmic bridges or nuclear buds.

The decrease of micronucleus frequency demonstrated that PRP not only improved quality of life and performance in work capacity exercises, but also reduced DNA damage.

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease; genomic instability; micronucleus pulmonary rehabilitation program.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos da Inflamação Pulmonar mediados pelas ROS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação Espirométrica da Gravidade da DPOC Baseada no VEF₁ Pós-Broncodilatador

Tabela 2 - Mudanças Celulares e Estruturais Presentes nos Pulmões de Fumantes “Normais” e de Fumantes com DPOC Estabelecida

Tabela 3 - Equação de Referência para Estimativa da Distância Percorrida no TC6

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS - American Thoracic Society

BDI - Índice de Dispnéia Basal de Mahler

BSO - Butionina Sulfoximina

CO₂ – Gás Carbônico

CVF – Capacidade Vital Forçada

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ERS - European Respiratory Society

FC – Frequência Cardíaca

FR – Frequência Respiratória

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

GOLD - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

GSH - Glutathiona Reduzida

GSH-Px - Glutathiona-peroxidase

GSH-Rd - Gglutathiona-redutase

GSSG – Oxidante da Glutathiona Reduzida

IMC – Índice de Massa Corporal

LEAFES - Laboratório de Estudos, Atividades Físicas e Exercícios

MD ± DP- Média ± Desvio Padrão

MDA – Malondialdeido

MN – Micronúcleo

MRC- Medical Research Council

NAC - N-acetilcisteína

NF- κ B - Fator Nuclear Kappa B

OMS – Organização Mundial de Saúde

O₂ - Oxigênio

PA – Pressão Arterial

PaO₂ - Pressão Arterial Parcial de Oxigênio

PaCO₂ - Pressão Arterial Parcial de Gás Carbônico

PRP - Programa de Reabilitação Pulmonar

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SARA – Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto

SGRQ – Questionário do Hospital Saint George na Doença Respiratória

SOD - Superóxido-dismutase

SpO₂ – Saturação Periférica de Oxigênio

TC6 – Teste da Caminhada dos Seis Minutos

TECP - Teste de Exercício Cardiopulmonar

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

VEF₁ - Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DA LITERATURA	21
1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA	21
1.1 Definição	21
1.2 Estadiamento	22
1.3 Patogênese, Manifestações Locais e Sistêmicas	24
1.3.1 Depleção Nutricional	25
1.3.2 Alteração dos Músculos Respiratórios	25
1.3.3 Alteração dos Músculos Periféricos	26
1.3.4 Efeitos Sistêmicos	27
2 TABAGISMO	29
3 BIOLOGIA MOLECULAR, DANO DE DNA E ESTRESSE OXIDATIVO	30
3.1 Estresse Oxidativo	31
4 REABILITAÇÃO PULMONAR	33
4.1 Avaliação Médica e Funcional do Paciente	33
4.1.1 Questionário de Qualidade de Vida	34
4.1.2 Teste da Caminhada dos Seis Minutos	34
4.1.3 Avaliação da Dispneia	37
4.2 Treinamento Físico	38

4. 3 Educação	39
4. 4 Suporte Nutricional	40
4. 5 Suporte Psicossocial	41
4. 6 Dano de DNA, Estresse Oxidativo e Exercício	41
4. 7 Estresse Oxidativo e Reabilitação Pulmonar	43
HIPÓTESE	45
OBJETIVO GERAL	46
REFERÊNCIAS	47
ARTIGO – VERSÃO EM PORTUGUÊS	55
ARTIGO – VERSÃO EM INGLÊS	74
CONCLUSÃO	90

INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é definida como uma enfermidade respiratória prevenível e tratável, que se caracteriza pela presença de obstrução crônica ao fluxo aéreo, que não é totalmente reversível. A obstrução ao fluxo aéreo é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos ^{1,2}.

Como fator primário desta resposta inflamatória está o tabagismo. Os aspectos que se sucedem da combustão do cigarro surgem a partir das 4.720 substâncias já identificadas. O mecanismo de atuação e suas repercussões há muito têm sido estudados, por tratar-se de um hábito que atinge 1 bilhão e 100 milhões de fumantes, ou seja, um quarto da população mundial, sendo responsável pela aquisição anual de 6 trilhões de cigarros, conforme dados publicados em 2005 por Sborgia e Ruffino-Neto ³.

Os pulmões não são os únicos órgãos envolvidos na DPOC. Aspectos extrapulmonares, como o aumento no número de células inflamatórias, que resulta em produção anormal de citocinas pró-inflamatórias, o desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a capacidade antioxidante resultando em sobrecarga oxidativa geram as alterações locais e sistêmicas. Estas alterações têm sido

apontadas como essenciais na patogênese da doença, mesmo que estas relações não estejam ainda adequadamente estabelecidas⁴⁻⁶.

Entre as manifestações sistêmicas encontram-se a depleção nutricional e a disfunção músculo-esquelética, contribuindo para a intolerância ao exercício. Somada às limitações ventilatórias e às co-morbidades se correlacionam com o estado geral e a sobrevida destes pacientes^{4, 6, 7}.

Estudos que analisaram as vias aéreas centrais de tabagistas ditos “normais”, têm demonstrado que linfócitos-T (particularmente células CD8⁺) e macrófagos são células inflamatórias encontradas em maior número na parede, enquanto que os neutrófilos, escassos na parede, são encontrados em maior número na luz do brônquio^{8,9}. Os neutrófilos, células da primeira linha de defesa do sistema imunológico e fonte das espécies reativas de oxigênio (ROS), as citocinas inflamatórias, os mediadores lipídicos e os peptídeos antibacterianos geram destruição do tecido pulmonar no enfisema e demais prejuízos em outras doenças, fato mais evidente nos fumantes quando comparados aos não-fumantes¹⁰⁻¹². Outro estudo complementa esta teoria, relatando que após a chegada dos neutrófilos no interstício pulmonar, sua ativação gera radicais superóxidos que lesam diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio, gerando lesão tissular progressiva¹³.

O equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante é essencial, uma vez que são agentes gerados endogenamente a partir do metabolismo do oxigênio (O₂) ou de situações não-fisiológicas. Como sistema de proteção, a célula possui duas linhas: 1) detoxificadora dos agentes antes que eles causem a lesão - constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; 2) reparadora da

lesão ocorrida - ácido ascórbico, glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px . O poder antioxidante da GSH protege o sistema pulmonar. No momento em que ocorre o desequilíbrio entre consumo de GSH e a produção de seu oxidante (GSSG), caracteriza-se o estresse oxidativo, cuja magnitude pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH, resultando em potencial dano celular, com dose-resposta relacionada às concentrações do extrato do cigarro ^{9,11-14}.

Um aspecto ainda controverso é se todos os pacientes com DPOC apresentam estas reações e susceptibilidades ou se apenas um determinado subgrupo, uma vez que somente 15% dos tabagistas desenvolvem a doença. Desta forma, estaria envolvido no mecanismo de desenvolvimento da DPOC não apenas a destruição, mas também uma quantidade e uma qualidade anormal de reparo do tecido pulmonar. A correlação entre a exposição ao cigarro e os fatores genéticos não respondem completamente aos questionamentos ainda existentes na patogenia da doença ^{11, 15, 16}.

No momento em que a comunidade científica abre-se em busca de novas perspectivas para esta doença que assume proporções alarmantes, com implicações diretas na saúde pública, na economia, nas áreas jurídica e psicossocial, parâmetros que avaliem adequadamente as intervenções terapêuticas são altamente desejados. Entre as estratégias terapêuticas utilizadas para a DPOC, a reabilitação pulmonar apresenta nível de evidência A, melhorando a performance física e a tolerância ao exercício, que interferem significativamente para a melhora na qualidade de vida destes pacientes.

Mercken et al.¹⁷ referem em seu estudo, que este método de tratamento influenciaria não somente na melhora da dispnéia e da atividade física, mas também seria capaz de reduzir a inflamação sistêmica e o estresse oxidativo. Desta forma, a

avaliação do dano de DNA apareceria como um marcador adicional, pois seria decorrente das alterações induzidas pelas ROS.

REVISÃO DA LITERATURA

1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

1.1 DEFINIÇÃO

Segundo o *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease – GOLD* ¹, a DPOC é uma enfermidade respiratória prevenível e tratável, que se caracteriza pela presença de obstrução crônica ao fluxo aéreo, que não é totalmente reversível. Esta obstrução é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos ^{1,18}.

A limitação ao fluxo aéreo pode estar relacionada com alterações das pequenas vias aéreas (bronquiolite obstrutiva), dos brônquios (bronquite crônica) e com a destruição do parênquima pulmonar (enfisema pulmonar) ^{1,2}.

Observa-se ainda, o desenvolvimento de alterações sistêmicas que levam ao desenvolvimento de outras doenças, denominadas de comorbidades, capazes de determinarem modificações significativas na qualidade de vida ¹.

A melhora na qualidade de vida não depende apenas do tratamento farmacológico (broncodilatadores, corticóides, oxigenoterapia, vacinação, etc.), mas está intimamente ligada aos programas de reabilitação pulmonar, bem como aos programas de cessação do tabagismo ^{2,18}. Entretanto, para que cada paciente obtenha os melhores resultados, são necessárias avaliações específicas para o diagnóstico preciso e a correta intervenção. Avaliação e quantificação dos sintomas, frequência e intensidade das exacerbações, comportamento evolutivo no decorrer do tempo, impacto sobre as atividades de vida diárias e avaliação da função pulmonar, são determinantes de uma multiplicidade de parâmetros, cujo somatório, associados à relação que a equipe estabelece com o paciente, são pontos cruciais para o sucesso da avaliação e proposta de tratamento ¹⁹.

Neste contexto, a espirometria aparece como o marco fundamental para o diagnóstico e para a classificação da obstrução gerada por esta doença.

1.2 ESTADIAMENTO

A alteração na função pulmonar, caracterizada por uma limitação ao fluxo aéreo, pode ser diagnosticada precocemente através da espirometria, um teste simples, de fácil compreensão e cujos resultados são confiáveis e reprodutíveis. Este exame é capaz de detectar obstrução mesmo que o paciente ainda não apresente sintomas como dispnéia progressiva, tosse e produção de escarro. Desta forma, torna-se essencial para o diagnóstico e classificação da gravidade da DPOC

Seguindo estes preceitos, a utilização dos critérios propostos pelo GOLD ¹ para estadiamento da doença servem como um balizador mundial, como observa-se a seguir:

Tabela 1

Classificação Espirométrica da Gravidade da DPOC Baseada no VEF₁
Pós-Broncodilatador

Estágio 1 – Leve	VEF ₁ /CVF < 0,70 VEF ₁ ≥ 80% do valor predito
Estágio 2 – Moderado	VEF ₁ /CVF < 0,70 50% ≤ VEF ₁ < 80% do valor predito
Estágio 3 – Severo	VEF ₁ /CVF < 0,70 30% ≤ VEF ₁ < 50% do valor predito
Estágio 4 – Muito Severo	VEF ₁ /CVF < 0,70 VEF ₁ < 30% do valor predito ou VEF ₁ < 50% do valor predito associado à falência respiratória*

Fonte: GOLD ¹

*Falência Respiratória: pressão arterial parcial de oxigênio (PaO₂) menor que 60 mmHg com ou sem pressão arterial parcial de gás carbônico (PaCO₂) maior que 50 mmHg

Uma das primeiras anormalidades fisiológicas da DPOC está no acentuado declínio do VEF₁, numa proporção de 30ml/ano em pessoas normais, para 60ml/ano nestes pacientes ²⁰.

Aqueles pacientes cuja espirometria demonstrar grau de obstrução ao fluxo aéreo entre os estágios 2 e 3 devem ser encaminhados ao programa de reabilitação pulmonar como forma de complementação ao tratamento farmacológico.

Novas perspectivas de tratamento e opções terapêuticas estão em processo de desenvolvimento como forma de suprimir o processo inflamatório e a progressão da doença (novos broncodilatadores, antagonistas dos mediadores inflamatórios, antioxidantes, antiinflamatórios, inibidores da protease, reparadores alveolares) ². Para tanto, faz-se necessária a compreensão do processo fisiopatológico desta doença, bem como de suas manifestações locais e sistêmicas.

1.3 PATOGÊNESE, MANIFESTAÇÕES LOCAIS E SISTÊMICAS

Há evidências de que ocorra uma inflamação sistêmica na DPOC, porém ainda não muito bem estabelecida, como a inflamação local. Existem também evidências de que o desequilíbrio entre a formação de radicais livres de O₂ e a capacidade antioxidante resultam em sobrecarga oxidativa. Este desequilíbrio está presente na patogênese da doença, com a participação ativa de macrófagos, neutrófilos e linfócitos CD8⁺, provavelmente envolvidos nos mecanismos de inflamação local e sistêmica, podendo causar lesão celular, hipersecreção mucosa, inativação de anti-proteases e aumentar ainda mais a inflamação pulmonar ^{4,7,21}.

