

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO
JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM**

CAMILA DANIELLE CUNHA NEVES

**EFEITO CRÔNICO DO TABAGISMO NO PERFIL INFLAMATÓRIO,
ESTRESSE OXIDATIVO E DESEMPENHO FÍSICO EM HOMENS
ASSINTOMÁTICOS.**

DIAMANTINA – MG

2014

CAMILA DANIELLE CUNHA NEVES

**EFEITO CRÔNICO DO TABAGISMO NO PERFIL INFLAMATÓRIO,
ESTRESSE OXIDATIVO E DESEMPENHO FÍSICO EM HOMENS
ASSINTOMÁTICOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, na área de concentração em Ciências Fisiológicas, como requisito para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Amaral Mendonça – UFVJM

Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira – UFMG

DIAMANTINA – MG

2014

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nathália Machado Laponez Maia – CRB6/3002

N518e 2014	<p>Neves, Camila Danielle Cunha. Efeito crônico do tabagismo no perfil inflamatório, estresse oxidativo e desempenho físico em homens assintomáticos / Camila Danielle Cunha Neves. – 2014. 85 p. : il., tabs.</p> <p>Orientadora: Profª Drª Vanessa Amaral Mendonça Coorientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira.</p> <p>Dissertação (Mestrado – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, 2014.</p> <p>1. Fumantes. 2. Receptores solúveis de TNF. 3. Antioxidantes. 4. Desempenho físico. 5. Músculo esquelético periférico. I. Mendonça, Vanessa Amaral. II. Teixeira, Mauro Martins. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.</p>
CDD 612.044	

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

**EFEITO CRÔNICO DO TABAGISMO NO PERFIL INFLAMATÓRIO, ESTRESSE
OXIDATIVO E DESEMPENHO FÍSICO EM HOMENS ASSINTOMÁTICOS.**

Camila Danielle Cunha Neves

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 20 / 02 / 2014

Prof. Antônio Teixeira Júnior – UFMG

Prof. Flávio de Castro Magalhães – UFVJM

Prof.^a Vanessa Amaral Mendonça – UFVJM

Presidente

DIAMANTINA

2014

Dedico esta dissertação a todos os fumantes que lutam incessantemente contra a dependência do tabaco, em especial ao meu pai Cristiano Neves, que após 30 anos de consumo do cigarro, hoje é considerado ex-fumante.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter guiado o meu caminho em todos os momentos do mestrado, me amparando durante todas as dificuldades encontradas nesta caminhada;

Aos meus pais Cristiano e Ednéia Neves e ao meu irmão Danilo Neves, pelo apoio e incentivo aos estudos, em especial a minha mãe que sempre ajudou nos momentos de coleta de dados e recrutamento de voluntários;

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Amaral Mendonça por aceitar me orientar, pela confiança, pelos ensinamentos e pelo apoio e presença constante em todos os momentos do mestrado;

Ao meu namorado Carlos Filipe pelas palavras de carinho e incentivo, e pela paciência nos momentos de nervosismo;

As alunas de iniciação científica e tecnológica, Vanessa Kelly e Liliana Lima pela disposição em ajudar em todos os momentos das coletas de dados, no recrutamento de voluntários e na escrita de trabalhos, em especial por colaborarem com o meu aprendizado de pesquisadora;

A Rosalina Tossige, que em nenhum momento mediu esforços para me ajudar com as avaliações do estresse oxidativo;

Aos meus amigos, em especial aos colegas de mestrado Dirceu, Maria Cecília, Sueli, Lauane, Lidiane, Paula e Silvia, pelo aprendizado mútuo e pela amizade que nasceu neste grupo, permitindo dividir os momentos de aflição e as dificuldades encontradas ao longo desta trajetória;

Aos professores Ana Cristina Lacerda, Etel Vieira e Adriano Prado Simão, por auxiliarem na correção dos trabalhos, pelos ensinamentos e por disponibilizarem os materiais necessários em diversas análises;

A Núbia Carelli, por colaborar com minha inserção na vida acadêmica, pelos ensinamentos, apoio e auxílio na escrita de trabalhos;

Aos meus familiares, principalmente meus tios Wanderson e Vainer Cunha que foram voluntários desta pesquisa, e a minha tia Érika Neves pelo auxílio na correção do português;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Mauro Teixeira pelo auxílio e suporte ao meu projeto de pesquisa que teve como resultado esta dissertação;

A todos os voluntários desta pesquisa pela disponibilidade e por permitirem o avanço da ciência;

Aos professores e alunos do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos e incentivo;

A banca examinadora por aceitar o convite e pela colaboração com o crescimento deste trabalho.

RESUMO

O efeito do consumo crônico do cigarro no perfil inflamatório, estresse oxidativo e desempenho físico têm sido investigado em fumantes assintomáticos, contudo, estes estudos na sua maioria ainda são poucos e divergentes. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito crônico do tabagismo no perfil inflamatório, estresse oxidativo, função muscular esquelética periférica e aptidão cardiorrespiratória de homens adultos assintomáticos. Os sujeitos do estudo foram divididos igualmente entre o grupo fumante (GF, n= 20) e grupo controle (GC, n= 20), composto por sujeitos não fumantes. A função pulmonar de todos participantes foi avaliada pela espirometria. O perfil inflamatório foi avaliado pela mensuração das concentrações plasmáticas das citocinas IL-6, TNF- α , IL-10 e pelos receptores solúveis de TNF- α (sTNFR1 e sTNFR2). O estresse oxidativo foi avaliado pela mensuração das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase de eritrócitos e pela capacidade antioxidante total do plasma. A função muscular esquelética periférica foi avaliada por meio das medidas de pico de torque dos músculos extensores e flexores de joelho e da resistência e fadiga muscular dos músculos extensores de joelho; e a aptidão cardiorrespiratória foi avaliada através da mensuração do consumo pico de oxigênio ($VO_{2\text{pico}}$), frequência cardíaca máxima (FC_{max}) e distância caminhada em um teste máximo de caminhada/corrida. Sujeitos do GF apresentaram aumentos significativos das concentrações plasmáticas de TBARS e do receptor solúvel sTNFR1 e diminuições significativas da atividade da enzima catalase em lisado eritrocitário, comparados ao GC. Além disso, sujeitos do GF exibiram menor resistência muscular dos músculos extensores de joelho como determinado pelas medidas de trabalho, com inalterado índice de fadiga dos músculos extensores de joelho e pico de torque dos músculos extensores e flexores de joelho. A aptidão cardiorrespiratória foi similar entre os sujeitos do GF e do GC. Este estudo demonstrou que homens fumantes crônicos e assintomáticos exibiram alterações no perfil inflamatório, no estresse oxidativo e na função muscular esquelética periférica, quando comparados a não fumantes.

Palavras-chave: fumantes, receptores solúveis de TNF- α , antioxidantes, radicais livres, músculo esquelético periférico, desempenho físico.

ABSTRACT

The effect of chronic cigarette smoking on inflammatory profile, oxidative stress and physical performance has been investigated in asymptomatic smokers, however, these studies are few and divergent. Thus, the aim of this study was to evaluate the chronic effect of smoking on inflammatory profile, oxidative stress, peripheral skeletal muscle function and cardiorespiratory fitness in asymptomatic adult men. The subjects of the study were divided equally between the smoking group (SG, n = 20) and control group (CG, n = 20) composed of non-smoking subjects. The lung function of all participants was assessed by spirometry. The inflammatory response was assessed by measurement of plasma concentrations of IL- 6, TNF- α , IL -10 and soluble receptors for TNF- α (sTNFR1 and sTNFR2). Oxidative stress was evaluated by measuring plasma concentrations of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase in erythrocytes and the total antioxidant capacity of plasma. The peripheral skeletal muscle function was assessed by measuring the peak torque of the extensor and flexor muscles of the knee; and resistance and muscle fatigue of the knee extensor muscles; and cardiorespiratory fitness was assessed by measurement of peak uptake oxygen (VO_{2peak}), maximum heart rate (HR_{max}) and distance walked on a maximum test of the walk/run. SG subjects showed significant increases in plasma concentrations of TBARS and soluble receptors sTNFR1 and significant decreases in erythrocyte catalase enzyme activity, compared to the CG. In addition, SG subjects exhibited less muscle strength of knee extensors muscles as determined by measures of work and unchanged fatigue index of the knee extensors muscles and peak torque of knee extensors and flexors muscles. Cardiorespiratory fitness was similar between subjects SG and CG. This study demonstrated that male chronic smokers, healthy adult, exhibited changes in the inflammatory response, oxidative stress and peripheral skeletal muscle function, when compared to non-smokers.

Keywords: smoking, soluble receptors for TNF- α , antioxidants, free radicals, peripheral skeletal muscle, physical performance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias e mecanismos envolvidos na fisiopatologia das principais doenças tabaco-relacionadas.....	21
Figura 2. Fluxograma do Estudo.....	32
Figura 3. Procedimentos experimentais do estudo.....	32
Figura 4. Representação do trajeto do <i>Shuttle Walking Test</i>	40
Figura 5. Valores médios das concentrações plasmáticas de sTNFR1 (A) (p= 0,049) e sTNFR2 (B) (p= 0,378) nos grupos controle (GC) e fumante (GF). Dados expressos em pg/mL. Teste-t independente.....	45
Figura 6. Valores de medianas das concentrações plasmáticas de IL-6 (A) (p= 0,074) e IL-10 (B) (p= 0,220) nos grupos controle (GC) e fumante (GF). Dados expressos em pg/mL. Teste Mann-Whitney.....	46
Figura 7. Valores médios e desvio padrão da concentração plasmática de TBARS nos grupos controle (GC) e fumante (GF) (p= 0,003). Dados expressos em nmol de malondialdeído (MDA)/mg de proteína. Teste-t independente.....	47
Figura 8. Valores médios e desvio padrão das atividades das enzimas antioxidantes catalase (A) (p< 0,0001) e SOD (B) (p= 0,070) nos grupos controle (GC) e fumante (GF). Dados de catalase expressos em variação da atividade da enzima (ΔE) /min/mg de proteína e de SOD expressos em unidade (U) /mg de proteína. Teste t-independente.....	47
Figura 9. Valores médios e desvio padrão da capacidade antioxidante total do plasma nos grupos controle (GC) e fumante (GF) (p< 0,0001). Dados expressos em μ mol de sulfato ferroso (FeSO ₄) /L/mg de proteína. Teste-t independente.....	48
Figura 10. Correlações das concentrações plasmáticas de sTNFR1 (p= 0,441; r= 0,260), TBARS (p= 0,725; r= 0,092), capacidade antioxidante total do plasma (p= 0,153; r= 0,375) e a atividade da enzima catalase (p= 0,494; r= 0,178) com o trabalho total do grupo fumante. Correlação de Pearson.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dos dados antropométricos, demográficos e função pulmonar entre os grupos.....	43
Tabela 2. História de tabagismo, dependência nicotínica e nível de exposição à fumaça do cigarro dos sujeitos fumantes.....	44
Tabela 3. Comparação da função muscular esquelética periférica, dos testes de contração isocinética voluntária máxima (pico de torque), resistência muscular (trabalho) e fadiga muscular (índice de fadiga), dos grupos controle (GC) e fumante (GF).....	49
Tabela 4. Comparação da aptidão cardiorrespiratória entre os grupos controle (GC) e fumante (GF).....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCEB	Critério de Classificação Econômica Brasil
CIVM	Contração isocinética voluntária máxima
CO	Monóxido de carbono
CVF	Capacidade vital forçada
DCV	Doenças cardiovasculares
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
e ⁻	Elétrons
FC	Frequência cardíaca
FTND	Teste de Fagerstrom para dependência nicotínica (<i>Fagerstrom test for nicotine dependence</i>)
GC	Grupo controle
GF	Grupo fumante
%G	Percentual de gordura
HDL	Lipoproteínas de alta densidade (<i>High-density lipoprotein</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucinas
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (<i>Low-density lipoprotein</i>)
MDA	Malondialdeído
NO	Óxido nítrico
SOD	Superóxido dismutase
sTNFR	Receptor solúvel de TNF
SWT	<i>Shuttle Walking Test</i>
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid reactive substance</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α (<i>Tumor necrosis factor- α</i>)
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VO ₂	Consumo de oxigênio
•O ₂	Radical ânion superóxido
•OH	Radical hidroxila
•HO ₂	Radical peroxila

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	TABAGISMO: Epidemiologia.....	15
1.2	Componentes químicos da fumaça do cigarro.....	16
1.3	Marcadores biológicos de exposição à fumaça do cigarro.....	17
1.4	Fisiopatologia das principais doenças tabaco-relacionadas.....	18
1.5	Perfil inflamatório e estresse oxidativo em fumantes assintomáticos	
1.5.1	Efeitos do tabagismo no perfil inflamatório de fumantes assintomáticos.....	22
1.5.2	Estresse oxidativo.....	23
1.5.3	Efeitos do tabagismo no estresse oxidativo de fumantes assintomáticos.....	25
1.6	Alterações funcionais em fumantes assintomáticos.....	27
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	HIPÓTESES.....	29
4	OBJETIVOS	
4.1	Objetivo Geral.....	30
4.2	Objetivos Específicos.....	30
5	MATERIAL E MÉTODOS	
5.1	Sujeitos.....	31
5.2	Procedimentos Experimentais.....	32
5.3	Primeira Etapa – Avaliação Clínica	
5.3.1	Coleta de dados clínicos e demográficos.....	33
5.3.2	Avaliação da composição corporal.....	34
5.3.3	Avaliação da função pulmonar.....	34
5.4	Segunda Etapa – Coleta Sanguínea	
5.4.1	Avaliação do perfil inflamatório.....	35
5.4.2	Avaliação do estresse oxidativo.....	36
5.4.3	Avaliação do nível de exposição à fumaça do cigarro.....	38
5.5	Terceira Etapa – Avaliação Funcional	
5.5.1	Avaliação da função muscular esquelética periférica.....	38
5.5.2	Avaliação da aptidão cardiorrespiratória.....	39
5.6	Análise Estatística.....	41

6	RESULTADOS.....	43
7	DISCUSSÃO.....	51
8	CONCLUSÃO.....	58
9	REFERÊNCIAS.....	59
10	ANEXOS	
	Anexo I: Teste de Fagerstrom para dependência nicotínica.....	68
	Anexo II: Critério de Classificação Econômica Brasil.....	69
	Anexo III: Artigo Submetido - Cardiorespiratory responses and prediction of peak oxygen uptake during the Shuttle Walking Test in healthy adult men.....	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 TABAGISMO: Epidemiologia

O tabagismo é caracterizado por intensa dependência física e psíquica de nicotina, provocada pelo consumo de cigarros ou outros produtos derivados do tabaco. Dentre os produtos oriundos do tabaco para o consumo humano (cigarros, charutos, cachimbos, gomas de mascar e narguilés), o cigarro é o mais consumido. Aproximadamente 1,3 bilhões de pessoas fumam atualmente no mundo inteiro, com consumo médio de 6 trilhões de cigarros por ano, sendo que, cerca de 900 milhões dos fumantes (84% do total) vivem em países em desenvolvimento e nas economias em transição, enquanto que apenas aproximadamente 16% moram em países desenvolvidos, onde o consumo de cigarros caiu acentuadamente durante as últimas décadas (WHO, 2011). Por outro lado, nos países em desenvolvimento o consumo vem crescendo desde 1970, em especial em classes socioeconômicas mais baixas e com menor nível educacional (MEKRUNGRONGWONG *et al.*, 2011; JHA e CHALOUPKA, 1999).

O panorama mundial revela alta prevalência de dependência do tabagismo em adultos de ambos os sexos, tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, com predomínio de homens fumantes (JHA e CHALOUPKA, 2000). No Brasil, um terço da população adulta é fumante, com estimativa total de 24 milhões de fumantes, representando 18,1% da população acima de 18 anos. Os homens representam a grande maioria com 21,6% e as mulheres 13,1%, embora o Brasil tem acompanhado as tendências mundiais com aumento da incidência de jovens e de mulheres fumantes nos últimos anos. Dos cigarros fumados, a prevalência do cigarro manufaturado é maior (14,4%) quando comparada aos cigarros enrolados a mão (5,1%) (INCA & OPAS, 2010).

Considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma pandemia, o tabagismo é a principal causa prevenível de morte em todo o mundo. Atualmente, cerca de cinco milhões de pessoas morrem por ano em consequência das doenças provocadas pelo tabaco, e estima-se que em 2030 o número de óbitos poderá elevar-se para dez milhões de pessoas ao ano se a tendência ao uso persistir (WHO, 2009). Segundo a OMS, cerca de 60% das mortes entre os homens e 40% entre as mulheres atribuídas ao tabagismo, ocorrem entre pessoas de 35 a 69 anos de idade (WHO, 1999). Os tabagistas perdem em média cerca de dez anos de vida. Em um estudo prospectivo com 35.000

peessoas, 81% de não fumantes, mas apenas 58% dos fumantes alcançaram 70 anos e; 59% de não fumantes, mas apenas 26% dos fumantes alcançaram 80 anos (DOLL *et al.*, 2004).

Das mais de 50 doenças tabaco-relacionadas, destacam-se diversos tipos de cânceres (orofaríngeo, laringe, esôfago, pulmão, estômago, pâncreas, bexiga, rim e colo do útero), doenças cardiovasculares (aterosclerose, doença cardíaca coronária, acidente vascular encefálico e aneurisma) e doenças respiratórias (asma, pneumonia e doença pulmonar obstrutiva crônica) em tabagistas ativos. Além disso, em adultos a exposição à fumaça secundária do cigarro (fumantes passivos) pode causar efeitos adversos no sistema cardiovascular e câncer de pulmão. Em crianças, incluindo os fetos, a exposição a fumaça é particularmente associada com efeitos adversos sobre o sistema respiratório, síndrome da morte súbita infantil e sobre o crescimento e desenvolvimento neuropsicológico (USDHHS, 2010).

As doenças cardiovasculares (doenças vasculares cerebrais e doença isquêmica cardíaca), a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e o câncer de pulmão são as principais doenças tabaco-relacionadas responsáveis por altos índices de mortalidade (CORRÊA *et al.*, 2009). Estima-se, que 90% de todas as mortes por câncer de pulmão entre os homens e 80% entre as mulheres, e cerca de 90% de todas as mortes por DPOC, sejam causadas pelo tabaco. Quanto maior o número de cigarros fumados e menor a idade de início de exposição aos componentes da fumaça do cigarro, maiores são os riscos de desenvolver tais doenças (USDHHS, 2010; PETO *et al.*, 2000).

1.2 COMPONENTES QUÍMICOS DA FUMAÇA DO CIGARRO

A fumaça do cigarro inalada pelo fumante é uma mistura heterogênea de gases e partículas que totalizam mais de 4.700 substâncias tóxicas, muitas com alta atividade carcinogênica e/ou mutagênica (GREEN E RODGMAN, 1996; IARC, 1986). Os produtos da fumaça do cigarro são formados por reações de pirólise, a partir da queima do tabaco em temperatura elevada (aproximadamente 900°C), quando o ar é aspirado pelo fumante. Os produtos formados geram um concentrado aerossol de bilhões de partículas com tamanho aproximado de 0,1 a 1µm de diâmetro que podem ser inaladas pelo fumante tanto pela corrente principal da fumaça, gerada durante a aspiração, quanto pela fumaça secundária formada pela queima do tabaco nos intervalos entre as aspirações (HOFFMAN *et al.*, 2001).

A composição da fumaça do cigarro é afetada por muitos fatores, incluindo o produto do tabaco, as propriedades da mistura do tabaco, aditivos químicos, padrão de

fumar, pH, tipo de papel, filtro e ventilação (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2011). Em geral, os compostos da fase gasosa constituem 95% da fumaça do cigarro, podendo ser representada por mais de 500 tipos de gases, principalmente por nitrogênio, oxigênio, dióxido de carbono, monóxido de carbono e hidrogênio (BRUNNEMAN *et al.*, 1976). Das diversas partículas que compõe a fase particulada, destacam-se alguns metais como arsênico, cobre, cálcio, berílio, níquel, cromo e cádmio; elementos radioativos (polônio 210), *N*-nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (benzopirenos), aldeídos (formaldeído e acetaldeído) e nicotina (ROBERTS, 1988; IARC 1986).

