



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

MARCELO TROTTE MOTTA

**PRÁTICA REGULAR DO FUTEBOL:
O ALTO RENDIMENTO DESTES ESPORTE ESTÁ
ASSOCIADO A DANOS GENÉTICOS?**

Feira de Santana, BA
2007

MARCELO TROTTE MOTTA

**PRÁTICA REGULAR DO FUTEBOL:
O ALTO RENDIMENTO DESTE ESPORTE ESTÁ
ASSOCIADO A DANOS GENÉTICOS?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eneida de Moraes
Marcílio Cerqueira

Feira de Santana, BA
2007

Dedico este trabalho ao professor e amigo de todas as horas Admilson Santos, e a minha querida orientadora Dra. Eneida que confiou e acreditou na minha capacidade de concretizar esta obra.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me iluminou e orientou para superar as dificuldades que não foram poucas, e me fez acreditar que a finalização seria possível;

Ao meu pai que abraçou minha família me apoiando nos momentos mais difíceis da minha vida;

Aos meus filhos que são a razão de minha vida;

A minha eterna companheira que pacientemente compreendeu e apoiou a minha trajetória;

A Fernanda Kehdy que me ajudou a entender toda teoria experimental desta dissertação;

Aos Professores Elielson Souza Rodrigues; Silvane Maria Braga Santos; José Roberto Cardoso Meireles; João Francisco dos Santos; Elinalva Maciel que me auxiliaram nos experimentos;

Ao meu querido amigo Henrique Celso dos Santos que sempre me auxilia nas correções ortográficas da Língua Inglesa;

A estagiária Manuela Lopes de Andrade Tôrres que atravessou todas as dificuldades experimentais comigo.

RESUMO

A prática de atividade física tem sido estimulada com o objetivo de beneficiar a saúde de seus adeptos. Entretanto, exercícios de alta intensidade induzem ao aumento dos processos oxidativos que ocorrem nas mitocôndrias, resultando, em consequência, na liberação de espécimes reativos de oxigênio, reconhecidamente capazes de induzir danos ao DNA. Este estudo objetiva identificar os danos cromossômicos em jogadores de futebol durante os jogos e no programa de treinamento físico-técnico através do Teste de Micronúcleo em linfócitos de acordo com protocolo sugerido por Fenech (2000). A amostra analisada incluiu três grupos de estudo: Grupo I, constituído por 15 jogadores de futebol, submetidos a regime intenso de treinamento; Grupo II, formado por 18 indivíduos que regularmente desenvolvem atividade física e Grupo III composto por 19 indivíduos com estilo de vida sedentário. A análise estatística dos resultados considerando o número de micronúcleos observado no total de células analisadas não revelou diferença significativa quer quando considerado o número absoluto de células com micronúcleos, quer considerando o número médio: $\chi^2=0,3603$; G.L.=2; $p> 0,70$ e $F_{2,49} = 0,1185$; $p= 0,8887$, respectivamente. Os resultados obtidos nestas condições experimentais não evidenciam o potencial da análise de micronúcleos para o biomonitoramento de indivíduos submetidos a exercícios intensos e ressaltam a necessidade de estudos adicionais antes que este *endpoint* citogenético venha a ser utilizado como biomarcador de risco.

Palavras-chave: Radicais livres. Micronúcleos. Danos ao DNA. Futebol.

ABSTRACT

Although physical training has been encouraged as a health-promoting activity, high intensity exercises lead to increased oxidative processes taking place in the mitochondria, thus generating reactive oxygen species, known for inducing DNA damage. This study is aimed at identifying the chromosomal damage in soccer players both during the games and in their physical and technical training programs by means of the Micronucleus Test for lymphocytes following the protocol proposed by Fenech (2000). The sample consisted of three groups: Group I, comprising fifteen soccer players under an intense physical training schedule; Group II, composed of 18 subjects performing physical activities on a regular basis; and Group III with 19 sedentary subjects. The statistical analysis of the number of micronuclei found in the total amount of cells under investigation did not present any significant differences either in the absolute number of cells with micronuclei or in their mean number: $\chi^2=0.3603$; G.L.=2; $p> 0.70$ and $F_{2,49} = 0.1185$; $p= 0.8887$, respectively. Results in this experiment conditions do not show the potential for micronucleus analysis to biomonitor subjects under intense physical training and point out the need for further studies before this cytogenetic endpoint becomes a risk biomarker.

Keywords: Free radicals. Micronuclei. DNA damage. Soccer.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 08 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 2.1 | Prática Regular da Atividade Física e da Saúde Humana | 12 |
| 2.1.1 | Considerações Gerais | 12 |
| 2.1.2 | Atividade Física e Doenças Cardiovasculares | 13 |
| 2.1.3 | Atividade Física e Doenças Metabólicas | 15 |
| 2.1.4 | Atividade Física e Câncer | 18 |
| 2.2 | O Exercício Físico e o Estresse Oxidativo | 21 |
| 2.2.1 | Considerações Gerais | 21 |
| 2.2.2 | Geração de Radicais Livres Conseqüentes ao Estresse Oxidativo | 22 |
| 2.2.3 | Mecanismos de Defesa Antioxidante | 23 |
| 2.2.4 | O Estresse Oxidativo e a Prática do Futebol Profissional | 24 |
| 2.3 | Danos Genéticos Conseqüentes ao Estresse Oxidativo | 25 |
| 2.4 | Danos Genéticos e o Câncer | 26 |
| 2.5 | Marcadores de Danos Citogenéticos: O Teste de Micronúcleo em Linfócitos pelo Bloqueio da Citocinese | 28 |
| 3 | OBJETIVOS | 31 |
| 4 | METODOLOGIA | 32 |
| 4.1 | Caracterização da Amostra | 32 |
| 4.2 | Coleta do Matreial e Coleta de Linfócitos | 32 |
| 4.3 | Análise Citogenética | 33 |
| 4.4 | Análise Estatística | 35 |
| 4.5 | Aspectos Éticos | 35 |
| 5 | RESULTADOS | 36 |
| 5.1 | Amostra Analisada | 36 |
| 5.2 | Características da Amostra | 36 |
| 5.2.1 | Idade | 36 |
| 5.2.2 | Prática do Exercício Físico | 37 |
| 5.2.3 | Hábito de Fumar | 38 |
| 5.2.4 | Hábito de Ingerir Bebidas Alcoólicas | 38 |
| 5.3 | Análise Citogenética | 39 |
| 5.3.1 | Ocorrência de Micronúcleos na Amostra Total e Distintos Grupos | 39 |
| 5.3.2 | Ocorrência de Micronúcleos em Função da Idade | 40 |
| 6 | DISCUSSÃO | 41 |
| 6.1 | Considerações Gerais | 41 |
| 6.2 | Ocorrência de Micronúcleos em Função da Atividade Física | 42 |
| 6.4 | Considerações Finais | 45 |
| 7 | CONCLUSÕES | 46 |
| | REFERÊNCIAS | 47 |
| | ANEXOS | 69 |

1 INTRODUÇÃO

A revolução industrial introduziu expressiva mudança no estilo de vida dos integrantes das sociedades ocidentais, mudanças essas que foram se acentuando no decorrer do tempo até os dias atuais. As atividades associadas ao esforço físico requerido para a realização de trabalhos característicos das economias rurais, foram paulatinamente substituídas nas populações urbanas por atividades em que o esforço físico perdeu sua preponderância e o sedentarismo passou a ser a tônica. A falta de atividade física, associada à competitividade das modernas sociedades, provavelmente contribuiu para a construção de populações em que a ansiedade e o estresse comprometem a qualidade de vida (POLLOCK ; WILMORE, 1993; FOSS et al., 2000; WILMORE ; COSTILL, 2001; MCARDLE et al., 2003; CONTI et al., 2007)

A relação entre prática de atividade física e promoção da saúde tem amplo registro na literatura e remonta a estudos epidemiológicos desenvolvidos ainda na década de quarenta, quando foi estabelecida a associação entre doenças crônicas degenerativas e estilo de vida. Nas últimas três décadas do século XX diversos estudos mostraram que altos níveis de atividade física, com conseqüente aumento da aptidão física, estão associados à diminuição no risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana, diabetes, hipertensão, obesidade e osteoporose (PAFFENBARGER, 2001; PITANGA, 2002; CONTI et al., 2007). Apesar do grande número de estudos que apontam para a redução nos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e endócrinas, Mctiernan (2003) chama atenção para a escassez de estudos que evidenciem uma relação entre câncer e prática de exercício físico.

Segundo Jennen; Ulenbruck (2004), os treinamentos físicos moderados, particularmente os exercícios de endurance, têm efeito preventivo não apenas nas doenças cardiovasculares, mas, também, sobre o câncer além de desempenharem importante papel na reabilitação dos indivíduos acometidos por estas doenças.

Alguns estudos epidemiológicos revelam que o aumento da prática da atividade física está associado com risco diminuído para câncer de mama e câncer de cólon (MCTIERNAN, 2003; DALLAL, 2007; SPRAQUE, 2007) e em estudo realizado por Irwin e outros. (2004) foi observada associação entre obesidade, baixos níveis de atividade física e risco elevado de câncer.

Em outros estudos, entretanto, foi mostrado que a prática de exercício físico, principalmente quando feito em alta intensidade, induz à ocorrência de danos genéticos os quais, por sua vez, associam-se ao processo de transformação maligna (HARTMANN et al., 1994; SCHIFFL; ZIERES; ZANKL, 1997; WIERZBA, et al., 2006).

Segundo Mctiernan (2003), dados precisos sobre a influência do tempo gasto no desenvolvimento de atividade física, bem como sobre o tipo e intensidade do exercício necessário para prevenção do câncer ainda não estão disponíveis, uma vez que os dados da literatura são conflitantes. Westerlind (2003) chama a atenção para a necessidade crescente de realização de estudos que avaliem o potencial do exercício físico em inibir ou favorecer o desenvolvimento do câncer. O que este autor questiona é: “Quais seriam as sobrecargas (volume e intensidade do exercício) efetivas em exercer um efeito protetor e em que níveis a prática do exercício físico propiciaria o desenvolvimento do câncer?”.

Esses questionamentos têm fundamento no fato de que o exercício promove estresse oxidativo com conseqüente aumento dos radicais livres (WESTERLIND, 2003; BRIVIBA, et al., 2005; NIKOLAILDIS, et al., 2007).

Segundo Inal e outros (2001) os radicais livres são essenciais para muitos processos biológicos normais, mas, podem levar a efeitos indesejáveis se sua produção não for controlada. O número elevado de espécimes reativos de oxigênio que são gerados pode potencialmente resultar em danos para lipídios, proteínas e DNA (WESTERLIND, 2003; BRIVIBA, et al., 2005; DAVISON, et al., 2005).

Espécimes reativos de oxigênio causam lesões e quebras no DNA e foram identificados em associação com muitas doenças em humanos (YU ; ANDERSON, 1997; APOR ; RADI, 2006; WIERZBA, et al., 2006). O potencial mutagênico dos radicais livres de oxigênio e sua relação com o desenvolvimento de câncer foram evidenciados por Dreher ; Junod (1996).

O corpo humano tem reservas antioxidantes adequadas para enfrentar a produção de radicais de oxigênio sob condições fisiológicas, todavia, quando a produção é excessiva, estas reservas não são suficientemente efetivas podendo assim ser gerados danos celulares e teciduais (WESTERLIND, 2003; FLORA, 2007).

O acúmulo de danos ao DNA, conseqüente ao “esgotamento” das reservas antioxidantes ou a falhas em seus mecanismos de reparo, pode culminar na ocorrência de mutações gênicas ou de alterações cromossômicas que

comprometam o funcionamento de genes envolvidos com o reparo do DNA ou com o controle da proliferação e diferenciação celular, podendo levar ao desenvolvimento de câncer. Danos genéticos resultantes do estresse oxidativo têm sido também associados ao envelhecimento e a anormalidades do sistema nervoso (FENECH, 2000; CLAYCOMBE ; MEYDANI, 2001; PERRY et al., 2007).

Uma vez que a relação entre danos genéticos e câncer está bem estabelecida, o biomonitoramento de populações sob risco de maior ocorrência destes danos é um passo importante na prevenção dessa doença (STOPPER ; MULLER, 1997; FENECH, 2007). Entre os testes citogenéticos que têm sido utilizados para o biomonitoramento de populações humanas, destaca-se o Teste de Micronúcleo, realizado em linfócitos ou em células epiteliais esfoliadas (STICH; CURTIS; PARIDA, 1982; FENECH, 2000; FENECH et al., 2003; FENECH, 2007).

Micronúcleos são estruturas delimitadas por membrana, de constituição similar à do núcleo e dele distintamente separadas. Eles são formados por exclusão de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que, durante a divisão celular, falham em sua ligação ao fuso e, assim não são incluídos no núcleo das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas (FENECH et al., 1997; STOPPER ; MULLER, 1997; ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA ; PATIÑO, 2005; MATEUCA et al., 2006).

Além de micronúcleos, em preparações para o seu estudo é possível observar alterações nucleares outras que são também indicativas de genotoxicidade, a exemplo de pontes nucleoplasmáticas (indicadoras da presença de cromossomos dicêntricos), condensação da cromatina e cariorréxis (relacionadas a apoptose). A presença de células exibindo citoplasma pálido, com numerosos vacúolos e danos nas membranas citoplasmática e nuclear (indicativos de necrose), sugere citotoxicidade (FENECH, 2000).

A ocorrência de micronúcleos em linfócitos circulantes, relacionada à prática de exercício físico foi avaliada por Schiffli; Zieres e Zankl (1997). Estes autores mostraram que os exercícios físicos exaustivos aumentam a frequência de micronúcleos, evidenciando, assim, os efeitos genotóxicos do estresse oxidativo induzido pelo excesso da atividade física. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Hartmann e outros (1994), que evidenciaram a ocorrência de danos ao DNA em consequência do exercício físico utilizando o Teste Cometa.

A prática intensa de exercícios físicos é desempenhada por atletas de diversas modalidades esportivas, destacando-se entre elas o futebol. Em atletas de elite do futebol, a duração do exercício em alta intensidade no decorrer dos 90 minutos de uma partida é estimada em sete minutos, o que corresponde a 8% do tempo total de jogo, incluindo cerca de 19 corridas intensas com duração média, cada uma, de dois segundos (BANGSBO, 1994). Apesar da dificuldade em mensurar a contribuição das vias aeróbias durante uma partida de futebol é estimado que a contribuição desta via seja em média de três litros de oxigênio consumidos por minuto (KAWAKAMI et al., 1992; HELGERUD et al., 2001; HOFF et al., 2002; IMPELLIZZERI; RAMPININI; MARCORA, 2005).

Tendo em vista a prática intensa de exercício físico necessária ao desempenho dos atletas de futebol, e levando em conta o potencial do estresse oxidativo em lesar o DNA, foi avaliado, no presente estudo, a possibilidade de ocorrência de danos cromossômicos em atletas do futebol baiano, devido a produção de radicais livres.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PRÁTICA REGULAR DE ATIVIDADE FÍSICA E SAÚDE HUMANA

2.1.1 Considerações Gerais

A história da evolução humana está obviamente atrelada a mudanças profundas nos hábitos de vida, que se fizeram sentir desde a pré-história até a atual era, com reflexo também nos padrões de atividade física (POLLOCK ; WILMORE, 1993; FOSS et al., 2000; WILMORE ; COSTILL, 2001; PAFFENBARGER, 2001; MCARDLE et al., 2003; CONTI et al, 2007)

De acordo com o *American College Sport of Medicine* (ACSM) (2003), o termo atividade física se refere a “Qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que resulta em dispêndio de energia”, incluindo tanto atividades ocupacionais quanto aquelas de lazer. O termo exercício é definido como “O movimento corporal planejado, estruturado e repetitivo executado com a finalidade de melhorar ou manter um ou mais componentes de aptidão física”

A importância da atividade física para a saúde e longevidade vem sendo discutida desde tempos que se perdem na memória. Tanto Hipócrates (460-377 aC) quanto Galeno (129-199 dC) consideravam que a falta ou a prática excessiva de atividade física era danosa à saúde (BERRYMAN, 1989; CONTI et al., 2007). A este respeito, Paracelso (1493-1541) também supunha que substâncias e hábitos excessivos (incluindo ingestão de alimentos, uso de remédios, bebidas alcólicas e exercícios físicos), poderiam atuar como veneno (apud PAFFENBARGER, 2001).