Além disso, a intolerância ao exercício, sujeita às limitações ventilatórias, pode estar envolvida com as alterações músculo-esqueléticas, que associada à depleção nutricional (abaixo de 90% do peso ideal, com baixo índice de massa corporal), correlacionam-se com a sobrevida e com o estado geral dos pacientes ^{4,7}.

1.3.1 Depleção Nutricional

O perfil elevado de citocinas pró-inflamatórias pode estar relacionado com a perda de peso e com a caquexia, podendo contribuir para o desenvolvimento do hipermetabolismo, com subsequente diminuição da ingesta energética, e assim, contribuir para as alterações nutricionais.^{22,23}

Considera-se também a hipoxemia, apresentada freqüentemente por estes pacientes, principalmente nos estágios avançados, como um fator contribuinte para as alterações nutricionais, estimulada pela produção de mediadores inflamatórios^{24,25}.

Pacientes desnutridos apresentam dispnéia mais intensa, deterioração da qualidade de vida e menor capacidade para realizar exercícios.

1.3.2 Alteração dos Músculos Respiratórios

A fraqueza e a diminuição da *endurance* dos músculos respiratórios podem ocorrer devido a fatores extrínsecos (alterações geométricas da parede torácica, do volume pulmonar e fatores metabólicos sistêmicos) e intrínsecos (mudança no tamanho da fibra muscular, comprimento do sarcômero, massa e metabolismo muscular)²⁶.

O diafragma preserva a propriedade intrínseca de gerar pressão, mas a função pulmonar pode estar prejudicada pela limitação ao fluxo aéreo, pelas mudanças geométricas do tórax e hiperinsuflação pulmonar, ocorrendo aumento de fibras musculares do tipo I, diminuição nas do tipo II e aumento da capacidade oxidativa de todas as fibras^{27,28}. Ele está adaptado para a sobrecarga crônica e

mostra uma grande resistência à fadiga. Como resultado, os músculos inspiratórios de pacientes com DPOC são capazes de gerar mais força do que sujeitos controles normais. Isto ocorre precocemente, antes que adaptações músculo-esqueléticas se estabeleçam e os músculos respiratórios entrem em desvantagem mecânica^{29,30}.

1.3.3 Alteração dos Músculos Periféricos

Há um impacto significativo da estrutura e função muscular periférica no estado geral de saúde, podendo apresentar alterações de força, massa, morfologia e bioenergética muscular.

A fraqueza muscular é proporcional à perda da massa muscular, sendo predominante em membros inferiores, podendo sua explicação estar embasada nos seguintes fatores^{26,31}:

- Atividades relacionadas ao desenvolvimento de marcha comumente evitada pelos pacientes pela sensação de dispnéia;
- Predomínio de atividades de vida diária realizadas com os membros superiores;
- Grande número de músculos de cintura escapular responsáveis pela elevação dos braços que participam concomitantemente da respiração acessória.

A diminuição da atividade contrátil influencia no trofismo e no balanço entre síntese e degradação muscular. Como consequência do desuso e da imobilização prolongada, há predomínio de perda de fibras de contração lenta, descondicionamento físico, metabolismo de aminoácidos, inflamação sistêmica e estresse oxidativo³².

1.3.4 Efeitos Sistêmicos

As manifestações clínicas da DPOC não são restritas à inflamação pulmonar. Os aspectos sistêmicos incluem alteração nos níveis de mediadores inflamatórios circulantes e estresse oxidativo. O enfraquecimento do balanço endógeno oxidante-antioxidante está amplamente relacionado à patogênese da DPOC ^{7,15,33}.

No exame das vias aéreas centrais, encontram-se linfócitos T e macrófagos como células infiltrativas da parede da via aérea, enquanto neutrófilos estão aumentados no lúmen ⁸.

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa celular do sistema imune e a fonte das espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS), de citocinas inflamatórias, mediadores lipídicos, peptídeos antibacterianos e enzimas de lesão tecidual, implicando na produção de muco na bronquite crônica e na destruição do tecido pulmonar no enfisema ¹⁰.

As vias aéreas periféricas são o maior sítio de resistência aumentada e apresentam maior suscetibilidade de lesão precoce, com importantes conseqüências funcionais. A limitação desenvolvida está associada a mudanças estruturais e celulares na via aérea central e periférica ⁸.

Saetta et al.⁸ demonstraram as mudanças estruturais e celulares sofridas pelos fumantes tidos como “normais” e aqueles com DPOC estabelecida, como pode-se observar na tabela abaixo.

Tabela 2

Mudanças Celulares e Estruturais Presentes nos Pulmões de Fumantes
 “Normais” e de Fumantes com DPOC Estabelecida

	Fumantes “Normais”	Fumantes com DPOC Estabelecida
Via Aérea Central		
<i>Parede</i>	* Linfócitos T * Macrófagos	* ↑ adicional de macrófagos e linfócitos T (particularmente CD8+) * Neutrófilos em doença severa
<i>Lumen</i>	* Neutrófilos	* Neutrófilos
Via Aérea Periférica	* Células mononucleares * <i>Clusters</i> de macrófagos nos bronquíolos respiratórios	* Células metaplásicas e <i>plugs</i> mucosos * Hipertrofia de musculatura lisa * Fibrose * Inflamação (particularmente CD8+) * Todas as células inflamatórias incluindo neutrófilos na doença severa
Parênquima	* Sem destruição * Sem fibrose	* Inflamação (particularmente CD8+) * Destruição (enfisema centroacinar e panacinar) * Fibrose
Artérias Pulmonares	* Espessamento da íntima	* Disfunção endotelial * Espessamento da íntima * Espessamento camada média (menos freqüente) * Inflamação camada adventícia (particularmente CD8+)

Fonte: Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM⁸

Em conjunto, o aumento do estresse oxidativo resulta da ação de cerca de 10 moléculas de oxidantes/tragada, sendo o cigarro o fator etiológico mais forte para o desenvolvimento da DPOC⁷.

2 TABAGISMO

O cigarro é o maior responsável pela pandemia tabágica, atingindo cerca de 1/4 da população mundial, consumindo 6 trilhões anuais de cigarro, sendo a maior causa de mortalidade após a fome ³.

As principais classes de carcinógenos da fumaça do cigarro são os hidrocarbonetos policíclicos, as nitrosaminas e as aminas aromáticas, sendo o cigarro também, uma rica fonte das espécies reativas de O₂. Estas espécies reativas são as maiores promotoras de dano no DNA, de elementos celulares e extracelulares do pulmão, da peroxidação lipídica e da oxidação protéica, propiciando uma menor capacidade de reparo nos portadores de DPOC e em outras doenças pulmonares quando comparadas a um grupo controle ^{6,15,34}.

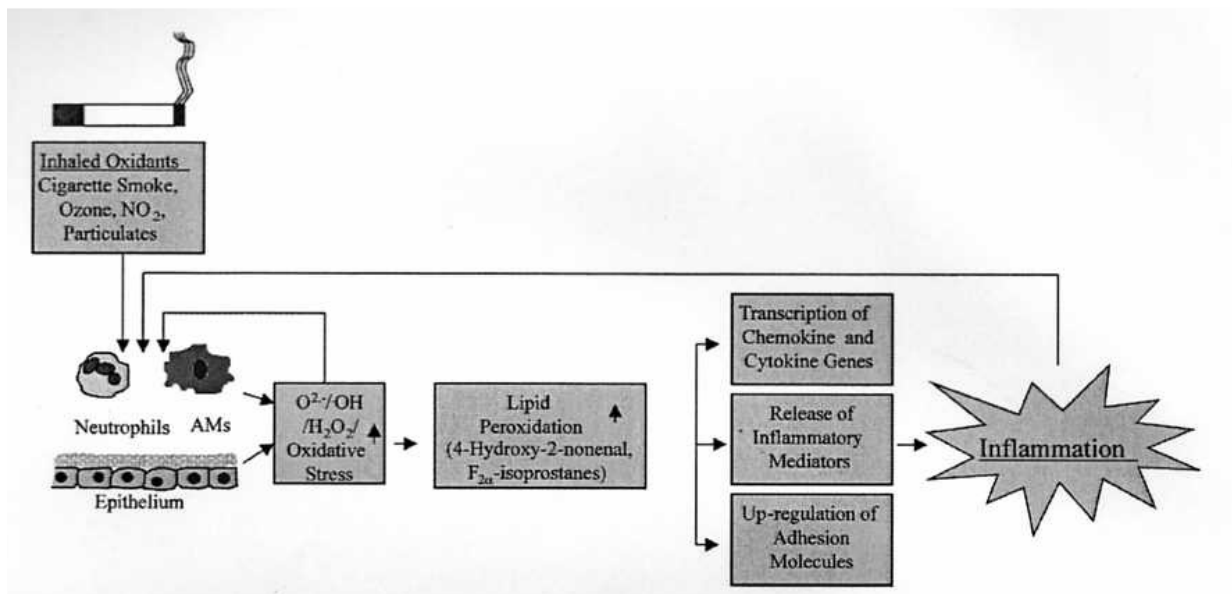


Figura 1 – Mecanismo da Inflamação Pulmonar mediados pelas ROS

Fonte: Rahman I ³⁵

Esta capacidade de reparo alterada pode ser descrita por uma diminuição da relação da glutathiona reduzida (GSH) pelo seu oxidante (GSSH), desde a primeira exposição, respondendo assim, o porquê de somente 15% do tabagistas desenvolverem enfisema pulmonar, determinando os graus de suscetibilidade ^{11,15}.

3 BIOLOGIA MOLECULAR, DANO DE DNA E ESTRESSE OXIDATIVO

A biologia molecular tem sido usada como benefício associativo na análise de efeito da toxicologia ambiental induzindo mutações celulares. A análise do DNA é um campo de estudo dentro da genética toxicológica que vem se desenvolvendo rapidamente. Neste estudo, a frequência de micronúcleos (pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico - estruturalmente pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal) pode estar relacionada com a exposição da população estudada a um determinado agente ou hábito com potencial genotóxico. Alguns estudos analisaram o efeito do tabagismo sobre a frequência de micronúcleos ^{36,37}.

A presença de micronúcleos pode ser tomada como indicativo da existência prévia de aberrações cromossômicas. Segundo Ceylan ³⁸, o micronúcleo aparece primeiramente no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese. porém micronúcleos adicionais podem se formar nas divisões seguintes. Neste estudo, a frequência de micronúcleos não sofreu influência pelo número de cigarros fumados por dia. Entretanto, o dano de DNA e o estresse oxidativo estão fortemente aumentados ^{37, 38}.

Estes biomarcadores pulmonares podem prever a progressão da doença, indicando sua instabilidade e a resposta a técnicas convencionais e a novas terapias, uma vez que a DPOC é caracterizada pelo estresse oxidativo crônico, bem como, e mais recentemente, pela presença de dano de DNA ^{39,40}.

3.1 ESTRESSE OXIDATIVO

Rahman ³⁵ conceitua a doença pulmonar inflamatória como aquela caracterizada pela presença de inflamação crônica e pelo desequilíbrio entre oxidante/antioxidante. Este processo, tanto nos pacientes asmáticos quanto nos portadores de DPOC, deriva do aumento da inalação de gases tóxicos e do aumento das ROS produzido nas vias aéreas, o que pode ser demonstrado pelo aumento dos biomarcadores.

Os sistemas biológicos são continuamente expostos aos oxidantes, geralmente por reações metabólicas endógenas ou exógenas (poluentes no ar ou cigarro). O aumento da produção das ROS tem direta ligação com oxidação protéica, DNA e lipídeos, que causam doenças pulmonares ou induzem a uma série de respostas celulares através do metabolismo das espécies reativas. As ROS podem alterar o remodelamento da matriz extracelular, apoptose e respiração mitocondrial, proliferação celular, manutenção do surfactante, defesa antiprotase, efetividade de resposta de reparo alveolar e modulação imune no pulmão ^{9,35}.

O aumento no número de neutrófilos nas células epiteliais alveolares, gerados pelo cigarro, pode causar o dano oxidativo do DNA pela geração de ROS. Esta idéia de que o recrutamento de células inflamatórias pode estar relacionado ao dano de DNA pode ser o fator contribuinte na patogênese de doenças pulmonares ⁴¹.