A nicotina é o maior constituinte das folhas do tabaco do gênero *Nicotiana tabacum* e é a principal substância do tabaco que está relacionada à dependência química do cigarro (TUTKA *et al.*, 2005; MOYER *et al.*, 2002). A nicotina, bem como outros biomarcadores pode ser medida em fluidos biológicos, a fim de avaliar o grau de exposição à fumaça do cigarro e conseqüentemente a dependência à nicotina.

1.3 MARCADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO

Para estimar a significativa exposição à fumaça do cigarro em fumantes ativos ou em fumantes passivos (aqueles expostos a poluição tabágica ambiental) são propostos a avaliação de vários biomarcadores que atestam a absorção das substâncias contidas no tabaco. Dos mais usados, destacam-se monóxido de carbono do ar expirado (SANTOS *et al.*, 2001), carboxihemoglobina no sangue, tiocianato e nicotina na saliva, sangue ou urina (BUTNARU *et al.*, 2002) e a cotinina, que pode ser determinada na urina, sangue, saliva e cabelo (MALAFATI e MARTINS, 2009).

A cotinina é um dos principais produtos da degradação da nicotina no fígado (LEWIS *et al.*, 1999) e a sua determinação tem sido o método de preferencial escolha, devido maior facilidade operacional e por sua presença em fluidos biológicos ser atribuída apenas à exposição a nicotina, a qual não é influenciada pela poluição ambiental, tais como o monóxido de carbono e tiocianato (ROSEMBERG, 2003; BUTNARU *et al.*, 2002; PACH *et al.*, 1996). A escolha da cotinina ao invés da nicotina deve-se a sua meia-vida maior, que em média dura cerca de 19 a 24 horas, enquanto que a meia-vida da nicotina é de apenas 2 horas, podendo ser detectada nos fluidos biológicos muitas horas após a exposição (BENOWITZ *et al.*, 1983). Nos dois casos, as concentrações em qualquer material são lineares com as quantidades de tabaco consumidas pelos fumantes ativos e com o grau de exposição à poluição tabágica ambiental pelos fumantes passivos

(ROSEMBERG, 2003). Quanto maior a intensidade de exposição (dose-relacionada), maiores os efeitos dos componentes químicos da fumaça do cigarro no organismo, predispondo-o ao surgimento e progressão das doenças tabaco-relacionadas.

1.4 FISIOPATOLOGIA DAS PRINCIPAIS DOENÇAS TABACO-RELACIONADAS

O desenvolvimento das principais doenças tabaco-relacionadas é devido principalmente à exposição crônica aos componentes tóxicos e carcinogênicos da fase gasosa e particulada da fumaça do cigarro, gerados a partir da combustão completa (corrente principal da fumaça) ou incompleta (fumaça secundária) do tabaco. As vias e mecanismos envolvidos na fisiopatologia destas doenças estão relacionadas em grande parte à lesão tecidual causada pelo estresse oxidativo e por uma série de reações inflamatórias, com a ativação de mediadores inflamatórios e apoptose celular. (SANGANI e GHIO, 2011; MAK, 2008; AMBROSE e BARUA, 2004). Essas vias muitas vezes interagem entre si, produzindo ciclos viciosos de estresse oxidativo e inflamação, contribuindo para a progressão da doença (Figura 1).

Das mais de 60 substâncias carcinogênicas da fumaça do cigarro, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, *N*-nitrosaminas, aldeídos e os metais têm sido relacionados aos mecanismos que induzem o câncer de pulmão. O processo principal da carcinogênese está na formação de adutos de DNA, que quando não reparados, podem persistir e aumentar a probabilidade de desenvolver mutações de genes de supressão oncogênica e tumoral. A mutação desses genes pode causar a perda das funções normais no controle do crescimento celular, resultando na proliferação celular e no câncer de pulmão (USDHHS, 2010).

Semelhante ao câncer de pulmão, o tabagismo é o principal fator causal da DPOC. O estresse oxidativo mediado pelos radicais livres, componentes químicos oxidantes e de metais do cigarro, parece desempenhar o papel central no desenvolvimento da DPOC. O processo inflamatório gerado pelo estresse oxidativo, tanto de vias aéreas como de parênquima pulmonar, resulta em bronquite crônica e enfisema pulmonar. A exposição aos oxidantes estimula macrófagos, neutrófilos e células epiteliais alveolares e bronquiais a liberarem mediadores pró-inflamatórios. Associado ao aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias ocorre maior ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios que provocam o aumento da expressão gênica destes mediadores, bem como, regulam a apoptose e a progressão do ciclo celular. O aumento da transcrição de

genes pró-inflamatórios e consequentemente a inflamação, aumenta o estresse oxidativo criando um ciclo vicioso de aumento de inflamação e aumento de estresse oxidativo, que se perpetua levando a um quadro de inflamação crônica. Além disso, ocorre maior liberação de proteases devido ao maior influxo e ativação de leucócitos e uma relativa deficiência de antiproteases que são inativadas pelos oxidantes, criando um desequilíbrio entre protease/antiprotease, que culminam na redução da elasticidade do tecido. A inflamação crônica acompanhada de maior apoptose celular e da perda da elasticidade pulmonar desencadeiam a lesão tecidual do pulmão e a DPOC (SANGANI e GHIO, 2011; USDHHS, 2010; MAK, 2008).

A fisiopatologia das doenças cardiovasculares (DCV) tem sido associada principalmente à nicotina, monóxido de carbono (CO) e as substâncias químicas oxidantes, que agredem o endotélio vascular provocando efeitos aterotrombóticos, que culminam clinicamente com trombose, aterosclerose, doença arterial coronariana, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico. A nicotina atua no sistema nervoso simpático estimulando a liberação de catecolaminas tanto localmente, a partir dos neurônios, quanto sistemicamente, a partir das glândulas adrenais, desencadeando aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial, da contratilidade miocárdica e vasoconstrição, aumentando a demanda de consumo de oxigênio e nutrientes pelo miocárdio. Por outro lado, o CO que possui maior afinidade pela hemoglobina que o oxigênio, formando carboxihemoglobina, diminui a oxigenação do miocárdio e dos tecidos em geral, predispondo a isquemia e infarto do miocárdio (BENOWITZ, 2003; ROSEMBERG, 2003).

Assim como na DPOC, o estresse oxidativo parece exercer papel central na gênese das DCV. A reação entre os radicais livres presentes na fumaça do cigarro e o óxido nítrico [NO] (importante vasodilatador), não só diminui a produção e biodisponibilidade do NO, mas também aumenta o estresse oxidativo pelo aumento da produção de radicais livres endógenos. O aumento do estresse oxidativo e a redução do efeito protetor do NO culminam em ativação plaquetária, redução de fibrinólise, aumento das concentrações das lipoproteínas de baixa densidade (LDL; *low-density lipoprotein*), redução de lipoproteínas de alta densidade (HDL; *high-density lipoprotein*) e inflamação, predispondo a eventos trombóticos e ateroscleróticos. A resposta inflamatória induzida pelo estresse oxidativo e pelos componentes químicos do cigarro é observada pelo aumento do recrutamento de leucócitos no endotélio vascular e pelo aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias, que além de aumentar a interação leucócito-

célula endotelial, levam ao maior recrutamento de leucócitos que perpetuam o processo inflamatório (AMBROSE e BARUA, 2004; ROSEMBERG, 2003).

As alterações inflamatórias e de estresse oxidativo observadas na DPOC e nas DCV, por provocarem o dano tecidual, culminam em alterações funcionais que são encontradas nos pacientes, tais como, aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso, redução da função pulmonar e alterações da função muscular esquelética periférica (DONALDSON *et al.*, 2012; MCKEEVER *et al.*, 2011; BENOWITZ, 2003). Assim como nos pacientes, a elevação do perfil inflamatório e do estresse oxidativo, com concomitantes alterações funcionais, têm sido observadas em fumantes assintomáticos, aqueles que apresentam função pulmonar normal e ausência de doenças tabaco-relacionadas.

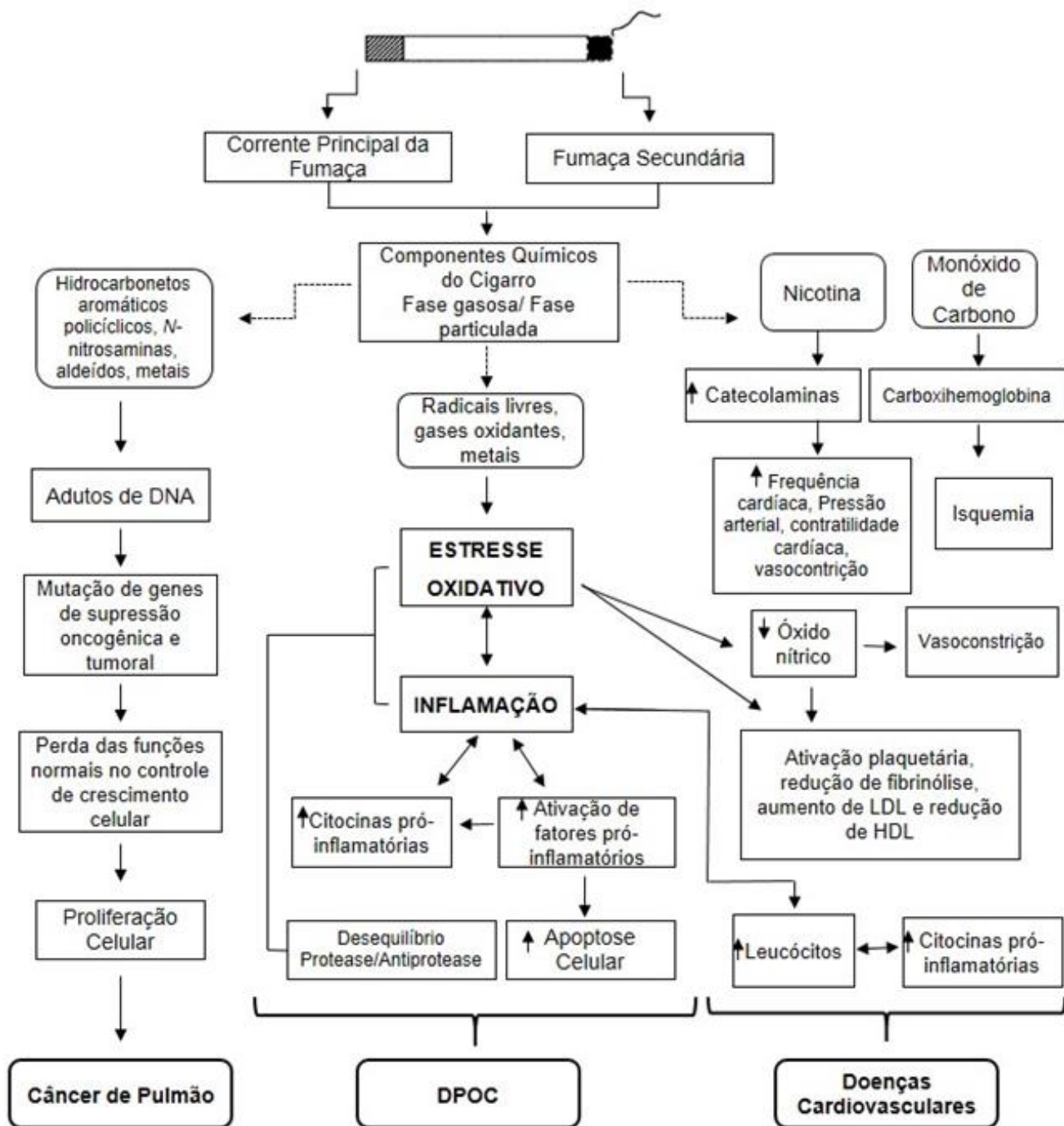


Figura 1. Vias e mecanismos envolvidos na fisiopatologia das principais doenças tabaco-relacionadas. DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; LDL: lipoproteínas de baixa densidade; HDL: lipoproteínas de alta densidade.

1.5 PERFIL INFLAMATÓRIO E ESTRESSE OXIDATIVO EM FUMANTES ASSINTOMÁTICOS

1.5.1 Efeitos do tabagismo no perfil inflamatório de fumantes assintomáticos

A inalação crônica da fumaça do cigarro altera uma ampla gama de funções imunológicas, provocando efeitos adversos na resposta imune inata e adquirida, que culminam com o aumento da atividade inflamatória pulmonar e sistêmica. O fenômeno é observado pela infiltração de células imunes inflamatórias, associadas com maior liberação e inibição de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, respectivamente (USDHHS, 2010).

Os componentes químicos da fase particulada; nicotina, hidroquinona (um composto fenólico) e aldeídos; são principalmente relacionados as respostas imunossupressoras e inflamatórias da exposição ao tabaco (SOPORI, 2002). A exposição aguda à fumaça do cigarro em fumantes assintomáticos, apesar de pouco esclarecida, tem sido associada ao aumento da contagem de neutrófilos no sangue (ABBOUD *et al.*, 1986) após 1 hora e ao aumento das concentrações de interleucina-8 (IL-8) e da redução de eosinófilos no sangue após 3 horas de exposição (van der VAART *et al.*, 2005).

Embora os efeitos crônicos do tabagismo na resposta imune-inflamatória estejam bem descritos na literatura, ainda são limitados os resultados em fumantes assintomáticos, uma vez que na sua maioria as amostras são constituídas por indivíduos com doenças associadas ou por pacientes hospitalizados (GONÇALVES *et al.*, 2011, ARSON *et al.*, 2010). Fumantes assintomáticos crônicos apresentam aumento de 20-30% na contagem de células brancas do sangue periférico, primariamente devido ao aumento de granulócitos (van EEDEN e HOGG, 2000). O aumento de leucócitos é observado principalmente pelo aumento de neutrófilos e macrófagos, células de defesa primária com função fagocítica contra poluentes e agentes microbianos (KUSCHNER *et al.*, 1996).

Acompanhado do aumento do número de macrófagos e neutrófilos, a resposta inflamatória em fumantes assintomáticos tem sido caracterizada pelo aumento de mediadores pró-inflamatórios, capazes de aumentar o recrutamento e ativação de leucócitos para o local da infecção (COMANDINI *et al.*, 2009). Em fumantes assintomáticos a exposição crônica à fumaça do cigarro foi relacionada ao aumento da produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, que colaboram com a perpetuação da resposta inflamatória. Tanni *et al.* (2012) e Petruscu *et al.* (2010) relataram que em fumantes com alta carga tabágica (consumo diário de cigarros maior que um maço), as

concentrações plasmáticas do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) foram significativamente maiores quando comparados a não fumantes. Similarmente, o aumento das concentrações e da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β em fumantes assintomáticos, foi observado no soro (BARBIERI *et al.*, 2011) e em culturas de células estimuladas com lipopolissacarídeo (ZEIDEL *et al.*, 2002). Além disso, o perfil inflamatório tem sido caracterizado por um desequilíbrio entre a produção e liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, uma vez que mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 tem se mostrado em concentrações reduzidas no escarro (TAKANASHI *et al.*, 1999) e similares no plasma (WHETZEL *et al.*, 2007) de fumantes comparados a não fumantes.

Foi sugerido que o aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias origina-se no pulmão, como observado pelo aumento do número de macrófagos e das concentrações de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-8 em lavado broncoalveolar (KUSCHNER *et al.*, 1996) e que a magnitude da resposta inflamatória sistêmica correlaciona com o número de partículas tóxicas fagocitadas pelos macrófagos. Desta forma, quanto maior a exposição aos componentes tóxicos do tabaco, maiores são as concentrações destas citocinas em sangue periférico (MUKAE *et al.*, 2001).

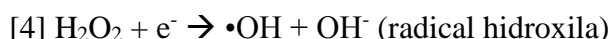
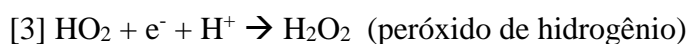
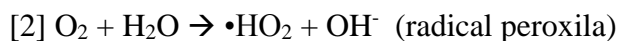
Além do estímulo das citocinas, o estresse oxidativo associado ao tabagismo tem sido considerado a principal causa para o aumento do número de neutrófilos e macrófagos, potenciais fontes de espécies reativas de oxigênio. Em contraste, apesar de aumentados, neutrófilos e macrófagos apresentam redução da atividade fagocítica e da resposta a estímulos, que associados à redução da proliferação de linfócitos B e linfócitos T CD4+ (auxiliadores) e CD8+ (citotóxicos) tornam o tabagista mais susceptível a infecções (GONÇALVES *et al.*, 2011; ARSON *et al.*, 2010; SOPORI, 2002).

1.5.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é decorrente do desequilíbrio celular entre compostos oxidantes e antioxidantes, caracterizado pelo excesso de oxidantes e/ou depleção de antioxidantes, que ocasionam um potencial dano oxidativo. Os oxidantes são representados pelas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, termo este que inclui uma ampla variedade de espécies formadas a partir da redução do oxigênio e do nitrogênio, podendo ser radicalares (radicais livres) e não radicalares. Já os antioxidantes, são as moléculas que atrasam ou inibem a oxidação dos substratos oxidantes (DAVIES, 1995).

Os radicais livres são moléculas que apresentam pelo menos um elétron não pareado em sua última camada eletrônica, o que os torna altamente reativos, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo a sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante (doadora) ou redutora (receptora) de elétrons (e^-). Formados continuamente a partir de reações do metabolismo celular, os radicais livres são produzidos em pequenas concentrações principalmente nas mitocôndrias ao longo da cadeia transportadora de elétrons, durante a respiração mitocondrial (DAVIES, 1995). Além disso, os radicais livres podem ser gerados na membrana plasmática ou no citoplasma das células, por atividade de algumas enzimas como xantina oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminooxidases, ciclooxigenases e NADPH oxidase; e por reações com metais de transição. Sua produção pode estar aumentada a partir da exposição de fontes oxidantes exógenas, tais como o tabaco, medicamentos, metais, óxidos de nitrogênio e outros poluentes do ar (DROGE, 2002).

Os radicais ânion superóxido ($\bullet O_2$), hidroxila ($\bullet OH$) e peroxila ($\bullet HO_2$) são exemplos de radicais livres formados a partir da redução do oxigênio, que, juntos com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) uma espécie não radicalar, constituem as espécies reativas de oxigênio (DAVIES, 1995).

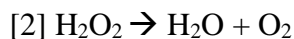
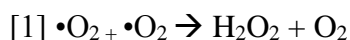


Em um ambiente inflamatório, o óxido nítrico (NO) um importante radical livre, pode levar a formação de fortes espécies reativas de nitrogênio. A reação entre NO e o $\bullet O_2$ forma o potente oxidante peroxinitrito, que além de contribuir com o aumento do estresse oxidativo, leva a nitração de biomoléculas, o que provoca inibição da respiração mitocondrial, disfunção proteica e lesão celular (FOLKERTS *et al.*, 2001).

Quando em concentrações aumentadas, os radicais livres podem causar danos celulares pela oxidação de proteínas, carboidratos, DNA e lipídeos. A oxidação das proteínas resulta em fragmentação, agregação e degradação proteica; de carboidratos na glicação; do DNA, em quebra e alteração das bases nitrogenadas; e a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados de membrana (peroxidação lipídica) leva a alteração da permeabilidade e estrutura da membrana plasmática. Os produtos da peroxidação lipídica, tais como os hidroperóxidos e o malondialdeído (MDA), têm sido as moléculas de escolha

para medição do dano oxidativo, uma vez que a detecção dos radicais livres é difícil por apresentarem meia vida extremamente curta (GATÉ *et al.*, 1999).

Embora as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio apresentem funções biológicas, como por exemplo ação bactericida, eles também podem causar potencial dano tecidual. A produção de oxidantes é equilibrada pela ação dos antioxidantes, que são o maior mecanismo de defesa *in vivo* contra o estresse oxidativo (COMHAIR e ERZURUM, 2002). Os antioxidantes são divididos em duas classes; os não enzimáticos, e os enzimáticos, ambos com capacidade de interromper ou atrasar reações de óxido-redução. Os antioxidantes não enzimáticos incluem vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), β -caroteno, ácido úrico, albumina, ceruloplasmina, flavonoides, polifenóis e glutatona. Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, glutatona peroxidase, glutatona redutase e tioredoxinas. A enzima SOD acelera a reação de dismutação do radical ânion superóxido a peróxido de hidrogênio [1], e as enzimas catalase, glutatona peroxidase, glutatona redutase e tioredoxinas, atuam como redutores celulares, pela decomposição do peróxido de hidrogênio [2] (GATÉ *et al.*, 1999).