A Revolução Industrial, acontecida no século XIX, se fez acompanhar de marcante mudança no estilo de vida das populações em que seus efeitos se fizeram sentir. É a partir daí que os efeitos da atividade física começam a ser avaliados mais objetivamente, sendo adotado para tal a quantificação numérica (PARK, 1997; CONTI et al., 2007). Segundo Park (1997) foi em meados daquele século que a ciência do exercício teve origem.

2.1.2 Atividade Física e Doenças Cardiovasculares

Segundo Lee; Sesso e Paffenbarger (2000); Conti e outros (2007); Lanas e outros. (2007) são consistentes e inegáveis os benefícios que a prática de atividade física exerce sobre o sistema cardiovascular.

Provavelmente o primeiro relato dos efeitos do exercício físico sobre a doença coronariana foi feito por William Heberden em 1772 (apud PAFFENBARGER, 2001).

No século XX, mais precisamente após a segunda Guerra Mundial, tiveram início investigações buscando estabelecer a relação entre a prática de atividade física e doença cardiovascular, destacando-se entre elas diversos estudos conduzidos por Morris, em Londres. Foi ainda em 1953 que Morris e outros. aventaram a hipótese de que indivíduos cuja profissão estava associada a trabalho fisicamente ativo eram menos susceptíveis à doença coronariana do que aqueles ocupacionalmente sedentários. Em um outro estudo, Morris e outros. (1966) avaliaram a incidência e a gravidade de doença coronariana entre cobradores e motoristas de ônibus de dois andares da cidade de Londres e os resultados obtidos sugeriram efeito protetor da movimentação associada ao trabalho dos cobradores. Resultado semelhante foi obtido por esses autores quando feita a mesma avaliação em carteiros, telefonistas e funcionários públicos com atividade sedentária, reforçando a hipótese de que o trabalho ativo exerce efeito protetor sobre a doença coronariana. Adicionalmente, foi também observado que nos cobradores e carteiros com história de doença coronariana, esta teve início mais tardiamente e seu desenvolvimento foi menos severo.

Muitos outros estudos evidenciaram a contribuição da atividade física na redução dos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SLATERRY et al., 1989; WANNAMETHEE; SHAPER ; WALKER, 2000; LEE et al., 2003; IWASAKI et al., 2003; ROBERT ; BARNARD, 2005; CONTI et al., 2007; LANAS et al., 2007).

De acordo com Slaterry e outros (1989) pessoas que são fisicamente inativas apresentam maiores níveis de hipertensão arterial, excesso de peso corporal e menores níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL), enquanto que as pessoas que são fisicamente ativas são menos propensas à depressão, ansiedade e estresse quando comparadas com pessoas sedentárias.

No desenvolvimento do *Stanford Coronary Risk Intervention Project* foram avaliados os efeitos tanto da dieta quanto do exercício físico na redução de

lipoproteínas associadas ao desenvolvimento da doença coronariana. No desenho deste projeto os portadores de doença coronariana foram submetidos a uma dieta com baixo teor de gorduras, incluindo o colesterol (reduzido a 75mg diários). Além da dieta, os indivíduos foram submetidos à atividade física diária. Os resultados mostraram um aumento nos níveis de HDL, uma redução de 20% nos níveis de triglicérides, de 4% no peso corporal e houve também um aumento superior a 20% na capacidade de se exercitar (HASKELL et al., 1994).

A identificação de fatores, a exemplo do exercício físico, que exerçam efeito protetor no desenvolvimento da doença coronariana é de grande importância para sua prevenção (RODRIGUES et al., 1994; CONTI et al., 2007; KALKA; SOBIESZCZAŃSKA; MARCINIAK, 2007; LANAS et al., 2007). Neste início do século XXI, em sociedades ocidentais, as doenças cardiovasculares; a diabetes tipo II; as síndromes metabólicas e o câncer são as principais causas de morte e estão progressivamente aumentando em frequência nos países em desenvolvimento (ROBERTS ; BARNADS, 2005; DE FLORA et al., 2005).

Dentre as doenças cardiovasculares, a aterosclerose figura como a principal causa de morte nos países desenvolvidos desde o começo do século XX, tendo sido responsável por um número superior a 700.000 mortes nos Estados Unidos em 1996, e em 2001 por 931.108 mortes, constituindo aproximadamente 39% de todas as mortes que ocorreram neste país (SESSO; PAFFENBARGER; LEE , 2000; ROBERTS ; BARNARD, 2005; DE FLORA et al., 2005).

A hipertensão afeta duas em cada 10 pessoas, principalmente aquelas que se encontram na meia idade (LIDEN, 2000). O aumento dos níveis da pressão arterial constitui-se em importante fator de risco para as doenças cardiovasculares, aumentando em 2 a 3 vezes o risco de infarto do miocárdio e em 4 vezes a ocorrência de insuficiência cardíaca (PORTO, 1998; BALAQUER, 2004; SKRTIC et al., 2006). Aliado a estes riscos existe a alta prevalência dessa doença que encontra-se em proporções epidêmicas. Assim sendo, a hipertensão é mais um fator que contribui para o quadro de que quase metade das mortes que ocorrem nos países desenvolvidos deve-se às doenças cardiovasculares (ANTIC et al., 2003; BALAQUER, 2004; MIERES, 2006).

Estudos epidemiológicos indicam que a hipertensão pode desencadear, além das doenças cardiovasculares, derrames cerebrais, doenças renais, distúrbios oculares e edema pulmonar (WHELTON et al., 2002; ROBERT ; BARNARD, 2005;

GANDJOUR ; STOCK, 2007; ISRAILI; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; VALASCO, 2007).

Segundo Antic e outros (2003) a hipertensão pode ser considerada uma doença do mundo moderno, pois nas denominadas populações primitivas não existem relatos de qualquer prevalência desta enfermidade nem de aumento na pressão arterial relacionado com a idade.

Uma possível explicação para relacionar o estilo de vida e a hipertensão fundamenta-se nas possíveis práticas regulares de atividade física que faziam parte do cotidiano das populações primitivas além de uma dieta pobre em sódio e de baixa quantidade de gordura. A adoção de um estilo de vida sedentária, comum nas civilizações ocidentais modernas, contribuiu sem dúvida para o aumento na prevalência desta doença (PAVAN et al., 1999; GASPERIN, 2006; ISRAILI; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; VALASCO, 2007).

De acordo com Antic e outros. (2003), distúrbios metabólicos tais como altos níveis de leptina, de ácidos graxos livres e insulina podem estimular o sistema nervoso simpático levando à vasoconstrição. Além disto, disfunção endotelial e resistência à insulina induzidas por obesidade podem potencializar a resposta vasoconstrictora e, finalmente, pode haver um aumento da reabsorção tubular renal de sódio em consequência do aumento na atividade do nervo simpático renal, também pelo efeito direto da insulina e/ou hiper-atividade do sistema renina angiotensina.

2.1.3 Atividade Física e Doenças Metabólicas

Várias são as condições metabólicas que podem ser beneficiadas com a adoção do exercício físico, a exemplo da obesidade e da diabetes tipo II (ANTIC et al., 2003; HOUMARD, 2004; BASSUK ; MANSON, 2005; HIIL ; WYATT, 2005; La MONT et al., 2005; PARK et al., 2007; SATO, 2007).

Obesidade é definida como excesso de gordura acumulada no tecido adiposo, localizado ou generalizado, causado por uma série de fatores associados aos aspectos ambientais e/ou endócrinos-metabólicos (GUEDES ; GUEDES, 1998; POLLOCK ; WILMORE, 1993; FOSS et al., 2000; WILMORE ; COSTILL, 2001; MCARDLE et al., 2003). A obesidade é precedida pela condição de sobrepeso, definida como a proporção relativa de peso maior que o desejável para a altura, sem

que tenham ocorrido alterações significativas na composição corporal (CLAO, 1998; POLLOCK ; WILMORE, 1993; FOSS et al., 2000; WILMORE ; COSTILL, 2001; MCARDLE et al., 2003).

Obesidade e sobrepeso são inferidos através do índice de massa corporal (IMC), obtido pela divisão do peso em Kg pelo quadrado da altura (P/H^2). Os indivíduos que apresentam valores de IMC entre 18,5 e 25,0 kg/m^2 são considerados de peso normal, aqueles com IMC maior que 25,0 e menor do que 30,0 kg/m^2 são considerados como tendo sobrepeso e aqueles cujo IMC é igual ou maior que 30,0 kg/m^2 são classificados como obesos (ANTIC et al., 2003; HILL ; WYATT, 2005).

Segundo Hill ; Wyatt (2005), atualmente, o quadro de obesidade nos Estados Unidos é epidêmico abrangendo cerca de 25% da população, cujo percentual de sobrepeso é de 35%. De acordo com Kopelman, (2000) a prevalência de obesidade não é um fato exclusivo dos países desenvolvidos, havendo uma tendência em seu crescimento também nos países em desenvolvimento (SICHIERI; NASCIMENTO; COUTINHO, 2007)

O ganho de peso que resulta em sobrepeso ou obesidade pode ser consequência de um desequilíbrio entre a ingesta calórica e o gasto energético diário, ou seja, os indivíduos ingerem uma quantidade maior de calorias, através de sua alimentação, do que a quantidade que consomem diariamente. Conseqüentemente, estes indivíduos podem aumentar em 450g a 900g o seu peso corporal em um ano (HILL ; WYATT, 2005)

A obesidade, per se, é fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, exercendo efeito adicional sobre os níveis de pressão arterial como já comentado. Indivíduos obesos são afetados com maior freqüência por distúrbios metabólicos (dislipidemias e diabetes), que se constituem em fatores de risco para doenças cardiovasculares (ANTIC et al., 2003; BIANCHI et al., 2007; KASHYAP ; DEFRONZO, 2007).

Sem nenhuma dúvida, a prática de atividade física é uma das medidas mais efetivas na prevenção e controle da obesidade (AGGOUN, 2007; BIANCHI et al., 2007; PARK et al., 2007; SATO, 2007) . Os benefícios dessa prática têm sido destacados em muitos estudos epidemiológicos apontando para o fato de que indivíduos que são fisicamente ativos ganharão menos peso do que aqueles que não o são (WILLIAMSON et al., 1993; HAAPANEN et al., 1997; AGGOUN, 2007; BIANCHI et al., 2007; PARK et al., 2007; SATO, 2007).

Williamson e outros (1993) mostraram que o aumento de peso entre indivíduos com pouca atividade física foi da ordem de 3 a 4 vezes superior ao observado entre aqueles que eram fisicamente ativos.

Haapanen e outros (1997) realizaram no período de 10 anos estudo em que foram acompanhados 2564 homens e 2695 mulheres, classificados em três categorias: fisicamente ativos e de forma regular; ativos (porém não de forma regular) e inativos. Os resultados obtidos mostraram que os indivíduos inativos e os pouco ativos ganharam peso, entretanto, o grupo ativo de forma regular manteve ou até mesmo perdeu peso.

Outra doença metabólica cuja prevalência vem aumentando significativamente em quase todos os países é a diabetes. O número de casos em 1995 era de aproximadamente 135 milhões, e é calculado que em 2025 este número alcance cerca de 300 milhões de casos em todo o mundo (KING et al., 1998).

Nos Estados Unidos, durante o biênio 1999 - 2000 aproximadamente 16,7 milhões de indivíduos eram portadores de diabetes (COWIE et al., 2003) e foi estimado que aproximadamente 95% dos casos da doença neste país são devidos ao diabetes do Tipo II (HARRIS, 1995; BASSUK ; MANSON, 2005).

A diabetes tem destacada importância na relação de morbidade e mortalidade decorrentes das doenças cardiovasculares, uma vez que pode aumentar o risco de desenvolvimento de doenças coronarianas em três a sete vezes entre as mulheres e de duas a três vezes entre os homens (BASSUK ; MANSON, 2005; BARTELS; DAVIDSON; GONG, 2007).

Sua etiologia fundamenta-se em processos multifatoriais complexos, que incluem determinantes de ordem genética e fatores relacionados ao estilo de vida, apresentando como característica comum aos portadores a hiperglicemia, resultante de distúrbios na secreção de insulina pelas células das ilhotas de Langerhans ou da incapacidade de absorção deste hormônio pelas células alvo (LAMONTE; BLAIR; CHURCH., 2005).

De acordo com Morrato e outros. (2007) a atividade física pode retardar o início e a progressão da diabetes tipo II e as possíveis seqüelas cardiovasculares devido aos efeitos favoráveis sobre o peso corporal, sensibilidade à insulina, controle glicêmico, pressão arterial e perfil lipídico.

A partir deste pressuposto é considerado que o estilo de vida sedentário deve ser visto como um fator de risco modificável para diabetes tipo II, uma vez que a

atividade física propicia benefícios aos portadores da doença ao contribuir para reduzir os riscos cardiovasculares e as alterações metabólicas naqueles que adotam regularmente essa prática (BASSUK ; MANSON, 2005; JACOBS et al., 2007; MORRATO et al., 2007).

Há registro na literatura de que nos indivíduos com baixos níveis de aptidão física os riscos de ocorrência de diabetes estão aumentados e que o aumento nas práticas regulares de atividade física é efetivo na prevenção da diabetes não-insulino dependente (HELMRICH; RAGLAND; PAFFENBARGER, 1994; BASSUK ; MANSON, 2005; JACOBS et al., 2007; MORRATO et al., 2007; TOLEDO et al., 2007).

2.1.4 Atividade Física e Câncer

Estudos epidemiológicos apontam o câncer como a segunda causa de mortalidade no mundo, com uma estimativa de mais de seis milhões de mortes a cada ano, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (PARKIN et al., 2001; GALLO et al., 2005; PARKIN et al., 2005).

A prevalência do câncer tem aumentado significativamente em todo o mundo, particularmente nos países desenvolvidos. A estimativa da incidência, prevalência e mortalidade de câncer em todo o mundo no ano de 2002 mostrou um total de 10,9 milhões de novos casos; 6,7 milhões de mortes e 24,6 milhões de indivíduos com a doença (PARKIN, 2001; PARKIN et al., 2005).

No Brasil, o câncer constitui a segunda causa de morte por doença. Em 1930, representava menos de 3% dos óbitos; em 1989, passou a representar 12%, sendo estimado que no ano de 2020 pelo menos 15 milhões de indivíduos estarão sob alto risco para o desenvolvimento desta doença (BRASIL, 1996; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Estimativas sobre a incidência por câncer nesse país, publicadas em 2005 pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) do Ministério da Saúde, previam para 2006 o acometimento de 472.050 pessoas (234.570 homens e 237.480 mulheres), sendo previstos 74.770 casos novos para a região nordeste (BRASIL, 2005).

Diversos são os fatores que têm contribuído para o aumento na incidência de câncer incluindo-se entre eles a urbanização; a industrialização; a exposição freqüente a uma gama de agentes com potencial mutagênico e/ou carcinogênico,

além do aumento nas taxas de sobrevivência observado em muitas populações (BELKIC ; NEDIC, 2007; SMITH, 2007).

Associação entre o aumento do risco de câncer e estilo de vida tem sido observada principalmente durante as duas últimas décadas (DARGA et al., 2007; SOLERA et al., 2007). O estilo de vida sedentário, como já comentado, está intimamente relacionado ao desenvolvimento da obesidade e do sobrepeso, condições estas que, por sua vez, estão associadas com risco elevado de cânceres de cólon, mama, endométrio, esôfago, pâncreas e rim (MCTIERNAN, 2003; DARGA et al., 2007).

Estudos epidemiológicos mostram a relação dos possíveis benefícios promovidos pela atividade física em relação ao risco diminuído de câncer de mama e câncer de cólon (BYERS et al., 2002; LEE et al., 2003; KRUK, 2007).