A atração dos neutrófilos e outras células inflamatórias para dentro do pulmão podem decorrer da liberação de mediadores gerados pela produção de ROS estimulados pelos macrófagos alveolares a partir dos oxidantes do cigarro. Rahman et al.³⁵ relatam em seu estudo, a existência da relação entre o número de neutrófilos circulantes com o VEF₁.

O sistema de defesa antioxidante (primeira linha de defesa contra as ROS) é essencial para o equilíbrio entre os agentes óxido-redutores (como as ROS) nos sistemas aeróbios. Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas, atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, sendo constituída por GSH (requerida para a síntese de DNA, proteínas e algumas prostaglandinas), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha atua reparando a lesão ocorrida, constituída por ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros^{13,42}.

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção oxidante da glutathiona reduzida (GSSG) e depleção de GSH. Em situações em que o sistema óxido-redução está íntegro haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, ocorrerá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, caracterizando o estresse oxidativo, podendo a razão GSSG/GSH ser o ponto de monitoração¹³.

Há evidências de que as ROS possam estar envolvidas em mais de 50 doenças ou eventos nosológicos; e, no que diz respeito às doenças pulmonares estão: toxicidade por bleomicina, paraquat, butilidroxitolueno, fibras minerais e fumo, asma, e síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), displasia broncopulmonar, pneumoconiose, DPOC e fibrose cística^{9,13,43}.

4 REABILITAÇÃO PULMONAR

A última diretriz de Reabilitação Pulmonar da ATS/ERS de 2006 ⁴⁴ fornece evidência suficiente de que a reabilitação pulmonar é uma intervenção que reduz a dispnéia, melhora a performance ao exercício e a qualidade de vida, sendo efetiva na redução de custos com a saúde, estabilizando ou revertendo as manifestações sistêmicas. Para isso, adota a seguinte definição: a reabilitação pulmonar é uma estratégia multidisciplinar de intervenções baseadas em evidências, para pacientes com doenças respiratórias crônicas, que são sintomáticos e freqüentemente apresentam diminuição na sua qualidade de vida.

De maneira resumida, este programa envolve avaliação médica e funcional do paciente, treinamento físico, educação, suportes nutricional e psicossocial.

4.1 Avaliação Médica e Funcional do Paciente

A avaliação do paciente se faz necessária tanto na fase inicial, para a inclusão no programa, quanto na fase final, quando serão avaliados os resultados obtidos no tratamento. Neste contexto, a utilização de instrumentos que possibilitem a verificação dos resultados serão fundamentais. Os testes de função pulmonar, utilizados para a confirmação do diagnóstico e para a realização do estadiamento da doença, não auxiliam na verificação dos resultados do programa, uma vez que já foi amplamente demonstrado que não ocorrem modificações nos níveis de obstrução do fluxo aéreo.

4.1.1 Questionário de Qualidade de Vida

Vários conceitos têm sido debatidos para estabelecer o que realmente significa qualidade de vida, como se pode observar no estudo de Ramos-Cerqueira e Crepaldi⁷⁰, envolvendo preceitos conceituais e metodológicos.

Entre as várias definições, a mais aceita e utilizada é a de Calman de 1984, que define a qualidade de vida como a diferença entre o que é desejável na vida do indivíduo e o que é alcançável ou não^{44, 45,46}. Para De Souza et al.⁴⁶, significa a quantificação do impacto da doença nas atividades de vida diária e bem-estar do paciente de maneira formal e padronizada.

Para pacientes com DPOC, um dos questionários doença-específicos mais utilizados é o do Hospital Saint George na Doença Respiratória (SGRQ)⁴⁶. É composto por 76 itens, com uma boa sensibilidade, sendo auto-aplicável⁴⁷. O SGRQ avalia questões relacionadas a três domínios: sintomas, atividades e impacto psicossocial que a doença respiratória determina ao paciente. Cada domínio possui uma pontuação máxima possível. Os pontos de cada resposta são somados e o total é referido como um percentual deste máximo. Valores acima de 10% refletem uma qualidade de vida alterada naquele domínio e após a intervenção de um PRP, alterações iguais ou superiores a 4% em qualquer domínio ou na soma total dos pontos, indica uma mudança significativa na qualidade de vida⁴⁶.

4.1.2 Teste da Caminhada dos Seis Minutos

Para avaliar os resultados do Programa de Reabilitação Pulmonar (PRP), bem como a tolerância ao exercício, as respostas globais e integradas de todos os

sistemas envolvidos durante o esforço, incluindo o sistema pulmonar e cardiovascular, a circulação sistêmica, a circulação periférica, o sangue, as unidades neuromusculares e o metabolismo muscular, além da resposta medicamentosa e à terapia com O₂, o Teste da Caminhada dos Seis Minutos (TC6) aparece como um teste prático, simples, que não requer nenhum equipamento de exercício ou treinamento avançado ^{48, 49}.

Este teste mede a distância que um paciente pode andar rapidamente em uma superfície plana, dura, em um período de 6 minutos num percurso retilíneo mínimo de 30 metros. Avalia o nível submáximo da capacidade funcional dos pacientes, pois sua grande maioria, não consegue completar a capacidade máxima de esforço. Considerando que a maioria das atividades diárias é realizada em níveis submáximos, o TC6 pode melhor refletir o nível funcional do esforço para atividades físicas diárias ^{48,49}.

Para sua realização, devem ser obtidos os seguintes parâmetros: Pressão Arterial (PA), Frequência Cardíaca (FC), Frequência Respiratória (FR), Saturação Periférica de Oxigênio (SpO₂) e grau de dispnéia (Escala de Borg). Alguns destes parâmetros devem ser determinados no começo, durante e ao final da caminhada e outros somente na avaliação inicial e final. O oxigênio deve ser administrado caso o paciente necessite. Os equipamentos idealmente requeridos são: cronômetro, oxímetro de pulso, contador mecânico de voltas, dois cones para marcar os pontos de retorno, uma cadeira que possa ser facilmente movida ao longo do percurso, folhas em uma prancheta, uma fonte de oxigênio, esfigmomanômetro, telefone e desfibrilador eletrônico automatizado ^{48,49}.

Os pacientes devem utilizar roupa confortável e sapatos apropriados para caminhada, podendo usar seus equipamentos usuais de caminhada durante o teste

(bengala, andador, etc.). O regime médico usual do paciente deve ser mantido. Uma refeição leve é aceitável antes da manhã ou tarde anterior ao teste. Os pacientes não devem fazer exercícios pesados 2 horas antes de começar o teste ⁴⁸.

A repetição do teste com intervalo de tempo pode ser realizada enfocando o fator de familiarização e aprendizagem. Um período de "aquecimento" antes do teste não deve ser realizado ⁴⁸.

Deve-se instruir o paciente, informando que os objetivos do teste são andar o máximo possível por 6 minutos, que andar de um lado para o outro em torno dos cones; que deve girar em torno dos cones e voltar pelo outro lado. Os pacientes devem escolher sua velocidade de caminhada. Além disso, no primeiro minuto durante o TC6, o sistema cardiopulmonar deve adaptar-se ao exercício, sendo esta, uma reação normal do corpo ao se exercitar ^{48,49}.

Após o primeiro minuto, deve-se dizer ao paciente o seguinte (em tons uniformes): "você está indo bem, você ainda tem 5 minutos; continue assim, você ainda tem 4 minutos; você está indo muito bem; quando o marcador marcar 3 minutos, diga você está na metade, continue assim; você tem apenas 2 minutos restantes, você está indo bem; resta apenas 1 minuto" ⁴⁸.

Somente frases padronizadas de encorajamento devem ser usadas durante o teste, tendo como fundamento lógico que o encorajamento verbal, isto é, estimular e apressar o paciente a caminhar mais rápido do que o possível através de frases, como por exemplo, "Rápido, está devagar demais!", ou linguagens corporais, podem aumentar significativamente a distância percorrida. Embora uma distância do TC6 média maior possa ser obtida desse modo, recomenda-se que tais frases não sejam utilizadas, pois elas enfatizam a velocidade inicial à custa de uma fadiga mais

adiante, e ao excesso de um possível estresse cardíaco em alguns pacientes com cardiopatia ^{50,51}.

Pode-se estabelecer o valor previsto ou o valor de referência através das equações propostas por Enright e Sherril ⁵² (tabela 3), determinando percentual previsto para cada paciente, com correspondente para cada sexo. Ou ainda, ter como referência de resultado positivo da intervenção realizada durante o PRP, o valor estabelecido por Redelmeier et al. ⁴⁹ cujas distâncias precisam diferenciar-se em 54 metros, para que os pacientes parassem de se avaliar “como a mesma coisa” e começassem a se denominar “um pouco melhor” ou “um pouco pior”.

Tabela 3

Equação de Referência para Estimativa da Distância Percorrida no TC6

Sexo	Fórmula
Feminino	$(2,11 \times \text{altura em cm}) - (2,29 \times \text{peso em Kg}) - (5,78 \times \text{idade}) + 667\text{m}$
Masculino	$(7,57 \times \text{altura em cm}) - (5,02 \times \text{peso em Kg}) - (1,76 \times \text{idade}) - 309\text{m}$

Fonte: Enright PL e Sherril DL ⁵²

4.1.3 Avaliação da Dispneia

A dispneia é um sintoma respiratório cardinal nos portadores de DPOC. A utilização de instrumentos que possibilitem a graduação da intensidade desta sensação subjetiva de desconforto respiratório deve ser incorporada. Assim como os demais parâmetros a serem avaliados, existe uma série de escalas específicas como a Escala de Borg, a escala *Medical Research Council* (MRC) e o *Índice Basal de Mahler* (BDI).

A mais divulgada e utilizada é a Escala de Borg, que apresenta uma boa relação com algumas variáveis fisiológicas, demonstrando correlação ao consumo de oxigênio, frequência cardíaca e ventilação pulmonar. Neste sentido, a escala pode fornecer dados reprodutíveis e objetivos do grau de fadiga durante o teste. Sua utilização pode ser útil para avaliar a constância versus mudança do esforço individual durante os seis minutos. É um marcador descritivo de esforço físico, categorizada em 15 variáveis com graus variando entre 6 e 20^{53,54}.

A Escala de Borg Modificada vem sendo utilizada também na prática clínica para avaliação do grau de desconforto respiratório durante o exercício. Trata-se de uma escala de 11 variáveis com graus variando de 0 a 10, na qual a intensidade da dispnéia sentida no momento da investigação é graduada pelo intermédio de números.

4.2 Treinamento Físico

O PRP baseia-se em estratégias específicas para tratar e prevenir as complicações pulmonares e sistêmicas advindas da doença, bem como influenciar na melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Para tanto, o treinamento aeróbico, atende como um dos alicerces deste programa, estando indicado para os indivíduos que têm diminuição da tolerância ao exercício, dispnéia ou fadiga acentuada e/ou debilidade para executar as atividades de vida diária. Pacientes com DPOC após exacerbação aguda são excelentes candidatos ao treinamento físico⁴⁴.

Deve-se lembrar que antes do exercício físico e durante a avaliação do paciente, é necessário estabilizá-lo clinicamente e otimizar o tratamento

medicamentoso, incluindo terapia broncodilatadora, oxigenoterapia e o tratamento de comorbidades, como forma de reduzir a dispnéia, a fadiga e melhorar a tolerância ao exercício, reduzindo a resistência da via aérea ⁵⁵.

O treinamento dos músculos respiratórios, previamente ao treinamento físico, em pacientes com força inicial pobre dos músculos inspiratórios, tem sido visto, em alguns estudos, como um fator contribuinte para melhora da capacidade ao exercício mais do que o treinamento físico isolado, através do treinamento de resistência, carga ou hiperpnéia normocápica ^{44,56}.

A ventilação por pressão positiva não invasiva também tem sido utilizada como uma estratégia para diminuir o trabalho respiratório e melhorar a tolerância ao exercício em certos pacientes com doença respiratória crônica, provavelmente pela redução aguda na carga dos músculos respiratórios ⁵⁷⁻⁵⁹.

Em diferentes aspectos da disfunção músculo-esquelética, o efeito do treinamento físico resulta na melhora da capacidade ao exercício, mesmo na ausência de melhora na função pulmonar. A melhora da capacidade oxidativa e a maior eficiência em manter uma ventilação alveolar com menor trabalho respiratório, auxiliam na redução da hiperinsuflação dinâmica e da dispnéia, reduzindo as limitações físico-funcionais impostas pela doença obstrutiva.

4.3 Educação

A educação ao paciente constitui o componente central para a compreensão do programa de reabilitação pulmonar, apesar das dificuldades em mensurar sua contribuição direta nos resultados. Inicia no momento diagnóstico e segue até os cuidados terminais ⁴⁴.