1.5.3 Efeitos do tabagismo no estresse oxidativo de fumantes assintomáticos

A complexa mistura de componentes químicos da fumaça do cigarro apresenta altas concentrações de radicais livres, compostos oxidantes e metais, que causam o estresse oxidativo (PRYOR e STONE, 1993). A fase gasosa contém aproximadamente 10^{15} radicais livres por *puff* (inalação) composta predominantemente por $\cdot\text{O}_2$ e NO; e a fase particulada tem sido estimada por conter mais que 10^{17} radicais livres por grama, tais como o radical semiquinona ($\cdot\text{Q}$), que reage com $\cdot\text{O}_2$ para formar $\cdot\text{OH}$ e H_2O_2 (ZANG *et al.*, 1995; PRYOR e STONE, 1993).

Como consequência a alta exposição aos radicais livres da fumaça do cigarro, diversos estudos tem avaliado os efeitos agudos e crônicos do tabagismo no estresse oxidativo de fumantes assintomáticos. No condensado do exalado expirado foram observados aumento de peróxido de hidrogênio 15 minutos após a exposição (GUATURA *et al.*, 2000) e de 8-isoprostano (um produto da peroxidação lipídica) (MONTUSCHI *et al.*, 2000), nitrato e nitrito 30 minutos após a exposição aguda

(BALINT *et al.*, 2001). No ar exalado são observadas reduções das concentrações do NO (KHARITONOV *et al.*, 1995) e no lavado broncoalveolar nenhuma alteração nas concentrações de glutathione intracelular reduzida ou oxidada (MORRISON *et al.*, 1999). No sangue periférico foram observados aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são produtos da peroxidação lipídica e redução da capacidade antioxidante total (RAHMAN *et al.*, 1996).

Estudos que avaliam os efeitos crônicos do tabagismo sobre o estresse oxidativo em sujeitos assintomáticos ainda são poucos e divergentes. Em relação aos antioxidantes não enzimáticos, tem-se observado que em fumantes, concentrações plasmáticas de vitamina E, ácido úrico, ácido ascórbico, ceruloplasmina e a capacidade antioxidante total, podem estar reduzidas ou inalteradas quando comparados a não fumantes (TAVILANI *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2000; ABOU-SEIF, 1996; DUTHIE *et al.*, 1991). Resultados controversos também têm sido verificados quando se avalia a atividade das enzimas antioxidantes. A atividade de catalase, SOD, glutathione peroxidase e glutathione reductase foi encontrada aumentada, reduzida e similar, em eritrócitos e no plasma de fumantes, quando comparados a não fumantes (TAVILANI *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2000; ABOU-SEIF, 1996; HULEA *et al.*, 1995; DUTHIE *et al.*, 1991). Em um estudo de coorte, que incluiu 200 sujeitos aparentemente saudáveis, metade deles fumantes, a atividade das enzimas glutathione peroxidase e SOD de eritrócitos foi significativamente maior em fumantes do grupo de faixa etária de 18-45 anos e menor no grupo de faixa etária de 46-80 anos (HULEA *et al.*, 1995). Resultados similares também foram relatados por Zhou *et al.* (2000) e Diken *et al.* (2001), no qual fumantes mais velhos (a partir dos 40 anos) que tiveram maior tempo de tabagismo e maior quantidade diária de cigarros fumados apresentaram redução da atividade de SOD, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase comparados com fumantes mais novos e com não fumantes. Estes dados demonstram que os resultados controversos são devidos em grande parte a diferença das amostras estudadas, incluindo sujeitos de diferentes faixas etárias e a falta de controle da exposição ao cigarro.

Ao contrário das moléculas antioxidantes, o estresse oxidativo em fumantes assintomáticos provocado pelo aumento de moléculas oxidantes é relatado pela maioria dos estudos. Concentrações de MDA, um produto da peroxidação lipídica, quando avaliado pelas concentrações plasmáticas de TBARS, são significativamente maiores no plasma (DIKEN *et al.*, 2001), soro (AULA e QADIR, 2013) e no ar exalado (NOWAK *et al.*, 2001) de fumantes quando comparados a não fumantes. Peróxido de hidrogênio liberado por monócitos do sangue periférico (TANNI *et al.*, 2012) e no ar exalado

(NOWAK *et al.*, 2001) e concentrações plasmáticas de lipoperóxidos [produtos da peroxidação lipídica] (ZHOU *et al.*, 2000) de fumantes estão aumentadas comparados a não fumantes.

O aumento das concentrações de moléculas oxidantes em fumantes assintomáticos pode resultar no aumento do perfil inflamatório dos pulmões e de outros órgãos que por sua vez produzem oxidantes adicionais através de macrófagos e neutrófilos, contribuindo com o aumento do estresse oxidativo. O aumento do estresse oxidativo associado ao aumento do perfil inflamatório parece exercer influência nas alterações funcionais encontradas em fumantes assintomáticos (MCKEEVER *et al.*, 2011, van den BORST *et al.*, 2011).

1.6 ALTERAÇÕES FUNCIONAIS EM FUMANTES ASSINTOMÁTICOS

A função pulmonar é um dos mais importantes indicadores de saúde. Quando comprometida é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da asma e DPOC. Fumantes assintomáticos apesar de apresentarem função pulmonar normal, como avaliado pela espirometria, quando comparados a não fumantes exibem função pulmonar menor e aumentos nos declínios anuais do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁), um dos principais marcadores do desenvolvimento e gravidade de doenças pulmonares (LEE e FRY, 2010; MASUKO *et al.*, 2011). Tais reduções parecem correlacionar inversamente com o aumento da contagem de células brancas do sangue periférico observados nesta população (MCKEEVER *et al.*, 2011).

A aptidão cardiorrespiratória ou capacidade aeróbia que reflete a capacidade funcional dos sistemas respiratório, cardiovascular e musculoesquelético durante um exercício físico aeróbio (*endurance*) (ACSM, 2003), também parece ser afetada pelo consumo crônico do cigarro. Fumantes assintomáticos parecem apresentar menor aptidão cardiorrespiratória como avaliada por reduções do desempenho físico, tempo de exercício e da frequência cardíaca máxima alcançada; medidos em testes de esteira, cicloergômetro e corrida (MACERA *et al.*, 2011; STRAND *et al.*, 2010; PAPATHANASIOU *et al.*, 2007; KOBAYASHI *et al.*, 2004). Em adição, a função muscular esquelética periférica em fumantes assintomáticos, avaliada pela resistência muscular e pelo pico de torque (força máxima) parece estar afetada apenas em seu componente resistivo, uma vez que o pico de torque tem apresentado pouca ou nenhuma redução (BARREIRO *et al.*, 2010; WUST *et al.*, 2008; MORSE *et al.*, 2007).

Uma vez que a disfunção muscular esquelética e a perda de massa muscular de pacientes com DPOC são relacionadas principalmente às alterações inflamatórias e ao estresse oxidativo local e sistêmico, e que o tabagismo, principal fator de risco da DPOC, parece ser acompanhado por essas alterações, estudos recentes avaliaram o papel da inflamação e do estresse oxidativo nas alterações musculares e na capacidade funcional de fumantes assintomáticos. Barreiro *et al.* (2010) e de Oca *et al.* (2008) observaram em biópsias do músculo vasto lateral de fumantes assintomáticos de meia-idade e idosos, redução das concentrações da enzima óxido nítrico sintetase endotelial e neuronal (enzima responsável pela síntese do óxido nítrico) e aumento das concentrações de MDA e do conteúdo proteico da enzima SOD, sugerindo a presença de alterações microvasculares e de estresse oxidativo na musculatura desses sujeitos. Ainda nestes trabalhos não foram observadas diferenças nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , de células inflamatórias totais e de macrófagos entre fumantes e não fumantes, sugerindo ausência das alterações inflamatórias na musculatura avaliada. Similar a esses achados, van den Borst *et al.* (2011) demonstraram que em fumantes idosos com ausência de DPOC, porém com comorbidades associadas, as concentrações plasmáticas de TNF- α , proteína C reativa e IL-6 não correlacionaram com a redução do desempenho físico em uma bateria de testes físicos (velocidade da marcha, equilíbrio ortostático e tempo de sentar e levantar da cadeira) de fumantes comparados a não fumantes. Desta forma, as alterações na função muscular esquelética periférica e aptidão cardiorrespiratória de fumantes assintomáticos, parece ser influenciada principalmente pelo estresse oxidativo, ao passo que o perfil inflamatório parece exercer pouca influência.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que os efeitos à exposição crônica ao cigarro são relacionados as doses consumidas, que indivíduos adultos em sua maioria apresentam tempo e quantidade de exposição menor do que idosos, e que alterações inflamatórias, de estresse oxidativo, função muscular esquelética periférica e de aptidão cardiorrespiratória em fumantes assintomáticos, ainda são pouco estudadas e muitas vezes divergentes; é importante que novos estudos avaliem os efeitos do tabagismo sobre esses parâmetros em fumantes crônicos, assintomáticos e adultos. Além disso, a influência do estresse oxidativo e do perfil inflamatório na função muscular esquelética periférica e na aptidão cardiorrespiratória desta população ainda não foi totalmente elucidada. Desta forma, a avaliação do efeito crônico do tabagismo nestes parâmetros permitirá detectar precocemente possíveis alterações relacionadas ao desenvolvimento das doenças tabaco-relacionadas, quando estas ainda são reversíveis, antes que a doença se instale.

3 HIPÓTESES

Acredita-se que o consumo crônico do cigarro seja capaz de aumentar o perfil inflamatório e o estresse oxidativo, bem como reduzir a função muscular esquelética periférica e a aptidão cardiorrespiratória de homens adultos assintomáticos. Além disso, acredita-se que as possíveis alterações inflamatórias e de estresse oxidativo nesta população possam exercer influência significativa nas alterações de função muscular esquelética periférica e aptidão cardiorrespiratória.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito crônico do tabagismo no perfil inflamatório, estresse oxidativo e desempenho físico de homens adultos assintomáticos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Avaliar o efeito crônico do tabagismo em homens adultos nos seguintes parâmetros:

- Perfil inflamatório;
- Estresse oxidativo;
- Função muscular esquelética periférica e;
- Aptidão cardiorrespiratória.

4.2.2 Correlacionar o perfil inflamatório e o estresse oxidativo à possíveis alterações funcionais de fumantes adultos assintomáticos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 SUJEITOS

Tratou-se de um estudo transversal, com a participação de sujeitos assintomáticos, do sexo masculino, fumantes e não fumantes, com idade entre 18-45 anos. Foram recrutados estudantes universitários e sujeitos da comunidade local, por meio de convite verbal, programas de Estratégia da Saúde e Família (ESF), folhetos e através de meios de comunicação (internet e rádio). Para serem incluídos no estudo os sujeitos deveriam estar enquadrados nos seguintes critérios: apresentar função pulmonar normal, relatar não apresentar nenhuma doença crônica ou aguda, neurológica, ortopédica, cardíaca, endócrina ou respiratória; ser eutrófico de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC entre 18,5-24,9 kg/m²); ser sedentário, ou seja, não realizar atividade física de no mínimo 30 minutos pelo menos três vezes semanais (ACSM, 2003); não estar em uso de medicação corticosteroide, anti-inflamatória ou β -bloqueadora; não ter realizado algum procedimento cirúrgico nos últimos 06 meses e relatar ausência de tosse, infecção, gripe e febre no mês anterior às avaliações. De acordo com a categoria em que se enquadravam, os sujeitos foram divididos em dois grupos, sendo eles:

Grupo Fumante (GF): composto por indivíduos fumantes, definidos como aqueles que tenham fumado pelo menos 100 cigarros ou 05 maços de cigarro em toda sua vida, e que fumam atualmente (OPAS, 1995) e;

Grupo Controle (GC): composto por indivíduos que nunca fumaram e que não fumam atualmente.

Além dos critérios citados anteriormente, sujeitos do GC não poderiam ser fumantes passivos, por meio do convívio com fumantes no ambiente de trabalho e no domicílio e sujeitos do GF deveriam ser fumantes de cigarros manufaturados com filtro e não estar em uso de nicotina terapêutica.

Inicialmente, 350 sujeitos, incluindo fumantes e não fumantes, foram contatados e convidados a participar do estudo. Destes, 310 foram excluídos por não preencherem os critérios de inclusão ou relatarem não ter interesse em participar do estudo. Os 40 sujeitos selecionados foram divididos igualmente entre os grupos, fumante (n= 20) e não fumante (n= 20), de acordo com a categoria em que se enquadravam. Em ambos os grupos, os 20 sujeitos participaram das etapas 1 e 2 do estudo, e destes, 18 sujeitos

participaram de todas as etapas (1, 2 e 3) do estudo (descritas abaixo). Os 4 sujeitos (GF, n= 2; GC, n= 2) que não participaram da última etapa do estudo relataram não poder comparecer ao laboratório de pesquisa no momento das análises (Figura 2). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) (CEP 003/12) e todos os sujeitos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

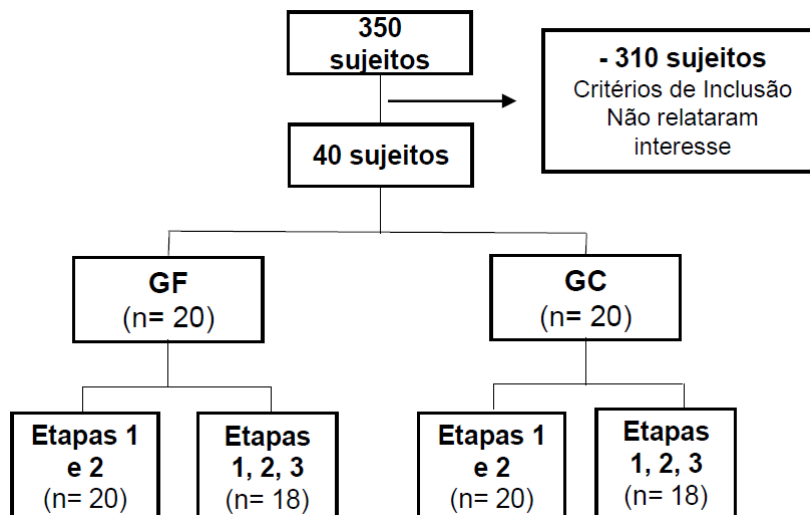


Figura 2. Fluxograma do Estudo.

5.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Após a seleção, os voluntários passaram pelos procedimentos experimentais do estudo, divididos em três etapas, realizadas em momentos distintos (Figura 3). A primeira etapa consistiu da avaliação clínica, a segunda etapa da coleta sanguínea e a terceira etapa da avaliação funcional. Durante todas as avaliações os indivíduos foram questionados sobre o cumprimento das recomendações dadas e quanto a possíveis intercorrências ou modificações na rotina diária.

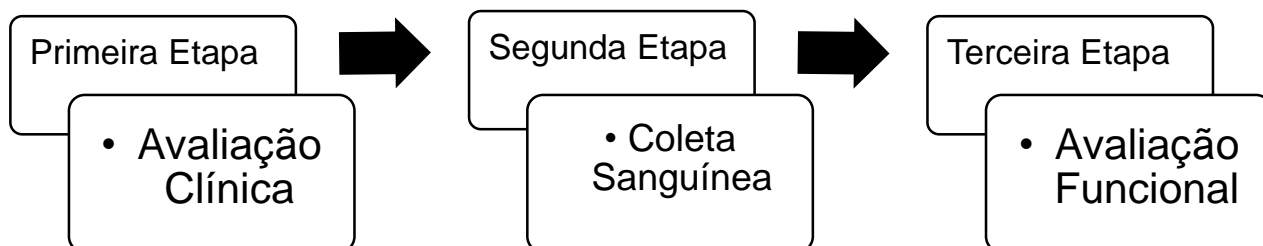


Figura 3. Procedimentos experimentais do estudo.

5.3 PRIMEIRA ETAPA – AVALIAÇÃO CLÍNICA

Na primeira etapa, cada voluntário compareceu ao laboratório de pesquisa para coleta de dados clínicos e demográficos, avaliação da composição corporal e da função pulmonar.

5.3.1 Coleta de dados clínicos e demográficos

Os dados clínicos e demográficos coletados consistiram da avaliação da dependência nicotínica pelo Teste de Fagerstrom para dependência nicotínica (FTND - *Fagerstrom test for nicotine dependence*) e história de tabagismo dos voluntários do GF; e da avaliação do nível socioeconômico dos voluntários de ambos os grupos.

O FTND é um questionário validado e adaptado para população brasileira (CARMO e PUEYO, 2002), que visa identificar a magnitude da dependência nicotínica do fumante, classificando-a em cinco graus: muito baixa, baixa, média, elevada e muito elevada. Composto por seis perguntas, a soma da pontuação das respostas obtidas fornece o escore bruto que pode variar de 0 a 10, sendo que, quanto maior o escore, maior o grau de dependência nicotínica (ANEXO I) (HALTY *et al.*, 2002).

A história de tabagismo foi determinada pelo auto relato da quantidade de anos-maço fumados, calculado como o número de cigarros fumados por dia, dividido por vinte e multiplicado pelo número de anos que o indivíduo fumou. Este cálculo permite avaliar a carga tabágica dos fumantes, ou seja, a quantidade de exposição do indivíduo ao tabagismo, levando em conta o número de cigarros consumidos por dia ao longo dos anos. Além disso, os fumantes foram classificados de acordo com o consumo diário de cigarros em: fumantes leves (com consumo de até 10 cigarros/dia), moderados (entre 10 e 20 cigarros/dia) e pesados (com consumo acima de 20 cigarros/dia) (REICHERT *et al.*, 2008).

Para avaliação do nível socioeconômico foi utilizado o Critério de Classificação Econômica Brasil (CCEB), da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (ABEP). O CCEB é um instrumento de segmentação econômica que utiliza o levantamento de características domiciliares (presença e quantidade de alguns itens domiciliares de conforto) e grau de escolaridade do chefe de família para diferenciar a população. A soma dos pontos obtidos de cada característica permite avaliar o correspondente estrato de classificação econômica (A1, A2, B1, B2, C1, C2, D, E) (ANEXO II).

5.3.2 Avaliação da Composição Corporal

Para avaliar a composição corporal foram medidos massa corporal total e estatura, calculado o IMC e estimado o percentual de gordura. Massa corporal e estatura foram medidos em balança mecânica antropométrica com estadiômetro e o IMC foi calculado como a massa corporal total dividida pela estatura ao quadrado (kg/m^2) (GARROW e WEBSTER, 1985). O percentual de gordura foi estimado com o uso de um plicômetro, a partir da medida de três pregas cutâneas (abdominal, coxa e peitoral) que possibilitaram o cálculo da densidade corporal pela equação de Jackson e Pollock (1978) [A] e posterior estimativa do percentual de gordura pela equação de Siri (1961) [B].

[A] Densidade Corporal (DC) = $1,1093800 - 0,0008267 (\text{peitoral} + \text{abdominal} + \text{coxa}) + 0,0000016 (\text{peitoral} + \text{abdominal} + \text{coxa})^2 - 0,0002574 (\text{idade})$.

[B] Percentual de gordura (%G) = $(495 / \text{DC}) - 450$.

5.3.3 Avaliação da função pulmonar

Para mensurar a função pulmonar dos sujeitos, foi realizada a espirometria por meio de um espirômetro digital (PonyFX, COSMED, Italy), de acordo com as padronizações e critérios da *American Thoracic Society* e *European Respiratory Society* (MILLER *et al.*, 2005). O equipamento foi calibrado diariamente com o uso de uma seringa de 3L e o exame foi realizado por um avaliador treinado com a técnica. No dia anterior ao exame, os sujeitos foram orientados a não fazer jejum, não ingerir café, chá, achocolatados, refrigerante ou bebida alcoólica 06 horas antes do exame, não fumar por pelo menos 02 horas antes do exame e evitar alimentar 01 hora antes do exame.