Apesar das evidências sugerindo que a atividade física regular promove um declínio no risco de alguns cânceres, a exemplo dos tumores malignos de mama como já citado, os mecanismos envolvidos no efeito protetor e na inibição de seu desenvolvimento relacionados com a prática regular de atividade física ainda não são inteiramente conhecidos (MCTIERNAN, 2003; WESTERLIND, 2003; RUNDLE, 2005; KRUK, 2007).

Um dos possíveis efeitos da atividade física na redução dos riscos de desenvolvimento de câncer está relacionado com a diminuição dos níveis de esteróides sexuais circulantes, hormônios esses associados com o desenvolvimento de cânceres reprodutivos em homens e mulheres o que provavelmente se deve aos seus potentes efeitos mitogênicos, estimulando a proliferação celular (WESTERLIND, 2003; CAMPBELL et al., 2007; TWOROGER et al., 2007). Segundo Pike e outros (1993) e Muti e outros (2006) estrógeno e progesterona são fortes estimuladores de atividade mitogênica na mama e conseqüentemente sua redução na circulação está associada com atividade proliferativa diminuída.

Associação entre níveis reduzidos de progesterona e estrógeno relacionados à prática de exercícios físicos em mulheres adultas antes da menopausa foi relatada por Bullen e outros (1985) e Tworoger e outros (2007)

Nos homens que são submetidos ao exercício, foi mostrado que pode haver diminuição nos níveis circulantes de andrógenos, alteração esta denominada “efeito depressivo do exercício” (HACKNEY; PREMO; MCMURRAY, 1995; HACKNEY, 1996; HACKNEY; SZCZEPANOWSKA; VIRU, 2003).

Na busca por medidas preventivas efetivas, é recomendada a prática do exercício físico em tempo precoce, adotando-se para crianças e adolescentes uma carga de exercício com intensidade moderada ou mais intensa pelo menos durante 30 minutos por dia, na frequência de cinco dias por semana. Para os adultos é recomendado o exercício moderado ou de maior intensidade durante 60 minutos, cinco dias por semana com o objetivo de manter o índice de massa corporal abaixo de 25 kg/m^2 , buscando uma relação de proteção contra vários cânceres (MCTIERNAN, 2003).

Segundo Baldwin; Snow e Febbraio (2000), respostas hormonais, cardiovasculares e metabólicas ao exercício diferem entre indivíduos treinados e destreinados durante um exercício de mesma intensidade. Desta maneira, o tipo; o volume e a intensidade de atividade física necessários para o alcance de possíveis benefícios no que diz respeito ao câncer são difíceis de estabelecer (MCTIERNAN, 2003).

Apesar das muitas evidências que apontam para os benefícios da atividade física na redução dos riscos de alguns tipos de câncer, em alguns estudos foi relatada maior ocorrência de lesões no DNA em decorrência da atividade física exacerbada o que certamente está relacionado com a liberação de espécimes reativos de oxigênio conseqüentes à maior atividade metabólica mitocondrial (MASTALOUDES et al., 2001; DROGE, 2002; BRIVIBA, et al., 2005; WIERZBA et al., 2006).

É sabido que o consumo de oxigênio durante os exercícios físicos intensos aumenta em até 20 vezes os valores registrados no repouso (PETERSEN et al., 2001; FATOUROS et al., 2004; WIERZBA et al., 2006).

A elevação no consumo de oxigênio aumentará a transferência de elétrons na cadeia respiratória, com conseqüente aumento na produção de radicais livres: entre 1% e 3% do total de oxigênio consumido são transformados nestas moléculas (HALLIWEL, 1994; McARDLE et al., 2005).

Adicionalmente, em exercícios contínuos com duração acima de 60 minutos e acima de 60% do consumo máximo de oxigênio, é detectado aumento na produção de espécimes reativas de oxigênio pelos neutrófilos (SMITH et al., 1990; SUZUKI et al., 1999; PEAKE ; SUZUKI, 2004; PEAKE et al., 2005).

As reduções incompletas de oxigênio que produzem os radicais livres na cadeia respiratória de muitas células causam lesões não apenas no DNA, seus

efeitos se fazem sentir nas proteínas, carboidratos e membranas celulares (CHANG et al., 2001; PETERSEN et al., 2001; FATOUROS et al., 2004; REN, 2007).

2.2 O EXERCÍCIO FÍSICO E O ESTRESSE OXIDATIVO

2.2.1 Considerações Gerais

A despeito de todos os benefícios que inegavelmente relacionam a prática regular de atividade física à diminuição nos riscos de desenvolvimento de diversas doenças, existem evidências consistentes de que a prática excessiva do exercício físico implica em estresse oxidativo, definido como o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante (ALESSIO et al., 2000; INAL et al., 2000; MASTALOUDIS; LEONARD; TRABER, 2001; MOLLER et al., 2001; PETERSEN et al., 2001; TSAI et al., 2001; FATOUROS et al., 2004; BRIVIBA, et al., 2005; McARDLE et al., 2005; WATSON et al., 2005; NIESS ; SIMON, 2007; NIKOLAILDIS et al., 2007).

Os efeitos adversos do estresse oxidativo se devem à geração de moléculas altamente reativas_ os radicais livres_ efetivas em lesar o DNA e alterar, através de reações de oxidação, moléculas que são componentes importantes de estruturas celulares a exemplo de carboidratos, proteínas e lipídios (ALESSIO et al., 2000; LIU et al., 2005; FINAUD; LAC; FINAIRE, 2006; TOYOKUNI ; AKATSUKA, 2007).

A liberação de radicais livres está intimamente associada às diferenças no consumo de oxigênio durante o repouso e em condições que exigem atividade muscular. Durante a prática de exercícios o consumo do oxigênio molecular nas mitocôndrias pode aumentar até dez vezes em relação aos níveis observados no repouso e o músculo ativo pode aumentar entre 100 e 200 vezes o consumo de oxigênio (ALESSIO et al., 2000; INAL et al., 2000; MASTALOUDIS; LEONARD; TRABER, 2001; LIU et al., 2005; McARDLE et al., 2005; LEKHI; GUPTA; SINGH, 2007). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio cada célula mobiliza cerca de 10^{12} moléculas de O_2 por dia e cerca de 1% destas geram espécimes reativos a exemplo do superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e oxigênio *singlet* (BYCZKOWSKI ; GESSNER, 1988, YU, 1994; FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; NOHMI et al., 2005; FLORA, 2007).

2.2.2 Geração de Radicais Livres Conseqüentes ao Estresse Oxidativo

O termo “radicais livres” foi introduzido por Denham Harman em 1956 para designar moléculas altamente reativas, originadas durante a respiração aeróbia, com potencial para causar danos oxidativos cumulativos que resultam em danos celulares e mutações que podem levar ao câncer e aos processos degenerativos do envelhecimento biológico (DROGE, 2002).

Radicalis livres são átomos ou moléculas que apresentam um número ímpar de elétrons em pelo menos um de seus orbitais. O não-emparelhamento de elétrons nesta camada faz com que estes átomos ou moléculas tornem-se altamente reativos. Ao interagir com outros átomos ou moléculas, um radical livre pode receber um novo elétron (Reação de Redução) ou doar o seu elétron não-pareado (Reação de Oxidação) estabilizando assim a sua molécula, mas em ambas as situações gerando novos radicalis (BYCZKOWSKI ; GESSNER, 1988; HALLIWELL, 1990; YU, 1994; FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; BEKMAN ; AMES,1998).

O anion superóxido (O_2^-) é formado quando ocorre a redução do oxigênio molecular (O_2) resultando no ganho de um elétron por parte desta molécula. O superóxido é considerado instável devido ao número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (BYCZKOWSKI ; GESSNER, 1988; YU, 1994; FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; BEKMAN ; AMES, 1998; DROGE, 2002, PERVAIZ ; CLEMENT, 2007).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não apresenta elétrons desemparelhados em sua última camada, entretanto, é um metabólito do oxigênio que faz parte da reação que dá origem ao radical hidroxil ($\cdot OH$), razão pela qual é classificado como espécie de oxigênio reativo (BYCZKOWSKI ; GESSNER, 1988; HALLIWELL, 1990; YU, 1994 FERREIRA ; MATSUBARA, 1997).

Radicalis hidroxil ($\cdot OH$) são as moléculas mais predominantes e as mais reativas dentre os espécimes formados no metabolismo do oxigênio. Estes radicalis promovem alterações em quase todas as moléculas encontradas nas células (BYCZKOWSKI ; GESSNER, 1988; HALLIWELL, 1990; YU, 1994; YU ; ANDERSON, 1997; NOHMI et al., 2005; FRISARD ; RAVUSSIN, 2006).

O oxigênio *singlet* não possui elétrons desemparelhados, porém é uma forma excitada de oxigênio molecular que tem importância em alguns eventos biológicos, não existindo, entretanto, relação significativa entre sua presença e alterações

celulares significativas (BYCZKOWSKI ; GESSNER, 1988; FERREIRA ; MATSUBARA, 1997).

2.2.3 Mecanismos de Defesa Antioxidante

Segundo Yu (1994), Ferreira ; Matsubara (1997) e Schneider ; Oliveira, (2004) todas as células possuem mecanismos que atuam na defesa das agressões provocadas por espécimes de oxigênio, moléculas reativas que são continuamente formadas em pequenas quantidades durante os processos normais do metabolismo.

As defesas antioxidantes funcionam com base em reações enzimáticas e não-enzimáticas (YU, 1994; JI, 1999; SCHENEIDER ; OLIVEIRA, 2004). As reações enzimáticas incluem as que são catalisadas pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase (YU, 1994; JI, 1999; SCHENEIDER ; OLIVEIRA, 2004; FLORA, 2007). Os sistemas não-enzimáticos estão relacionados à ação protetora de micronutrientes presentes nos alimentos ou de proteínas e hormônios endogenamente sintetizados como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A), flavonóides, bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina e coenzima Q (SCHENEIDER ; OLIVEIRA, 2004; FLORA; 2007).

A proteção celular contra os efeitos deletérios dos espécimes reativos de oxigênio inclui dois mecanismos principais. O primeiro atua como via detoxificadora do agente oxidante e é acionado antes que ocorra a lesão. Nesse mecanismo estão envolvidas as enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase e glutatona-peroxidase (GSH-Px), além da Vitamina E e da glutatona reduzida (GSH). O segundo mecanismo atua reparando a lesão que ocorreu e nele atuam as enzimas glutatona-redutase (GSH-Rd) e glutatona-peroxidase (GSH-Px) (YU, 1994; FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; JI, 1999).

A descoberta da enzima superóxido dismutase em 1969 forneceu a primeira evidência convincente da geração do anion superóxido O_2^- *in vivo*, constituindo o primeiro passo para elucidação dos mecanismos de defesa antioxidante (HALLIWELL, 1990; BEKMAN ; AMES,1998; DROGE, 2002). A enzima superóxido dismutase catalisa a reação em que o radical superóxido (O_2^-), em presença de dois prótons H^+ , gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). A catalase é uma hemoproteína citoplasmática encontrada no sangue, fígado, medula óssea, rim e

mucosas, e tem o papel de catalisar a metabolização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água e oxigênio livre (YU, 1994; FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; JI, 1999; SCHNEIDER ; OLIVEIRA, 2004).

A glutatona reduzida quando exposta ao agente oxidante é convertida a glutatona oxidada (GSSG) e a enzima glutatona-redutase (GSH-Rd) promove sua recuperação. A glutatona peroxidase (GSH-Px) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois através da conversão de GSH em GSSG (YU , 1994; FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; JI, 1999).

2.2.4 Estresse Oxidativo e a Prática do Futebol Profissional

A prática de futebol em níveis profissionais implica em atividades intermitentes de alta intensidade durante um longo período de tempo (REILLY, 1997; DRUST; REILLY; CABLE, 2000; KINGSLEY et al., 2005; CASTAGNA; ABT; D'OTTAVIO, 2007).

Alguns estudos mostram que durante uma partida oficial, os jogadores profissionais percorrem em média uma distância aproximada de 9km a 12km (BANGSBO, 1994; REILLY, 1997; MOHR et al., 2005; CASTAGNA; ABT; D'OTTAVIO, 2007).

De acordo com Morh e outros (2005) e Bangsbo; Mohr; Krustup (2006) os exercícios intermitentes, que constituem a principal atividade realizada no futebol, implicam em mudanças de ritmo a cada 4-6 segundos. Esses autores destacam que em um jogo de nível internacional um atleta pode realizar aproximadamente de 150 a 250 pequenas corridas em alta intensidade.

Alterações fisiológicas ocorrem como resposta à esses padrões de movimento e incluem elevação da frequência cardíaca e aumento na concentração sanguínea de lactato, em consequência do metabolismo anaeróbio que é acionado em adição à respiração aeróbia para atender à demanda maior de oxigênio exigida nesses exercícios (KRUSTRUP; MOHR; BANGSBO, 2002; BROWN et al., 2007).

Na busca da vitória sobre o adversário, os jogadores que têm melhor treinamento aeróbio são mais capazes de manter seu alto desempenho ao final da partida, quando comparados com aqueles que têm menor capacidade aeróbia

(REILLY, 1997; HOFF; HELGERUD, 2004; METAXAS et al., 2006; CASTAGNA; ABT; D'OTTAVIO, 2007).

Os treinamentos desse esporte fundamentam-se, assim, em prescrições de exercícios baseados na potência aeróbia, uma valência física que é dependente do consumo máximo de O_2 , (HOFF et al., 2002; GLAISTER, 2005; CASTAGNA; ABT; D'OTTAVIO, 2007).

Movimentos aeróbios predominam em 90% de uma partida de futebol, sendo consumido pelos jogadores profissionais, em média, cerca de 2,8 l/min de O_2 (DRUST; REILLY; CABLE, 2000; BANGSBO; MOHR; KRUSTRUP, 2006)

A elevação no consumo de oxigênio molecular e as rápidas mudanças no fluxo de oxigênio na mitocôndria, como conseqüência desse tipo de atividade, são os responsáveis pelas lesões oxidativas que afetam moléculas orgânicas o que ocorre quando falham os mecanismos de defesa antioxidante (KINGSLEY et al., 2005; WIERZBA et al., 2006).

2.3 DANOS GENÉTICOS CONSEQÜENTES AO ESTRESSE OXIDATIVO

Como já comentado, o estresse oxidativo gera radicais livres que têm o potencial de lesar a molécula do DNA contribuindo para o aumento da taxa de mutações espontâneas e, conseqüentemente, para o envelhecimento precoce e desenvolvimento de câncer (LOFT ; POULSEN, 1996; TSAI et al., 2001; TRUEBA; SÁNCHEZ ; GIULIANI, 2004; WIERZBA et al., 2006)

Durante a respiração aeróbica, o oxigênio pode sofrer transferência de um único elétron gerando radicais superóxido (O_2^-) que normalmente são convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido desmutase (YU, 1994; FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; JI, 1999; SCHNEIDER ; OLIVEIRA, 2004).

Logo após a conversão, as moléculas de peróxido de hidrogênio podem atravessar a membrana nuclear e reagir com íons metálicos resultando em radicais hidroxil ($\cdot OH$) que têm potencial de oxidar o DNA induzindo alterações que afetam bases nitrogenadas e a desoxirribose, ou que resultam em quebras nas cadeias nucleotídicas (ESTEBAUER et al., 1991; HUANG; HELZLSOUER; APPEL, 2000; KAWANISH ; MURATA, 2006).

Dentre as modificações que ocorrem nas bases nitrogenadas do DNA provenientes do estresse oxidativo, uma das mais freqüentes é a modificação da

guanina, em seu carbono 8, pelos radicais $\cdot\text{OH}$ com formação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (LOFT ; POULSEM, 1996; KAWANISH ; MURATA, 2006). Desta alteração, pode resultar a substituição de um par **GC** por um par **TA**, dando origem a uma mutação de sentido equívoco com conseqüente alteração na cadeia polipeptídica.