Alguns dos tópicos trabalhados são: condições do paciente, função pulmonar normal e fisiopatologia da doença, uso de medicamentos e oxigênio, intervenções terapêuticas dos vários profissionais da saúde, benefícios da atividade física estratégias respiratórias, técnicas de higiene brônquica, melhores técnicas de auto-manejo, prevenção e tratamento precoce das exacerbações enfatizando o controle da doença pelas modificações ambientais, trabalho, viagens e atividades sexuais, controle da ansiedade (técnicas de relaxamento e manejo do estresse) e nutrição adequada ⁴⁴.

4.4 Suporte Nutricional

Pacientes com DPOC freqüentemente estão abaixo do peso. A perda da massa gorda-livre está mais relacionada com a morbidade e mortalidade. Intervenções nutricionais geralmente não são efetivas, não que sejam má indicadas, mas sim, pela presença de inflamação sistêmica, idade avançada e a baixa ingesta calórica, aliadas aos curtos períodos de duração dos programas ⁶⁰.

O treinamento físico e mais as atividades de vida diária podem induzir a um equilíbrio negativo de proteína pelo aumento do gasto energético. Sendo assim, a suplementação nutricional pode ser benéfica, melhorando o efeito do treinamento em termos funcionais e de composição corporal no que se refere à qualidade de vida

^{61,62}.

4.5 Suporte Psicossocial

Intervenção voltada principalmente para pacientes com ansiedade, depressão, estresse e outras desordens mentais que requerem atenção especial da equipe de reabilitação. Faz-se importante no momento que muitos pacientes apresentam ansiedade e dispnéia relacionadas ^{44,60}.

Também está relacionada na otimização e discussão de estratégias para a cessação do tabagismo com pacientes que continuam fumando ^{44,60}.

4.6 Dano de DNA, Estresse Oxidativo e Exercício

Estresse oxidativo e níveis elevados de dano oxidativo de DNA e peroxidação lipídica têm sido associados com atividade física excessiva. Existem controvérsias sobre como o estresse oxidativo está relacionado com o aumento de risco de doenças; logo, os níveis de atividade física devem ser cuidadosamente indicados. Em curto prazo, o dano de DNA pode ser monitorado pelo teste do cometa que correlaciona-se com danos reparáveis e com tempo de exposição de minutos/horas (pico de dano em 24 horas e retorno aos níveis basais em 72 horas após o exercício). Para detecção de um período de exposição mais longo (dias/meses), opta-se pelo já mencionado teste de micronúcleo, evidenciando danos não reparáveis ^{17, 36,42}.

A condição física do indivíduo parece influenciar os níveis de dano de DNA após atividade física ⁶⁶. Fato relevante, levando-se em conta que trabalha-se com pacientes já debilitados por sua doença em diferentes níveis de descompensações.

O exercício físico extenuante resulta em um aumento da geração dos radicais livres, estando associado à fadiga músculo-esquelética. No paciente com DPOC pode resultar em aumento da oxidação da glutathione sanguínea (marcador de estresse oxidativo) e em peroxidação lipídica (alterando estrutura e permeabilidade das membranas celulares, deixando mais sensíveis à ação das ROS) ^{13, 67,68}.

Em sujeitos normais, o teste de exercício incremental máximo é limitado pelo sistema cardiocirculatório. Em pacientes com DPOC de moderada à grave, a resistência à fadiga está reduzida. Quando o VEF₁ estiver abaixo de 50% do valor predito, o exercício máximo será limitado pelo sistema ventilatório. Este fato resulta na incapacidade para eliminar adequadamente o gás carbônico (CO₂). A limitação ventilatória é um resultado da incapacidade dos músculos respiratórios agirem para manter a ventilação alveolar normal. Em adição à limitação ventilatória, debilidade músculo-esquelética periférica também contribui para limitar o exercício. Em DPOC grave, a hipoxemia arterial pode ocorrer durante o exercício como resultado de limitação da difusão da membrana alvéolo-capilar ⁶⁷.

O sistema músculo-esquelético, aparece como um potencial sítio de produção de inflamação sistêmica, particularmente durante o exercício, em pacientes com DPOC ¹².

Além da disfunção músculo-esquelética, recentemente tem-se sugerido a detecção de um grupo clínico de fenótipos específicos, como hipoxemia persistente, hiperinsuflação com enfisema heterogêneo e exacerbações freqüentes, resultando em formas bem delineadas de abordagem que apresentem resultados efetivos ^{69,70}.

Complementando o grupo de fenótipos, somam-se à presença de níveis elevados de fator e necrose tumoral α (TNF- α), o desequilíbrio oxidante/antioxidante o aumento do trabalho respiratório ou ainda, a combinação desses mecanismos. O

índice de massa corporal (IMC) inferior a 0.21 também deve ser considerado, sendo um preditor independente de morte nos pacientes com DPOC ⁶⁹.

4.7 Estresse Oxidativo e Reabilitação Pulmonar

O maior resultado obtido através do programa de reabilitação pulmonar está na melhora da performance física e na qualidade de vida. A identificação de novos biomarcadores e a maior compreensão da inflamação sistêmica nos portadores de DPOC, tem sugerido a utilização da monitorização da inflamação e do estresse oxidativo em pacientes tratados num programa de reabilitação pulmonar. Dessa forma, Mercken et al.¹⁷ mostraram pela primeira vez que o PRP foi capaz de diminuir o estresse oxidativo induzido pelo exercício, especialmente após o exercício submáximo. Este decréscimo foi acompanhado por uma significativa melhora da capacidade ao exercício após a reabilitação. A melhora observada foi atribuída a respostas adaptativas, envolvendo mais eficientemente o metabolismo oxidativo ou pelo aumento da capacidade do sistema de antioxidantes endógenos. Entretanto, a suplementação nutricional específica e a modulação farmacológica em concomitância ainda carecem de estudos mais aprofundados.

Adicionalmente, a suplementação de O₂ durante o exercício pode prevenir o estresse oxidativo e atenuar, em portadores de DPOC com perda de massa muscular, o ciclo de indução da inflamação sistêmica ^{61,62}. Por este motivo, tem sido proposto, em portadores de DPOC muito grave com hipoxemia avançada, a administração de O₂ suplementar (2-3 L/min) como forma de reduzir a oxidação da glutathiona sangüínea induzida pelo exercício, diminuindo o estresse oxidativo.

Mecanicamente, é desconhecido qual das três maiores origens de geração de radicais livres intracelulares são afetados pela suplementação de oxigênio⁵⁵.

HIPÓTESE

As recentes evidências de que a reabilitação pulmonar reduz o estresse oxidativo, sugere a possibilidade de novos marcadores para avaliar a eficácia desta modalidade de tratamento. O teste de micronúcleo detecta alterações nucleares já estabelecidas, que não podem mais ser reparadas e representam eventos ocasionados a médio e longo prazo. Desta forma, seria provável e esperada uma redução no dano de DNA, uma vez que este dano resulta principalmente da presença de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo.

OBJETIVO GERAL

Analisar o dano genético (DNA) em linfócitos de sangue periférico, através da técnica de micronúcleo, em portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica submetidos a um programa de reabilitação pulmonar.

REFERÊNCIAS

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2006. Available from: <http://www.goldcopd.org>
2. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. J Bras Pneumol 2004; 30 (S4): 1s
3. Sborgia RC, Ruffino-Neto A . Tabagismo, saúde e educação. J Bras Pneumol 2005; 31(4):371-2
4. 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):161-71
5. Wouters EFM, Creutzberg EC, Schols AMWJ. Systemic Effects in COPD. Chest 2002; 121:127-30
6. Duarte RLM, Paschoal EM. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. J Bras Pneumol 2005; 32(1):56-65

7. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Thorac Soc* 2005;2:50-60
8. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1304-9
9. Ricciardolo FLM, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *European Journal of Pharmacology* 2006; 533:240-52
10. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax* 2006; 61:448-54
11. Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipolloni M, Scatena F, Paggiaro P, Celi A, Giuntini C. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L955-63
12. Agusti A. Chronic Obstructive Pulmonary Disease – A Systemic Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:478-83
13. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ver Ass Med Brasil* 1997;43(1):61-8
14. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative Stress in Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:S38-43
15. van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004; 59:713-21
16. Cookson WOC. Genetics and genomics of chronic obstructive pulmonary disease. *Am Thorac Soc* 2006;3: 473-7

17. Mercken EM, Hageman GJ, Schols AMW, Akkermans MA, Bast A, Wouters EFM. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172: 994-1001
18. Mannino DM, Watt G, Hole D, Gillis C, McConnachie A, Smith GD, Upton M, Hawthorne V, Sin DD, Man SFP, Eeden SV, Mapel DW, Vestbo J. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27:627-43
19. Ferreira CAS, Cukier A. Avaliando a DPOC pela perspectiva do paciente. *J Bras Pneumol* 2006; 32(2): vii – viii.
20. Sutherland ER, Cherniack RM. Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2004;350:2689-97
21. Rufino R, Silva JRL. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol* 2006; 32(3): 241-8
22. Ferreira I, Brooks D, Laçasse Y, Golstein R. Nutrition intervention in COPD; a systemic overview. *Chest* 2001; 119(2):353-63
23. Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, Mancino J, Rogers RM. Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *Am J Resp Crit Care Med* 1996; 153(2): 633-7
24. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Ioune S, Hino T, Salto H et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patient with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 161:1179-84
25. Neder JA, Nery LE, Cendon Filha SP, Ferreira IM, Jardim JR. Reabilitação pulmonar: fatores relacionados ao ganho aeróbio de pacientes com DPOC. *J Bras Pneumol* 1997; 23(3): 115-23

26. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. A Statement of the American Thoracic Society and European. *Am J Resp Crit Care Med* 1999; 159(4): S2 – S40
27. Orozco-Levi M. Structure and function of the respiratory muscles in patients with COPD: impairment or adaptation? *Eur Respir J* 2003; 46: 41s-51s
28. Levine S, Nguyen T, Kaiser LR, Shrager JB. Evaluating respiratory muscle adaptations: a new approach. *Am J Resp Crit Care Med* 2002;166(11): 1418-9
29. Levine S, Gregory C, Nguyen T, Shrager J, Kaiser L, Rubinstein N, Dudley G. Bioenergetic adaptation of individual human diaphragm myofibers to severe COPD. *J Appl Physiol* 2002; 92: 1205-13
30. Levine S, Kaiser L, Lefterovich J, Tikunov B. Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 1799-1806
31. Bernard S, LeBlanc P, Whitton F, Carrier G, Jobin J, Belleau R et al. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 1998;158(2):629-34
32. Jagoe RT, Engelen MPKJ. Muscle wasting and changes in muscle protein metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 46: 52s-63s
33. Emil FM, Wouters MD. Systemic effects in COPD. *Chest* 2002;121:125s-30s
34. Kim H, Liu X, Kobayashi T, Conner H, Kohyama T, We, FQ, Fang Q, Abe S, Bitterman P, Rennard SI. Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts. *Am J Resp Crit Care Med* 2004; 31: 483-90.