Precedente ao início do teste, o voluntário permaneceu em repouso de 5 a 10 minutos e todo o procedimento foi descrito e demonstrado pelo avaliador, com ênfase na necessidade de evitar vazamentos em torno da peça bucal. Com o voluntário sentado, e em uso de bucal e clipe nasal, o teste foi conduzido em manobra expiratória forçada, no qual o voluntário foi solicitado a realizar inspiração máxima seguida de expiração rápida e sustentada até que o avaliador ordenasse a interrupção. O número de tentativas realizadas levou em conta a obtenção de três curvas aceitáveis [diferença de no máximo 150 mL da capacidade vital forçada (CVF) e 500 mL do pico de fluxo expiratório] e duas curvas reprodutíveis [diferença de no máximo 200 mL entre CVF e o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1)]. Foi considerada espirometria normal quando todos

os parâmetros avaliados, CVF, VEF₁, e a relação VEF₁/CVF, apresentassem resultados superiores ao limite inferior de normalidade. Foram adotados valores de referência padronizados para a população brasileira para cálculo de valores preditos baseados no sexo, idade e estatura (PEREIRA *et al.*, 2002). Os dados foram expressos como percentual do valor predito.

5.4 SEGUNDA ETAPA – COLETA SANGUÍNEA

A segunda etapa foi realizada com o intuito de avaliar o perfil inflamatório, o estresse oxidativo e o nível de exposição dos fumantes à fumaça do cigarro pela concentração de cotinina. A coleta sanguínea foi realizada no período da manhã, entre 06:00 e 08:00 horas, com o voluntário em jejum e abstinência do cigarro de 8-12 horas. O sangue foi coletado de forma asséptica, por punção da veia anticubital, em tubos contendo os anticoagulantes ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA - (4mL de sangue, para análise do estresse oxidativo) e heparina (6mL de sangue, para análise do perfil inflamatório). Adicionalmente, em sujeitos do GF, foram coletados 5mL de sangue em tubo sem anticoagulante para análise de cotinina. Imediatamente após a coleta, o sangue do tubo sem anticoagulante foi levado a um laboratório particular, e os demais tubos foram processados no Laboratório de Inflamação e Metabolismo (LIM) da UFVJM. Foi separado 1mL de sangue total do tubo contendo EDTA para análise da atividade das enzimas antioxidantes de eritrócitos e o sangue remanescente e o tubo contendo heparina foram centrifugados duas vezes a 3.000 rpm por 10 min. Amostras de plasma e de sangue total foram armazenadas e estocadas em freezer -80°C até o momento da análise.

5.4.1 Avaliação do perfil inflamatório

O perfil inflamatório foi avaliado pela mensuração das concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , anti-inflamatória IL-10 e dos receptores solúveis de TNF- α , sTNFR1 e sTNFR2, por meio da técnica imunoenzimática (ELISA) (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, USA). Em microplaca, os anticorpos monoclonais (100 μ L) contra as citocinas e o receptores a serem dosados foram adicionados a cada poço, e incubados por 12 horas. Anticorpos não absorvidos pelas placas foram descartados por inversão e por sucessivas lavagens em PBS - Tween, seguidos pelo bloqueio com solução PBS - BSA 1% (200 μ L/poço), por no mínimo 2 horas. Após o bloqueio, a placa foi lavada, as amostras foram adicionadas (100 μ L) e incubadas por 12

horas. Posterior a incubação, foi realizada nova lavagem da placa e os anticorpos secundários diluídos em PBS – BSA 0,1% foram adicionados e incubados por duas horas. Finalmente, a estreptavidina ligada a peroxidase em PBS – BSA 0,1% foi adicionada (100µL) à placa, mantida sob agitação por 30 minutos e o cromógeno OPD (0-phenylenediamine) na diluição de 4 mg para 10 mL de tampão citrato, foi adicionado a cada poço (100µL) em adição à água oxigenada de 30 volumes (H₂O₂ - 2µL/placa). Após vinte minutos de incubação em ausência de luz, a reação foi interrompida adicionando-se ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1M; 50µL/poço), seguida da leitura da intensidade de marcação em espectrofotômetro a 490 nm. Para análise dos receptores solúveis sTNFR1 e sTNFR2 as amostras foram diluídas na proporção de 1:7 em solução PBS – BSA 0,1%. Os limites de detecção para estes ensaios foram de 10 pg/mL para IL6, IL-10, sTNFR1 e sTNFR2 e 5 pg/mL para TNF-α. Os dados são expressos em pg/mL.

5.4.2 Avaliação do estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado por meio da determinação dos níveis plasmáticos de TBARS, da capacidade antioxidante total do plasma e da atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase de eritrócitos.

Determinação das concentrações de TBARS: A determinação das concentrações de TBARS é o método mais utilizado para avaliar a peroxidação lipídica, principal lesão do estresse oxidativo. O método se baseia na reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA), principal produto da peroxidação lipídica, resultando em coloração rosa em condições ácidas. Para a determinação foi utilizado o método descrito por Ohkawa *et al.*, (1979), modificado conforme Premanand *et al.*, (2007). Aliquotas de plasma (400µL) foram adicionadas à ácido acético 2,5M, pH 3.4 e ao ácido tiobarbitúrico a 0,8%. A mistura foi incubada por 90 minutos a 95°C, adicionada a n-butanol (3 mL) e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado, pipetado em microplaca (200 µL) e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 532nm. A concentração de TBARS foi estimada a partir de uma curva padrão de MDA e expressa em nmol de MDA/mg de proteína, cuja concentração em plasma foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976)

Determinação da capacidade antioxidante total: A capacidade antioxidante total foi determinada pelo método de redução do ferro do plasma (FRAP), desenvolvido por

Benzie e Strain (1996). O método se baseia na avaliação do poder antioxidante do plasma pela mensuração da habilidade dos antioxidantes plasmáticos em reduzirem o complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} TPTZ) à sua forma ferrosa (Fe^{2+} TPTZ), em pH ácido, produzindo intensa cor azul. Alíquotas de plasma ($15\mu\text{L}$) foram adicionadas a água deionizada e ao reagente FRAP [TPTZ (2,4,6-tripiridiltriazina) 10 mmol/L; FeCl_3 20mmol/L, tampão acetato de sódio 0,3 mol/L, pH 3.6], homogeneizadas, incubadas a 37°C por 30 minutos e resfriadas. Em microplacas, a absorbância da mistura foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de sulfato ferroso (FeSO_4) foi estimada a partir de uma curva padrão e expressa em μmol de $\text{FeSO}_4/\text{L}/\text{mg}$ de proteína, cuja concentração em plasma foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Atividade da enzima antioxidante SOD: A atividade da SOD de eritrócitos foi avaliada pela capacidade de inibição da auto oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund e Marklund (1974). Inicialmente, foi realizada a hemólise de eritrócitos do sangue total (GLASS e GERSHON, 1981) e o lisado eritrocitário foi utilizado para a determinação da atividade da SOD. Após aquecidas em banho a 37°C , as amostras ($160\mu\text{L}$) e a solução tampão ($840\mu\text{L}$) [fosfato de potássio (50mM, pH 8.2) e DTPA (1mM)] foram misturados, homogeneizados e adicionados a $5\mu\text{L}$ de pirogalol (0,5 mM). Imediatamente, a mistura foi pipetada em microplaca e absorbância determinada em espectrofotômetro a 37°C , 420 nm, por 260 segundos. Os dados foram expressos em U/mg de proteína, onde 1U= 50% de inibição da auto oxidação do pirogalol. A concentração de proteína dos eritrócitos foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Atividade da enzima antioxidante Catalase: A atividade da catalase dos eritrócitos foi mensurada pela taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como descrito por Nelson e Kiesov (1972). Foi realizada a hemólise de eritrócitos do sangue total (GLASS e GERSHON, 1981) e o lisado eritrocitário foi utilizado para análises. Às amostras ($20\mu\text{L}$) em solução tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7.0) ($700\mu\text{L}$) foram mantidas em banho a 25°C , a qual foi adicionado o H_2O_2 (0,3 M) ($15\mu\text{L}$). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 25°C , 240nm, a cada 15 segundos, durante 1 minuto. A atividade da catalase foi determinada pelo decaimento da absorbância do H_2O_2 , considerando a diferença entre valores de absorbância em 15 e 30s. Os dados foram expressos em $\Delta\text{E}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, sendo que ΔE corresponde a variação da atividade

da enzima durante um minuto. A concentração de proteína dos eritrócitos foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

5.4.3 Avaliação do nível de exposição à fumaça do cigarro

Com o objetivo de avaliar o nível de exposição à fumaça do cigarro, e consequentemente a quantidade de absorção da nicotina, foram mensuradas as concentrações de cotinina no soro. Esta análise foi realizada em laboratório particular, pelo método de quimioluminescência. Foi considerado como valor de referência para indivíduos fumantes, concentrações de cotinina superiores a 25 ng/mL.

5.5 TERCEIRA ETAPA – AVALIAÇÃO FUNCIONAL

Na última etapa do estudo, os voluntários compareceram ao Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFIEX) da UFVJM para avaliação funcional, que consistiu da análise da função muscular esquelética periférica e da aptidão cardiorrespiratória. As análises ocorreram em um único turno do dia, e os sujeitos foram orientados a evitar a prática de atividade física, ingestão de cafeína e bebidas alcoólicas nas 24 horas antecedentes aos testes, dormir no mínimo 8 horas na noite anterior, realizar uma refeição leve e ingerir 500 mL de água no mínimo duas horas antes dos testes (ACSM, 2003). Inicialmente foi realizada a avaliação da função muscular esquelética periférica, seguida por repouso de 10 minutos e avaliação da aptidão cardiorrespiratória.

5.5.1 Avaliação da função muscular esquelética periférica

A função muscular esquelética periférica foi avaliada pela mensuração da força de contração isocinética voluntária máxima dos músculos extensores (quadríceps femoral) e flexores (isquiotibiais) de joelho, e da resistência muscular e fadiga dos músculos extensores de joelho (quadríceps femoral), com a utilização de um dinamômetro isocinético Biodex System 4 Pro[®] (Biodex Medical Systems Inc., Shirley, NY, USA). Para realizar os testes, o voluntário foi posicionado sentado, com o tronco ereto, quadris e joelhos fletidos a 90° e os braços cruzados a frente do tronco. A alavanca de resistência foi posicionada no terço distal do membro a ser avaliado (membro dominante), e os quadris, o tronco e a coxa do membro avaliado foram fixados por tiras de velcro, a fim de evitar movimentos extras. O membro dominante foi determinado como

aquele em que o sujeito relatasse preferência para chutar bola. Anterior aos testes, os sujeitos realizaram um exercício preparatório, pelo alongamento da musculatura avaliada e pela realização de cinco contrações isocinéticas submáximas. Além disso, foi realizada a calibração das angulações avaliadas e a correção da gravidade. Durante todo o teste, foi fornecido *feedback* verbal padronizado aos voluntários, sempre pelo mesmo avaliador (BROWN *et al.*, 2003; PINCIVERO *et al.*, 2000). Todo o procedimento foi descrito pelo avaliador, dando ênfase na necessidade de se realizar o movimento de flexo-extensão do joelho (90-30° de flexão, onde 0° corresponde à extensão completa) de forma rápida e máxima. A avaliação foi iniciada pelo teste de contração isocinética voluntária máxima, seguido de repouso de 5 minutos e do teste de resistência e fadiga muscular.

Avaliação da contração isocinética voluntária máxima (CIVM): A CIVM dos músculos quadríceps femoral e isquiotibiais foi avaliada pela realização de cinco repetições concêntricas isocinéticas máximas, consecutivas e ininterruptas, na velocidade máxima de $60^{\circ}\cdot s^{-1}$. A força máxima gerada foi determinada pelo Pico de Torque, dado em N.m (BROWN *et al.*, 2003).

Avaliação da resistência e fadiga muscular: Para avaliar a resistência e a fadiga muscular do músculo quadríceps femoral, os sujeitos foram solicitados a realizar 30 repetições concêntricas isocinéticas máximas, consecutivas e ininterruptas, na velocidade máxima de $180^{\circ}\cdot s^{-1}$. A resistência muscular foi determinada pelas medidas de trabalho (torque sustentado ao longo da distância do arco de movimento), sendo estes trabalho total e trabalho realizado nos terços inicial e final das repetições. A fadiga foi determinado pelo índice de fadiga, calculado como a relação das diferenças do trabalho realizado entre os terços inicial e final. Este índice representa o percentual de decréscimo (queda) do trabalho realizado no início e no final das repetições (PINCIVERO *et al.*, 2000). Medidas de trabalho foram expressas em joules (J) e o índice de fadiga em %.

5.5.2 Avaliação da aptidão cardiorrespiratória

A aptidão cardiorrespiratória foi avaliada através do *Shuttle Walking Test* (SWT), um teste de campo, de estrutura progressiva, sintoma-limitado, com o ritmo da passada ditada externamente (SINGH *et al.*, 1992). Para realizar o SWT, os sujeitos foram instruídos a caminhar um percurso de 10 metros, ao redor de uma marcação de dois cones inseridos a 0,5 m de distância cada um do ponto final, de forma a evitar mudanças bruscas

na direção (Figura 4). A velocidade da caminhada em que o sujeito deveria caminhar foi ditada por um sinal sonoro, tocado em um CD e originalmente gerado em um microcomputador. O início do teste foi indicado por um bipe triplo. Em seguida, o bipe único era emitido em intervalos regulares, indicando o tempo em que o voluntário deveria percorrer a distância predeterminada, alcançar o cone e mudar de direção retornando ao outro cone.

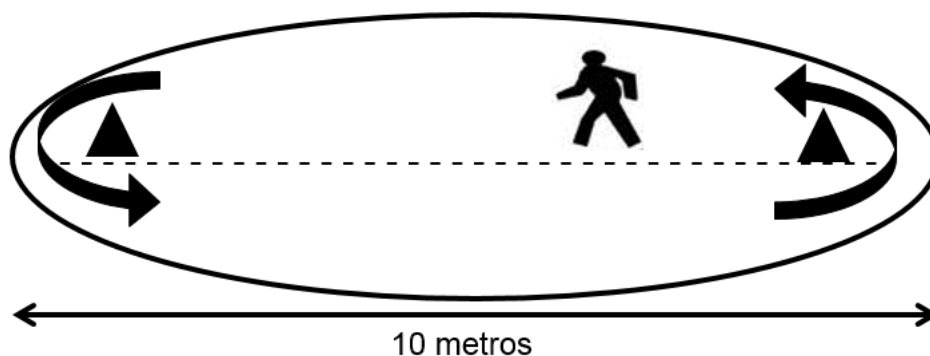


Figura 4. Representação do trajeto do *Shuttle Walking Test*.

O teste é composto por 15 níveis, em que a cada mudança de nível (1 minuto) a velocidade da caminhada é aumentada em 0,17 m/s, sendo a velocidade inicial de 0,5 m/s. A mudança de nível com o incremento da velocidade é indicada pelo bipe triplo. Para ajudar o sujeito a estabelecer a rotina do teste e a velocidade da caminhada, o operador caminhou ao lado do mesmo no primeiro minuto do teste. Após o primeiro minuto, o sujeito deveria coordenar sua velocidade de caminhada/corrída com o tempo dos sinais sonoros. Quando o voluntário alcançava o cone antes do sinal, este era orientado a permanecer no local, em marcha estacionária, até que o próximo sinal indicasse o prosseguimento do teste. Nenhum encorajamento foi dado durante a prova e o operador apenas realizava contato verbal a cada minuto, indicando um leve aumento na velocidade. O teste era finalizado quando o voluntário não era capaz de manter a velocidade requerida (mais que 0,5m do final quando o sinal tocava), por desejo do voluntário ou por alguma sintomatologia relatada (dispneia, tontura, vertigem, angina). Como sugerido pela literatura, foram realizados dois SWT com intervalo de 30 minutos entre eles, a fim de diminuir o efeito do aprendizado do teste (SINGH *et al.*, 1992). Para análise dos dados, foram utilizados os resultados do teste em que o voluntário atingiu a maior distância caminhada.

Antes e após o teste foram medidos com o voluntário sentado; frequência cardíaca (FC) por meio de um cardiófrequencímetro, pressão arterial sistólica e diastólica pelo

método auscultatório da artéria braquial utilizando manguito inflado, manômetro de mercúrio e estetoscópio, e a percepção subjetiva do esforço pela escala de Borg. As medidas antecedentes ao teste foram realizadas após 10 minutos de repouso sentado, e as medidas pós teste, foram realizadas imediatamente após o término do mesmo. Além disso, foram registradas as voltas completas no teste para cálculo da distância percorrida. Dados recentemente submetidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o SWT em sujeitos adultos e saudáveis, foi capaz de promover respostas cardiorrespiratórias máximas, similares a um teste padrão-ouro em esteira (ANEXO III).

Durante ambos SWT, os gases expirados foram coletados através de um analisador de gases por meio do sistema de telemetria portátil (K4b², COSMED, Italy). O sistema de telemetria consistiu de máscara facial, monitor de frequência cardíaca, bateria, unidade de transmissão (contendo analisadores de O₂ e CO₂) e unidade receptora. A unidade de transmissão, com a bateria e a máscara facial com turbina (peso total de aproximadamente 1Kg) foram fixados no tronco dos sujeitos por meio de um colete que permitiu a livre movimentação, enquanto que a unidade receptora foi conectada a um computador presente no local da aplicação dos testes. Foram realizadas calibrações do ar ambiente, gás de referência, volume (seringa de 3L) e *delay*, de acordo com as recomendações do fabricante. Dentre outras variáveis, o consumo de oxigênio (VO₂) e a FC foram monitorados respiração-a-respiração durante o teste. Os dados foram filtrados e definiu-se como o VO₂_{pico} o maior valor obtido a partir da média aritmética de intervalos de 30s do registro (ROBERGS *et al.*, 2010) e a FC máxima como o maior valor de FC registrado durante o teste. A FC máxima prevista foi calculada pela equação FC máx.= 220 – idade (KARVONEN *et al.*, 1957).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando os pacotes estatísticos SPSS 20.0 (SPSS Inc., USA) e GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., USA). Os indivíduos foram caracterizados pela análise descritiva dos dados (apresentados como média e desvio padrão ou mediana e valores mínimos e máximos) e de prevalência (apresentados como frequência). A normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk, e a comparação dos resultados do GF e GC foi realizada pelo Teste-t independente para variáveis paramétricas ou teste Mann-Whitney para variáveis não paramétricas. A correlação das variáveis quantitativas foi realizada pela correlação de Pearson e associação das variáveis categóricas foi realizada pelo teste qui-quadrado. O

tamanho da amostra calculado foi baseado no estudo de Barreiro *et al.*, (2010), com base na variável pico de torque de extensores de joelho, considerando erro alfa de 0.05 e poder de 0.8, sendo identificada a necessidade de 15 sujeitos por grupo. Considerou-se significativo $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

As características gerais (dados antropométricos, demográficos e função pulmonar) dos sujeitos do estudo são apresentadas na tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos no que se refere à idade, peso, estatura, IMC, %G e classificação socioeconômica. Todos sujeitos apresentaram função pulmonar normal. Não houve diferença no VEF₁ e na CVF entre os grupos, no entanto, sujeitos do GF apresentaram valores significativamente menores da relação VEF₁/CVF.

Tabela 1. Comparação dos dados antropométricos, demográficos e função pulmonar entre os grupos.

Características Gerais	GC n= 20	GF n= 20	Valor de p
Idade (anos)	34,30 (5,92)	34,35 (6,45)	0,979 [†]
Peso (kg)	70,33 (7,94)	66,45 (7,74)	0,126 [†]
Estatura (m)	1,74 (0,06)	1,74 (0,07)	0,899 [†]
IMC (kg/m ²)	23,07 (1,88)	21,85 (2,02)	0,066 [†]
%G (%)	11,78 (5,83)	10,87 (5,55)	0,641 [†]
VEF ₁ (% pred.)	99,32 (6,93)	94,60 (8,04)	0,054 [†]
CVF (% pred.)	96,32 (6,89)	96,31 (8,87)	0,797 [¥]
VEF ₁ /CVF (% pred.)	102,9 (5,35)	98,63 (5,69)	0,019 ^{†*}
CCEB (% de classes)			
B1	17,6%	11,1%	
B2	35,3%	22,2%	0,424 [#]
C	47,1%	55,6%	
E	-	11,1%	
TOTAL	100%	100%	

Dados apresentados em média (desvio padrão) e frequência. GC: grupo controle, GF: grupo fumante, IMC: Índice de Massa Corporal, VEF₁: Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo, CVF: Capacidade Vital Forçada, CCEB: Critério de Classificação Econômica Brasil. [†]Teste-t independente, [¥] Teste Mann-Whitney, [#] Teste qui-quadrado. *p≤ 0,05.