Radicais livres são também efetivos em induzir danos cromossômicos. A ocorrência desses danos, traduzidos como micronúcleos, em conseqüência do estresse oxidativo gerado pela prática exaustiva do exercício físico foi avaliada por Schiffli, Zieres e Zankl (1997) em linfócitos circulantes de seis voluntários. A avaliação da ocorrência dessas estruturas nas células que foram cultivadas 24 horas após a atividade física, revelou aumento significativo em 5 dos 6 voluntários quando feita comparação com a freqüência detectada antes da atividade.

2.4 DANOS GENÉTICOS E CÂNCER

O câncer é considerado hoje doença genética. Resulta de alterações em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA ou que estão envolvidos no controle da proliferação e da diferenciação celular_ os protooncogenes e os genes supressores de tumor. Em conseqüência, protooncogenes são ativados a oncogenes e genes supressores de tumor e de reparo do DNA têm sua atividade silenciada (CERQUEIRA, 2000).

De acordo com Volders, Fenech (2001) a taxa elevada de danos na molécula do DNA e nos cromossomos são importantes fatores de risco relacionados ao câncer e outras doenças degenerativas. Por outro lado, diversos estudos apontam para a associação do câncer com vários fatores ambientais e, mais recentemente, fatores genéticos individuais e produtos de refugo do metabolismo, a exemplo dos espécimes reativos de oxigênio, têm também sido apontados como em associação com seu desenvolvimento (TSAI et al., 2001; BONASSI ; AU, 2002; NAKACHI et al., 2004; ISIK; CEYLAN; ISIK, 2007; LOPEZ et al., 2007).

Dentre os fatores ambientais que têm sido mais consistentemente apontados em associação com o câncer destaca-se o hábito de fumar, relacionado ao desenvolvimento dos cânceres de pulmão, bexiga, cavidade oral e esôfago dentre outros órgãos. Quando em associação com o hábito de ingerir bebidas alcoólicas, incrementa em muitas vezes o risco de desenvolvimento dos cânceres da cavidade

oral e do esôfago (ZAVRAS et al., 2001; LLEWELLYN et al., 2003; WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND; SCULLY, 2005; ISIK et al., 2007). A exposição ocupacional a diversos agentes de natureza química tem também sido freqüentemente apontada como associada ao desenvolvimento de vários tipos de neoplasias malignas (HARDELL ; ERIKSSON, 1999; ZHENG et al., 2001; LOPEZ et al., 2007).

A associação entre câncer e fatores ambientais se deve ao potencial mutagênico e/ou carcinogênico destes fatores, que são efetivos em lesar o DNA levando à ocorrência de mutações em genes que estão relacionados com os mecanismos de reparo do DNA e com o controle da proliferação e diferenciação celular (ITO; HIRAKU; KAWANISHI, 2007; BADISA et al., 2007).

A América Latina é considerada uma área particularmente interessante para monitorar e controlar as tendências na incidência e mortalidade por câncer, bem como para estudar as variações geográficas associadas aos diversos tipos desta doença. Parkin e outros (1997; 2001) e Parkin (2006), mostraram que devido às disparidades econômicas e sociais desta região o mapa de distribuição de câncer apresenta uma superposição de cânceres que são freqüentes em países industrializados e em países em desenvolvimento. Segundo estes autores, nos países industrializados os cânceres de mama, pulmão, próstata e cólon incidem em maior freqüência, o que provavelmente está relacionado ao estilo de vida, ou seja, hábito de fumar, sedentarismo e má qualidade da dieta. Em países em desenvolvimento, entretanto, os cânceres de colo de útero, esôfago, da cavidade oral, bexiga e fígado são os mais freqüentes, o que poderia estar relacionado à má nutrição, exposição ambiental específica da região e algumas infecções virais.

De acordo com Bonassi; Au (2002), a abordagem tradicional da pesquisa epidemiológica do câncer tem limitações, pois os resultados destas investigações são aplicados em populações inteiras, objetivando a implantação de medidas preventivas. Todavia, neste tipo de abordagem não são levadas em conta variações inter individuais na resposta à exposição dos sujeitos.

Gallo e outros (2005) expõem as dificuldades existentes no processo de desenvolvimento de políticas de saúde global objetivando prevenir, detectar e monitorar o câncer, destacando o uso de biomarcadores moleculares como ferramenta importante no estudo dessa doença e de sua relação com fatores de

risco tais como: as variações genéticas individuais, o estilo de vida e outros fatores biológicos e ambientais.

A utilização de marcadores citogenéticos no biomonitoramento de indivíduos expostos a fatores de risco para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, bem como para o monitoramento de lesões pré-malignas é considerada valiosa ferramenta na prevenção desta doença (CERQUEIRA, 1998; CASARTELLI et al., 2000; ZAVRAS et al., 2001; LLEWELLYN et al., 2003; WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND; SCULLY, 2005; BOFFETTA et al., 2007). De acordo com Rundle (2005), estudos a partir de biomarcadores serão muito úteis no estabelecimento dos possíveis efeitos da atividade física na prevenção do câncer. O autor considera que a inclusão de biomarcadores em estudos epidemiológicos contribuirá significativamente para elucidação dos mecanismos através dos quais a atividade física exerce seus efeitos.

2.5 MARCADORES DE DANOS CITOGENÉTICOS: O TESTE DE MICRONÚCLEO EM LINFÓCITOS PELO MÉTODO DO BLOQUEIO DA CITOCINESE(CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS ASSAY – CBMN)

O uso de marcadores genéticos para o biomonitoramento de populações sob maior risco de desenvolvimento de câncer, como acima comentado, constitui-se em importante estratégia para a prevenção dessa doença. Para alguns tipos de cânceres, alguns marcadores moleculares já estão bem definidos a exemplo de algumas mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, indicativas de maior risco de desenvolvimento do câncer de mama (EYFJORD ; BODVARSDOTTIR, 2005).

Por outro lado, a análise citogenética clássica, a técnica de hibridização in situ com sondas específicas e o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas, ou em linfócitos, têm sido largamente empregados para avaliação da ocorrência de alterações cromossômicas quando do biomonitoramento de indivíduos, ou de populações expostas a mutágenos e/ou carcinógenos (AGOSTINI; OTTO; WAJNTAL, 1996; BURGAZ et al., 1998; KARAHALIL et al., 1999; ZNAOR et al., 2003; BOFFETTA et al., 2007; KNUDSEN ; HANSEN, 2007).

Segundo Bonassi ; Au (2002) já existe registro suficiente na literatura evidenciando micronúcleos como marcadores tanto de exposição (revelando danos genéticos) quanto de efeito (indicador de risco de câncer).

Micronúcleos são estruturas que resultam de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que se perdem na divisão celular e, assim, não são incluídos nos núcleos das células filhas permanecendo no citoplasma das células interfásicas onde são observados como estruturas arredondadas, apresentando em relação ao núcleo principal cerca de 1/3 a 1/5 de seu tamanho e distribuição cromatínica similar (EVANS, 1997; STOPPER ; MULLER, 1997; FENECH, 2000; FENECH, 2007).

Os ensaios de micronúcleo foram utilizados pela primeira vez *in vitro* através de experimentos com raízes de *Vicia Faba* e pela primeira vez *in vivo* em estudos de células de medula óssea no início dos anos 70 (MAJER et al., 2001). O Teste de Micronúcleo em células de medula óssea de roedores constitui-se atualmente em um dos testes mais utilizados na avaliação dos efeitos aneugênicos e clastogênicos de substâncias químicas (FENECH, 1997; MAJER et al, 2001).

Após a Segunda Guerra Mundial, diversos estudos foram conduzidos objetivando a avaliação, através da análise cromossômica clássica, dos efeitos genotóxicos da radiação emitida pela explosão das bombas atômicas sobre as cidades de Hiroshima e Nagasaki (EVANS, 1997; MALUF, 2004).

A análise de micronúcleos em cultura de linfócitos para avaliação da frequência de danos cromossômicos em humanos foi feita pela primeira vez por Countryman e Heddle em 1976. A técnica apresentava, contudo, limitações devido a impossibilidade de identificar células quiescentes de células que haviam passado por um ciclo de divisão. A introdução por Fenech e Morley da citocalasina-B no meio de cultura permitiu ultrapassar essa limitação, uma vez que esta substância tem o potencial de bloquear a citocinese, de modo que os dois novos núcleos ficam retidos em um só citoplasma permitindo, assim, a identificação (e computo exclusivo) das células que se dividiram (FENECH ; MORLEY, 1985). Surgia assim o Teste de Micronúcleo pelo método do bloqueio da citocinese (*Cytokinesis-block micronucleus assay* – CBMN), metodologia que passou a ser amplamente empregada (FENECH, 1998).

Em 1999, um amplo programa internacional _ o *HUMAN MicroNucleus Project* _ HUMN foi conduzido por Michael Fenech e Stefano Bonassi e envolveu laboratórios de diferentes partes do mundo. O desenvolvimento desse programa validou definitivamente o Teste de Micronúcleos em linfócitos pelo método do bloqueio da citocinese como efetiva ferramenta para identificação de danos cromossômicos e como marcador de maior risco de desenvolvimento de câncer (FENECH et al.,

1999). A este trabalho inicial, outros se seguiram de autoria de participantes do programa objetivando a otimização do protocolo para o teste (FENECH, 2000; BONASSI et al., 2001; FENECH et al., 2003a; 2003b).

Além de linfócitos circulantes, a ocorrência de micronúcleos tem sido analisada em células epiteliais, conforme sugerido na década de 80 por Stich, Curtis e Parida (1982). Estes autores propuseram a utilização do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral para o biomonitoramento de populações humanas expostas a genotóxicos. Após este estudo pioneiro, muitos outros foram conduzidos avaliando a frequência de micronúcleos em diversos outros epitélios: cervical (CERQUEIRA et al., 1998); nasal (SURUDA, 1993), da orofaringe (BOFFETA et al., 1992), dos brônquios (LIPPMAN et al., 1990, LOOMIS, 1990), vesical (RIBEIRO et al., 1990; ROSIN ; ANWAR, 1992) e do trato gastrointestinal (DIETZ et al., 2000).

O Teste de Micronúcleo, aplicado em células esfoliadas ou em linfócitos, apresenta a vantagem de detectar tanto a ação aneugênica quanto a ação clastogênica de um dado agente. Em tempos mais recentes, o Teste de Micronúcleo em linfócitos tem sido utilizado através de protocolo diferenciado no qual, além de micronúcleos, são também computadas pontes nucleoplasmáticas (indicadoras de rearranjos cromossômicos), células em necrose e em processo de apoptose (indicadores da viabilidade celular) e estabelecidos índices de divisão celular, fornecendo informações adicionais sobre lesões de DNA e efeitos citostáticos/citotóxicos (FENECH et al., 1999; KIRSCH-VOLDERS; FENECH, 2001; FENECH, 2007).

Nos estudos em que micronúcleos são avaliados é importante levar em consideração fatores que têm sido apontados como efetivos em alterar a frequência destas estruturas, a exemplo da idade, hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas. Mais recentemente, a interferência da variabilidade individual relativa a diferenças genótípicas na ocorrência de micronúcleos têm sido investigada (ISHIKAWA, 2006).

3. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a ocorrência de danos cromossômicos, traduzidos como micronúcleos, em indivíduos com estilo de vida sedentário e indivíduos submetidos a exercícios com diferentes intensidades, utilizando o Teste de Micronúcleo em Linfócitos pelo Método do Bloqueio da Citocinese no biomonitoramento de indivíduos submetidos a exercícios de alta intensidade.

ESPECÍFICO

Comparar a ocorrência de micronúcleos entre indivíduos com estilo de vida sedentária e indivíduos submetidos a exercícios com diferentes intensidades.

4 METODOLOGIA

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra analisada incluiu exclusivamente indivíduos do sexo masculino, distribuídos em três grupos: Grupo I, formado por atletas de futebol, integrantes de um mesmo clube, submetidos à prática intensa de exercícios físicos; Grupo II, constituído por alunos da Universidade Estadual de Feira de Santana matriculados no Programa de Exercício Físico do Laboratório de Atividade Física e, Grupo III, formado por indivíduos de hábitos sedentários.

A caracterização da amostra foi feita através de questionário contendo indagações a respeito de idade, hábito de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas, exposição a outros genotóxicos e prática de atividade física (Anexo 1).

4.2 COLETA DO MATERIAL E CULTURA DE LINFÓCITOS

O preparo do material foi feito em consonância com o método proposto por Fenech, (2000), com algumas modificações. Tal seja:

De cada indivíduo que integrou a amostra, foram coletados 10ml de sangue periférico por punção venosa, utilizando seringa descartável e estéril. O sangue assim coletado foi imediatamente vertido em tubo falcon contendo EDTA (1 gota para cada 5ml de sangue) e em seguida o material foi vertido em outro tubo falcon de 15 ml, contendo 3 ml de histopaque (Sigma), o que foi feito evitando homogeneização. Os linfócitos mononucleados foram devidamente fracionados em gradiente de densidade Histopaque (centrifugação feita em velocidade de 1500rpm durante 40 minutos). Após a centrifugação os linfócitos foram pipetados e adicionados (10^6 células/ml) a tubo falcon contendo 5ml de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco). Em seguida foi feita nova centrifugação em velocidade de 1500rpm durante 10 minutos, após o que o sobrenadante foi descartado e ao pellet adicionado 1ml de RPMI 1640. O pellet foi ressuspenso e transferido (200 μ L) para placa de cultura cada uma delas com cinco poços contendo um mix de 1 ml constituído por 10% (v/v) de soro bovino fetal (Gibco), 1% de L-glutamina (Gibco), 1% de antibióticos (penicilina, 100 U/mL, estreptomicina, 100 μ g/mL e anfotericina B,

25µg/mL; Gibco) e 2% (v/v) de fitohemaglutinina A (Gibco), complementado com RPMI 1640 (Gibco).

Após estes procedimentos a cultura foi mantida a 37°C em estufa de CO₂ (5%) (BIOSYSTEMS). Após 44 horas, 6 µg/mL de citocalasina B (Sigma) foram adicionadas à cultura.

Ao fim do período de cultivo (72 horas) as células foram novamente pipetadas dos cinco poços e colocadas em um tubo falcon, devidamente identificado, para centrifugação a 800rpm por 10 minutos e à temperatura ambiente.

Após esta centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado sendo mantido 1ml do meio para que as células fossem ressuspensas. Logo em seguida foram cuidadosamente adicionadas em 4ml da solução fixadora (metanol a 70% e ácido acético na proporção de 3:1) e o tubo foi levado para geladeira onde permaneceu durante 20 minutos. Findo este tempo foram realizadas duas centrifugações em velocidade de 800rpm durante 10 minutos. Após cada uma delas o sobrenadante foi descartado e ao pellet adicionado 5 ml de solução fixadora sendo o pellet mais uma vez ressuspenso.

Após o último descarte do sobrenadante foram adicionados 700 microlitros de solução fixadora e o pellet novamente ressuspenso, após o que a suspensão foi gotejada em quatro lâminas (com identificação codificada e correspondente à do tubo) deixadas para secar ao ar e então coradas por 15 minutos com a solução de Giemsa (4%; Gibco) em tampão fosfato salino de Dulbecco (pH 7,1; Gibco).

4.3 ANÁLISE CITOGENÉTICA

A análise citogenética foi realizada em teste cego, sob microscopia óptica, com aumento de 1000X. A observação da ocorrência de micronúcleos foi feita, para cada indivíduo, em 1000 células binucleadas (Figura 1). Foram computadas apenas as células binucleadas em que os núcleos apresentassem tamanho e coloração similar, com limites nucleares e citoplasmáticos bem definidos. Os critérios adotados para identificação de micronúcleos foram aqueles descritos por Fenech et al. (2003). Foram considerados micronúcleos as estruturas arredondadas ou ovaladas, distintamente separadas dos núcleos, vistas no mesmo plano que estes, medindo de

um sexto até um terço do tamanho deles e com coloração e distribuição cromatínica similar (Figura 2).