35. 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
36. Org.: da Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003
37. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi Lin Y, Chang W, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Fenech M. Effect of smoking habito in the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutation Research* 2003; 543 : 155-66
38. 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
39. Barners PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussem H, Page CP, Postma D, Saetta M. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 2006; 174: 6-14
40. Casella M, Miniati M, Monti S, Minichilli F, Bianchi F, Simi S. No evidence of chromosome damage in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutagenesis* 2006; 21(2): 167-71
41. Leanderson P, Tagesson C. Cigarette tar promoters neutrophil-induced DNA damage in culture lung cells. *Environ Res* 1994; 64: 103-11
42. Maluf SW. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clin Chim Acta* 2004;347: 15-24
43. Russell PB, Crapo JD. Oxidative Stress in Airways. *Am J Resp Crit Care Med* 2002; 166: S38-S43

44. American Thoracic Society/European Respiratory Society – Statement on Pulmonary Rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1390-1413
45. Carr AS, Gibson B, Robinson PG. Measuring quality of life: is quality of life determined by expectations or experience? *BMJ* 2001; 322: 1240-3
46. De Souza TC, Jardim JR, Jones P. Validação do questionário do Hospital Saint George na Doença Respiratória (SGRQ) em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica no Brasil. *J Bras Pneumol* 2000; 26 (3) : 119-28
47. Ramos-Cerqueira ATA, Crepaldi AL. Qualidade de vida em doenças pulmonares crônicas: aspectos conceituais e metodológicos. *J Bras Pneumol* 2000; 26(4): 207-13
48. American Thoracic Society - ATS. ATS Statement: Guidelines for the Six-Minute Walk Test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 111-7.
49. Redelmeier DA, Bayroumi AM, Goldstein RS, Guyatt GH. Interpreting small differences in functional status: the six minute walk test in chronic lung diseases patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1278-82
50. Teoosters T, Gosselink R, Decramer M. Six minute walking distance in healthy elderly subjects. *Eur Respir J* 2000; 14: 270-4.
51. Guyatt GH, Pugsley SO, Sullivan MJ, Thompson PJ, Berman LB, Jones NL, Fallen EL, Taylor DW. Effect of encouragement on walking test performance. *Thorax* 1984; 39:818-22.
52. Enright PL, Sherrill DL. Reference equations for the six minute walk in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158: 1384-7
53. Brunetto AF, Paulin EI, Yamagutti WPS. Comparação entre a Escala de Borg Modificada e a Escala de Borg Análogo Visual aplicadas em pacientes com dispnéia. *Rev. Bras. Fisioter.*, 2002 ; 6 (1):41-5

54. Guimarães GV, Bellotti G, Bacal F, Mocelin A, Boccho EA. Pode o Teste Ergoespirométrico de Caminhada de Seis Minutos ser representativo das atividades habituais de pacientes com insuficiência cardíaca? *Arq. Bras. Cardiol* 2002; 78 (6): 553-6
55. Casaburi R, Kukafka D, Cooper DB, Kesten S. Improvement in exercise endurance with the combination of tiotropium and rehabilitative exercise training in COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: A756
56. Lotters F, van Tol B, Kwakkel G, Gosselink R. Effects of controlled inspiratory muscle training in patients with COPD: a meta-analysis. *Eur Respir J* 2002; 20: 570-6
57. Ambrosino N, Strambi S. New strategies to improve exercise tolerance in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004; 24: 313-22
58. O'Donnell DE, Sani R, Younes M. Improvement in exercise endurance in patients with chronic airflow limitation using continuous positive airway pressure. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 1185-91
59. Maltais F, Reissmann H, Gottfried SB. Pressure support reduces inspiratory effort and dyspnea during exercise in chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1027-33
60. Troosters T, Casaburi R, Gosselink R, Decramer M. Pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 19-38
61. Steiner MC, Barton RL, Singh SJ, Morgan MD. Nutritional enhancement of exercise performance in chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Thorax* 2003; 58: 745-51
62. Creutzberg EC, Wouters EF, Mostert R, Welling-Scheepers CA, Schols AM. Efficacy of nutritional supplementation therapy in depleted patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Nutrition* 2003; 19: 120-7

63. van Helvoort HAC, Heijdra YF, de Boer RCC, Swinkels A, Thijs HMM, Dekhuijzen PNR. Six-minute walking-induced systemic inflammation and oxidative stress in muscle-wasted COPD patients. *Chest* 2007; 131: 439-45
64. Debigaré R, Côté CH, Maltais F. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical Relevance and Mechanisms. Am J Respir Crit Care Med* 2001;164: 1712-7
65. van Helvoort HAC, Heijdra YF, Heunks LMA, Meijer PLM, Ruitenbeek W, Thijs HMM, Dekhuijzen PNR. Supplemental oxygen prevents exercise-induced oxidative stress in muscle-wasted patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1122-9
66. Niess AM, Hartmann A, Grünert-Fuchs M, Poch B, Speit G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *J Sports Med* 1996;17:397-403
67. Heunks LM, Vina J, Van Herwaarden CLA, Folgering HTM, Gimeno A, Dekhuijzen PNR. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol* 1999; 277: R1697-R704
68. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22 (46): 14s-27s
69. Celli BR. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes and their clinical relevance. *Am Thorac Soc* 2006;3:461-6
70. Bauerle O, Chrusch C, Younes M. Mechanisms by which COPD affects exercise tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 57-68

ARTIGO – VERSÃO EM PORTUGUÊS

A Reabilitação Pulmonar reduz o dano de DNA em portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

Luciane Dalcanale Moussalle ^(1,2), Sharbel Weidner Maluf ^(1,3), Luciano Basso da Silva ⁽¹⁾, Cássia Cinara da Costa ^(1,2), Suzana de Fátima Vettorazzi ⁽¹⁾, Paulo José Zimmermann Teixeira ^(1,2)

⁽¹⁾ Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brasil

⁽²⁾ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Pavilhão Pereira Filho, Santa Casa de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

⁽³⁾ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

Endereço para Correspondência: Paulo José Zimmermann Teixeira

Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, RS 239, 2755, CEP 93352-000, Novo Hamburgo, RS, Brasil. Tel: 55 51 35885600 ;

Endereço de e-mail: paulozt@via-rs.net

RESUMO: O aumento no número de células inflamatórias, a produção anormal de citocinas pró-inflamatórias e o desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a capacidade antioxidante geram alterações locais e sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), associada com disfunção e perda da massa muscular. A reabilitação pulmonar é uma modalidade de tratamento com evidência A, cujos desfechos são medidos através da melhora da capacidade de exercício físico e qualidade de vida, mas estudos recentes demonstram uma redução no estresse oxidativo induzido pelo exercício, o que potencialmente também reduziria o dano tecidual. A análise do dano de DNA em linfócitos de sangue periférico foi utilizada como possível medida de desfecho em 13 de 39 portadores de DPOC submetidos a um programa de reabilitação pulmonar (PRP) com duração de 4 meses. Todos os pacientes foram submetidos ao teste da caminhada dos seis minutos (TC6) e ao questionário de qualidade de vida Saint George (QQVSG), sendo que 13 pacientes coletaram sangue antes e depois do PRP para análise do dano de DNA pela técnica de micronúcleos. Do total de 39 portadores de DPOC, 69,23% eram do sexo masculino com idades de $63,33 \pm 8,60$ anos e média de VEF1 de $1,06 \pm 0,55$ L. Após o PRP, ocorreu aumento significativo na distância percorrida no TC6 ($366,84 \pm 108,42$ [pré PRP] vs. $400,76 \pm 94,55$ [pós PRP], $p=0,001$) e melhora em todos os domínios do QQVSG (Sintomas: $47,05 \pm 21,28$ [pré PRP] vs. $35,28 \pm 16,92$ [pós PRP], $p=0,005$; Atividades: $62,84 \pm 27,07$ [pré PRP] vs. $56,02 \pm 24,09$ [pós PRP], $p=0,038$; Impacto: $33,30 \pm 18,71$ [pré PRP] vs. $19,97 \pm 12,11$ [pós PRP], $p<0,001$; Total: $49,41 \pm 21,99$ [pré PRP] vs. $37,61 \pm 18,96$ [pós PRP], $p<0,001$). Quanto à avaliação do dano genético, obteve-se uma diminuição estatisticamente significativa ($p=0,014$) na frequência de micronúcleos ($5,53 \pm 2,14$ [pré PRP] vs. $3,07 \pm 2,13$ [pós PRP]), o que não ocorreu na análise das pontes nucleoplasmáticas e buds

nucleares ($1,15 \pm 0,89$ [pré PRP] vs. $0,76 \pm 1,01$ [pós PRP], $p=0,244$ e $1,69 \pm 1,43$ [pré PRP] vs. $1,69 \pm 2,13$ [pós PRP], $p=0,804$, respectivamente). A redução na frequência de micronúcleos demonstrou que o PRP não somente melhorou a qualidade de vida e o desempenho na capacidade de exercício, mas também foi capaz de reduzir o dano de DNA.

Descritores: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; Programa de Reabilitação Pulmonar; Instabilidade Genômica; Micronúcleo.

ABREVIACOES:

BSO- Butionina Sulfoximina

CVF – Capacidade Vital Forçada

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

GOLD - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

GSH - Glutathiona Reduzida

GSH-Px - Glutathiona-peroxidase

GSH-Rd - Glutathiona-redutase

GSSG – Oxidante da Glutathiona Reduzida

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

IMC – Índice de Massa Corporal

LEAFES - Laboratório de Estudos, Atividades Físicas e Exercícios

MDA – Malondialdeido

MD ± DP - Média ± Desvio Padrão

MN – Micronúcleo

NAC - N-acestilcisteina

NF-kB - Fator Nuclear Kappa B

OMS – Organização Mundial de Saúde

O₂ - Oxigênio

PRP - Programa de Reabilitação Pulmonar

QQVSG – Questionário de Qualidade de Vida do Hospital Saint George

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SOD - Superóxido-dismutase

TC6 – Teste da Caminhada dos Seis Minutos

TECP - Teste de Exercício Cardiopulmonar

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

VEF₁ - Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo

INTRODUÇÃO:

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) se caracteriza pela presença de obstrução crônica ao fluxo aéreo, que não é totalmente reversível. A obstrução ao fluxo aéreo é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos ^{1,2}.

O tabagismo é o principal fator desencadeante desta resposta inflamatória. Estudos que analisaram as vias aéreas centrais de tabagistas sem doenças detectadas têm demonstrado que linfócitos-T (particularmente células CD8⁺) e macrófagos são as células inflamatórias encontradas em maior número na parede do brônquio, enquanto que os neutrófilos, escassos na parede, são encontrados em maior número na luz do brônquio ^{3,4}. Os neutrófilos, células da primeira linha de defesa do sistema imunológico e fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS), citocinas inflamatórias, mediadores lipídicos e peptídeos antibacterianos, geram destruição do tecido pulmonar no enfisema e demais prejuízos em outras doenças, fato mais evidente nos fumantes quando comparados aos não-fumantes ⁵⁻⁷.

O equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante é essencial, uma vez que são agentes gerados endogenamente a partir do metabolismo de oxigênio (O₂) ou de situações não-fisiológicas. A célula possui duas linhas de proteção: 1) detoxificadora dos agentes, antes que eles determinem lesão - constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; 2) reparação da lesão já ocorrida - ácido ascórbico, glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. O poder antioxidante da GSH protege o sistema pulmonar. No momento em que ocorre o desequilíbrio entre consumo de GSH e a produção de seu oxidante (GSSG), caracteriza-se o estresse oxidativo, cuja magnitude pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH,

resultando em potencial dano celular, com dose-resposta relacionada às concentrações do extrato do cigarro^{4,6-8}. Embora seja reconhecido que o aumento do estresse oxidativo e a reduzida capacidade antioxidante estão associados ao desenvolvimento e progressão da DPOC⁹, um aspecto ainda controverso é se todos os pacientes, ou apenas um determinado subgrupo, apresentam estas reações e suscetibilidades, uma vez que somente 15% dos tabagistas desenvolvem DPOC, não somente pela destruição, mas também por quantidade e qualidade anormal de reparo do tecido pulmonar^{6,10,11}.

Dentre as manifestações sistêmicas da doença, a depleção nutricional e a disfunção músculo-esquelética são determinantes da intolerância ao exercício, somados às limitações ventilatórias¹²⁻¹⁴. O programa de reabilitação pulmonar (PRP) melhora a performance física e a tolerância ao exercício, influenciando na melhora da qualidade de vida dos portadores de DPOC.

Os parâmetros de resposta de um PRP têm sido o teste de caminhada dos seis minutos para avaliar a capacidade de exercício e a melhora dos sintomas e o teste de qualidade de vida. Um estudo recente sugere que este método de tratamento influenciaria também reduzindo a liberação de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, o dano tecidual induzido pelas ROS¹⁵. Nosso grupo demonstrou que portadores de DPOC apresentam maior dano de DNA quando comparados com controles sem DPOC ou qualquer outra doença inflamatória¹⁶, através do aumento da freqüência de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico. Este estudo analisou os efeitos de um programa de reabilitação pulmonar sobre as taxas de dano de DNA, avaliado através da técnica de micronúcleo (MN).

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

Este estudo foi conduzido com 39 pacientes portadores de DPOC, dos quais 69,23% eram do sexo masculino, admitidos no Programa de Reabilitação Pulmonar do Centro Universitário Feevale, com duração de 4 meses. O diagnóstico de DPOC seguiu os critérios estabelecidos pelo Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases (GOLD), usando a história clínica, o exame físico e obtendo a confirmação através da espirometria, que deveria mostrar obstrução ao fluxo aéreo, definida como a razão entre o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) e a capacidade vital forçada (CVF) abaixo de 70% do valor predito após uso do broncodilatador. Todos os pacientes apresentavam graus de obstrução do fluxo aéreo de moderado a grave, definidos pela presença de $VEF_1 < 60\%$ do previsto. Foram excluídos portadores de outras doenças inflamatórias crônicas, pacientes em período de exacerbação e aqueles que não conseguiram completar qualquer fase do protocolo do PRP.