A história de tabagismo, a dependência nicotínica e o nível de exposição à fumaça do cigarro dos sujeitos fumantes são apresentados na tabela 2. Os fumantes apresentaram medianas de 13,0 anos-maço, 12,0 cigarros consumidos/dia e 16,0 anos de consumo do cigarro. Todos os fumantes apresentaram concentrações de cotinina superiores ao valor de referência, com mediana de 142,5 ng/mL. Em relação ao consumo diário de cigarros, a maioria dos sujeitos foram classificados como fumantes de consumo leve e moderado (45% e 50%). Além disso, maior percentual de sujeitos exibiram dependência nicotínica muito baixa e baixa (33,3% e 27,7% respectivamente). Um percentual menor apresentou dependência nicotínica média, elevada (16,7%) e muito elevada (5,6%).

Tabela 2. História de tabagismo, dependência nicotínica e nível de exposição à fumaça do cigarro dos sujeitos fumantes.

GF	n= 20
Anos-maço (n°)	13,0 [1,1 - 52,0]
Cigarros/dia (n°)	12,0 [3,0 - 40,0]
Anos de consumo (n°)	16,0 [7,0 - 26,0]
Cotinina (ng/mL)	142,5 [49,1 - 354,0]
Consumo diário	
Leve	45%
Moderado	50%
Pesado	5%
TOTAL	100%
Dependência nicotínica	
Muito Baixa	33,3%
Baixa	27,7%
Média	16,7%
Elevada	16,7%
Muito Elevada	5,6%
TOTAL	100%

Dados apresentados em mediana [mínimo-máximo] e frequência.

O perfil inflamatório foi observado por concentração significativamente maior de sTNFR1 em sujeitos do GF comparados ao GC (Figura 5A). Concentrações de sTNFR2 ($p = 0,378$), IL-6 ($p = 0,074$) e IL-10 ($p = 0,220$) não diferiram entre o GF e o GC (Figura 5B, Figura 6 A e B). TNF- α não foi detectado nas amostras de ambos os grupos.

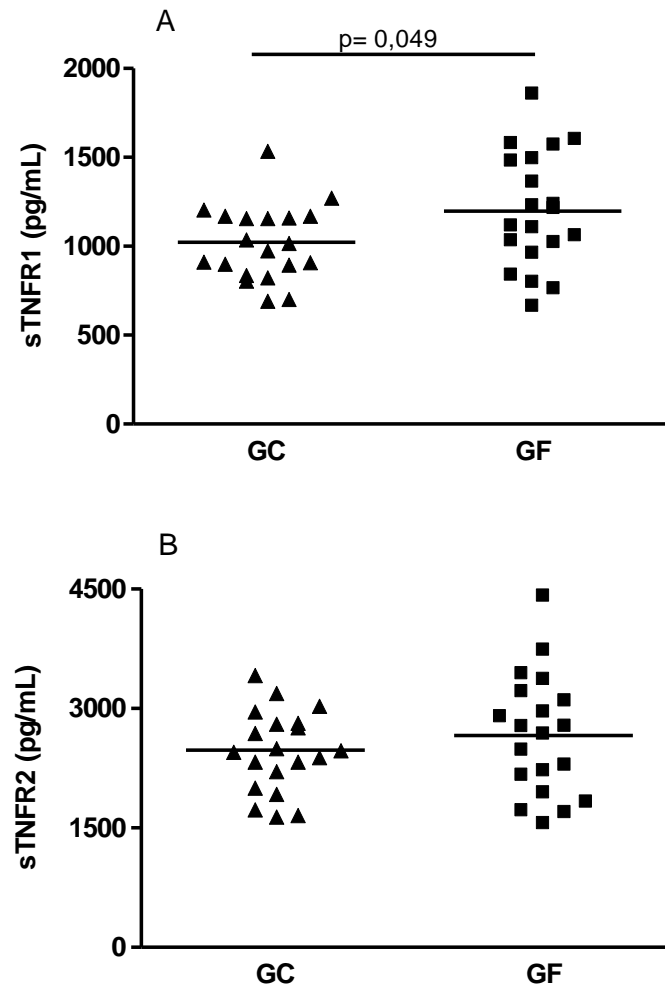


Figura 5. Valores médios das concentrações plasmáticas de sTNFR1 (A) ($p = 0,049$) e sTNFR2 (B) ($p = 0,378$) nos grupos controle (GC) e fumante (GF). Dados expressos em pg/mL. Teste-t independente.

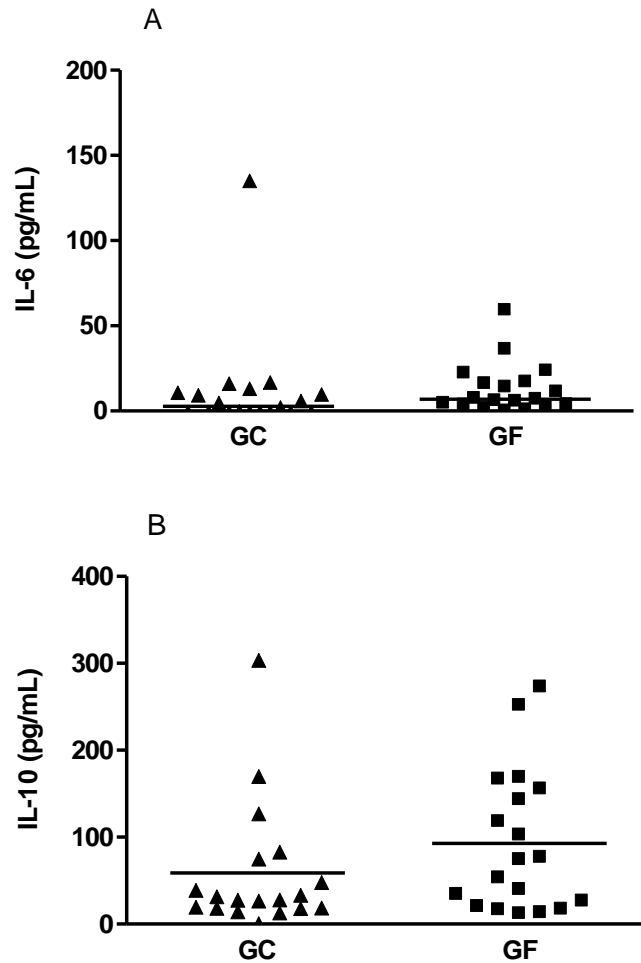


Figura 6. Valores de medianas das concentrações plasmáticas de IL-6 (A) ($p=0,074$) e IL-10 (B) ($p=0,220$) nos grupos controle (GC) e fumante (GF). Dados expressos em pg/mL. Teste Mann-Whitney.

Em relação ao estresse oxidativo, concentração plasmática de TBARS foi significativamente maior em sujeitos do GF comparados ao GC ($p=0,003$) (Figura 7). A atividade da enzima catalase no lisado eritrocitário e a capacidade antioxidante total do plasma foram significativamente menores em sujeitos do GF em relação ao GC ($p<0,0001$) (Figura 8A e 9). Apesar de não significativo, a atividade da enzima SOD foi menor em sujeitos do GF comparado ao GC ($p=0,070$) (Figura 8B).

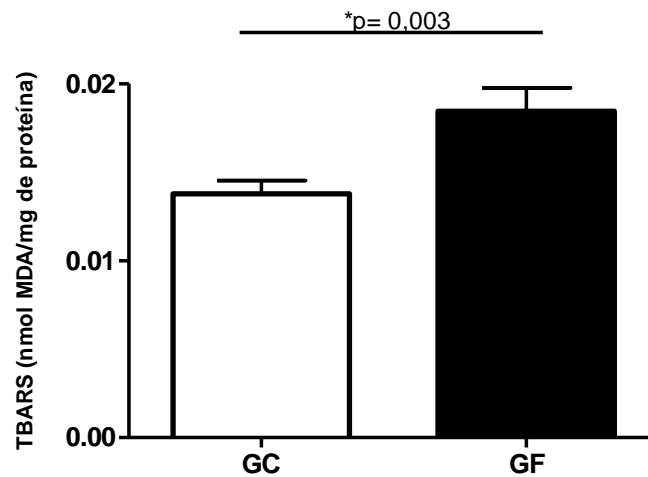


Figura 7. Valores médios e desvio padrão da concentração plasmática de TBARS nos grupos controle (GC) e fumante (GF) ($p= 0,003$). Dados expressos em nmol de malondialdeído (MDA)/mg de proteína. Teste-t independente.

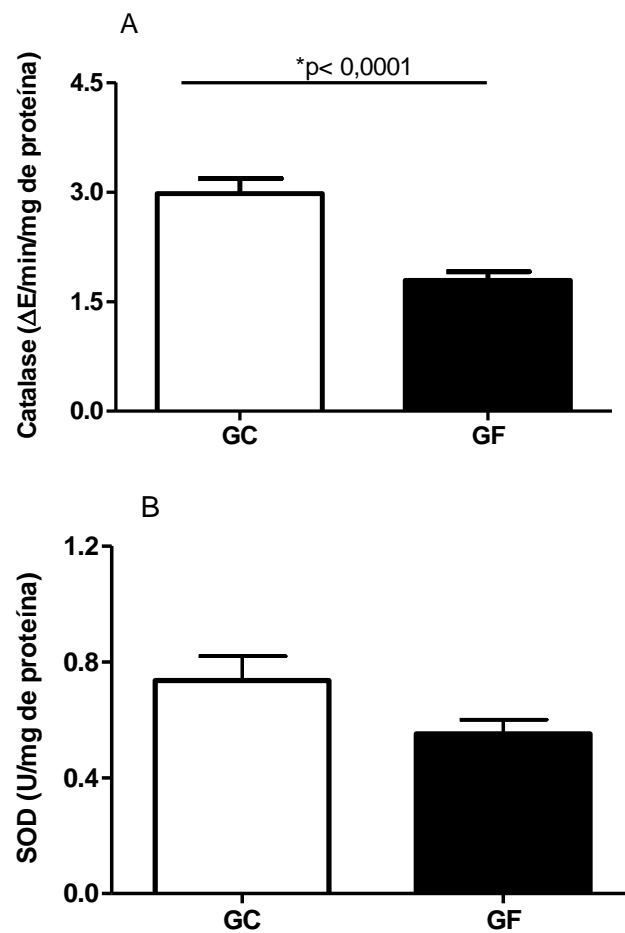


Figura 8. Valores médios e desvio padrão das atividades das enzimas antioxidantes catalase (A) ($p < 0,0001$) e SOD (B) ($p = 0,070$) nos grupos controle (GC) e fumante (GF). Dados de catalase expressos em variação da atividade da enzima (ΔE) /min/mg de proteína e de SOD expressos em unidade (U) /mg de proteína. Teste t-independente.

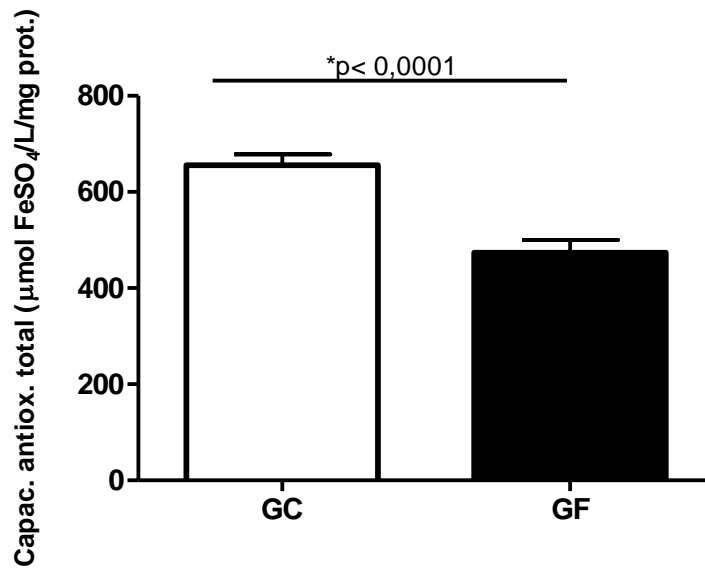


Figura 9. Valores médios e desvio padrão da capacidade antioxidante total do plasma nos grupos controle (GC) e fumante (GF) ($p < 0,0001$). Dados expressos em μmol de sulfato ferroso (FeSO_4) /L/mg de proteína. Teste-t independente.

No que se refere à função muscular esquelética periférica, o pico de torque (força máxima) do quadríceps femoral e isquiotibiais foi similar entre os sujeitos do GC e GF. Quanto ao trabalho total e o trabalho realizado nos terços inicial e final das repetições, sujeitos fumantes apresentaram significativas reduções em relação aos não fumantes. O percentual de queda do trabalho realizado nos terços inicial e final, avaliado pelo índice de fadiga, foi similar entre os grupos (Tabela 3).

Em relação à aptidão cardiorrespiratória foi observado que o $\text{VO}_{2\text{pico}}$, a FC máxima e a distância caminhada, foram similares entre sujeitos do GC e GF durante o SWT (Tabela 4). Além disso, não houve diferença significativa entre a FC e a pressão arterial sistólica e diastólica de repouso.

Tabela 3. Comparação da função muscular esquelética periférica, dos testes de contração isocinética voluntária máxima (pico de torque), resistência muscular (trabalho) e fadiga muscular (índice de fadiga), dos grupos controle (GC) e fumante (GF).

Função Muscular Esquelética	GC n= 18	GF n= 18	Valor de p
Pico de Torque, Extensores de joelho (N.m)	215,9 (24,08)	199,3 (31,83)	0,087
Pico de Torque, Flexores de joelho (N.m)	113,6 (25,15)	101,7 (28,15)	0,189
Trabalho Total (J)	2718 (389,2)	2341 (413,3)	0,010*
Trabalho 1/3 inicial repetições (J)	1114 (183,3)	960,7 (226,4)	0,032*
Trabalho 1/3 final repetições (J)	618,9 (69,56)	543,4 (100,0)	0,014*
Índice de fadiga (%)	41,98 (10,2)	41,43 (12,34)	0,886

Dados apresentados em média (desvio padrão). Teste-t independente.

Tabela 4. Comparação da aptidão cardiorrespiratória entre os grupos controle (GC) e fumante (GF).

Aptidão Cardiorrespiratória	GC n= 18	GF n= 18	Valor de p
VO _{2pico} (mL/kg/min)	35,40 (4,61)	37,72 (5,15)	0,163
FC máxima (% pred.)	99,73 (6,44)	97,84 (6,69)	0,403
FC máxima (bpm)	185,4 (10,97)	180,9 (13,47)	0,286
Distância caminhada (m)	1077 (173,3)	1081 (145,0)	0,951
FC repouso (bpm)	82,94 (8,42)	79,67 (9,08)	0,269
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	110,0 (12,83)	111,1 (14,91)	0,812
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	71,67 (7,86)	73,33 (9,70)	0,575

Dados apresentados em média (desvio padrão). VO_{2pico}: consumo pico de oxigênio, FC: frequência cardíaca. Teste-t independente.

Para finalizar, não houve correlação significativa entre as concentrações plasmáticas de sTNFR1 ($p=0,441$; $r=0,260$), TBARS ($p=0,725$; $r=0,092$), a capacidade antioxidante total do plasma ($p=0,153$; $r=0,375$) e a atividade da enzima catalase ($p=0,494$; $r=0,178$) com o trabalho total (Figura 10 A, B, C e D) e o trabalho realizado nos terços inicial e final das repetições do músculo quadríceps femoral para o grupo fumante ($p>0,05$).

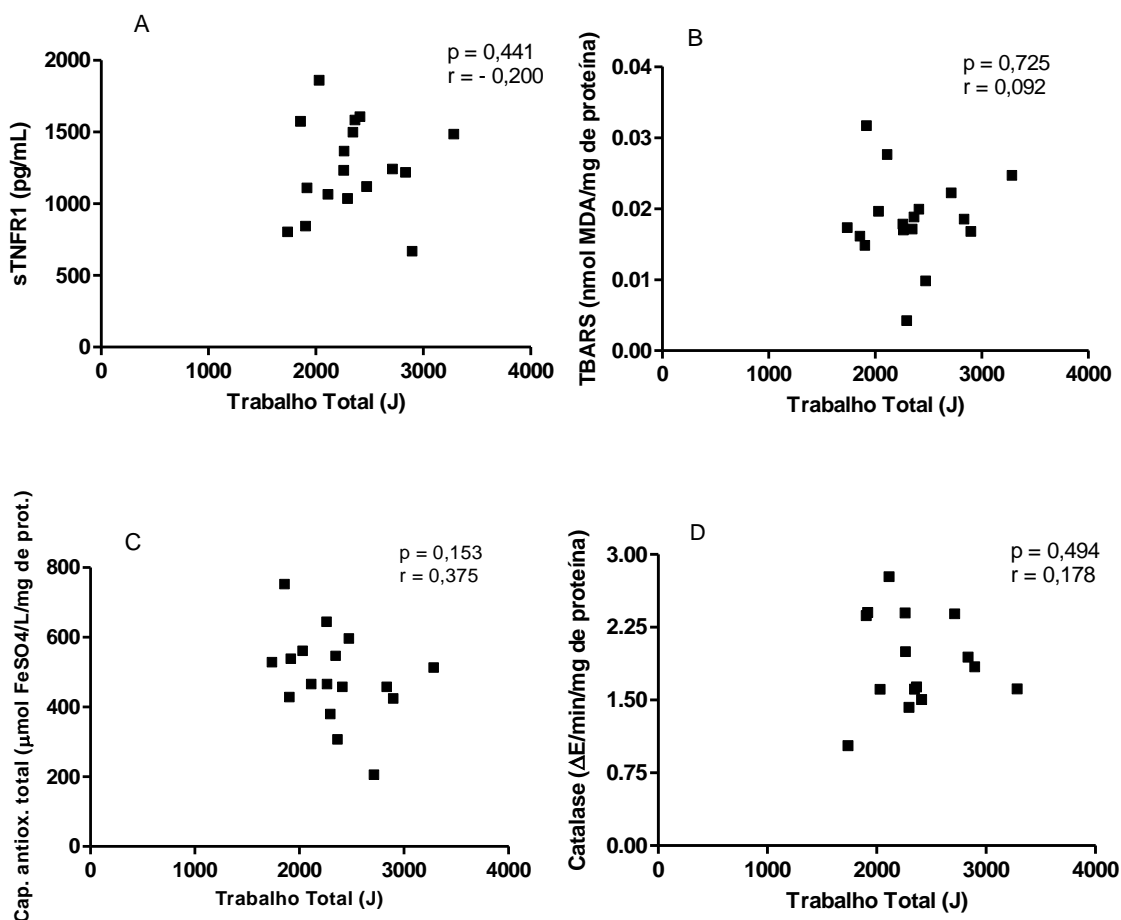


Figura 10. Correlações das concentrações plasmáticas de sTNFR1 ($p=0,441$; $r=0,260$), TBARS ($p=0,725$; $r=0,092$), capacidade antioxidante total do plasma ($p=0,153$; $r=0,375$) e a atividade da enzima catalase ($p=0,494$; $r=0,178$) com o trabalho total do grupo fumante. Correlação de Pearson.