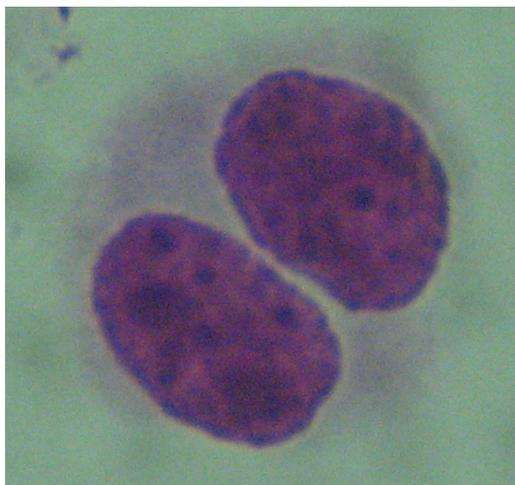


Figura 1. Linfócito binucleado (1000 X)

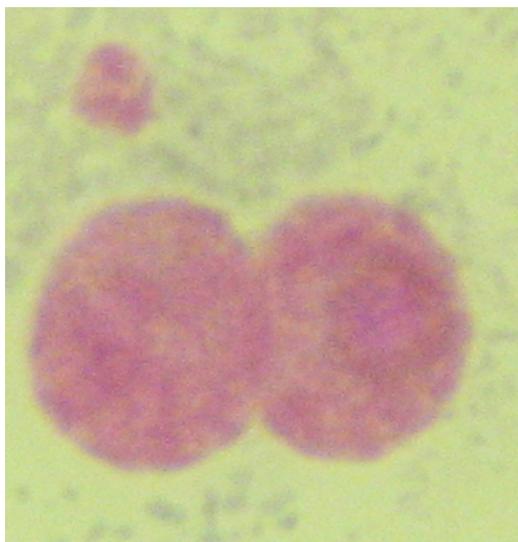


Figura 2. Micronúcleo em Linfócito binucleado (1000 X)

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação das diferenças entre os Grupos, relativa à idade foi feita com o uso da Análise de Variância com um critério de classificação. Para análise das tabelas de associação, levando em conta parâmetros considerados no questionário (hábito de beber) foi utilizado o teste de Qui-quadrado (χ^2). A análise relativa à ocorrência de micronúcleos foi feita de dois modos: 1) Empregando a análise de variância, desde que possível a pressuposição de normalidade; 2) com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (BRAGANÇA-PEREIRA, 1991). Este é um teste de significância alternativo ao de qui-quadrado, na linha do teste exato de Fisher e adequado à avaliação de eventos citogenéticos quando uma grande amostra de células é necessária para detecção da ocorrência de uma determinada aberração cromossômica. Em todas as análises o nível de significância adotado foi de 5%.

4.5 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa, feita em consonância com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Feira de Santana (Protocolo 058/2006 e CAAE 0054.0.059.000-06). A participação foi voluntária e todos, após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido procederam à sua assinatura.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRA ANALISADA

Foi coletado material de sessenta indivíduos, oito dos quais foram excluídos da amostra porque o número de células não foi suficiente para análise.

A amostra total foi, portanto, constituída por 52 indivíduos do sexo masculino, na faixa etária de 18 a 38 anos, distribuídos em três grupos: Grupo I, formado por 15 atletas de futebol, integrantes de um mesmo clube, submetidos à prática intensa de exercícios físicos; Grupo II, constituído por 18 alunos da Universidade Estadual de Feira de Santana matriculados no Programa de Exercício Físico do Laboratório de Atividade Física e, Grupo III, formado por 19 indivíduos de hábitos sedentários.

5.2 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

5.2.1 Idade

A média calculada de idade da amostra total (X_{iD}) foi $22,4423 \pm 4,0362$ e as obtidas para os Grupos I, II e III foram respectivamente $21,200 \pm 4,4593$; $22,7222 \pm 3,1212$ e $23,1579 \pm 4,4255$. A análise das diferenças entre as médias observadas nos três grupos, feita com o uso da análise de variância, com um critério de classificação, não revelou diferença significativa: $F_{2, 49} = 1,055$, $p = 0,3561$ (Dados apresentados na Tabela 1).

Tabela 1 - Dados referentes às médias de idade ($X_{iD} \pm D.P$)

| Grupo | $X_{iD} \pm D.P$ | $F_{2,49}$ |
|--------------|----------------------|--------------|
| I | $21,2000 \pm 4,4593$ | |
| II | $22,7222 \pm 3,1212$ | 1,0550 |
| III | $23,1579 \pm 4,4255$ | $p = 0,3561$ |
| I + II + III | $22,4423 \pm 4,0362$ | |

5.2.2 Prática de Exercício Físico

Todos os indivíduos do Grupo I eram submetidos a treinamento de futebol profissional diariamente. Os indivíduos do grupo II informaram em sua maioria prática variada de exercícios. Indivíduos dos Grupos I e II são apresentados na Tabela 2I.

Tabela 2 - Dados relativos à prática de atividade física (Grupo II)

| Atividade Física | Grupo I (N) | Grupo II (N) |
|-----------------------------|-------------|--------------|
| Tipo | | |
| Futebol | 15 | 2 |
| Ginástica | | |
| Musculação | | 5 |
| Natação | | 1 |
| Corrida | | |
| Mais de um tipo | | 5 |
| Outros | | 5 |
| Tempo (meses) | | |
| 01 a 04 | | 1 |
| 05 – 08 | | 2 |
| 09 a 12 | | 3 |
| > 12 | | |
| >24 | 15 | 12 |
| Freqüência (semanal) | | |
| 01 a 02 | | 1 |
| 03 a 04 | | 11 |
| 05 a 06 | | 06 |
| > 06 | 15 | |
| Duração (minutos) | | |
| < 30 | | |
| = 30 | | |
| > 30 | | 1 |
| = 60 | | 7 |
| > 60 | 15 | 10 |
| Intensidade | | |
| Leve | | |
| Moderada | | 07 |
| Intensa | 13 | 11 |
| Extenuante | 02 | |

5.2.3 Hábito de Fumar

Foram considerados fumantes os indivíduos que fumavam regularmente e tragando a fumaça, três ou mais cigarros por dia em média e o faziam há um tempo igual ou superior a um ano. Como não-fumantes foram classificados os indivíduos que deixaram de fumar há pelo menos cinco anos, além daqueles, é lógico, que nunca fizeram uso do cigarro. Os indivíduos que não se enquadraram nestes critérios foram excluídos da amostra (TREVATHAN et al., 1983; La VVECCHIA et al., 1986).

Em toda a amostra apenas um indivíduo do Grupo I informou uso de cigarro industrializado. Este indivíduo referiu ser fumante há aproximadamente um ano e consumir em torno de cinco cigarros por dia.

5.2.4 Hábito de Ingerir Bebidas Alcoólicas

Foram considerados bebedores os indivíduos que referiram uso de bebidas alcoólicas de qualquer tipo há mais de seis meses, com frequência de pelo menos duas vezes por semana (KEHDY, 2005).

Nenhum indivíduo do Grupo I informou uso de bebida alcoólica em frequência maior do que uma vez por semana. Dois deles informaram uso quinzenal e cinco bebiam esporadicamente. Seis pessoas do Grupo II faziam uso de bebidas alcoólicas duas vezes por semana e oito o faziam esporadicamente. No Grupo III apenas duas pessoas foram classificados como bebedores, informando uso de bebidas duas vezes por semana. Neste Grupo, oito indivíduos bebiam uma vez por semana e três esporadicamente. Os dados referentes ao hábito de ingerir bebidas alcoólicas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados relativos ao hábito de ingerir bebidas alcoólicas

| | Grupo I n=15 | Grupo II n=18 | Grupo III n=19 |
|-----------------|--------------|---------------|----------------|
| HÁBITO DE BEBER | | | |
| Bebe | 00 | 06 | 02 |
| Não bebe | 15 | 12 | 17 |
| QTADE. Copo/DIA | | | |
| 1 a 2 | 00 | 02 | 0 |
| 3 a 4 | 00 | 04 | 02 |

| | | | |
|-----------------|----|----|----|
| >5 | 00 | 00 | 00 |
| FREQ.BEB/SEMANA | | | |
| 1 vez | 02 | 00 | 08 |
| 2 vezes | 00 | 06 | 02 |
| Esporadicamente | 05 | 08 | 03 |

5.3 ANÁLISE CITOGENÉTICA

5.3.1 Ocorrência de Micronúcleos na Amostra Total e Distintos Grupos

Um total de 52.000 células foi analisado. As preparações do Grupo I totalizaram 15.000 células binucleadas sendo observados 30 micronúcleos. No Grupo II foram observados 35 micronúcleos em um total de 18.000 células e, nas 19.000 células do Grupo III foram observados 33 micronúcleos.

A análise das diferenças entre as médias de micronúcleos calculadas, feita com o uso da análise de variância, com um critério de classificação, não revelou diferença significativa: $F_{2,49} = 0,1185$; $p = 0,8887$. Dados apresentados na Tabela 4.

Tabela IV - Dados referentes às médias de micronúcleos observadas nos Grupos

| Grupo | Total células | de MN (obs) | $X_{MN} \pm D.P$ | $F_{2,49}$ |
|----------|---------------|-------------|------------------|--------------------|
| I | 15.000 | 30 | 2,0000 1,8516 | \pm 0,1185 |
| II | 18.000 | 35 | 1,9444 1,6968 | \pm $p = 0,8887$ |
| III | 19.000 | 33 | 1,7368 1,5579 | \pm |
| I+II+III | 52.000 | 98 | 1,8846 1,6648 | \pm |

As diferenças observadas nas freqüências de micronúcleos foram também avaliadas com o uso do Teste condicional para comparação de proporções em

situações de eventos raros. Os resultados obtidos também não revelam significância estatística (Tabela 5).

Tabela V – Frequências de micronúcleos com o uso do Teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros.

| Grupo | Total de células | de MN (obs) | MN (esp) | χ^2 |
|----------|------------------|-------------|----------|----------|
| I | 15.000 | 30 | 28,2692 | 0,3603 |
| II | 18.000 | 35 | 33,9231 | G.L.=2 |
| III | 19.000 | 33 | 35,8077 | p> 0,70 |
| I+II+III | 52.0000 | 98 | 98 | |

A avaliação da ocorrência de micronúcleos em função da prática de atividade física entre os indivíduos do Grupo II não foi feita em função da diversidade de prática informada levando em consideração o número de indivíduos desse grupo.

5.3.2 Ocorrência de Micronúcleos em Função da Idade

A análise da distribuição de micronúcleos em relação à idade dos indivíduos na amostra total e nos Grupos I, II e III, isoladamente, feita pelo teste condicional de proporção para eventos raros, com os valores de idade distribuídos em duas categorias pelo valor da mediana (M=21) não mostrou diferença significativa. Dados apresentados na Tabela 6.

Tabela - 6 Análise da distribuição de micronúcleos em relação à idade

| Grupo | N (≤ 21) | N (≥ 21) | #de cél ≤ 21 | #de cél ≥ 21 | MN (obs) ≤ 21 | MN (esp) ≤ 21 | MN (obs) ≥ 21 | MN (esp) ≥ 21 | χ^2 ; G.L.=1 |
|----------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| I | 11 | 04 | 11000 | 4000 | 24 | 22,0000 | 06 | 08,0000 | 0,6818, p> 0,30 |
| II | 08 | 10 | 8000 | 10000 | 15 | 15,5556 | 20 | 19,4444 | 0,0357, p> 0,70 |
| III | 09 | 10 | 9000 | 10000 | 12 | 15,6316 | 21 | 17,3684 | 1,6030, p> 0,10 |
| I+II+III | 28 | 24 | 28000 | 24000 | 51 | 52,7692 | 47 | 45,2308 | 0,1285, p> 0,70 |

6 DISCUSSÃO

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Apesar da análise de micronúcleos em linfócitos ter sido proposta ainda na década de 70 (COUNTRYMAN ; HEDDLE, 1976) foi somente em 1985, com a introdução por Fenech e Morley da citocalasina no meio de cultura, que esta metodologia foi reconhecida como ferramenta eficaz na detecção de danos citogenéticos. Surgia, assim, o Teste de Micronúcleo pelo Bloqueio da Citocinese (*Cytokinesis-block micronucleus assay* – CBMN), método que passou a ser amplamente empregado principalmente a partir de 1999, com o desenvolvimento *HUman MicroNucleus Project* (HUMN), conduzido por Michael Fenech e Stefano Bonassi e que envolveu laboratórios de diferentes partes do mundo. A partir de então este teste foi definitivamente validado como ferramenta eficaz na detecção de danos cromossômicos e vem sendo largamente utilizado para avaliação: 1) dos efeitos citogenéticos da exposição à mutágenos; 2) da associação entre frequência de micronúcleo, sexo e idade; 3) dos efeitos protetores de antioxidantes; 4) da eficácia de quimioterápicos e de diferentes formas de radiação no tratamento do câncer e, 5) da associação entre danos genéticos e doenças de natureza diversa (AU et al., 1991; MIGLIORE et al., 1991; TOMANIN et al., 1991; XUE et al., 1992; SEVERIN, 1995; DUFFAUD, 1997; HANDO et al., 1997; STROM, 1997; BARALE et al., 1998; KUBIAK et al., 1999; LUCERO et al., 2000; BUKVIC et al., 2001; JAGETIA et al., 2001; SCHNEIDER et al., 2001; BOLOGNESI, PERRONE e LANDINI, 2002; MAFFEI et al., 2002; PORCIELLO, 2003). O registro na literatura referente ao uso do CBMN para avaliação da ocorrência de danos cromossômicos induzidos por espécimes reativos de oxigênio, em consequência da atividade mitocondrial exacerbada frente ao exercício físico, é, contudo, escasso e os dados relatados são controversos (SCHIFFL; ZIERES; ZANKL, 1997; HARTMANN et al., 1998; UMEGAKI et al., 1998; PITTALUGA, 2006).

Resultados de estudos realizados com o uso de outras metodologias sugerindo associação entre atividade física e efeitos adversos sobre o DNA são, também, controversos, sendo evidenciados, ou não, na dependência do teste utilizado,

embora a maioria sugira tais efeitos (HARTMANN et al., 1994; 1998; TSAI, et al., 2001; ORHAN et al., 2004).

O presente estudo representa, assim, uma contribuição para a real avaliação dos efeitos que podem resultar da prática excessiva, ou não, do exercício físico. Os resultados aqui apresentados baseados nas condições experimentais em que foi realizado não demonstrou os efeitos da prática intensiva de exercícios físicos na indução de danos cromossômicos expressados como micronúcleos.

6.2 OCORRÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM FUNÇÃO DA ATIVIDADE FÍSICA

O registro na literatura da ocorrência de micronúcleos em função da atividade física é escasso e teve início com o estudo de Schiffli; Zieres e Zankl em 1997. Neste estudo os autores avaliaram a ocorrência de micronúcleos em apenas seis indivíduos, computando a ocorrência destas estruturas em 3000 linfócitos binucleados, cultivados 24h e 48h após duas seqüências de exercícios intensos. O número médio de micronúcleos aumentou significativamente nos dois períodos, tendo os autores concluído “que estes resultados indicam que o exercício físico causa severas mutações ao nível cromossômico nos linfócitos sangüíneos”.

Hartmann e outros (1998) analisaram as freqüências de micronúcleos em 1000 linfócitos binucleados coletados de seis indivíduos (três homens e três mulheres), que em um período de um a sete anos estiveram engajados em treinamento para competição de triatlon. A análise de micronúcleos foi feita 24h e 96h após os atletas terem nadado 1,5km, pedalado 40km e corrido 10km respectivamente. A comparação entre as freqüências de micronúcleos observadas nesses períodos e a freqüência observada antes das atividades não mostrou diferença significativa.

Resultados semelhantes aos obtidos por Hartmann e outros (1998) foram relatados por Umegaki e outros (1998). Estes autores avaliaram a ocorrência de micronúcleos em linfócitos coletados de indivíduos treinados e não-treinados em corrida de esteira. O sangüe foi coletado antes que os indivíduos realizassem uma corrida com duração de 30 minutos, ao término da corrida e 30 minutos após o término. As freqüências de micronúcleos não foram alteradas em função do exercício.

Um questionamento a ser feito seria se o momento em que foram realizados tais testes seria um tempo suficiente para o surgimento de células com micronúcleos.