Desenho do Estudo

Todos os pacientes foram submetidos ao teste da caminhada dos seis minutos (TC6) seguindo os critérios da ATS¹⁷, trabalho de caminhada^{18,19} encontrado pelo produto da distância x peso corporal e questionário de qualidade de vida Saint George (QQVSG). Treze pacientes que não tinham evidência de doença inflamatória, coletaram sangue antes e depois do PRP para análise do dano de DNA. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário Feevale e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Após uma semana de avaliações, os pacientes começavam o treinamento físico três vezes por semana e participavam de um programa educacional sobre a sua doença, juntamente com seus familiares. Com o término de um período de treinamento de quatro meses, o mesmo protocolo de avaliação foi reaplicado.

Teste do Micronúcleo (MN)

Para o teste do micronúcleo, a uma quantidade de sangue (0.5ml) foi adicionado 5ml de RPMI 1640, com adição média de 20% fetal calf serum e 0,2% de phytohemagglutinin. As células foram cultivadas a 37° C por 44h, após 4,5µg/ml de citocalasina B (CytB, Sigma) foram adicionadas de acordo com o método descrito por Fenech e Morley ²⁰ e revisadas por Fenech ²¹. As células suspensas foram fixadas em 3:1methanol: ácido acético sem tratamento hipotônico, e pingado sobre lâminas limpas. As lâminas foram então tingidas com Giemsa. Mil (1000) células binucleadas para cada indivíduo foram o escore para os micronúcleos, pontes dicêntricas (pontes nucleoplasmáticas entre células filhas), e buds nucleares (amplificação de DNA) in coded, unidentified slides. A análise foi realizada na própria Instituição no Setor de Citogenética do Laboratório de Biomedicina.

Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Para comparação dos achados antes e após o PRP foi utilizado o Teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

RESULTADOS

As características basais dos 39 participantes do estudo (dados antropométricos, espirométricos e hábitos tabágicos) encontram-se na tabela 1.

Destes, 69,23% eram do sexo masculino. O tabagismo estava presente na história de 84,62% dos pacientes, com índice tabágico (pack year) de $52,27 \pm 61,40$. O grupo em estudo apresentou graus de DPOC de moderado a grave, com VEF_1 $1,06 \pm 0,55$ L ($40,17 \pm 18,21\%$ do valor previsto), e com obstrução ao fluxo aéreo, medida pela relação VEF_1/CVF , de $56,85 \pm 20,97\%$ do previsto. A média do IMC foi de $24,48 \pm 5,09$ kg/m².

As tabelas 2 e 3 apresentam, respectivamente, os resultados encontrados a partir da realização do TC6 e da análise do QQVSG antes e depois do PRP. Com relação à tabela 2 (TC6), encontrou-se diferença estatisticamente significativa na distância percorrida ($366,84 \pm 108,42$ m [pré PRP] vs. $400,76 \pm 94,55$ m [pós PRP], $p=0,001$) e no trabalho de caminhada ($24,61 \pm 9,85$ KgKm⁻¹ [pré PRP] vs. $26,89 \pm 9,87$ KgKm⁻¹ [pós PRP], $p=0,005$). A análise do QQVSG (tabela 3) mostrou melhora significativa em todos os domínios - Sintomas: $47,05 \pm 21,28$ [pré PRP] vs. $35,28 \pm 16,92$ [pós PRP], $p=0,005$; Atividades: $62,84 \pm 27,07$ [pré PRP] vs. $56,02 \pm 24,09$ [pós PRP], $p=0,038$; Impacto: $33,30 \pm 18,71$ [pré PRP] vs. $19,97 \pm 12,11$ [pós PRP], $p<0,001$; Total: $49,41 \pm 21,99$ [pré PRP] vs. $37,61 \pm 18,96$ [pós PRP], $p<0,001$.

Considerando-se os 13 pacientes que avaliaram o dano genético (figura 1), obteve-se redução estatisticamente significativa na frequência de micronúcleos ($5,53 \pm 2,14$ [pré PRP] vs. $3,07 \pm 2,13$ [pós PRP], $p=0,014$). Os outros dois marcadores de dano de DNA (pontes nucleoplasmáticas e buds nucleares) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores medidos antes e depois do PRP.

DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que o PRP com duração de quatro meses de treinamento físico foi capaz de reduzir o dano de DNA em portadores de DPOC, detectada através da redução na frequência de micronúcleos. Alterações relacionadas com aumento no número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T CD8⁺, excesso de produtos oxidativos e a facilitação de colonização por microorganismos interagem no recrutamento de células pró-inflamatórias²². Estes mecanismos correlacionam-se com o estresse oxidativo, podendo o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes resultar em dano no DNA e na perda da massa e da função muscular pela estimulação da proteólise muscular. Essas alterações podem ser causadas pelo desequilíbrio da glutatona e pelo aumento da peroxidação lipídica⁹.

O processo inflamatório e o estresse oxidativo estão associados. Existem evidências que apontam a influência dos oxidantes na inflamação e também a inflamação como indutor do estresse oxidativo. Na primeira hipótese, a inflamação pulmonar surgiria a partir da resposta às ROS, ativando a transcrição das citocinas pró-inflamatórias e dos genes chemokine, bem como a transcrição de fatores ligados ao fator nuclear kappa B (NF- κ B) e aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios. Na outra possibilidade, a inflamação inicial e, principalmente, a ativação de mediadores tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) seriam capazes de aumentar o estresse oxidativo em várias células e tecidos^{9,23,24}.

Mercken et al.²⁵ realizaram um estudo com 11 pacientes portadores DPOC e 11 sujeitos controles hígidos pareados para idade, avaliando a performance ao exercício máximo e submáximo em cicloergômetro com carga de trabalho de 60%. Os pacientes com DPOC realizaram os testes antes e após um PRP de 8 semanas.

As mensurações em ambos os grupos ocorreram antes, imediatamente após e 4 horas após o término de cada teste. Estes mesmos autores demonstraram que previamente à reabilitação, as espécies reativas de oxigênio (ROS) induziam ao dano de DNA em sangue periférico de células mononucleadas, detectadas através da técnica do cometa. Após a reabilitação ocorreu diminuição do estresse oxidativo sistêmico induzido pelo exercício, o que poderia ser decorrente da melhora da tolerância ao exercício, maior efetividade do metabolismo oxidativo ou pelo aumento da capacidade do sistema antioxidante endógeno. Não houve alteração significativa relacionada a este dano no grupo controle em ambos os testes, possivelmente justificado pelo curto tempo de teste e pela atuação do sistema de defesa antioxidante ser capaz de deter o aumento da atuação das ROS.

No nosso trabalho, optamos por utilizar o teste de micronúcleos que detecta alterações nucleares já estabelecidas, que não podem mais serem reparadas e representam eventos ocasionados a médio e longo prazo, diferente do teste do cometa, que detecta alterações passíveis de reparo e que ocorreram momentos antes da coleta. A redução na frequência de micronúcleos indica uma diminuição no dano da DNA, muito possivelmente resultante de uma redução do estresse oxidativo e da condição inflamatória, o que se deve a uma melhor performance física evidenciada pelo significativo aumento na distância percorrida no teste de caminhada dos seis minutos e pela melhora significativa no trabalho de caminhada. A frequência de pontes nucleoplasmáticas parece também ter reduzido após a reabilitação, o que não pôde ser demonstrado estatisticamente. Isso se deve pela raridade deste evento. A origem das pontes nucleoplasmáticas são os cromossomos dicêntricos, formados a partir de duas quebras em cromossomos diferentes que se unem. Na anáfase mitótica, cada um desses dois centrômeros vai para um núcleo

filho diferente, formando a ponte ²⁰. Como as freqüências de pontes nucleoplasmáticas apresentam-se normalmente muito baixas, o poder estatístico desse marcador é menor do que o da freqüência de micronúcleos. Já os buds nucleares parecem não ter sofrido modificação em suas freqüências. O bud é formado pela amplificação gênica, em resposta à exposição a agentes genotóxicos ²⁶, o que significa que em nosso estudo, esse tipo de resposta não apresentou diferenças entre os dois momentos de avaliação.

A análise da freqüência de MN tem sido utilizada como fator de avaliação do efeito genotóxico do cigarro. Kim et al. ²⁷ identificaram que o inibidor da síntese da glutathione (butionina sulfoximina- BSO) aumentou significativamente o dano do DNA oriundo do efeito do extrato do cigarro em 1%, e que a N-acetilcisteína (NAC) – precursor da síntese da glutathione- bloqueou em 5% este efeito. Enfatizando estudos com efeitos genotóxicos, Bonassi et al. ²⁸ demonstrou que não houve aumento substancial na freqüência de MN quando comparados os fumantes (menos de 20 cigarros/dia) com os não-fumantes e que somente o grupo dos tabagistas pesados demonstrou aumento significativo neste tipo de dano, mensurado pelo MN em linfócitos. Dos 39 pacientes portadores de DPOC apenas dois permaneciam fumando, o dano detectado antes da reabilitação seria oriundo de um processo inflamatório e estresse oxidativo que se perpetuam nestes pacientes conforme já demonstrado anteriormente ¹⁵.

Concluindo-se, nossos dados demonstraram que a análise do dano genético pode ser um parâmetro de resposta em portadores de DPOC submetidos a um PRP. Outros estudos avaliando o dano de DNA e estresse oxidativo se fazem necessários, uma vez que as intervenções terapêuticas na DPOC demandam um

monitoramento não somente da função pulmonar e da capacidade de exercício, mas também do componente sistêmico da doença.

REFERÊNCIAS:

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2006. Available from: <http://www.goldcopd.org>
2. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. J Bras Pneumol 2004; 30 (S4): 1s
3. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:1304-9
4. Ricciardolo FLM, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. European Journal of Pharmacology 2006; 533:240-252.
5. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. Thorax 2006; 61:448-454
6. Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipolloni M, Scatena F, Paggiaro P, Celi A, Giuntini C. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003;284:L955-963
7. Agustí A. Chronic Obstructive Pulmonary Disease – A Systemic Disease. Proc Am Thorac Soc 2006; 3:478-483
8. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Ver Ass Med Brasil 1997;43(1):61-68

9. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Oxidant Metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; S 46: 14s-27s
10. van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004;59:713-721
11. Cookson WOC. Genetics and genomics of chronic obstructive pulmonary disease. *Am Thorac Soc* 2006;3: 473-477
12. 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
13. Duarte RLM, Paschoal EM. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. *J Bras Pneumol* 2005; 32(1):56-65
14. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Thorac Soc* 2005;2:50-60
15. Mercken EM, Hageman GJ, Schols AMW, Akkermans MA, Bast A, Wouters EFM. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172: 994-1001
16. Maluf SW, Mergener M, Dalcanale L, Costa CC, Pollo T, Kayser M, da Silva LB, Pra D, Teixeira PJZ. DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutation Research* 2007; 626(1-2):180-184
17. American Thoracic Society - ATS. ATS Statement: Guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 111-117
18. Chuang ML, Lin IF, Wasserman K. The body weight-walking distance product as related to lung function, anaerobic threshold and peak VO_2 in COPD patients. *Respir Med* 2001;95:618-626

19. Carter R, Holiday DB, Nwasuruba C, Stocks J, Grothues C, Tiep B. 6-Minute walk work capacity in patients with COPD. *Chest* 2003;123:1408-1415
20. Fenech M, Moley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* 1985;147:29 -36
21. Fenech M. The cytokinesis micronucleis technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutation Research* 1993; 285:35-44
22. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343 (4) 269-280
23. Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2003; 36 (1):95-109
24. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:s38-s43
25. Mercken AM, Hageman GJ, Schols AMW, Akkermans MA, Bast A, Wouters EFM. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:994-1001
26. Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis block micronucleus assay. *Mutation Research* 2002; 504:131-136
27. Kim H et al. Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:483-490

28. Bonassi S et al. Efect of smoking on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from Human MicroNucleus project. Mutation Research 2003; 543:155-166

Tabela 1- Características Basais dos 39 Pacientes com DPOC

Características	MD ± DP	Valor %
Idade, anos	63,33 ± 8,60	
Sexo		
Masculino (n 27)		69,23
Feminino (n 12)		30,77
Tabagismo		84,62
IMC, Kg/m ²	24,48 ± 5,09	
Pack Year, cigarro/ano	52,27 ± 61,40	
Teste de Função Pulmonar		
VEF ₁ , L	1,06 ± 0,55	
VEF ₁ , %	40,17 ± 18,21	
CVF, L	2,25 ± 0,99	
CVF, %	66,00 ± 22,02	
VEF ₁ /CVF, %	56,85 ± 20,97	

* MD ± DP = média ± desvio padrão; IMC = índice de massa corporal; VEF₁ = volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF = capacidade vital forçada.