7 DISCUSSÃO

Considerando a literatura pesquisada, este foi o primeiro estudo a avaliar o estresse oxidativo e o perfil inflamatório acompanhados da função muscular esquelética periférica e da aptidão cardiorrespiratória de homens adultos assintomáticos, fumantes e não fumantes. Os principais achados deste estudo foram: (1) as concentrações plasmáticas de sTNFR1 foram significativamente maiores, e de sTNFR2, IL-6 e IL-10 similares em fumantes comparados a não fumantes; (2) concentrações plasmáticas de TBARS foram significativamente maiores em fumantes comparados a não fumantes; (3) a capacidade antioxidante total do plasma e a atividade da enzima antioxidante catalase de eritrócitos apresentaram-se reduzidas em fumantes; (4) o pico de torque e o índice de fadiga foram similares entre fumantes e não fumantes e as medidas de trabalho foram significativamente menores em fumantes; (5) o $VO_{2\text{pico}}$, a FC máxima e a distância caminhada durante o SWT foram similares entre fumantes e não fumantes e; (6) não foram encontradas correlações significativas entre os parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo com a função muscular esquelética periférica dos fumantes.

Todos os sujeitos avaliados apresentaram função pulmonar normal, porém os fumantes apresentaram a relação VEF_1/CVF menor quando comparados a não fumantes. Redução do VEF_1 e da relação VEF_1/CVF de fumantes com função pulmonar normal comparados a não fumantes, também foram relatados por estudos anteriores (TANNI *et al.*, 2012; van den BORST *et al.*, 2011; van EEEDEN e HOGG, 2000). Tal fato pode ser atribuído à lesão de vias aéreas dos fumantes, principalmente àquelas de menor calibre, devido a inflamação local e sistêmica resultante do consumo crônico das partículas tóxicas do cigarro (OSAKA *et al.*, 2010; ABBOUD *et al.*, 1998). Apesar dos sujeitos fumantes na sua maioria terem sido classificados como fumantes leves e moderados e com dependência nicotínica muito baixa e baixa de acordo com o auto-relato, concentrações expressivas de cotinina no soro (mediana de 142,5 ng/mL; 82,5% maior que o valor de referência) foram observadas nesses sujeitos, indicando alta exposição à nicotina pelo organismo.

O perfil inflamatório foi observado nos fumantes do presente estudo por significativos aumentos das concentrações plasmáticas de sTNFR1; ao passo que as citocinas IL-6, IL-10 e o sTNFR2 não diferiram entre fumantes e não fumantes. Estudos prévios que avaliaram as concentrações de IL-6 no soro também mostraram concentrações similares entre adultos assintomáticos, fumantes e não fumantes (TANNI *et al.*, 2012; GARLICH *et al.*, 2009). Enquanto que quando avaliada em lavado

broncoalveolar, IL-6 apresentou concentrações significativamente maiores em adultos fumantes, demonstrando que embora não detectada sistemicamente esta citocina parece estar presente na inflamação local do pulmão provocada pelo cigarro (KUSCHNER *et al.*, 1996). Garlich *et al.* (2009) relacionaram esses resultados a amostra de adultos-jovens (média de 25 anos de idade) de seu estudo, que tendem a apresentar menores alterações nas concentrações sistêmicas de citocinas pró-inflamatórias do que indivíduos mais velhos, que em média apresentam maior tempo de consumo do cigarro. Tal fato também pôde ser observado no presente estudo, onde fumantes adultos com média de 34 anos não apresentaram diferenças nas concentrações plasmáticas de IL-6 quando comparados a não fumantes.

Embora as concentrações de IL-6 no plasma não tenham modificado entre fumantes e não fumantes acredita-se que o consumo crônico dos componentes do cigarro seja responsável pela inflamação sistêmica observada em fumantes assintomáticos. Esta inflamação é caracterizada por um desequilíbrio entre a produção e liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, em resposta ao aumento do número de neutrófilos e macrófagos visto em fumantes (TANNI *et al.*, 2012; KUSCHNER *et al.*, 1996). Este desequilíbrio tem sido caracterizado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas, IL-1 β , TNF- α e IL-8 avaliadas no soro e lavado broncoalveolar (TANNI *et al.*, 2012; BARBIERI *et al.*, 2011; PETRUSCU *et al.*, 2010; KUSCHNER *et al.*, 1996) e reduzidas concentrações de citocinas anti-inflamatórias tais como a IL-10 (TAKANASHI *et al.*, 1999). Redução da concentração de IL-10 foi observada somente em escarro (TAKANASHI *et al.*, 1999), enquanto que semelhante aos nossos dados a IL-10 tem se mostrado inalterada no plasma e após estimulação de células mononucleares do sangue periférico de fumantes assintomáticos comparados aos seus controles não fumantes (WETZEL *et al.*, 2007; ZEIDEL *et al.*, 2002).

Apesar de não detectado nas amostras dos sujeitos fumantes e não fumantes do atual estudo, provavelmente por menor sensibilidade do *kit* utilizado para análise, estudos prévios relataram concentrações aumentadas de TNF- α no soro de fumantes adultos (BARBIERI *et al.*, 2011; PETRUSCU *et al.*, 2010). Este achado pode estar relacionado com a instabilidade desta citocina que tem uma meia-vida curta que pode variar ao longo do dia (PENNIX *et al.*, 2004). Além disso, nos estudos que identificaram aumentos de TNF- α no soro as amostras eram constituídas por fumantes pesados com consumo diário maior que um maço de cigarro, com média de 30 anos-maço (PETRUSCU *et al.*, 2010); ou por sujeitos que foram avaliados após exposição aguda ao cigarro (BARBIERI *et al.*,

2011), o que pode ter facilitado sua detecção. Vale ressaltar que o TNF- α parece ser menos estável que seus receptores solúveis (KRONFOL e REMICK, 2000).

A atividade biológica do TNF- α é mediada por dois receptores de membrana, TNFR1 (p55) e TNFR2 (p75) que possuem diferentes efeitos (BROCKHAUS, 1997). O TNFR1 é associado a resposta pró-inflamatória e apoptose e o TNFR2 ao reparo tecidual e angiogênese. Ambos receptores são liberados na sua forma solúvel (sTNFR1 e sTNFR2) por clivagem proteolítica das formas associadas a superfície de membrana, exercendo um importante papel na regulação da atividade do TNF- α (BRADLEY, 2008). Os sTNFRs podem tanto inibir os efeitos do TNF- α por competir com os receptores de membrana, bem como, servirem como carreadores do TNF- α e em alguns casos aumentar seus efeitos por prolongar sua função, sendo considerados reservatórios de lenta liberação (ADERKA *et al.*, 1992).

Devido à dificuldade de detecção no plasma, geralmente por TNF- α apresentar concentração muito baixa, tem sido sugerido a medida de seus receptores solúveis, uma vez que as concentrações destes no plasma é consequência à exposição ao TNF- α (BROCKHAUS, 1997). No presente estudo, os receptores solúveis sTNFR1 e sTNFR2 apresentaram maiores concentrações em fumantes comparados a não fumantes, apesar de não observada diferença significativa para o sTNFR2. Resultados análogos foram observados por Fernandez-Real *et al.* (2003) que encontraram maiores concentrações destes receptores em fumantes, embora somente sTNFR2 tenha sido significativo. Portanto, acredita-se que o aumento de sTNFR1 nos fumantes avaliados no atual estudo seja devido provavelmente à maior exposição ao TNF- α , apesar deste não ter sido detectado nas amostras de ambos fumantes e não fumantes.

O estresse oxidativo foi verificado no GF pelo aumento do dano oxidativo a lipídeos, avaliado pela mensuração dos produtos da peroxidação lipídica (aumento da concentração de TBARS plasmático) associado à redução das concentrações de antioxidantes (redução da capacidade antioxidante total do plasma e da atividade da enzima catalase de eritrócitos), comparados a não fumantes. Aumento da concentração de TBARS tem sido observado em fumantes assintomáticos adultos e idosos. Aula e Qadir (2013) e Nowak *et al.* (2001) relataram aumentos de TBARS no soro e no condensado do ar exalado de fumantes adultos, com médias de 10-17 cigarros fumados/dia por mais de 10 anos. No entanto, no estudo de Aula e Qadir (2013) a função pulmonar dos sujeitos não foi avaliada. Ao contrário destes estudos, Diken *et al.* (2001) encontraram aumento da concentração de TBARS no plasma apenas em fumantes idosos (média de 20,5 anos-maço) comparados com fumantes adultos (média de 8,1 anos-maço)

e seus respectivos controles não fumantes. Esses estudos demonstram que as concentrações de TBARS são principalmente influenciadas pela quantidade de consumo do cigarro. Os resultados do presente estudo demonstraram que o dano oxidativo pôde ser observado em fumantes assintomáticos adultos que apresentaram mediana de 13,0 anos-maço (média de 13,62 anos-maço).

A sobrecarga de oxidantes no organismo de sujeitos fumantes gerada pelo grande número de radicais livres e de compostos oxidantes presentes na fumaça do cigarro (PRYOR e STONE, 1993), tem sido relacionada ao aumento da peroxidação lipídica, como avaliado pelos significativos aumentos das concentrações de TBARS nesses sujeitos (AULA e QADIR, 2013; NOWAK *et al.*, 2001; DIKEN *et al.*, 2001). Em contrapartida, a resposta ao aumento da produção das espécies reativas de oxigênio, devido à exposição crônica aos oxidantes do cigarro, parece ser acompanhada de insuficiente defesa antioxidante (TAVILANI *et al.*, 2012; ABOU-SEIF *et al.*, 1996). Tal fato pode ser confirmado a partir dos presentes resultados, como constatado pela significativa redução da atividade da enzima catalase de eritrócitos e, apesar de não significativo, da menor atividade da enzima SOD de eritrócitos em sujeitos fumantes. Similar aos nossos achados, Tavilani *et al.* (2012) e Zhou *et al.* (2000) observaram atividades reduzidas das enzimas catalase e SOD de eritrócitos em fumantes assintomáticos comparados a não fumantes.

A reduzida defesa antioxidante de fumantes também foi verificada por significativa redução da capacidade antioxidante total do plasma. A capacidade antioxidante total reflete o poder antioxidante da combinada defesa antioxidante enzimática e não enzimática de fluidos biológicos (BENZIE e STRAIN, 1996). Redução da capacidade antioxidante total e de diversos antioxidantes plasmáticos não enzimáticos, tais como, vitamina E, ácido ascórbico, cerusplasma e ácido úrico também foi relatada por estudos prévios, caracterizando o estresse oxidativo observado em fumantes assintomáticos (TAVILANI *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2000; ABOU-SEIF *et al.*, 1996). Apesar do método de avaliação da capacidade antioxidante total do plasma utilizado no presente estudo ser baseado apenas na mensuração dos antioxidantes plasmáticos que tem habilidade em reduzir o ferro, já foi demonstrado que diversos antioxidantes não enzimáticos, dentre eles vitamina E, ácido ascórbico, ácido úrico e bilirrubina apresentaram tal habilidade em plasma (BENZIE e STRAIN, 1996).

Acompanhado do perfil inflamatório e do estresse oxidativo, a função muscular esquelética periférica de fumantes foi afetada, pois houve redução do trabalho total e do trabalho realizado nos terços inicial e final das repetições dos músculos extensores de

joelho (quadríceps femoral). O trabalho total muscular é a ação da força por meio de uma distância específica, ou seja, ação do torque durante a amplitude de movimento. Essa variável é calculada pela área sob a curva do torque, que fisicamente é a energia desenvolvida pelo músculo. Se esse valor é baixo, pode representar que clinicamente a função muscular está alterada e que a energia despendida durante uma amplitude de movimento não é adequada ou apresenta déficit muscular (BASTIANI *et al.*, 2012). Em adição a esses resultados, o pico de torque dos músculos extensores e flexores de joelho e o índice de fadiga de extensores de joelho foram similares entre os sujeitos do estudo. Dessa forma, pôde ser notado que a resistência muscular foi afetada pelo déficit de energia despendida pela contração durante a amplitude de movimento em sujeitos fumantes conforme as medidas de trabalho, porém a queda do trabalho (índice de fadiga) e o pico de torque foram similares entre os sujeitos. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram que o pico de torque máximo dos extensores de joelho foi similar entre fumantes e não fumantes (van den BORST *et al.*, 2011; WUST *et al.*, 2008; MORSE *et al.*, 2007; LARSSON e ORLANDER, 1984) e que apenas a resistência desta musculatura foi reduzida em fumantes (WUST *et al.*, 2008; MORSE *et al.*, 2007).

Esses achados têm sido confirmados por estudos histológicos e imunohistoquímicos da musculatura de fumantes, a qual tem sido relacionada à mudanças na composição do tipo de fibra muscular, com reduzido percentual e diâmetro de fibras tipo I (alta capacidade oxidativa) e maior percentual de fibras tipo IIB (baixa capacidade oxidativa) (de OCA *et al.*, 2008; LARSSON e ORLANDER, 1984); à redução do suprimento de oxigênio à musculatura, em função da alta afinidade da hemoglobina com o CO presente na fumaça do cigarro (PUENTE-MAESTU *et al.*, 1998); ao declínio da função mitocondrial devido a redução da atividade da enzima citocromo *c* oxidase (complexo IV da cadeia transportadora de elétrons) (LARSSON e ORLANDER, 1984), e ao estresse oxidativo (BARREIRO *et al.*, 2010; de OCA *et al.*, 2008).

Além da função muscular esquelética periférica o desempenho físico dos sujeitos foi avaliado pela medida da aptidão cardiorrespiratória em teste máximo de caminhada/corrida. Com base nos resultados de $VO_{2\text{pico}}$, FC máxima e distância caminhada, não foram verificadas diferenças no que concerne a aptidão cardiorrespiratória entre fumantes e não fumantes. Similaridades entre adultos fumantes e não fumantes em relação ao $VO_{2\text{max}}$ e FC máxima alcançados em testes de esteira foram relatadas anteriormente pelos estudos de Kobayashi *et al.* (2004) e Morton e Holmik (1985). Em contraste, estudos que avaliaram a aptidão cardiorrespiratória com base na capacidade de trabalho de teste máximo em cicloergômetro (SANDIVIK *et al.*, 1995) e

tolerância ao exercício, como avaliado pela duração de testes físicos de caminhada/corrida, demonstraram que sujeitos fumantes apresentaram reduções significativas no desempenho físico (MACERA *et al.*, 2011; PAPATHANASIOU *et al.*, 2007). Contudo, vale ressaltar que a mensuração do VO_{2max} por meio da análise direta dos gases exalados em testes máximos é considerado a medida padrão-ouro para avaliação da aptidão cardiorrespiratória (ACSM, 2003).

A ausência de influências do tabagismo crônico na aptidão cardiorrespiratória, sugere em parte que os sistemas cardiovascular e respiratório dos sujeitos deste estudo ainda não sofreram alterações significativas que repercutissem na capacidade aeróbia. Redução na aptidão cardiorrespiratória de fumantes adultos têm sido relacionadas a valores significativamente maiores da FC de repouso e da FC durante exercício submáximo (PAPATHANASIOU *et al.*, 2007) devido ao aumento da atividade simpática, provocado pela ação direta da nicotina nos nervos simpáticos cardíacos e elevados níveis de catecolaminas plasmáticas (NARKIEWITZ *et al.*, 1998). Ao mesmo tempo, há reduzido controle vagal cardíaco, que resulta no predomínio da atividade simpática (HAYANO *et al.*, 1990). Como observado, a FC de repouso, a FC máxima e a pressão arterial sistólica e diastólica de repouso foram similares entre os sujeitos do presente estudo, demonstrando parecer haver ausência de mudanças no controle autonômico cardíaco que pudessem afetar a aptidão cardiorrespiratória. Em adição, os sujeitos apresentaram função pulmonar normal, o que demonstra que apesar da provável resposta inflamatória pulmonar, a troca gasosa ainda pode não ter sido afetada. Além disso, assim como os marcadores do estresse oxidativo e do perfil inflamatório, a aptidão cardiorrespiratória também parece ser influenciada pela quantidade de consumo do cigarro. Um recente estudo identificou que apenas homens fumantes de meia-idade que haviam fumado mais que 15 anos-maço, apresentaram reduções significativas no desempenho físico comparados a não fumantes (STRAND *et al.*, 2010). Desta forma, acredita-se que a quantidade de exposição ao cigarro pelos sujeitos do presente estudo, apesar de provocar alterações no estresse oxidativo, no perfil inflamatório e na função muscular esquelética periférica, não foi capaz de provocar mudanças na aptidão cardiorrespiratória de fumantes comparados a não fumantes.

Embora não tenham sido encontradas correlações significativas entre o perfil inflamatório e o estresse oxidativo com a função muscular esquelética periférica dos sujeitos fumantes, pesquisas recentes têm demonstrado que o estresse oxidativo, ao contrário do perfil inflamatório, parece afetar a função muscular esquelética periférica de fumantes assintomáticos. Em biópsias do músculo vasto lateral de fumantes

assintomáticos de meia-idade e idosos, Barreiro *et al.* (2010) observaram aumento das concentrações de proteínas carboniladas e de MDA, e de Oca *et al.* (2008) relataram redução da concentração da enzima óxido nítrico sintetase endotelial e neuronal, sugerindo a presença de alterações microvasculares e do estresse oxidativo na musculatura desses sujeitos. Adicionalmente, nestes trabalhos não foram observadas diferenças no perfil inflamatório muscular de fumantes e não fumantes quando avaliadas as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e o número de macrófagos. Apesar do estresse oxidativo no presente estudo ter sido avaliado no sangue periférico, já foi demonstrado pela literatura que marcadores do estresse oxidativo no sangue periférico, dentre eles a atividade da enzima antioxidante catalase podem satisfatoriamente descrever o *status* redox do músculo esquelético (VESKOUKIS *et al.*, 2009). Sendo assim, acredita-se que as alterações de estresse oxidativo observadas nos sujeitos fumantes do presente estudo possam exercer papel influente na redução da resistência muscular observada nesses sujeitos. Contudo, novas pesquisas são necessárias para investigar os mecanismos com que o estresse oxidativo e o perfil inflamatório influenciam a função muscular esquelética periférica de fumantes assintomáticos.

Algumas limitações do presente estudo devem ser destacadas, tais como o tamanho da amostra, que apesar de ser baseado em cálculo amostral pode ter sido insuficiente para detectar as mudanças entre os grupos. Além disso, a análise de outros marcadores do perfil inflamatório (análise fenotípica de leucócitos, IL-1 β , IL-8) e do estresse oxidativo (proteína carboniladas, enzima antioxidante glutathiona peroxidase) poderiam ter sido realizadas para auxiliar a detecção dos danos inflamatórios e oxidativos. Por fim, as análises laboratoriais foram realizadas em sangue periférico, demonstrando marcadores sistêmicos e não locais (em pulmão), contudo, vale ressaltar que análises sistêmicas também foram realizadas por diversos estudos prévios, uma vez que a avaliação local é invasiva (lavado broncoalveolar) ou com pouca validação (ar exalado).

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstrou que homens fumantes crônicos, adultos e assintomáticos, exibiram alterações no perfil inflamatório, no estresse oxidativo e na função muscular esquelética periférica, quando comparados a não fumantes.

REFERÊNCIAS

ABBOUD, R.T. et al. Effect of smoking on plasma neutrophil elastase levels. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 108, n. 4, p. 294–300, Oct. 1986.

ABBOUD, R.T. et al. Relationship of alveolar macrophage plasminogen activator and elastase activities to lung function and CT evidence of emphysema. **Chest**, v. 113, n. 5, p. 1257-1263, May. 1998.

ABOU-SEIF, M.A.M. Blood antioxidant status and urine sulfate and thiocyanate levels in smokers. **Journal of Biochemical Toxicology**, v. 11, n. 3, p. 133-138, 1996.

ACSM, American College of Sports Medicine. **Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição**. 6. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Kogan, 2003, 239 p.

ADERKA, D. et al. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 2, p. 323-329, Feb. 1992.

AMBROSE, J.A.; BARUA, R.S. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease an update. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 43, n. 10, p. 1731-1737, May. 2004.

ARSON, Y.; SHOENFELD, Y.; AMITAL, H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, p. 258-265, May. 2010.

AULA, F.A.; QADIR, F.A. Effects of cigarette smoking on some immunological and hematological parameters in male smokers in Erbil city. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 2, p. 159-166, June. 2013.

BARBIERI, S.S. et al. Cytokines present in smokers' serum interact with smoke components to enhance endothelial dysfunction. **Cardiovascular Research**, v. 90, p. 475–483, Feb. 2011.