Resguardadas as diferenças entre o presente estudo e os de Hartmann e outros (1998) e Umegaki e outros (1998), particularmente no que tange ao tipo de atividade física praticada, os resultados aqui obtidos corroboram aqueles descritos por esses autores sugerindo que os efeitos de espécimes de radicais livres liberados em consequência da atividade física intensa não demonstraram danos genéticos traduzidos como micronúcleos.

Um possível questionamento a ser feito no que se refere aos resultados apresentados nestes estudos baseia-se no número de amostras analisadas e no tempo para a coleta do sangue após à atividade

Na interpretação desses resultados, é preciso ter em mente que micronúcleos são expressões de eventos clastogênicos e aneugênicos não se esgotando com sua análise a possibilidade de que outros danos ao DNA ocorram em consequência do exercício físico exacerbado.

Hartmann e outros (1994), fazendo uso de Ensaio Cometa em condições alcalinas, metodologia considerada sensível na detecção de quebras nas cadeias de DNA, e da análise de Trocas Entre Cromátides Irmãs, avaliaram em diferentes tempos os efeitos da atividade física intensa em linfócitos cultivados de três indivíduos (dois homens e uma mulher). Dos dois homens que se submeteram ao teste, um praticava esportes diversificados e o outro era sedentário, e a mulher desenvolvia atividades esportivas ocasionalmente. Nenhum deles era fumante. Amostras de sangue foram coletadas antes e em diferentes tempos após duas seqüências de corrida de esteira. Na primeira seqüência, os indivíduos correram em velocidade crescente até a exaustão e na segunda correram durante 45 minutos em velocidade suficiente para assegurar o metabolismo aeróbico. Aumento da migração do DNA no Teste Cometa foi observado 6h após a primeira seqüência de exercício e alcançou valor máximo após 24h, não tendo sido observada diferença significativa após 72h quando feita comparação com o nível de migração adotado como controle. Nenhum efeito foi observado nas análises feitas em seguida à segunda seqüência de exercícios. Efeitos sobre a freqüência de Trocas entre Cromátides Irmãs também não foram descritos. Esses resultados sugerem que a atividade física desenvolvida acima do limiar anaeróbico induzem alterações nos leucócitos que podem ser

detectadas pela análise da migração do DNA no Teste Cometa. Segundo os autores, estes resultados podem ter implicações para o uso deste teste no biomonitoramento de indivíduos que desenvolvem atividade física exaustiva e apontam para a necessidade de avaliação cuidadosa do estado fisiológico dos indivíduos sob estudo.

Niess e outros (1996) também descreveram aumento nos danos ao DNA, avaliados pelo Teste Cometa, em consequência do exercício físico. Neste estudo, seis homens treinados em corrida de esteira e cinco não-treinados correram até a exaustão. Aumento significativo na migração do DNA foi detectado 24h após o término da corrida tanto nos indivíduos treinados quanto nos não-treinados. A comparação da migração do DNA entre indivíduos treinados e não-treinados revelou níveis significativamente maiores nos indivíduos não-treinados, o que segundo os autores sugere que a adaptação ao treinamento parece ser capaz de reduzir os efeitos dos radicais livres sobre o DNA.

No estudo de Hartmann e outros (1998) em que foi analisada a ocorrência de micronúcleos, foi também investigada a ocorrência de danos genéticos com o uso do Teste Cometa em condições alcalinas. Migração aumentada de DNA foi observada nos leucócitos dos seis indivíduos que compuseram a amostra 24h e 72h após o exercício, mas não 48h após, revelando segundo os autores um padrão bifásico. Adicionalmente foi empregado protocolo modificado do Teste Cometa efetivo para a detecção de bases do DNA oxidadas e não foi detectada diferença nos resultados obtidos antes e depois do exercício. Os autores também mediram, durante cinco dias subseqüentes ao exercício, a excreção urinária de 8-hidroxi-guanosina que se manteve estável em todo este período. Levando em conta estes resultados e os obtidos na análise de micronúcleos os autores consideram que os efeitos do exercício físico sobre os leucócitos, detectados no Teste Cometa, são secundários, não tendo origem em bases oxidizadas e não resultando em danos cromossômicos.

6.3 Considerações Finais

Da análise da literatura e considerando os resultados obtidos neste estudo, é possível supor que a indução de danos genéticos em consequência da prática intensiva do exercício físico está na dependência da quebra do equilíbrio fisiológico entre o metabolismo aeróbico/anaeróbico, e que tais danos podem ser traduzidos em diferentes *endpoints* citológicos os quais ainda não estão suficientemente consubstanciados com dados da literatura para que possam ser, no presente momento, utilizados como biomarcadores de risco.

7 CONCLUSÕES

Efeitos clastogênicos e aneugênicos consequentes à ação de radicais livres liberados em consequência do exercício físico, tal como avaliados neste estudo, não puderam ser observados em linfócitos;

Estudos adicionais se fazem necessários para a real avaliação do uso de micronúcleos como biomarcadores de risco em função da prática exacerbada do exercício físico.

REFERÊNCIAS

AGGOUN, Y. Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. **Pediatr Res.**, 2007.

AGOSTINI, J.M.S.; OTTO, P.A.; WAJNTAL, A. Chromosome damage in underground coal miners: detection by conventional cytogenetic techniques and by submitting lymphocytes of unexposed individuals to plasma from at-risk groups. **Braz J Genet.**, v. 19, p. 641-646, 1996.

ALESSIO, H.M. *et al.* Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Med Sci Sports Exerc.**, v.32, p.1576-81, 2000.

ANTIC, V.A. ; MONTANI, J.P. Multiple mechanisms involved in obesity-induced hypertension. **Heart Lung Circ.**, v. 12, p.84-93, 2003.

APOR, P. ; RÁDI, A. Physical exercise, oxidative stress and damage. **Orv Hetil.**, v. 4, n.147, p.1025-1031, 2006.

AU, W.W. *et al.* Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. **Mutat Res.**, v. 260, p. 137-144, 1991.

BADISA, V.L. Mechanism of DNA damage by cadmium and interplay of antioxidant enzymes and agents. **Environ Toxicol.**, v. 22, p.144-151, 2007.

BALAQUER, V. I. Control and prevention of cardiovascular disease around the world. **Rev Esp Cardiol.**, v.57, p.487-494, 2004.

BALDWIN, J.; SNOW, R.J.; FEBBRAIO, M.A. Effect of training status and relative exercise intensity on physiological responses in men. **Med Sci Sports Exerc.**, v.32, p.1648-1654, 2000.

BANGSBO, J. The physiology of soccer--with special reference to intense intermittent exercise. **Acta Physiol Scand Suppl.**, v. 619, p. 1-155, 1994.

BANGSBO, J.; MOHR, M.; KRUSTRUP, P. Physical and metabolic demands of training and match-play in the elite football player. **J Sports Sci.**, v.24, p.665-674, 2006.

BARALE, R. et al. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes and mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. **Mutat Res.**, v. 157, p. 235-240, 1985.

BARALE, R. et al. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population:II. Contribution of sex, age and lifestyle. **Environ Mol Mutagen.**, v. 31, p. 228-242, 1998.

BARTELS, D.W.; DAVIDSON, M.H.; GONG, W.C. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: reducing the risk. **J Manag Care Pharm.**, v. 13, p.2-15, 2007.

BASSUK, S.S. ; MANSON, J.E. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. **J Appl Physiol.**, v. 99, p. 1193-1204, 2005.

BECKMAN, K.B. ; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev.**, v. 78, p. 547-581, 1998.

BELKIĆ, K. ; NEDIC, O. Workplace stressors and lifestyle-related cancer risk factors among female physicians: assessment using the Occupational Stress Index. **J Occup Health**, v. 49, p. 61-71, 2007.

BERRYMAN, J.W. The tradition of the "six things non-natural": exercise and medicine from Hippocrates through ante bellum America. **Exerc Sport Sci Rev.**, v.17, p.515-559, 1989.

BIANCHI C. Treating the metabolic syndrome. **Expert Rev Cardiovasc Ther.**, v. 5, p. 491-506, 2007.

BLOCHING, M. et al. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 550-555, 2000

BOFFETA, P. et al. Carcinogenic effect of tobacco smoking and alcohol drinking on anatomic sites of the oral cavity and oropharynx. **Int J Cancer**, v.52, p. 530-533, 1992

BOFFETA, P. et al. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. **Am J Epidemiol.**, v. 165, n. 1, p. 36-43, 2007.

BOLOGNESI, C. et al. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 6, p. 249-256, 1997.

BOLOGNESI, C. et al. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. **Age Ageing**, v. 28, p. 393-397, 1999.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; LANDINI, E. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. **Mutagenesis**, v. 17, p. 391-397, 2002.

BONASSI, S. ; AU, W.W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutat Res.**, v. 511, p. 73-86, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA) Coordenadoria de Programas de Controle do Câncer (Pro- Onco). **Câncer de Boca**: manual de detecção de lesões suspeitas. Brasília, D. F., 1996. p. 7-10.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2006**: incidência de câncer no Brasil. Brasília, D.F.: INCA, 2005. 94 p.

BRIVIBA, et al. A half-marathon and a marathon run induce oxidative DNA damage, reduce antioxidant capacity to protect DNA against damage and modify immune function in hobby runners. **Redox Rep.**, v. 10, p. 325-31, 2005

BROWN, P.I.; HUGHES, M.G.; TONG, R.J. Relationship between VO₂max and repeated sprint ability using non-motorised treadmill ergometry. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 47, p.186-190, 2007.

BUKVIC, N. et al. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. **Mutat Res.**, v. 498, p. 159-167, 2001.

BULLEN, B.A. et al. Induction of menstrual disorders by strenuous exercise in untrained women. **N Engl J Med.**, v. 23, n. 312, p.1349-1353, 1985.

BURGAZ, S. et al. Cytogenetic biomonitoring of workers exposed to bitumen fumes. **Mutat Res.**, v. 419, p. 123-130, 1998

BYCZKOWSKI, J. Z. ; GESSNER, T. Biological role of superoxide ion-radical. **Int J Biochem.**, v. 20, p. 569-580, 1998.

BYERS, T. et al. American Cancer Society 2001 Nutrition and Physical Activity Guidelines Advisory Committee. American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: Reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. **CA Cancer J Clin.**, v. 52, p. 92-119, 2002.

CAMPBELL, K.L. Effects of aerobic exercise training on estrogen metabolism in premenopausal women: a randomized controlled trial. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v.16, p. 731-739, 2007

CASARTELLI, G. et al. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, preancerous lesions and squamous cell carcinoma. **Analytical and Quantitative Cytology and Hisytology**, v. 22, p. 486-492, 2000.

CASTAGNA, C.; ABT, G.; D'OTTAVIO, S. Physiological aspects of soccer refereeing performance and training. **Sports Med.** v. 37, p. 625-646, 2007.

CASTELLI E. et al. Indicators of genetic damage in alcoholics: reversibility after alcohol abstinence. **Hepatogastroenterology**, v. 46, p. 1664-1668, 1999.

CATALÁN, J. et al. Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. **Cytogenet Cell Genet.**, v. 68, p. 11-16, 1995.

CHANG, C.L. et al. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 283, p. 148-154, 2002.

CLAYCOMBE, K.J. ; MEYDANI, S.N. Vitamin E and genome stability. **Mutat Res.**, v. 475, p. 37-44, 2001.

CERQUEIRA E. M. M. *et al.* Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix: Association and interaction between cigarette smoking and progression to malignant transformation? **Acta Cytol.**, v. 42, p. 639-649, 1998.

CERQUEIRA, E. M. M. Genética e câncer. In: FERNANDES, Hélio Jandir; SILVA, Maria José; VAN EYLL, Brigitte M.H.R.A (Coord.). **Cancerologia básica**. São Paulo: Rocca , 2000. p. 507-515.

CONSENSO LATINO AMERICANO DE OBESIDADE. Disponível em: <<http://www.abeso.com.br.htm>> Acesso em; 24 abr.2006.

CONTI, A.A. et al. Relationship between physical activity and cardiovascular disease. Selected historical highlights. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 47, p. 84-90, 2007.

COUNTRYMAN, P.I. ; HEDDLE, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutat Res.**, v. 41, p. 321-332, 1976.

DARGA, L. L. Quality of life as a predictor of weight loss in obese, early-stage breast cancer survivors. **Oncol Nurs Forum**, v. 34, p. 86-92, 2007.

DALLAL, C.M. et al. Long-term recreational physical activity and risk of invasive and in situ breast cancer: the California teachers study. **Arch Intern Med.**, v.167, p.408-415, 2007.

DAVISON et al. Exercise and mononuclear cell DNA damage: the effects of antioxidant supplementation. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v.15, p. 480-492, 2005.

DE FLORA, S. et al. The epidemiological revolution of the 20th century. **FASEB J.**, v. 19, p .892-897, 2005.

DE MOURA GALLO, C.V. et al. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. **Mutat Res.**, v. 589, n. 3, p. 192-207, Mar. 2005.

DIETZ, J. et al. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, p. 207-211, 2000.

DREHER, D. ; JUNOD, A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur J Cancer**, v. 32 , p. 30-38, 1996.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.**, v. 82, p .47-95, 2002.

DRUST, B.; REILLY, T.; CABLE, N.T. Physiological responses to laboratory-based soccer-specific intermittent and continuous exercise. **J Sports Sci.**, v.18, p. 885-892, 2000.

DUFFAUD, F. et al. Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. **Mutagenesis**, v. 12, p. 227-231, 1997.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med.**, v. 11, p. 81-128, 1991.

EVANS, H.J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. **Mutat Res.**, v. 392, p. 5-10, 1997.

EYFJORD, J. E. ; BODVARSDOTTIR, S. K. Genomic instability and cancer: Networks involved in response to DNA damage. **Mutat Res.**, v. 592, n. 1-2, p. 18-28, Dec. 2005

FATOUROS, I.G. et al. Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 36, p. 2065-2072, 2004.

FENECH, M. ; MORLEY, A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low-dose X-irradiation. **Mutat Res.**, v. 161, p. 193-198, 1986.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutat Res.**, v. 392, p. 11-18, 1997.

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes _ a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutat Res.**, v. 404, p. 155-165, 1998.

FENECH M. et al. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide, **Mutagenesis**, v. 14, p. 605-612, 1999.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res.**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. et al. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. **Mutat Res.**, v. 534, p. 45-64, 2003a.

FENECH, M. et al. HUman MicroNucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat Res.**, v. 534, p. 65-75, 2003b.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc.**, v.2, p.1084-1104, 2007

FERREIRA, A.L.A. AND MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. **Sports Med.**, v. 36, p. 327-358, 2006.

FLORA, S.J. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 53, n. 1, p. 1-2, apr. 2007.

FOSS, L.M. ; KETEVAN, J. M. FOX. **Bases fisiológicas do exercício e do esporte.** 6º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

FRISARD, M. ; RAVUSSIN, E. Energy metabolism and oxidative stress: impact on the metabolic syndrome and the aging process. **Endocrine**, v. 29, p. 27-32, 2006.

GANDJOUR, A. ; STOCK, S. A national hypertension treatment program in Germany and its estimated impact on costs, life expectancy, and cost-effectiveness. **Health Policy.** Feb, 2007.

GASPERIN, D. ; FENSTERSEIFER, LM. Changes in the lifestyle of hypertensive patients. **Rev Gaucha Enferm.**, v. 27, p. 372-378, 2006.

GLAISTER, M. Multiple sprint work: physiological responses, mechanisms of fatigue and the influence of aerobic fitness. **Sports Med.**, v. 35, p. 757-777, 2005.

GUEDES, D.P.; GUEDES, J.E.R.P. **Controle do peso corporal:** composição corporal, atividade física e nutrição. Londrina. Mediograf, 1998. p.16-20.

GUTTENBACH, M.; SCHAKOWSKI, M.; SCHMID, M. Aneuploidy and ageing: sex chromosome exclusion into micronuclei. **Hum Genet.**, v. 94, p. 295-298, 1994.

GUZMAN, P. et al. Positive correlation between the frequency of micronucleated cells and dysplasia in Papanicolaou smears. **Environ Mol Mutagen.**, v. 41, p. 339-343, 2003.