Tabela 2- Teste da Caminhada dos Seis Minutos (TC6)

Características n(39)	Antes	Depois	Wilcoxon Teste Valor de p
Distância, m	366,84 ± 108,42	400,76 ± 94,55	0,001**
Borg Inicial	1,5 ± 1,46	1 ± 1,12	0,05
Borg Final	3,42 ± 2,72	3,03 ± 0,42	0,52
SpO ₂ Inicial, %	90,74 ± 5,31	90,17 ± 6,77	0,76
SpO ₂ Final, %	88,97 ± 7,66	88,64 ± 7,67	0,77
Trabalho de Caminhada			
DXP, kgKm ⁻¹	24,61 ± 9,85	26,89 ± 9,87	0,005**

* Dados apresentados na forma de média ± desvio padrão; SpO₂ = saturação periférica de oxigênio; D=distância; P=Peso Corporal.

** Significância estatística, p<0,05.

Tabela 3- Questionário de Qualidade de Vida do Hospital Saint George (QQVSG)

Características n(39)	Antes	Depois	Wilcoxon Teste Valor de p
Sintomas	47,05 ± 21,28	35,28 ± 16,92	0,005**
Atividades	62,84 ± 27,07	56,02 ± 24,09	0,038**
Impacto	33,30 ± 18,71	19,97 ± 12,11	< 0,001**
Total	49,41 ± 21,99	37,61 ± 18,96	< 0,001**

* Dados apresentados na forma de média ± desvio padrão; SpO₂ = saturação periférica de oxigênio; D=distância; P=Peso Corporal

** Significância estatística, p<0,05.

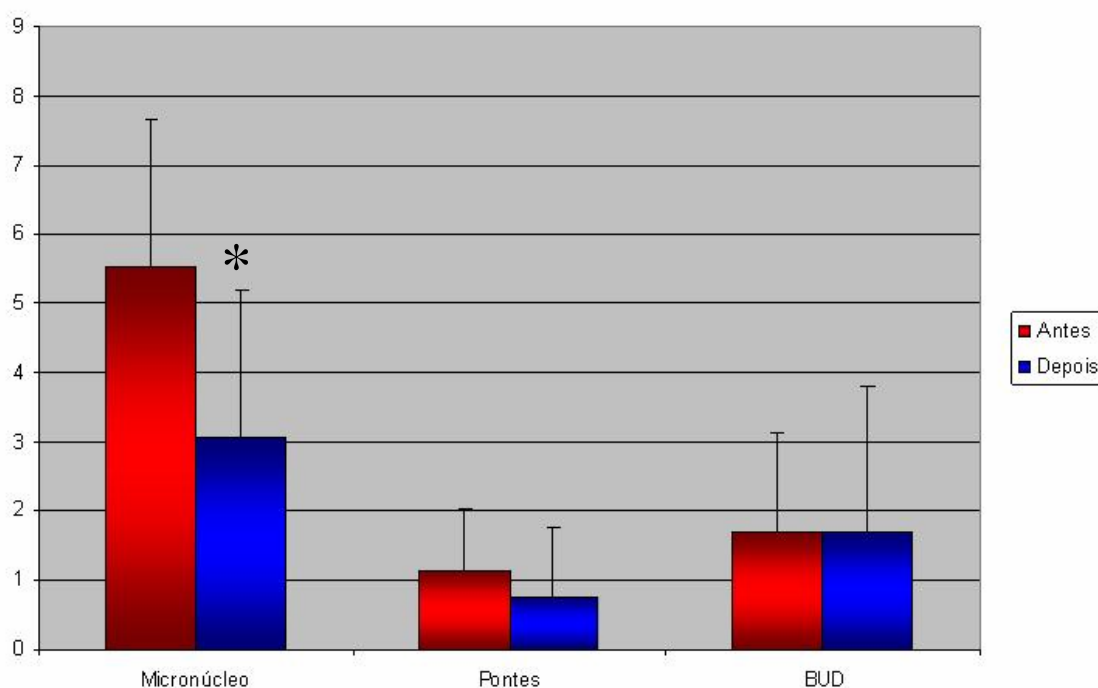


FIGURA 1 – Análise do Dano Genético em 13 pacientes portadores de DPOC antes e depois do PRP
Micronúcleo $p= 0,014$; Pontes $p= 0,244$; BUD $p=0,804$

ARTIGO – VERSÃO EM INGLÊS**Pulmonary rehabilitation reduce DNA damage in patients with COPD**

Luciane Dalcanale Moussalle,^{1,2} Sharbel Weidner Maluf,^{1,3} Luciano Basso da Silva,¹
Cássia Cinara da Costa,^{1,2} Suzana de Fátima Vettorazzi,¹ Paulo José Zimmermann
Teixeira^{1,2}

⁽¹⁾ Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil

⁽²⁾ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Pavilhão Pereira Filho, Santa Casa de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

⁽³⁾ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence to: Paulo José Zimmermann Teixeira

Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, RS 239, 2755

CEP 93352-000, Novo Hamburgo, RS, Brazil

Phone/Fax: 55 51 35885600

E-mail: paulozt@via-rs.net

ABSTRACT

Pulmonary rehabilitation is a treatment supported by level A evidence, and its outcomes are measured by the improvement in physical exercise capacity and quality of life. The objective of this study is to investigate if pulmonary rehabilitation reduces DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease.

DNA damage in peripheral blood lymphocytes was used as an outcome measure in 13 of 39 patients with chronic obstructive pulmonary disease who underwent a 4-month pulmonary rehabilitation program. All patients underwent the 6-minute walk test and answered the Saint George's respiratory questionnaire to assess quality of life. Blood was collected from 13 patients before and after pulmonary rehabilitation program to analyze DNA damage using the micronucleus technique.

After pulmonary rehabilitation program, there was a significant increase in 6-minute walk distance and improvement in all the Saint George's respiratory questionnaire domains. The evaluation of genetic damage revealed a statistically significant decrease ($p = 0.014$) of micronucleus frequency. No significant differences were found in the analysis of nucleoplasmic bridges or nuclear buds.

The decrease of micronucleus frequency demonstrated that PRP not only improved quality of life and performance in work capacity exercises, but also reduced DNA damage.

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease; genomic instability; micronucleus pulmonary rehabilitation program.

INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by chronic airflow obstruction that is not fully reversible. Airflow obstruction is usually progressive and associated with an abnormal lung inflammatory response to inhalation of particles or toxic gases [1,2].

Smoking is the main factor to trigger this inflammatory response. Studies that analyzed smokers' central airways in the absence of established diseases found that T-lymphocytes, particularly CD8⁺ cells, and macrophages are the inflammatory cells found in greater numbers in the airway walls, whereas neutrophils, rare in the bronchial walls, are more frequently detected in the bronchial lumen [3,4]. Neutrophils are the first immunologic system defense cells and a source of reactive oxygen species (ROS), inflammatory cytokines, lipid mediators and antibacterial peptides. They promote the destruction of lung tissue in emphysema, as well as other damages in other diseases, which is more evident in smokers when compared to nonsmokers [5-7].

The balance between oxidation-reduction agents and the antioxidant defense system is essential because these agents are generated endogenously from oxygen (O₂) metabolism or from nonphysiologic events. Cell protection occurs in two ways: (1) detoxification of agents before they cause lesions: reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px) and vitamin E; or (2) repair of an already existing lesion: ascorbic acid, glutathione reductase (GSH-Rd) and GSH-Px. The antioxidant activity of GSH protects the respiratory system. The imbalance between the consumption of GSH and the production of glutathione disulfide (GSSG), its oxidizing agent, leads to oxidative stress. Its magnitude may be monitored using the GSSG/GSH ratio, which indicates potential

cell damage and a dose-response relationship with cigarette smoke extract [4,6-8]. Although increased oxidative stress and reduced antioxidant capacity are associated with the development and progression of COPD [9], a still controversial aspect is whether all patients, or only a certain subgroup, have these reactions and susceptibility. Only 15% of smokers develop COPD, not only by destruction, but also by abnormal amounts and inadequate quality of lung tissue repair [6,10,11].

Of the systemic signs and symptoms of the disease, nutritional depletion and skeletal muscle dysfunction determine intolerance to exercise and add up to ventilatory limitations [12-14]. Pulmonary rehabilitation programs (PRP) improve physical performance, tolerance to exercise, and quality of life of patients with COPD.

The parameters to measure response to PRP are the 6-minute walk test (6MW), which evaluates exercise capacity and improvement of symptoms, and quality of life tests. A recent study suggested that such programs might also reduce the release of reactive oxygen species (ROS) and, consequently, tissue damage caused by ROS [15]. Another study, which reported an increase of the frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes, demonstrated that patients with COPD had greater DNA damage than controls without COPD or any other inflammatory disease [16]. This study analyzed the effects of a pulmonary rehabilitation program on DNA damage using the micronucleus technique (MN).

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

This study was conducted with 39 patients with COPD (69.23% male sex) enrolled in a 4-month pulmonary rehabilitation program of a university center. COPD diagnosis was made according to the criteria established by the Global Initiative for

Chronic Obstructive Lung Diseases (GOLD): clinical history; physical examination; and confirmation by spirometry, which should demonstrate airflow obstruction, defined as the ratio of forced expiratory volume in one second to forced vital capacity (FEV1/FVC) lower than 70% of predicted value after bronchodilator use. All patients had moderate to severe airflow obstruction defined as FEV1 < 60% of predicted value. Thirteen patients were consecutively recruited to have blood samples collected to analyze DNA damage. Patients were excluded if they had other chronic inflammatory diseases or exacerbations, or were not able to complete all the PRP phases.

Methods

All patients underwent the 6-min walk test according to the criteria established by ATS [17]. Results of work of walking [18,19], calculated as the distance x body weight product, were collected, and all patients answered the Saint George's respiratory questionnaire (SGRQ) to assess quality of life. Blood samples were collected from 13 patients, who had no evidence of inflammatory disease, before and after PRP for analysis of DNA damage. This study was approved by the Committee on Ethics and Research of the university center where it was conducted, and all patients signed and informed consent term.

After one week of evaluations, the patients started physical training three times a week and participated, together with their families, in an educational program about their disease. At the end of the 4-month training period, the same evaluation protocol was repeated.

Micronucleus Test Assay (MN)

An aliquot of blood (0.5 ml) was added to 5ml of RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal calf serum and 0.2% phytohemagglutinin. The cells were cultured at 37 °C for 44h, after which 4.5 µg/ml cytochalasin B (CytB, Sigma) was added according to the method described by Fenech and Morley [20] and revised by Fenech [21]. The cell suspension was fixed in 3:1methanol: acetic acid with no hypotonic treatment, and dropped onto clean slides. The slides were then stained with Giemsa. One thousand binucleate cells from each individual were scored for micronuclei, dicentric bridges (nucleoplasmic bridges between daughter nuclei), and nuclear buds (amplified DNA) in coded, unidentified slides. The analysis was conducted in the same institution, in the Cytogenetics Department of the Biomedical Laboratory.

Data are presented as means and standard deviations. The Wilcoxon test for paired samples was used to compare findings before and after PRP.

RESULTS

Baseline data for the 39 study participants consisted of anthropometry and spirometry values and smoking status (Table 1). Of the 39 participants, 69.23% were men. Smoking was reported by 84.62% of the patients, and mean pack years was 52.27±61.40. COPD was moderate to severe, and FEV₁ was 1.06±0.55 L (40.17±18.21% of predicted value). Airflow obstruction was measured by the FEV₁/FCV ratio, and the mean value was 56.85±20.97% of predicted value. Mean BMI was 24.48±5.09 kg/m².

Tables 2 and 3 show the results of 6MW tests and SGRQ analyses before and after PRP. Table 2 (6MW) shows a significant statistical difference in distance walked

(366.84±108.42m [before PRP] vs. 400.76±94.55m [after PRP], $p = 0.001$) and in walk work (24.61±9.85 kgkm⁻¹ [post PRP] vs. 26.89±9.87 kgkm⁻¹ [after PRP], $p = 0.005$). The analysis of SGRQ results (Table 3) showed a significant improvement in all domains: symptoms - 47.05±21.28 [before PRP] vs. 35.28±16.92 [after PRP], $p = 0.005$; activities: 62.84±27.07 [before PRP] vs. 56.02±24.09 [after PRP], $p = 0.038$; impact: 33.30±18.71 [before PRP] vs. 19.97±12.11 [after PRP], $p < 0.001$; total: 49.41±21.99 [before PRP] vs. 37.61±18.96 [after PRP], $p < 0.001$.

The evaluation of genetic damage in the group of 13 patients (Figure 1) showed a statistically significant reduction in frequency of micronuclei (5.53±2.14 [before PRP] vs. 3.07±2.13 [after PRP], $p = 0.0145$). The other two DNA-damage markers, nucleoplasmic bridges and nuclear buds, did not show any statistically significant difference between values measured before and after PRP.