BARREIRO, E. et al. Cigarette smoke–induced oxidative stress: A Role in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Skeletal Muscle Dysfunction. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, p. 477–488, May. 2010.

BASTIANI, D. et al. Trabalho e potência dos músculos extensores e flexores de joelho de paciente com osteoartrite e artroplastia total de joelho. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 189-202, 2012.

BENOWITZ, N.L. et al. Cotinine disposition and effects. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, n.5, p. 604–611, Nov. 1983.

BENOWITZ, N.L. Cigarette smoking and cardiovascular disease: pathophysiology and implications for treatment. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 46, n. 1, p. 91-111, Jul-Aug. 2003.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, Jul. 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-254, May. 1976.

BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149-160, Jan. 2008.

BROCKHAUS, M. Soluble TNF receptor: what is the significance? **Intensive Care Medicine**, v. 23, p. 808–809, Aug. 1997.

BROWN, L.E.; WEIR, J.P. Recomendação de procedimentos da Sociedade Americana de Fisiologia do Exercício (ASEP) I: avaliação precisa da força e potência muscular. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 11, n. 4, p. 95-110, mar.-abr. 2003.

BRUNNEMAN, K.D.; LEE, H.C.; HOFFMAN, D. Chemical studies on tobacco smoke. On the quantitative analysis of catechols and their reduction. **Analytical Letters**, v.9, p. 939-955, 1976.

BUTNARU, E. et al. Variation of carboxyhemoglobin and of thiocyanates in smokers. **Revista Medico-chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași**, v. 106, n. 4, p. 782-786, Oct-Dec.2002.

CARMO, J.T.D.; PUEYO, A.A. A adaptação ao português do Fagerström test for nicotine dependence (FTND) para avaliar a dependência e tolerância a nicotina em fumantes brasileiros. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 59, p. 73-80, 2002.

COMANDINI, A. et al. Biomarkers of lung damage associated with tobacco smoke in induced sputum. **Respiratory Medicine**, v. 103, p. 1592-1613, Jul. 2009.

COMHAIR, S.A.; Erzurum, S.C. Antioxidant responses to oxidant mediated lung diseases. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246–255, Aug. 2002.

CORRÊA, P.C.R.P; BARRETO, S.M.; PASSOS, V.M.A. Smoking-attributable mortality and years of potential life lost in 16 Brazilian capitals, 2003: a prevalence-based study. **BMC Public Health**, v. 9, n. 206, p. 1-13, Jun. 2009.

DAVIES, K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochemical Society Symposium**, v.6, p. 1–31, 1995.

de OCA, M.M.D. et al. Peripheral muscle alterations in non-COPD Smokers. **Chest**, v. 133, n. 1, p. 13-18, Jan. 2008.

DIKEN, H. et al. Effects of cigarette smoking on blood antioxidant status in short-term and long-term smokers. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 31, p. 553-557, 2001.

DOLL, R. et al. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. **British Medical Journal**, v. 22, n. 328: 1519, p. 1-9, Jun. 2004.

DONALDSON, A.V. et al. Muscle function in COPD: a complex interplay. **International Journal of COPD**, v. 7, p. 523–535, 2007.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, Jan. 2002.

DUTHIE, G.G.; ARTHUR, J.R.; JAMES, W.P.T. Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, n. (4 Suppl), p. 1061S-1063S, Apr. 1991.

FERNANDEZ-REAL, J.M. et al. Smoking, fat mass and activation of the tumor necrosis factor- α pathway. **International Journal of Obesity**, v. 27, p. 1552–1556, Dec. 2003.

FOLKERTS, G. et al. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 19, n. 429 (1-3), p. 251–262, Oct. 2001.

GARLICH, C.D. et al. CD40/CD154 system and pro-inflammatory cytokines in young healthy male smokers without additional risk factors for atherosclerosis. **Inflammation Research**, v. 58, p. 306-311, Jan. 2009.

GARROW, J.S.; WEBSTER, J. Quetelet's index (W/H²): as a measure of fatness. **International Journal of Obesity**, v. 9, n. 2, p. 147-153, 1985.

GATÉ, L. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, n. 4, p. 169-180, May. 1999.

GLASS, G.A.; GERSHON, D. Enzymatic changes in rat erythrocytes with increasing cell and donor age: loss of superoxide dismutase activity associated with increases in catalytically defective forms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 103, n. 4, p. 1245-1253, Dec. 1981.

GONÇALVES, R.B. et al. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular Mechanisms. **Inflammation Research**, v. 60, n. 5, p. 409–424, May. 2011.

GREEN, C.R.; RODGMAN, A. The Tobacco Chemists' Research Conference: A half-century of advances in analytical methodology of tobacco and its products. **Recent Advances in Tobacco Science**, v. 22, p. 131-304, 1996.

GUATURA, S.B. et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 118, n. 4, p. 93-108, Jul. 2000.

HALTY, L.S. et al. Análise da utilização do Questionário de Tolerância de Fagerström (QTF) como instrumento de medida da dependência nicotínica. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, n. 4, p. 180-186, 2002.

HAYANO, J. et al. Short and long-term effects of cigarette smoking on heart rate variability. **American Journal of Cardiology**, v. 65, p. 84-88, Jan. 1990.

HOFFMANN, D.; HOFFMANN, I.; EL-BAYOUMY, K. The less harmful cigarette: a controversial issue. A Tribute to Ernst L. Wynder. **Chemical Research in Toxicology**, v.14, n. 7, p. 767-790, Jul. 2001.

HULEA, S.A. et al. Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case-control study. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 14, n. 3-4, p. 173–180, 1995.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. **Tobacco Smoking**. France, 1986.

INCA & OPAS: Instituto Nacional de Câncer & Organização Pan-Americana de Saúde. **Global Adult Tobacco Survey**. Rio de Janeiro, 2010.

JACKSON, A.S.; POLLOCK, M.L. Generalized equations for predicting body density of men. **British Journal of Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 497-504, Nov. 1978.

JHA, P.; CHALOUPKA F.J. **Curbing the Epidemic: Governments and the Economics of Tobacco Control**. Washington, D.C.: World Bank, 1999.

JHA, P.; CHALOUPKA, F.J. **Tobacco Control in Developing Countries**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

KARVONEN, M.J.; KENTAL, E.; MUSTALA, O. The effects of on heart rate a longitudinal study. **Annals Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae**, v. 35, p. 307-315, 1957.

KHARITONOV, S.A. et al. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 152, n. 2, p. 609–612, Aug. 1995.

KOBAYASHI, Y. et al. Effects of habitual smoking on cardiorespiratory responses to sub-maximal exercise. **Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science**, v. 23, n. 5, p. 163–169, Sep. 2004.

KRONFOL, Z.; REMICK, D.G. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. **The American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 5, p. 683-694, May. 2000.

KUSCHNER, W.G. et al. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. **European Respiratory Journal**, v. 9, p. 1989–1994, Oct. 1996.

LARSSON, L.; ORLANDER, J. Skeletal muscle morphology, metabolism and function in smokers and non-smokers. A study on smoking-discordant monozygous twins. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 120, n. 3, p. 343-52, Mar. 1984.

LEE, P.N.; FRY, J.S. Systematic review of the evidence relating FEV1 decline to giving up smoking. **BMC Medicine**, v. 8, n. 84, p. 1-29, Dec. 2010.

LEWIS, D.F. et al. Molecular modelling of the human cytochrome P450 isoform CYP2A6 and investigations of CYP2A substrate selectivity. **Toxicology**, v. 133, n. 1, p. 1–33, Mar. 1999.

MACERA, C.A. et al. Cigarette smoking, body mass index, and physical fitness changes among male navy personnel. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 13, n. 10, p. 965–971, Oct. 2011.

MAK, J.C.W. Pathogenesis of COPD, Part II: Oxidative-antioxidative imbalance. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 12, n. 4, p. 368–374, Apr. 2008.

MALAFATTI, L.; MARTINS, I. Aspectos analíticos da determinação de cotinina em matrizes biológicas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 22, n.1-2, p. 9-20, 2009.

MARKLUND, S.; MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, Sep. 1974.

MASUKO, H. et al. Lower FEV1 in non-COPD, non-asthmatic subjects: association with smoking, annual decline in FEV1, total IgE levels, and TSLP genotypes. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 6, p. 181–189, 2011.

MCKEEVER, T.; SAHA, S.; FOGARTY, A.W. The Association between Systemic Inflammatory Cellular Levels and Lung Function: A Population-Based Study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1-7, 2011.

MEKRUNGRONGWONG, S. et al. Great inclination to smoke among younger adults coming from low-socioeconomic class in Thailand. **Internacional Archives of Medicine**, v. 4, n. 29, p. 1-7, Aug. 2011.

MILLER, M.R. et al. Standardisation of spirometry. **European Respiratory Journal**, v. 26, p. 319–338, Aug. 2005.

MONTUSCHI, P. et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, n. 162(3 Pt 1), p. 1175–1177, Sep. 2000.

MORRISON, D. et al. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, n. 2, p. 473-479, Feb. 1999.

MORSE, C.I. et al. Muscle fatigue resistance during stimulated contractions is reduced in young male smokers. **Acta Physiologica**, v. 191, p. 123–129, Oct. 2007.

MORTON, A.R.; HOLMIK, E.V. The effects of cigarette smoking on maximal oxygen consumption and selected physiological responses of elite team sportsmen. **European Journal of Applied Physiology Occupational Physiology**, v. 53, n. 4, p. 348-52, 1985.

MOYER, T.P. et al. Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry, with clinically relevant metabolic profiles. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 1460-1471, Sep. 2002.

MUKAE, H. et al. The effect of repeated exposure to particulate air pollution (PM10) on the bone marrow. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 163, n. 1, p. 201–209, 2001.

NARKIEWICZ, K. et al. Cigarette smoking increases sympathetic outflow in humans. **Circulation**, v. 98, p. 528-534, Aug. 1998.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Tobacco-related exposures: tobacco smoking. **Report on Carcinogens**, v. 12, p. 408-410, 2011.

NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, p. 474-478, Oct. 1972.

NOWAK, D. et al. Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by healthy subjects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 2, p. 178–186, Jun. 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, Jun. 1979.

OPAS, Organização Pan-Americana de Saúde. **Guias para o controle e monitoramento da Epidemia Tabágica**, 1995.

OSAKA, D. et al. Relationship between habit of cigarette smoking and airflow limitation in healthy Japanese individuals: The Takahata Study. **International Medicine**, v. 49, n. 15, p. 1489-1499, 2010.

PACH, J.; KAMENCZAK, A.; PANAS, M. The frequency of toxic methemoglobinemias in people living in the vicinity of refuse dumps in Barycz. **Przegląd Lekarski**, v. 53, n. 4, p. 348-350, 1996.

PAPATHANASIOU, G. et al. Effects of chronic smoking on exercise tolerance and on heart rate-systolic blood pressure product in young healthy adults. **European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation**, v. 14, p. 646–652, Oct. 2007.

PENNINX, B.W. et al. Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 31, p. 2027-2031, Oct. 2004.

PEREIRA, C.A.C. et al. Consenso Brasileiro de Espirometria. **Jornal de Pneumologia**, v. 28 (Supl 3), p. 1-82, 2002.

PETO, R. et al. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. **BMJ**, v. 5, n. 321 (7257), p. 323-329, Aug. 2000.

PETRESCU, F.; VOICAN, S.C.; SILOSI, I. Tumor necrosis factor- α serum levels in healthy smokers and nonsmokers. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 5, p. 217–222, Aug. 2010.

PINCIVERO, D.M.; GEAR, W.S.; STERNER, R.L. Assessment of the reliability of high-intensity quadriceps femoris muscle fatigue. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 2, p. 334-338, Feb. 2001.

PREMANAND, R.; KUMAR, P.H.S.; MOHAN, A. Study of thiobarbituric reactive substances and total reduced glutathione as indices of oxidative stress in chronic smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. **The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences**, v. 49, p. 9-12, Jan-Mar. 2007.

PRYOR, W.A.; STONE, K. Oxidants in cigarette smoke: radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 28, n. 686, p.12-27, May. 1993.

PUENTE- MAESTU, L. et al. Relationship between tobacco smoke exposure and the concentrations of carboxyhemoglobin and hemoglobina. **Archives Bronconeumology**, v. 34, p. 339-343, Jul-Aug. 1998.

RAHMAN, I. et al. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154, n. (4 Pt 1), p. 1055-1060, Oct. 1996.

REICHERT, J. et al. Diretrizes para a cessação do tabagismo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 10, p. 845-880, 2008.

ROBERGS, R.A.; DWYER, D.; ASTORINO, T. Recommendations for improved data processing from expired gas analysis indirect calorimetry. **Sports Medicine**, v. 40, n. 2, p. 95-111, Feb. 2010.

ROBERTS, D. L. Natural tobacco flavor. **Recent Advances in Tobacco Science**, v. 14, p. 49-81, 1988.

ROSEMBERG, José. **Nicotina: Droga Universal**. São Paulo, SES/CEV, 2003, 174 p.

SANDVIK, L.; ERIKSSSEN, G.; THAULOW, E. Long term effects of smoking on physical fitness and lung function: a longitudinal study of 1393 middle aged Norwegian men for seven years. **British Medical Journal**, v. 311, p. 715-718, Sep. 1995.

SANGANI, R.G.; GHIO, A.J. Lung injury after cigarette smoking is particle related. **International Journal of COPD**, v. 6, p. 191-198, 2011.

SANTOS, U.P. et al. Emprego da determinação de monóxido de carbono no ar exalado para a detecção do consumo de tabaco. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n. 5, p. 231-236, 2001.

SINGH, S.J. et al. Development of a Shuttle Walking Test of disability in patients with chronic airways obstruction. **Thorax**, v. 47, p.1019-1024, Dec. 1992.

SIRI, W.E. **Body composition from fluid space and density. Techniques for measuring body composition**. Washington: National Academy of Science, 1961.

SOPORI, M. Effects of cigarette smoke on the immune system. **Nature Reviews**, v. 2, p. 372- 377, May. 2002.

STRAND, B.H. et al. Smoking History and Physical Performance in Midlife: Results From the British 1946 Birth Cohort. **Journal of Gerontology: Medical Sciences**, v. 66A, n. 1, p. 142–149, Jan. 2010.

TAKANASHI, S. et al. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. **European Respiratory Journal**, v. 309, p. 309-314, Aug. 1999.

TANNI, S.E. et al. Increased production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes associated with smoking exposure intensity in smokers. **Journal of Inflammation**, v. 9, n. 45, p. 1-6, Nov. 2012.

TAVILANI, H. et al. Oxidative Stress in COPD Patients, Smokers, and Non-smokers. **Respiratory Care**, v. 57, n. 12, p. 2090 –2094, Dec. 2012.

TUTKA, P.; MOSIEWUCZ, J.; WIELOSZ, M. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. **Pharmacological Reports**, v. 57, n. 2, p. 143-153, Mar-Apr. 2005.

USDHHS. U.S. Department of Health and Human Services. **How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease**. A Report of the Surgeon General. Atlanta, 2010.

van den BORST, B. et al. Is age-related decline in lean mass and physical function accelerated by obstructive lung disease or smoking? **Thorax**, v. 6, p. 1-9, Nov. 2011.

van der VAART, H. et al. Acute effects of cigarette smoking on inflammation in healthy intermittent smokers. **Respiratory Research**, v. 6, n. 22, p. 1-11, Mar. 2005.

van EEDEN, S.F.; HOGG, J.C. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. **European Respiratory Journal**, v. 15, p. 915-921, May. 2000.

VESKOUKIS, A.S. et al. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1371–1374, Nov. 2009.

ZANG, L.Y.; STONE, K.; PRYOR, W.A. Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 2, p. 161-167, Aug. 1995.

ZEIDEL, A. et al. Immune response in asymptomatic smokers. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 46, n. 8, p. 959-64, Sep. 2002.

ZHOU, J.F. et al. Effects of cigarette smoking and smoking cessation on plasma constituents and enzyme activities related to oxidative stress. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 13, n. 1, p. 44-55, Mar. 2000.

WHETZEL, C.A.; CORWIN, E.J.; KLEIN, L.C. Disruption in Th1/Th2 immune response in young adult smokers. **Addictive Behaviors**, v. 32, n. 1, p. 1-8, Jan. 2007.

WHO, World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Geneva, 2011.

WHO, World Health Organization. **Global Health Risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks.** Geneva, 2009.

WÜST, R.C.I. et al. Skeletal muscle properties and fatigue resistance in relation to smoking history. **European Journal Applied Physiology**, v. 104, p. 103–110, Sep. 2008.

ANEXOS

ANEXO I – Teste de Fargstrom para dependência nicotínica (FTND)

1. Quanto tempo após acordar você fuma seu primeiro cigarro?

(3) nos primeiros 5 minutos

(2) de 6 a 30 minutos

(1) de 31 a 60 minutos

(0) mais de 60 minutos

2. Você acha difícil não fumar em lugares proibidos?

(1) sim

(0) não

3. Qual o cigarro do dia que traz mais satisfação?

(1) o 1º da manhã

(0) os outros

4. Quantos cigarros você fuma por dia?

(0) menos de 10

(1) 11-20

(2) 21-30

(3) mais de 31

5. Você fuma mais freqüentemente pela manhã?

(1) sim

(0) não

6. Você fuma mesmo doente, quando precisa ficar acamado a maior parte do tempo?

(1) sim

(0) não

Total: 0-2 = muito baixa; 3-4 = baixa; 5 = média; 6-7 = elevada;
8-10 = muito elevada

ANEXO II – Critério de Classificação Econômica Brasil (CCEB)

SISTEMA DE PONTOS

Posse de itens

	Quantidade de Itens				
	0	1	2	3	4 ou +
Televisão em cores	0	2	3	4	5
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	2	3	4	4
Automóvel	0	2	4	5	5
Empregada mensalista	0	2	4	4	4
Aspirador de pó	0	1	1	1	1
Máquina de lavar	0	1	1	1	1
Videocassete e/ou DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	2	2	2	2
Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex)	0	1	1	1	1

Grau de Instrução do chefe de família

Analfabeto / Primário incompleto	0
Primário completo / Ginásial incompleto	1
Ginásial completo / Colegial incompleto	2
Colegial completo / Superior incompleto	3
Superior completo	5

CORTES DO CRITÉRIO BRASIL

Classe	PONTOS	TOTAL BRASIL (%)
A1	30-34	1
A2	25-29	5
B1	21-24	9
B2	17-20	14
C	11-16	36
D	6-10	31
E	0-5	4

ANEXO III – Artigo Submetido**Revista: Brazilian Journal of Medical and Biological Research – CBII, A2****Title Page****Title:****Cardiorespiratory responses and prediction of peak oxygen uptake during the Shuttle Walking Test in healthy adult men****Runnig Title:**

Cardiorespiratory fitness during the SWT in healthy adult

Authors and Affiliatons:C.D.C. Neves¹, V.K.S. Lage¹, L.P. Lima¹, S.F. Fonseca¹, N.C.P. Avelar², A.C.R. Lacerda¹, M.M. Teixeira³, V.A. Mendonça¹.¹Programa Multicêntrico de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brasil.²Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Santa Catarina, Araranguá, SC, Brasil.³Laboratório de Imunofarmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.**Corresponding author:**

Vanessa Amaral Mendonça, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus JK – Rodovia MGT 367 – Km 583, N°. 5000 – Alto da Jacuba, Diamantina, Minas Gerais, Brasil, 39100-000. Tel.: + 55/38/35321239. E-mail: vaafisio@hotmail.com

Acknowledgment: Sociedade Brasileira de Fisiologia e Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).**Key Words:** Incremental shuttle walk test; Functional capacity; Cardiopulmonary exercise test; VO_{2peak}.