HAAPANEN, N. et al. Association of leisure time physical activity with the risk of coronary heart disease, hypertension and diabetes in middle-aged men and women. **Int J Epidemiol.**, v. 26, p. 739-747, 1997.

HACKNEY, A.C. The male reproductive system and endurance exercise. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 28, p.180-189, 1996.

HACKNEY, A.C.; PREMO, M.C.; MCMURRAY, R.G. Influence of aerobic versus anaerobic exercise on the relationship between reproductive hormones in men. **J Sports Sci.**, v. 13, p. 305-311, 1995.

HACKNEY A. C., SZCZEPANOWSKA E., VIRU A.M. Basal testicular testosterone production in endurance-trained men is suppressed. **Eur J Appl Physiol.**, v. 89, n. 2, p. 198-201, Apr, 2003.

HALDER, A. et al. Comparative study of exfoliated oral mucosal cell micronuclei frequency in normal, precancerous and malignant epithelium. **Int J Hum Genet.**, v. 4, p. 257-260, 2004.

HALLIWELL, B. ; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. **344**, n. **8924**, p. **721-4**, Sep. 1994.

HANDO, J.C. et al. X chromosome inactivation and micronuclei in normal and Turner individuals. **Hum Genet.**, v. 100, p. 624-628, 1997.

HARDELL, M ; ERIKSSON, A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides, **Cancer**, v. 85, p.1353-1360, 1999.

HARTMANN, A. *et al.* Does physical activity induce DNA damage? **Mutagenesis**, v. 9, n. 3, p. 269-72, May 1994.

HARTMANN, A. et al. Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei. **Free Radic Biol Med.**, v. 24, p. 245-251, 1998.

HARRIS, M.I. Epidemiologic studies on the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). **Clin Invest Med.**, v.18, p. 231-239, 1995.

HASKELL, W.L et al. Effects of intensive multiple risk factor reduction on coronary atherosclerosis and clinical cardiac events in men and women with coronary artery disease. The Stanford Coronary Risk Intervention Project (SCRIP). **Circulation**, v.189, p. 975-990, 1994.

HEEPCHANTREE, W.; PARATASILPIN, T.; KANGWANPONG, D.A Comparative biomonitoring study of populations residing in regions with low and high risk of lung cancer using the chromosome aberration and the micronucleus tests. **Mutat Res.**, v. 587, p. 134-139, 2005.

HELGERUD, J. et al. Aerobic endurance training improves soccer performance. **Med Sci Sports Exerc.**, v.33, p.1925-1931, 2001.

HELMRICH, S.P.; RAGLAND, D.R.; PAFFENBARGER, R.S. JR. Prevention of non-insulin-dependent diabetes mellitus with physical activity. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 26, p. 824-830, 1994.

HILL, J.O. ; WYATT, H.R. Role of physical activity in preventing and treating obesity. **J Appl Physiol.**, v. 99, p. 765-770, 2005.

HOFF, J. ; HELGERUD, J. Endurance and strength training for soccer players: physiological considerations. **Sports Med.**, v. 34, p.165-180, 2004.

HOFF, J. et al. Soccer specific aerobic endurance training. **Br J Sports Med.**, v. 36, p. 218-221, 2002.

HOFFMANN, H. ; SPEIT, G. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. **Mutat Res.**, v. 581, p. 105-114, 2005.

HÓLMEN, A. et al. Increased frequencies of micronuclei in T8 lymphocytes of smokers. **Mutat Res.**, v. 334, p. 205-208, 1995.

HOUWARD, J.A. et al. Effect of the volume and intensity of exercise training on insulin sensitivity. **J Appl Physiol.**, v. 96, n. 1, p. 101-6, Jan. 2004.

HUANG, H.Y.; HELZLSOUER, K.J.; APPEL, L.J. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 9, p. 647-652, 2000.

HUSGAFVEL-PURSIAINEN, K. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. **Mutat Res.**, v. 567, p. 427-445, 2004.

IWASAKI K. et al. Dose-response relationship of the cardiovascular adaptation to endurance training in healthy adults: how much training for what benefit? **J Appl Physiol.**, v. 95, n. 4, p. 1575-83, Jun.-Oct, 2003.

IMPELLIZZERI, F.M.; RAMPININI, E.; MARCORA, S.M. Physiological assessment of aerobic training in soccer. **J Sports Sci.**, v. 23, p. 583-592, 2005.

INAL, M. et al. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 33, p. 564-567, 2001.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans.** Lyon, France, v. 83, 2004.

IRWIN, M.L. et al. Physical activity levels among breast cancer survivors. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 36, p. 1484-1491, 2004.

ISHIKAWA, H. et al. Gene-environmental interactions between alcohol-drinking behavior and ALDH2 and CYP2E1 polymorphisms and their impact on micronuclei frequency in human lymphocytes. **Mutat Res.**, v. 594, p. 1-9, 2006.

ISIK, B.; CEYLAN, A.; ISIK, R. Oxidative Stress in Smokers and Non-smokers. **Inhal Toxicol.**, v. 19, p. 767-769, 2007.

ISRAILI, Z.H.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, R.; VALASCO, M. The future of antihypertensive treatment. **Am J Ther.**, v. 14, p.121-134, 2007.

ITO, K.; HIRAKU, Y.; KAWANISHI, S. Photosensitized DNA damage induced by NADH: site specificity and mechanism. **Free Radic Res.**, v. 41, p. 461-468, 2007.

JACOBS-VAN DER BRUGGEN, M.A. et al. Lifestyle interventions are cost-effective in people with different levels of diabetes risk: results from a modeling study. **Diabetes Care**, v. 30, p.128-134, 2007.

JAGETIA, G.C. et al. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. **Mutat Res.**, v. 491, p. 9-16, 2001.

JENNEN, C.; UHLENBRUCK, G. Exercise and Life-Satisfactory-Fitness: Complementary Strategies in the Prevention and Rehabilitation of Illnesses. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 1, p.157-165, 2004.

Jl, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 222, p. 283-292, 1999.

KAŁKA, D.; SOBIESZCZAŃSKA, M.; MARCINIAK, W. Physical activity as component of cardiovascular disease prevention in elderly people. **Pol Merkur Lekarski.** v.127, p. 48-53, 2007.

KARAHALIL, B. et al. Biological monitoring of young workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in engine repair workshops. **Mutat Res.**, v. 41, p. 261-269, 1999.

KASHYAP, S.R. ; DEFRONZO, R.A. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. **Diab Vasc Dis Res.**, v. 4, p.13-19, 2007.

KAWAKAMI, Y. et al. Reliability of measurement of oxygen uptake by a portable telemetric system. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.**, v. 65, p. 409-414, 1992.

KAWANISHI, S. ; MURATA, M. Mechanism of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress. **Toxicology**, v. 221, n. 2-3, p. 172-8, Feb. 2006.

KEHDY, F. S. G. **Evaluation of the cytogenetic effects of occupational exposure to pesticides on sanitary workers in Belo Horizonte, Brazil.** 2005. Dissertação (Mestrado em Genética)- Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2005.

KING, H.; AUBERT, R.E.; HERMAN, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v. 21, p.1414-1431, 1998.

KINGSLEY, M.I. et al. Effects of phosphatidylserine on oxidative stress following intermittent running. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 37, p.1300-1306, 2005.

KIRSCH-VOLDERS, M. ; FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis**, v. 16, p. 51, 2001.

KNUDSEN, L.E. ; HANSEN, A.M. Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. **Int J Hyg Environ Health**, v. 210, n. 3-4, p. 461-70, Feb. 2007.

KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-43, Apr. 2000.

KRUK, J. Lifetime physical activity and the risk of breast cancer: a case-control study. **Cancer Detect Prev.**, v. 31, n. 1, p. 18-28, Feb. 2007.

KRUSTRUP, P.; MOHR, M.; BANGSBO, J. Activity profile and physiological demands of top-class soccer assistant refereeing in relation to training status. **J Sports Sci.**, v. 20, p. 861-871, 2002.

KUBIAK, R. et al. Biomarkers of carcinogenesis in humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mutat Res.**, v. 445, p. 175-180, 1999.

LAMONTE, M.J.; BLAIR, S.N.; CHURCH, T.S. Physical activity and diabetes prevention. **J Appl Physiol.**, v. 99, p.1205-1213, 2005.

LANAS, F. et al. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America: the INTERHEART Latin American study. **Circulation**, v. 115, p.1061-1063, 2007.

LA VECCHIA, C. et al. Cigarette smoking and risk of cervical neoplasia. **Am. J. Epidemiol.**, v. 123, p. 22-29, 1986.

LEACH, N.T. ; JACKSON-COOK, C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei? **Mutat Res.**, v. 554, p. 89-94, 2004.

LEAL-GARZA, C.H. et al. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer. **Mutat Res.**, v. 515, p. 57-62, 2002.

LEE, I.M. Physical activity and cancer prevention--data from epidemiologic studies. **Med Sci Sports Exerc.** v. 35, p. 1823-1827, 2003.

LEE, I.M.; SESSO, H.D.; PAFFENBARGER, R.S.JR. Physical activity and coronary heart disease risk in men: does the duration of exercise episodes predict risk? **Circulation**, v. 102, p. 981-986, 2000.

LEE, I.M. et al. Relative intensity of physical activity and risk of coronary heart disease. **Circulation**, v.107, p.1110-1116, 2003.

LEKHI, C.; GUPTA, P.H.; SINGH, B. Influence of Exercise on Oxidant Stress Products in Elite Indian Cyclists. **Br J Sports Med.**, May, 2007.

LINDEN, B. Systems and diseases. The heart, Part Seven. **Nurs Times**, v. 96, p. 49-52, 2000.

LIPPMAN, S.M. et al. Bronchial micronuclei as a marker of an early stage of carcinogenesis in the human tracheobronchial epithelium. **Int J Cancer**, v. 45, p. 811-815, 1990.

LIU, J.F. et al. Blood lipid peroxides and muscle damage increased following intensive resistance training of female weightlifters. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1042, p. 255-261, 2005.

LLEWELLYN, C. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. **Oral Oncol.**, v. 39, p. 106-114, 2003.

LOFT, S. ; POULSEN H. E. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. **J Mol Med.**, v. 74, p. 297-312, 1996.

LÓPEZ, O. et al. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. **Toxicol Lett.**, May, 2007.

LOOMIS, D.P. et al. Micronuclei in epithelial cells from sputum of uranium workers. **Scand J Work Environm Health**, v.16, p. 355-362, 1990.

LUCERO, L. et al. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. **Mutat Res.**, v. 464, p. 255-262, 2000.

MAFFEI, F. et al. Micronuclei frequencies in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation: influence of smoking status and other factors. **Mutagenesis**, v. 17, p. 405-409, 2002.

MAJER B. J. *et al.* Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutat Res.**, v. 489, p.147-72, 2001.

MALUF, S.W. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Clin Chim Acta**, v. 347, p.15-24, 2004.

MASTALOUDIS, A. ; LEONARD, S.W.; TRABER, M.G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. **Free Radic Biol Med.**, v. 31, p. 911-922, 2001.

MATEUCA R. *et al.* Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**. v. 88, n. 11, p. 1515-31, Nov. 2006.

MCARDLE, D. W.; KATCH, I. F.; KATCH, L.V. **Fisiologia do exercício energia, nutrição e desempenho humano**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MCARDLE F. et al. Intracellular generation of reactive oxygen species by contracting skeletal muscle cells. **Free Radic Biol Med**. v. 39, n. 5, p. 651-7, Sep. 2005.

MCTIERNAN, A.; Intervention studies in exercise and cancer prevention. **Med Sci Sports Exerc**, v.35, n.11, p.1841-5, Nov 2003.

METAXAS T, *et al.* Seasonal variation of aerobic performance in soccer players according to positional role. **J Sports Med Phys Fitness**. v. 46, n. 4, p. 520-5, Dec. 2006.

MIERES J H. Review of the American Heart Association's guidelines for cardiovascular disease prevention in women. **Heart**. 92 Suppl 3:iii10-3, May, 2006.

MIGLIORE, L. et al. Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. **Mutat Res.**, v. 263, p. 243-248, 1991.

MOHR M.; KRUSTRUP P.; BANGSBO J. Fatigue in soccer: a brief review. **J Sports Sci**. v. 23, n. 6, p. 593-9, Jun. 2005.

MOLLER P. et al. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. **FASEB J**. 2001 May;15(7):1181-6.

MORRATO E H. et al. Physical activity in U.S. adults with diabetes and at risk for developing diabetes, 2003. **Diabetes Care**. v. 30, n. 2, p. 203-9, Feb. 2007.

MORRIS J. N. et al. Incidence and prediction of ischaemic heart-disease in London busmen. **Lancet**. v. 2, n. 7463, p. 553-9, Sep.1966.

MUTI P, ROGAN E, CAVALIERI E. Androgens and estrogens in the etiology and prevention of breast cancer. **Nutr Cancer**., v. 56, n. 2, p. 247-52, 2006.

NAKACHI K. et al. Perspectives on cancer immuno-epidemiology. **Cancer Sci.**, v. 95, n. 12 , p. 921-9, Dec. 2004.

NATH, J.; TUCKER, J.D.; HANDO, J.C. Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men. **Chromosoma**, v. 103, p. 725-731, 1995.

NIESS A M. *et al.* DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. **Int J Sports Med.**, v. 17, p. 397-403, 1996.

NIESS A M, SIMON P. Response and adaptation of skeletal muscle to exercise--the role of reactive oxygen species. **Front Biosci.**, v. 1, p. 4826-38, 2007.

NIKOLAILDIS M G. *et al.* Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v. 32, n. 2, p. 197-205, Apr. 2007.

NOHMI T.; KIM S. R.; YAMADA M. Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. **Mutat Res.**, v. 591, n. 1-2, p. 60-73, Aug-Dec, 2005.

ODAGIRI, Y. ; UCHIDA, H. Influence of serum micronutrients on the incidence of kinetochore-positive or negative micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. **Mutat Res.**, v. 415, p. 35-45, 1998.

ORHAN, H. Et al. Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. **Free Radic Res.**, v. 38, p. 1269-1279, 2004.

PAFFENBARGER R. S. JR.; BLAIR S. N.; LEE I.M. A history of physical activity, cardiovascular health and longevity: the scientific contributions of Jeremy N Morris, DSc, DPH, FRCP. **Int J Epidemiol.**, v. 30, n. 5, p. 1184-92, Oct. 2001.

PARK R. J. High-protein diets, "damaged hearts," and rowing men: antecedents of modern sports medicine and exercise science, 1867-1928. **Exerc Sport Sci Rev.**, v. 25, p. 137-69, 1997.

PARK T G. et al. Lifestyle plus Exercise Intervention Improves Metabolic Syndrome Markers without Change in Adiponectin in Obese Girls. **Ann Nutr Metab.**, v. 51, n. 3, p. 197-203, Jun. 2007.

PARKIN D M. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet Oncol.**, v. 2, n. 9, p. 533-43, Sep. 2001.

PARKIN D. M.; BRAY F. I.; DEVESA S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur J Cancer.**, 37 Suppl 8:S4-66, Oct. 2001.

PARKIN D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin.**, v. 55, n. 2, p. 74- 108, Mar-Apr. 2005.

PARKIN D M. The evolution of the population-based cancer registry. **Nat Rev Cancer.**, v. 6, n. 8, p. 603-12, Aug. 2006.

PAVAN L. et al. Effects of a traditional lifestyle on the cardiovascular risk profile: the Amondava population of the Brazilian Amazon. Comparison with matched African, Italian and Polish populations. **J Hypertens.**, v. 17, n. 6, p. 749-56, jun. 1999.

PEAKE J M ; SUZUKI K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. **Exerc Immunol Rev.**, v. 10, p. 129-41, 2004.

PEAKE J M. et al . Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, and markers of neutrophil activation. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 37, n. 5, p. 737-45, May, 2005.

PEREIRA, C. A. B. Teste Estatístico Para Comparar Proporções em Problemas de Citogenética. In: GAY, N. R.; RODRIGUES, M.; MONTELEONE-NETO, R. (Org.). **Mutagenese, teratogenese e carcinogenese - metodos e criterios de avaliação.** Brasil, 1991. p. 113-121.