DISCUSSION

This study demonstrated that a 4-month PRP program with physical training reduced DNA damage in patients with COPD, which was detected by a reduction in the frequency of micronuclei. Changes associated with the number of macrophages, neutrophils and CD8+ T lymphocytes, excessive oxidative products and promotion of colony formation by microorganisms interact in the recruitment of proinflammatory cells [22]. These mechanisms correlate with oxidative stress, and an oxidative-antioxidative imbalance may result in DNA damage and skeletal muscle loss and dysfunction caused by stimulation of muscle proteolysis. These changes may be caused by glutathione imbalance and increase of lipid peroxidation [9].

Inflammation and oxidative stress are associated. Some evidence suggests that oxidants have an effect on inflammation, or that inflammation is an inducer of

oxidative stress. Pulmonary inflammation may arise from the response to ROS, which activates transcription of proinflammatory cytokines and chemokine genes and of factors linked to nuclear factor kappa B (NF- κ B) and increases the release of proinflammatory mediators. Another possibility is that initial inflammation, and particularly the activation of mediators such as the tumoral necrosis factor α (TNF- α), increases oxidative stress in several cells and tissues [9,23,24].

Mercken et al. [25] conducted a study with 11 patients with COPD and 11 age-matched healthy individuals, and evaluated the performance of maximum and submaximum exercise in a cycle ergometry test at 60% of peak load. Patients with COPD underwent testing before and after an 8-week PRP. Measurements were made before, immediately after, and 4 hours after the end of each test in both groups. They demonstrated, using a comet assay, that ROS induced DNA damage in mononuclear cells in peripheral blood before rehabilitation. After rehabilitation, there was a decrease in systemic oxidative stress induced by exercise, which may be a consequence of the improvement of tolerance to exercise, greater effectiveness of oxidative metabolism, or improvement of the endogenous antioxidative system. There was no significant change in damage in the control group in either test, which may be explained by the short duration of the test and by the fact that the action of the antioxidant system can block the increase of ROS action.

The comet assay detects changes that can still be repaired and that occurred a short time before collection. In this study, however, we used the micronucleus test, which detects existing nuclear changes that can no longer be repaired and that resulted from intermediate- and long-term events. The reduction in the frequency of micronuclei indicates a decrease in DNA damage. Such decrease is very likely a result of the reduction of oxidative stress and inflammation that are consequences of

a better physical performance, which was indicated by the significant increase in 6MW distance and by a significant improvement in walk work. The frequency of nucleoplasmic bridges was also lower after rehabilitation, but the significance of this decrease was not demonstrated statistically, probably because this is a rare event. Nucleoplasmic bridges originate from dicentric chromosomes formed by breakage and fusion. The centromeres are pulled to the opposite poles of the cell at anaphase, and a bridge is formed [20]. As the frequencies of nucleoplasmic bridges are usually very low, the statistical power of this marker is lower than that of the frequencies of micronuclei. The frequencies of nuclear buds, however, did not seem to change in this study. Buds are formed by gene amplification in response to exposure to genotoxic agents [26]. Therefore, the fact that bud frequencies did not change in our study indicates that this type of response was not different at the two evaluation time points.

The analysis of MN frequency has been used to evaluate the genotoxic effect of cigarettes. Kim et al. [27] reported that a glutathione synthesis inhibitor, buthionine sulfoximine (BSO), significantly increased DNA damage caused by the effect of cigarette smoke extract in 1%, and that N-acetylcysteine (NAC), a precursor of glutathione synthesis, blocked this effect in 5%. In agreement with previous studies about genotoxic effects, Bonassi et al. [28] demonstrated that there was not a substantial increase in MN frequency when smokers and nonsmokers were compared, and that only the group of heavy smokers showed a significant increase of this type of damage measured by MN in lymphocytes. Of the 39 patients with COPD, only two continued smoking. Damage detected before rehabilitation may have originated from persistent inflammation and oxidative stress, as demonstrated in other studies [15].

Our data demonstrates that the analysis of genetic damage may be used as a parameter to assess response in patients with COPD that undergo PRP. Other studies to evaluate DNA damage and oxidative stress should be conducted because therapeutic interventions in COPD require control not only of the pulmonary function and exercise capacity, but also of the systemic component of the disease.

REFERENCES

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2006. <http://www.goldcopd.org>. Date last update: 2006 Date last accessed 22/01/2007.
2. Il Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. *J Bras Pneumol* 2004; 30 (S4): 1s.
3. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1304-1309.
4. Ricciardolo FLM, Di Stefano A, Federica Sabatini F, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 240-252.
5. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax* 2006; 61: 448-454.
6. Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipollini M, Scatena F, Paggiaro P, Celi A, Giuntini C. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: 955-963.
7. Agusti A. Chronic Obstructive Pulmonary Disease – A Systemic Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 478-483.

8. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Bras* 1997; 43: 61-68.
9. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Oxidant Metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 46: 14-27.
10. van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004; 59: 713-721.
11. Cookson WOC. Genetics and genomics of chronic obstructive pulmonary disease. *Am Thorac Soc* 2006; 3: 473-477.
12. Dourado VZ, Tanni SE, Vale AS, Faganello MM, Sanchez FF, Godoy I. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol* 2006; 32: 161-171.
13. Duarte RLM, Paschoal EM. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. *J Bras Pneumol* 2005; 32: 56-65.
14. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Thorac Soc* 2005; 2: 50-60.
15. Mercken EM, Hageman GJ, Schols AM, Akkermans MA, Bast A, Wouters EF. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 994-1001.
16. Maluf SW, Mergener M, Dalcanale L, Costa CC, Pollo T, Kayser M, da Silva LB, Pra D, Teixeira PJ. DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutat Res* 2007; 626(1-2): 180-184.
17. American Thoracic Society - ATS. ATS Statement: Guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 111-117.

18. Chuang ML, Lin IF, Wasserman K. The body weight-walking distance product as related to lung function, anaerobic threshold and peak VO₂ in COPD patients. *Respir Med* 2001; 95: 618-626.
19. Carter R, Holiday DB, Stocks J, Grothues C, Tjep B. 6-Minute walk work capacity in patients with COPD. *Chest* 2003; 123: 1408-1415.
20. Fenech M, Moley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985; 147: 29-36.
21. Fenech M. The cytokinesis micronucleis technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutat Res* 1993; 285: 35-44.
22. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 269-280.
23. Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 95-109.
24. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 38-43.
25. Mercken EM, Hageman GJ, Schols AM, Akkermans MA, Bast A, Wouters EF. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 994-1001.
26. Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis block micronucleus assay. *Mutat Res* 2002; 504: 131-136.

27. Kim H, Liu X, Kobayashi T, Conner H, Kohyama T, Wen FQ, Fang Q, Abe S, Bitterman P, Rennard SI. Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 483-490.
28. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Fenech M, HUMN collaborative group. Effect of smoking on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from Human Micronucleus project. *Mutat Res* 2003; 543: 155-166.

Table 1 – Baseline characteristics of 39 patients with COPD

Characteristics	M±SD	Value %
Age, years	63.33±8.60	
Sex		
Male (n 27)		69.23
Female (n 12)		30.77
Smoking		84.62
BMI, Kg/m ²	24.48±5.09	
Pack year	52.27±61.40	
Pulmonary function		
FEV ₁ , L	1.06±0.55	
FEV ₁ , %	40.17±18.21	
FVC, L	2.25±0.99	
FVC, %	66.00±22.02	
FEV ₁ /FVC, %	56.85±20.97	

*M±SD = mean±standard deviation; BMI = body mass index; FEV₁ = forced expiratory volume in one second; FVC = forced vital capacity.

Table 2 – 6-minute walk test (6MW)

Characteristics	Before	After	Wilcoxon Test
n(39)			p-value
Distance walked (m)	366.84±108.42	400.76±94.55	0.001**
Initial Borg	1.5±1.46	1±1.12	0.05
Final Borg	3.42±2.72	3.03±0.42	0.52
SpO ₂ Initial, %	90.74±5.31	90.17±6.77	0.76
SpO ₂ Final, %	88.97±7.66	88.64±7.67	0.77
Work of walking			
DxW, kgKm ⁻¹	24.61±9.85	26.89±9.87	0.005**

*Data described according to mean±standard deviation; SpO₂ = peripheral oxygen saturation; D = distance walked; W = body weight.

**Statistical significance, p < 0.05.

Table 3 – Saint George’s respiratory questionnaire (SGRQ)

Characteristics	n	Before	After	Wilcoxon Test
(39)				p-value
Symptoms		47.05±21.28	35.28±16.92	0.005**
Activities		62.84±27.07	56.02±24.09	0.038**
Impact		33.30±18.71	19.97±12.11	< 0.001**
Total		49.41±21.99	37.61± 18.96	< 0.001**

*Data described according to mean±standard deviation; SpO₂ = peripheral oxygen saturation; D = distance; W = body weight.

**Statistical significance, $p < 0.05$.

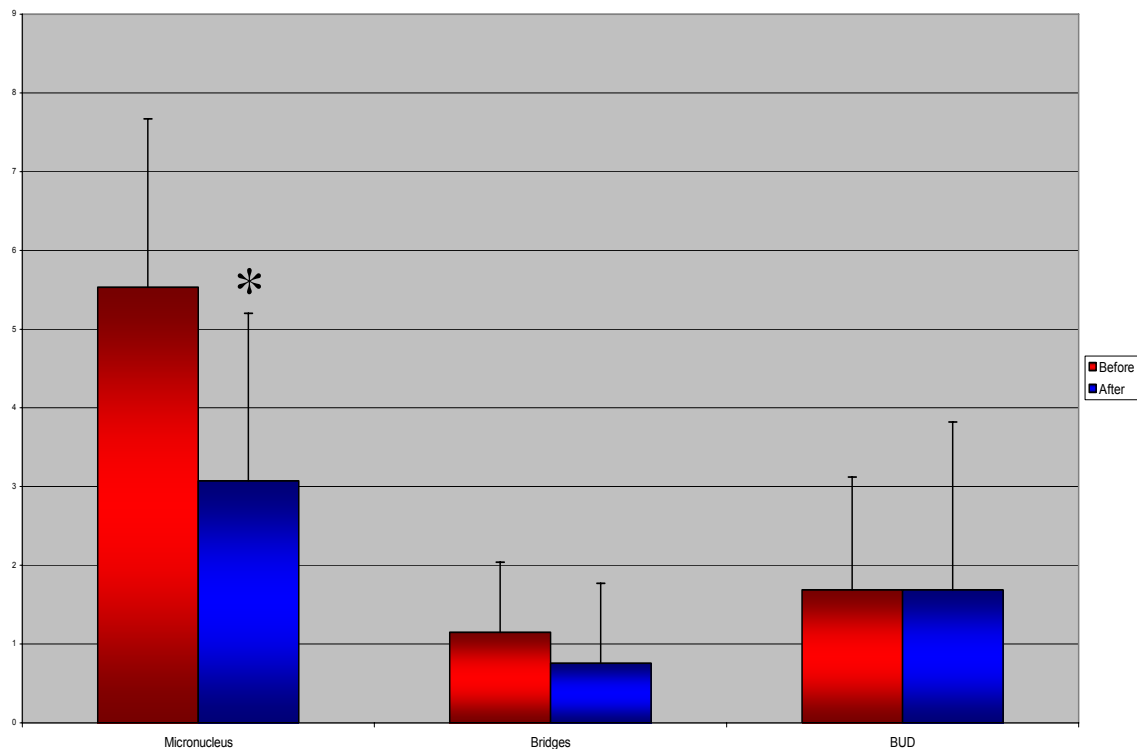


Figure 1 – Analysis of the genetic damage in 13 patients with COPD before and after

PRP – Micronucleus $p = 0,014$; Bridges $p = 0,244$; BUD $p = 0,804$

CONCLUSÃO

Ao término deste trabalho, infere-se que o PRP não somente melhorou a qualidade de vida e o desempenho na capacidade de exercício, corroborando com dados já estabelecidos pela literatura, como também foi capaz de diminuir o dano de DNA demonstrado pela redução na frequência de micronúcleos em 13 pacientes portadores de DPOC de grau moderado a grave, dos 39 pesquisados. Este fato, muito provavelmente, é resultante de uma redução do estresse oxidativo e da condição inflamatória, o que se deve a uma melhor performance física evidenciada pelo significativo aumento na distância percorrida no teste de caminhada dos seis minutos e pela melhora significativa no trabalho de caminhada.

Dessa forma, sugere-se a inserção da análise do dano de DNA pela técnica de MN como nova forma de comprovação de desfecho após a execução do PRP.