PERRY J J.; FAN L.; TAINER J A. Developing master keys to brain pathology, cancer and aging from the structural biology of proteins controlling reactive oxygen species and DNA repair. **Neuroscience.** 2007 Apr 14;145(4):1280-99. Epub 2006 Dec 15

PERVAIZ S, CLEMENT M V. Superoxide anion: Oncogenic reactive oxygen species? **Int J Biochem Cell Biol.**, 21, Apr. 2007.

PETERSEN E. W. *et al.* Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 280, n. 6, p. C1570-5, Jun. 2001.

PIKE M. C. *et al.* Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. **Epidemiol Rev.**, v.15, n. 1, p. 17-35, 1993.

PITANGA, F.J.G. Epidemiologia, atividade física e saúde. **Rev. Brás. Ciên. e Mov.**, v.10, n.3, p. 49-54, jul. 2002.

PITTALUGA, M. et al. Cellular and biochemical parameters of exercise-induced oxidative stress: relationship with training levels. **Free Radic Res.**, v. 40, p. 607-614, 2006.

POLLOCK, M.L.; WILMORE, J. H. **Exercícios na saúde e na doença. Avaliação e prescrição para prevenção e reabilitação.** 2. ed. São Paulo: Medsi, 1993.

PORCIELLO, G. et al. Spontaneous chromosome damage (micronuclei) in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. **J Reumatol.**, v. 30, p. 1244-1247, 2003.

REILLY, T. Energetics of high-intensity exercise (soccer) with particular reference to fatigue. **J Sports Sci.**, v. 15, p. 257-63, 1997.

REN, J. Influence of gender on oxidative stress, lipid peroxidation, protein damage and apoptosis in hearts and brains from spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 34, p. 432-438, 2007.

RIBEIRO, L.R. *et al.* Biomonitoring of individuals occupationally exposed to aromatic amines. In Mutation and Environment. Somatic and Heritable Mutation, Adduction and Epidemiology. M.L. Mendelsohn ; R.J. Abertini, Eds. **Part C. Wiley-Liss**, New York, p.387-396, 1990.

ROBERTS, C.K. ; BARNARD, R.J. Effects of exercise and diet on chronic disease. **J Appl Physiol.**, v. 98, p. 3-30, 2005.

RODRIGUEZ, B.L. *et al.* Physical activity and 23-year incidence of coronary heart disease morbidity and mortality among middle-aged men. The Honolulu Heart Program. **Circulation**, v. 89, p. 2540-2544, 1994.

ROITMAN, J.L. **Manual de pesquisa das diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição. American College of Sports Medicine.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

ROSIN, M.P. ; ANWAR, W. Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic *Schistosoma haematobium* infections. **Int J Cancer**, v. 50, p. 539-543, 1992.

RUNDLE, A. Molecular epidemiology of physical activity and cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 14, p. 227-236, 2005.

SATO, Y. *et al.* Clinical aspects of physical exercise for diabetes/metabolic syndrome. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 9, p., 2007.

SCHIFFL, C.; ZIERES, C.; ZANKL, H. Exhaustive physical exercise increases frequency of micronuclei. **Mutat Res.**, v. 389, p. 243-6, 1997.

SCHNEIDER, M. *et al.* Protective effect of vitamins C and E on the numbers of micronuclei in lymphocytes in smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. **Free Rad Res.**, v. 34, p. 209-219, 2001.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med**

Esporte, v.10; n. 4, p. 308-13, 2004.

SESSO, H.D.; PAFFENBARGER, R.S.JR.; LEE, I.M. Physical activity and coronary heart disease in men: The Harvard Alumni Health Study. **Circulation**, v. 29; n. 102, p. 975-980, 2000.

SEVERIN, E. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. **Romanian J Morphol Embryol.**, v. 41, p. 55-58, 1995.

SICHERI, R.; NASCIMENTO, S D.; COUTINHO, W. The burden of hospitalization due to overweight and obesity in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 23, p.1721-1727, 2007.

SKRTIC, S. *et al.* Risk factor identification and assessment in hypertension and diabetes (RIAHD) study. **Blood Press.**, v. 15, p.367-374, 2006.

SLATTERY, M.L.; JACOBS, D.R.JR.; NICHAMAN, M.Z. Leisure time physical activity and coronary heart disease death. The US Railroad Study. **Circulation**, v. 79, p. 304-311, 1989.

SMITH, J.A. *et al.* Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. **Int J Sports Med.**, v.11, p.179-187, 1990.

SMITH, J.T. Are passive smoking, air pollution and obesity a greater mortality risk than major radiation incidents? **BMC Public Health.**, v. 7, p. 49, Apr. 2007.

SOLERA, A.J. Influence of diet and lifestyle in colorectal cancer. **Rev Esp Enferm Dig.**, v. 99, p.190-200, 2007.

SPRAQUE, B. L. Lifetime recreational and occupational physical activity and risk of in situ and invasive breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v.16, p. 236-243, 2007.

STICH, H.F.; CURTIS, J.R.; PARIDA, B.B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. **Int. J. Cancer.**, v. 30, p. 553- 559, 1982.

STICH, H. F. ; ROSIN, M. P. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human bucal mucosa cells. *Int*

J Cancer, v. 31, p. 305-308, 1983.

STOPEER, H. ; MULEER, S.O. Micronuclei as a biologic endpoint for genotoxicity: A minireview. **Toxi in vitro**, p. 661-667, 1997.

STROM, S.S. et al. Evaluation of sister chromatid exchange and chromosome breaks in a cohort of untreated Hodgkin's disease patients. **Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 6, p. 291-293, 1997.

SURUDA, A. et al. Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v.2, p. 453-460, 1993

SUZUKI K. et al. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. **J Appl Physiol.**, v.87, p.1360-7,1999.

TOLEDO, F.G. et al. Effects of Physical Activity and Weight Loss on Skeletal Muscle Mitochondria and Relationship to Glucose Control in Type 2 Diabetes Mellitus. **Diabetes**, v. 29, p.2142-7,2007.

TOMANIN, R. et al. Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. **Mutagenesis**, v. 6, p. 123-126, 1991.

TOYOKUNI, S. ; AKATSUKA, S. Pathological investigation of oxidative stress in the post-genomic era. **Pathol Int.**, v.57, p.461-473, 2007.

TREVATHAN, E. et al. Cigarette smoking and dysplasia and carcinoma *in situ* of the uterine cervix. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 250, p. 499-502, 1983.

TRUEBA, G. P.; SÁNCHEZ, G. M.; GIULIANI, A. Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. **Front Biosci.**, v. 1; n. 9, p. 2029-2044, 2004.

TSAI K. et al. Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. **Free Radic Biol Med.**, v. 1;n. 31, p. 1465-1472, 2001.

TWOROGGER, S.S. et al. Physical activity and inactivity in relation to sex hormone, prolactin, and insulin-like growth factor concentrations in premenopausal women: Exercise and premenopausal hormones. **Cancer Causes Control**, v. 18, p. 743-752, 2007.

WATSON T. A. et al. Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 37, p. 63-71, 2005.

WANNAMETHEE S. G.; SHAPER A. G.; WALKER M. Physical activity and mortality in older men with diagnosed coronary heart disease. **Circulation.**, v.19; n.102, p.1358-1363, 2000.

WARNAKULASURIYA, S.; SUTHERLAND G.; SCULLY C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. **Oral Oncol.**, v. 41, p. 244-269, 2005

WESTERLIND, K.C. Physical activity and cancer prevention--mechanisms. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 35, p. 1834-1840, 2003.

WHELTON, S. P. et al. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. **Ann Intern Med.**, v.2; n. 136, p. 493-503, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Agency for Research on Cancer. World cancer report.** In: STEWART BW, KLEIHUES P, editors. Oxford: Oxford University Press, 2003.

WIERZBA, T. H. et al. Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. **J Physiol Pharmacol.**, v. 57, Suppl 10, p.115-131, 2006.

WILLIAMSON, D. F. et al. Recreational physical activity and ten-year weight change in a US national cohort. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v. 17, p. 279-286, 1993.

WILMORE, J.H.; COSTILL, D.L. **Fisiologia do esporte e do exercício.** 2. ed. São Paulo: Manole, 2001.

UMEGAKI, K. et al. Influence of one bout of intensive running on lymphocyte micronucleus frequencies in endurance-trained and untrained men. **Int J Sports Med.**, v. 19, p. 581-585, 1998.

YACH, D. et al. The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control. **JAMA**, v. 2; n. 291, p. 2616-2622, 2004.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev.**, v. 74, p.139-162, 1994.

YU, T.W. ; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutat Res.**, v. 379, p. 201-210, 1997.

XUE, K. et al. Micronucleus formation in peripheral-blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol and tea drinking habits. **Int J Cancer**, v. 50, p. 702-705, 1992.

ZALACAIN, M.; SIERRASESÚMAGA, L.; PATIÑO, A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. **An Sist Sanit Navar.**, v. 28, p. 227-36, 2005

ZAVRAS A. et al. Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece **Oral Oncol.**, v. 37, p. 28-35, 2001

ZHENG, T. et al. Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-Hodgkin lymphoma, **J. Occup. Environ. Med.**, v. 43, p. 641-649, 2001.

ZNAOR A. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes as a possible cancer risk biomarker: a cohort study of occupationally exposed workers in Croatia. **Croat Med J.**, v. 44, p. 441-446, 2003.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**PROJETO: *PRÁTICA REGULAR DO FUTEBOL: O ALTO RENDIMENTO DESTES
ESPORTE ESTÁ ASSOCIADO A DANOS GENÉTICOS?***

Eu, Marcelo Trotte Motta, sou Professor do curso de Educação Física na Universidade Estadual de Feira de Santana e pretendo desenvolver uma pesquisa para investigar se a prática regular e intensa do exercício físico está relacionada com danos no material genético de um tipo de célula que está presente no sangue (o linfócito).

Para realizar esta pesquisa é necessário coletar uma quantidade pequena de sangue (10ml) da veia do braço, o que será feito utilizando seringa descartável e esterilizada. Este procedimento poderá trazer algum desconforto, devido à introdução da agulha na veia, mas não oferece risco à sua saúde. Preciso, também, fazer algumas perguntas relacionadas à prática de atividade física, aos hábitos de fumar e de beber e sobre a ocorrência de diabetes, pressão alta, uso de medicação, tratamento com radiação e qual o tipo de atividade profissional que exerce.

Este procedimento será realizado pela enfermeira Sueli Souza Pereira, quando a coleta de material for realizada em Salvador e também pela bióloga Joelande Esquivel Correia (Laboratório de Análises Clínicas UEFS) em coletas realizadas em Feira de Santana.

Dou garantia de que todas as informações sobre você serão mantidas em sigilo e que a divulgação dos resultados será feita com preservação da identidade dos participantes.

Desta pesquisa, poderão ser geradas informações a respeito da intensidade com que os exercícios passam a não exercer efeitos benéficos para o indivíduo sugerindo limites para sua realização.

Caso você concorde em participar deste estudo, gostaria que assinasse este termo, elaborado em duas vias, ficando com uma delas. Esclareço que a qualquer momento você poderá se desvincular do estudo, se assim o desejar, sem que isto cause qualquer constrangimento.

Estarei à disposição, assim como a minha orientadora, para qualquer esclarecimento a mais que você julgar necessário e me comprometo a informar diretamente, para todos os participantes do estudo, os resultados que obtiver.

Marcelo Trotte Motta
Pesquisador Responsável
Laboratório de Genética Toxicológica
Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Feira de
Santana
Telefone: 75 3224-8019/ 8285

Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira
Pesquisadora Orientadora
Laboratório de Genética Toxicológica
Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Feira de
Santana
Telefone: 75 3224-8019/ 8285

Sujeito da Pesquisa

QUESTIONÁRIO

Código de identificação _____ Idade _____ Data _____
 Contato _____
 Profissão _____
 Peso _____ Altura _____

Antecedentes Patológicos

Alguém em sua família tem ou já teve?

- | | | | |
|----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Pressão alta | <input type="checkbox"/> Diabete | <input type="checkbox"/> Anemia | <input type="checkbox"/> Bronquite |
| <input type="checkbox"/> Pressão baixa | <input type="checkbox"/> Colesterol alto | <input type="checkbox"/> Asma | <input type="checkbox"/> Problemas de coluna |
| <input type="checkbox"/> Infarto | <input type="checkbox"/> Derrame | <input type="checkbox"/> Obesidade | <input type="checkbox"/> Câncer |

Você tem ou já teve?

- | | | | |
|----------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Pressão alta | <input type="checkbox"/> Diabete | <input type="checkbox"/> Anemia | <input type="checkbox"/> Tonturas |
| <input type="checkbox"/> Pressão baixa | <input type="checkbox"/> Colesterol alto | <input type="checkbox"/> Asma | <input type="checkbox"/> Problemas de coluna |
| <input type="checkbox"/> Infarto | <input type="checkbox"/> Derrame | <input type="checkbox"/> Problemas Hormonais | |

Você já praticou atividade física ou esportes de forma regular?

- Não
 Sim. Que tipo e por quanto tempo?
-

Quantas vezes por semana?

- 1 a 2 vezes 3 a 4 vezes 5 a 6 vezes Mais de 6 vezes

Qual a duração de cada período de atividade?

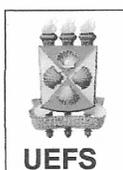
- | | | |
|------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 10 a 20 minutos | <input type="checkbox"/> 21 a 30 minutos | <input type="checkbox"/> 31 a 40 minutos |
| <input type="checkbox"/> 41 a 50 minutos | <input type="checkbox"/> 51 a 60 minutos | <input type="checkbox"/> Mais de 60 minutos |

Você considerava intensidade da atividade?

- Leve Moderada Intensa Extenuante

Você já fumou?

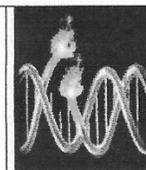
- Não
 Sim. Durante quanto tempo? _____



UNIVERSIDADE ESDADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Departamento de Ciências Biológicas

Laboratório de Genética Toxicológica



Feira de Santana, 16 de maio de 2006

Ofício S/N

DE: **Marcelo Trotte Mota**

Pesquisador Responsável

PARA: **Dra. Eliane Elisa de Souza e Azevedo**

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da
Universidade estadual de Feira de Santana

Senhora Coordenadora,

Encaminhamos a Vossa Senhoria o Projeto de Pesquisa "**Prática Regular no Futebol: o Alto Rendimento deste Esporte está Associado à Danos Genéticos?**" para que seja avaliado por este Comitê.

Atenciosamente,

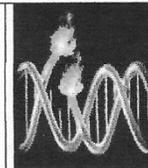
Marcelo Trotte Mota
Pesquisador Responsável



UNIVERSIDADE ESDADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Departamento de Ciências Biológicas

Laboratório de Genética Toxicológica



DECLARAÇÃO

Eu, Marcelo Trotte Mota, declaro para os devidos fins que a coleta dos dados do Projeto de Pesquisa "**Prática Regular no Futebol: o Alto Rendimento deste Esporte está Associado à Danos Genéticos?**", não foi iniciada, estando aguardando a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Feira de Santana, 16 de maio de 2006

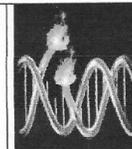

Marcelo Trotte Mota
Pesquisador Responsável



UNIVERSIDADE ESDADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Departamento de Ciências Biológicas

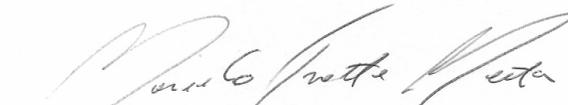
Laboratório de Genética Toxicológica



DECLARAÇÃO

Eu, Marcelo Trotte Mota, declaro para os devidos fins que comprometo-me a observar a Resolução nº 196/96 em todas as fases do desenvolvimento do Projeto de Pesquisa "**Prática Regular no Futebol: o Alto Rendimento deste Esporte está Associado à Danos Genéticos?**", incluindo o envio de relatórios parcial e final.

Feira de Santana, 16 de maio de 2006



Marcelo Trotte Mota
Pesquisador Responsável