Abstract

The application of the Shuttle Walking Test (SWT) to assess cardiorespiratory fitness and the intensity of this test in healthy individuals have rarely been studied. In the first step of the study, which aimed to evaluate and correlate the cardiorespiratory responses of the SWT with the Incremental Test, 12 healthy men (25.1 ± 5.8 years old), underwent the SWT and the Incremental Test on a treadmill. In the second step, which aimed to develop a regression equation for the prediction of peak oxygen uptake (VO_{2peak}), 53 healthy men (32.4 ± 7.3 years old), underwent the SWT. In both phases, the VO_{2peak} , respiratory exchange ratio (R), and heart rate (HR) were evaluated. Similar results in VO_{2peak} (38.7 ± 6.3 mL/kg/min, 38.7 ± 3.8 mL/kg/min, $p = 0.993$), R_{peak} (1.3 ± 0.24 , 1.3 ± 0.14 , $p = 0.877$) and % of maximum HR (97.6 ± 6.1 %, 98.3 ± 4.1 %, $p = 0.700$) were obtained between the SWT and Incremental Test, respectively. Both tests showed strong and significant correlations of VO_{2peak} ($r = 0.704$, $p = 0.011$) and R_{peak} ($r = 0.737$, $p = 0.006$), as well as agreement of these measurements by Bland-Altman analysis. Body mass index and gait speed were the variables that explained 40.6 % of the variance in VO_{2peak} . In conclusion, the SWT promoted maximal cardiorespiratory responses, and the referenced developed equation showed viability for the prediction of VO_{2peak} in healthy men.

Introduction

Assessment of functional capacity or cardiorespiratory fitness (CRF) has been commonly performed both clinically and in scientific research, with the goal of providing parameters for the prescription and preparation of exercise programs, as well as providing information about reduced exercise tolerance under various pathological conditions (1,2). CRF can be measured or predicted by submaximal or maximal exercise testing, which aims to measure (by means of exhaled gases) or predict (using equations) uptake (consumption) of maximal oxygen (VO_{2max} . or VO_{2peak}). The assessment of CRF through maximal tests on treadmills or cycle ergometers, with direct measurement of VO_{2max} (cardiopulmonary exercise testing - CEPT) is considered the gold-standard measurement; however, this measurement is not always possible, because it has high costs and requires a specialized laboratory and trained personnel (3).

To facilitate the assessment of the CRF, field tests have been developed that allow for the assessment of the CRF in a simple, secure and affordable manner. Among these tests, we emphasize the Shuttle Walking Test (SWT), which is a test of incremental structure and symptom-limited, with the pace of the test dictated externally (4). The SWT was originally developed to evaluate CRF patients with airflow obstruction, and it consists of a test in which the subject must walk on flat terrain, repeatedly traversing a distance of 10 meters, and the walking pace is dictated by beeps that become closer to each other at each stage, leading the volunteer to walk at an increasing speed (4). The format of the incremental SWT causes a progressive increase in the workload, and with this increase, a strong correlation with the performance of CEPT in the SWT has been observed in cardiopulmonary patients (5,6,7).

In recent years, the application of the SWT to assess the CRF of healthy individuals has been implemented (8-11); however, the implementation and intensity of this test in this population have not been well studied often (11,12,13). When evaluated, the results of these studies regarding the intensity of the SWT through maximum heart rate (HR_{max}) reached by the end of the test have shown differences in maximal and submaximal rates. Compared with the VO_{2peak} values achieved with the SWT, the predicted values of this measurement in CEPT appear to be similar, but such responses must be confirmed with the completion of CEPT, because this comparison was performed with the VO_{2peak} values estimated for the population studied (13). Moreover, in these studies, to allow for better interpretation of walking performance and physiological responses, regression equations were developed to predict walking distance and VO_{2peak} . It is noteworthy that thus far, all these studies were conducted in elderly or middle-aged subjects, and because cardiorespiratory fitness is directly influenced by increasing age, mainly due to the effects of aging, such as increased mass

body fat and decreased lean body mass, these data cannot be extrapolated to younger people.

Thus, the present study aimed to evaluate and correlate the cardiorespiratory responses during CEPT, using the SWT and a treadmill, to classify the intensity of SWT, and to develop a regression equation to predict VO_{2peak} , based on anthropometric, demographic and physical performance variables in healthy young and middle-aged men.

Material and Methods

Subjects

This was a cross-sectional study involving healthy male subjects aged 18-45 years old. The subjects and university students from the local community were recruited with verbal invitations and flyers or through the media (Internet, radio). To be included in the study, the participants had to meet the following inclusion criteria: did not present any acute or chronic neurological, orthopedic, cardiac, endocrine or respiratory diseases; was eutrophic according to body mass index (BMI between 18.5 and 24.9 kg/m²); was sedentary, i.e., not performing physical activity for at least 30 minutes at least three times per week (3); and was not using corticosteroid medications. To meet the objectives, this study was divided into two steps. The first step was to evaluate the intensity of the SWT with the participation of 12 volunteers, and the second step aimed to develop a regression equation for the prediction of VO_{2peak} , with the participation of 53 volunteers. This study was approved by the Ethics and Research of the Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri, Brazil (CEP 108/12), and all the subjects signed consent forms.

First step procedures

In the first step, each subject attended the research laboratory on three consecutive days at the same time, to obtain intervals of 24 hours. On the first day, body composition was assessed (measured weight, height and body fat percentage), and familiarization was performed. Weight and height were measured with an anthropometric mechanical scale with stadiometer, and BMI was calculated as weight divided by height squared (kg/m²) (14). Body fat percentage was estimated from the measurement of three skinfolds (abdomen, thigh and chest), which allowed for the calculation of body density using Jackson and Pollock's (15) equation and subsequent estimation of the percentage of fat using the SIRI equation (16). Familiarization consisted of testing that would be performed on consecutive days to reduce the effect of learning on later reviews. On the second and third days, the SWT and CEPT were applied. The testing order was randomized and

balanced. The entire procedure took place during a single day shift, and the subjects were instructed to avoid physical activity and intake of caffeine and alcohol in the 24 hours prior to testing, to get at least 8 hours of sleep the night before, to eat a light meal and to ingest 500 ml of water for at least two hours before the tests (3). On the days of testing, subjects were asked about their compliance with the recommendations above and about possible complications or changes in their daily routines. The room temperature and relative humidity (RH) were recorded on the second and third days, using a digital thermometer in the environment.

Second step procedures

In the second step, the volunteers attended the research laboratory at two different times. First, the body composition measurements were obtained as described above. In the second phase, the subjects attended the laboratory for two SWTs, with an interval of 30 minutes between them. Realization of two SWTs with this range has been suggested to reduce the effects of the learning test (4,11,17). For the data analysis, the results of the test in which the volunteer obtained the greatest distance covered were used. As with the first step, the entire procedure took place during a single day shift, the subjects were instructed to follow all the recommendations for the practice of physical tests, and prior to completion of the tests, the subjects were asked about their compliance with the recommendations and about possible complications or changes in their daily routines.

Shuttle walking test

As described by Singh et al. (4), to perform the SWT, the subjects were instructed to walk a distance of 10 meters around a marking between two cones, placed 0.5 m from each end point, to avoid sudden changes in direction. The walking speed at which the subject should walk was dictated by a sound played from a CD that was originally generated by a microcomputer. The beginning of the test was indicated by a triple beep. Then, single beeps were issued at regular interval, indicating that the volunteer should go through the predetermined distance, reach the cone and change direction to return to the other cone. Every minute, the walking speed was increased by 0.17 m/s, with an initial speed of 0.5 m/s. Each level change, with increasing speed, was indicated by the triple beep. When the volunteer reached the cone before the signal, he was instructed to remain in place and be stationary until the next signal indicated the continuation of the test. No encouragement was given during the test, and the operator only gave verbal feedback once per minute to indicate a slight increase in speed. The test was finished when the volunteer was not able to maintain the required speed (more than 0.5 m from the cone), at the request of the volunteer or for some other reported symptoms (dyspnea,

dizziness, vertigo, angina). The original protocol consisted of 12 levels (1020 m); however, as suggested by the literature, we used a protocol of 15 levels (1500 m) to evaluate healthy subjects, to prevent the ceiling effect (10,11). Because the protocol was extended, the volunteers were allowed to run when judged necessary. Before and after the test, HR, blood pressure and rating of perceived exertion (RPE) were assessed by the Borg scale, with a range of 6-20, on which the higher the number is, the greater the perception of effort is (18). Moreover, laps were recorded during the testing to calculate the distance and speed of the pace reached at the last full level.

Incremental test

The CEPT was performed on a treadmill, using an incremental protocol based on the progression of the SWT, which is called the Incremental Test. This protocol consisted of 1-minute stages, with speed increasing every minute without increasing the incline of the treadmill. The initial velocity was 0.5 m/s, and it increased by 0.17 m/s at each stage. Initially, the volunteer remained at rest, sitting for 10 minutes, during which HR, blood pressure and RPE were measured by the Borg scale. These measurements were repeated at the end of each stage and during recovery. After the initial rest, the volunteer was instructed regarding the test and then was positioned on the treadmill to perform the test. The criteria for stopping the test according to the American College of Sports Science (3) were as follows: increased systolic blood pressure (SBP) greater than 210 mm Hg; diastolic blood pressure greater than 120 mm Hg; sustained decrease in SBP; angina; dyspnea; cyanosis; nausea; dizziness; or request of the volunteer. Once the test was complete, the subject performed active recovery (5 min of walking at low speed) and passive (5 minutes sitting at rest).

Physiological responses

Expired gases were collected in two steps during the tests, using a gas analyzer via the portable telemetry system (K4b2, COSMED, Italy). Among other variables, uptake oxygen (VO_2), respiratory quotient (R) and HR breath-by-breath were monitored during the tests. The data were filtered and were defined as VO_{2peak} and R_{peak} , with the highest value obtained from the arithmetic mean of the log intervals of 30 s and HR_{max} as the highest HR value recorded during the test (19,20). HR_{max} was calculated by the equation $HR_{max} = 220 - \text{age}$ (21).

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the statistical packages SPSS 20.0 (SPSS Inc., USA) and GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., USA). Data are presented as mean value (SD). In the first step, the normality of data was checked by the Shapiro-

Wilk test and the differences among measured variables were determined by paired-t-test or Wilcoxon test. Pearson's coefficient of correlation was performing to study the correlation between variables and the agreement between tests was assessed by Bland-Altman analysis. The sample size was calculated based on the study by Singh et al. (7) and was identified the need of the 10 subjects. In the second step, the normality of data was checked by the Kolmogorov-Smirnov test and for compiling the reference equation, the linear multiple regression analysis was performed to identify the predictors (anthropometric, demographic and physical performance) of the dependent variable (VO_{2peak}). The collinearity was evaluated in regression models ($VIF \leq 1.0$). At the end of the regression analysis, the paired t-test to compare the means of the results obtained by the reference equation and the values of VO_{2peak} measured directly was conducted. The sample size was estimated based on the relationship between the number of variables to be included in the multiple regression analysis and the minimum number of observations required, indicating at least 52 subjects to develop a linear model containing up to 4 variables. The level of statistical significance was considered $p \leq 0.05$.

Results

First step

Twelve subjects, with a mean age 25.1 (5.8) years old, weight of 71.5 (5.6) kg, height of 1.77 (0.06) m, BMI of 22.9 (1.9) kg/m^2 and body fat percentage of 12.0 (5.5) %, participated the study. The Borg and cardiorespiratory responses obtained at the end of the SWT and Incremental Test are presented in Table 1. Similar results in VO_{2peak} , R_{peak} , and % HR_{max} were found. As noted, according to the % HR_{max} expected (97.6 [6.1] %) and R_{peak} (1.3 [0.24]), the SWT is considered a test of high intensity (maximum). The RPE at the end of the test, obtained by the Borg scale, was significantly higher in the Incremental Test ($p = 0.007$). Continuous and similar data for the RPE at the beginning of the test were found for both the SWT and the Incremental Test (RPE = 06). Strong and significant correlations in VO_{2peak} ($r = 0.704$, $p = 0.011$) and R_{peak} ($r = 0.737$, $p = 0.006$) were found between the tests (Figures 1A and B). The Bland-Altman analysis also showed agreement between the results for VO_{2peak} and R_{peak} on the SWT and the Incremental Test (Figures 2A and B). The temperature and RH of the air were not significantly different during the two days of the testing (Day 01 - Temperature= 23.9 [1.3] °C and RH= 57.9 [14.3] %; Day 02 - Temperature= 23.3 [1.2] °C and RH= 61.7 [16.3] %, $p = 0.108$).

Second step

The characteristics of the 53 subjects are shown in Table 2. Age, BMI, distance walked and gait speed were the demographic, anthropometric and physical performance variables selected for the preparation of reference equation. The univariate analysis showed that VO_{2peak} correlated significantly with distance walked ($r = 0.405$, $p = 0.001$), gait speed ($r = 0.446$, $p = 0.000$) and BMI ($r = -0.515$, $p = 0.000$). There was no significant correlation with age ($r = -0.175$, $p = 1.08$). A model of stepwise linear multiple regression showed that BMI and gait speed explained 40.6 % of the variance in VO_{2peak} (Table 3). There was no interaction of the VO_{2peak} with distance walked and age. The reference equation for the VO_{2peak} in the SWT was:

$$VO_{2peak} \text{ (predicted)} = 37.44 - (1.081 \times \text{BMI}) + (10,151 \times \text{gait speed})$$

The results obtained by the equation of VO_{2peak} with the values obtained by the gas analyzer, showed no significant difference between them (VO_{2peak} predicted = 36.66 [3.22] mL/kg/min; VO_{2peak} on the SWT = 36.72 [5.1] mL/kg/min, $p = 0.909$).

Discussion

This was the first study to compare the cardiorespiratory responses between the SWT with CEPT on a treadmill in healthy subjects. In the present study, measurements of VO_{2peak} , R_{peak} and percentage of HR_{max} expected were similar between the SWT and the Incremental Test. During the SWT, the subjects reached 97.6 (6.1) % HR_{max} and provided 1.3 (0.24) of the R_{peak} , which by itself classifies the SWT as a high-intensity test (maximum), because the values for HR_{max} of ≥ 90 % and $\geq 1:10 R_{peak}$ indicate a maximal test (19,20). Despite significantly lower RPE, as assessed by the Borg scale at the end of the SWT, maximum values for characteristic tests were also obtained ($RPE \geq 17$) (19). Strong and significant correlations between VO_{2peak} and R_{peak} and agreement of these variables using the Bland-Altman plots were obtained on both tests. Similar results have been observed in patients with cardiopulmonary diseases. In patients with COPD, strong and significant correlations were found between VO_{2peak} with the SWT and VO_{2peak} in both CEPTs performed on a cycle ergometer ($r = 0.92$) (5) and treadmill ($r = 0.88$) (7). Correlations of this magnitude were also observed between the distance walked on the SWT and VO_{2peak} of CEPT using a treadmill in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (22) and heart failure (6,23). These results support the proposal that the SWT is a field test of maximal effort, which provides objective measurement of CRF on cardiopulmonary patients.

Due to its recent application in healthy subjects, the determination of intensity of the SWT remains controversial in this population. Few studies have been undertaken using SWT as an assessment tool for CRF in healthy subjects, and the majority of the samples have been middle-aged (> 40 years old) and elderly. Dourado and Guerra (12) and Jurgensen et al. (11) applied the SWT in healthy subjects of both sex, with mean ages of 57 (9) years and 58 (11) years old, respectively, and they reported values of % HR_{max} at the end of the test of 88 (10) % and 78 (12)%, respectively, which might indicate the SWT to be a submaximal test. Different results in subjects of both sexes and in subjects with similar ages (mean ages of 56 and 50 years old), featuring the SWT as the maximum test, have also been observed, with values of % HR_{max} ranging from 94 % (13) to 99 % (17). Such differences could have been due to differences in the samples studied, which included active, sedentary, overweight and obesity subjects and patients with stable heart disease. The determination of the intensity of the SWT in this population was also evaluated by comparing the VO_{2peak} obtained with the SWT with estimated values of VO_{2peak} during CEPT on a cycle ergometer, in which the VO_{2peak} of the SWT reached 105 (24) % of the estimated value. However, as reported by the authors, a limitation of this study was the failure to implement the CEPT, as data on this test were estimated (13).

The application of the SWT in young adults has been reported in only two studies; however, aspects of these works should be highlighted. In the study by Probst et al. (17), although it applied criteria for inclusion of subjects 18-83 years old, the mean age of the subjects was 50 years old, representing a sample of middle-aged adults. Moreover, in this study, the subjects were characterized as apparently healthy; however, much of their sample had some comorbidity, such as hypertension (34 %), peripheral vascular disease (24 %), arthritis (22 %), and diabetes (13 %), among others, which might have influenced the test results. In this study, values of % HR_{max} estimated of 99% were reported. In the study by Seixas et al. (24), which aimed to assess oxygen desaturation in young adult subjects after the SWT (mean age of 35.05 [12.53] years old), the authors reported mean values of % HR_{max} expected of 88.29 (9.34) and 87.64 % (9.62) % in individuals with and without oxygen desaturation, respectively. However, this sample consisted of physically active subjects, recruited from a gym, who performed the SWT at 12 levels. Because the subjects were healthy, young and physically active adults, the use of 12 SWT levels might have generated insufficient overloading for this sample; thus, the results might have been underestimated. The use of the extended protocol for the SWT, consisting of 15 levels to assess functional capacity in healthy subjects, has been suggested in the literature (8,10,11). From the data on the walking distance in the present study, we confirmed the necessity of using the protocol with 15 levels, because for our sample, which consisted of healthy young and middle-aged sedentary adults, the average

distance walked was of 1069 (152) m, which exceeded the maximum distance of 1020 m with 12 SWT levels. To date, no studies have compared the cardiorespiratory responses of the SWT with CEPT in healthy subjects. Given the above, and based on the data of the present study, we suggest that the SWT provides for valid measurement and assessment of CRF in healthy subjects, and as in cardiopulmonary patients, the SWT in young and middle-aged could be considered a field test of maximal effort

The gold-standard measurement of VO_{2peak} by analyzing exhaled gases in maximal tests is not always feasible in research and clinical environments due to its high cost, laboratory and specialized personnel. Thus, the development and use of equations to predict VO_{2peak} allow for easy and indirect assessment of CRF. The reference equation developed in this study, which presented BMI and gait speed as independent variables, explained 40.6 % of the variance in VO_{2peak} . Gait speed as a major determinant of VO_{2peak} was also observed in recent studies that developed reference equations for the prediction of VO_{2peak} during the SWT in healthy, middle-aged and elderly subjects, presenting R^2 values of 0.73 and 0.88 for this variable (8,13). In young adults (18-50 years old), the variance in predicted VO_{2peak} in the Shuttle Run Test, a precursor test of the SWT, was also determined by gait speed ($r = 0.90$) (25). As with gait speed, BMI influenced the prediction of VO_{2peak} . The correlation between the two measurements was negative, which can be explained by an inverse linear relationship between body weight and functional capacity. The influence of body composition and anthropometric variables on VO_{2peak} and the distance walked on the SWT has been reported in the literature (8,11,17). Age and distance walked did not affect VO_{2peak} . As the speed of recorded gait was equivalent to that at the last complete level, this finding showed a strong correlation with the distance walked ($r = 0.946$, $p = 0.000$) and thus had a greater influence on VO_{2peak} in stepwise linear multiple regression analysis. The influence of age was observed in the regression models of VO_{2peak} and distance walked in middle-aged and elderly subjects (8,11,17). Similar to our findings, age did not influence VO_{2peak} in young adult subjects who underwent the Shuttle Run Test (25). Despite CRF being directly influenced by age, this influence appears to be present from the age of 40 years old, mainly due to reductions in lean body mass and increased body fat (26). As with age, sex had an influence on the prediction of VO_{2peak} in middle-aged and elderly subjects (8). Unlike age, however, the influence of sex on cardiorespiratory capacity seems to be present mainly in young people (26); however, because our sample consisted only of men, the influence of sex on VO_{2peak} could not be evaluated. Although the equation developed in this study could be explained by moderate variance (40.6 %), the VO_{2peak} values obtained by the equation with the values of VO_{2peak} obtained by the gas analyzer were similar ($p = 0.909$), demonstrating the feasibility of applying the same test in healthy young and middle-aged men.

Data from this study demonstrated that the SWT was capable of causing maximal cardiorespiratory responses, thereby providing parameters for assessing cardiorespiratory fitness and for prescribing and monitoring a physical training program. Thus, it is concluded that in young and middle-aged healthy men, the SWT produced results similar to those with the Incremental Treadmill test with regard to cardiorespiratory responses, and the reference equation demonstrated elaborate viability for the prediction of VO_{2peak} in this population.

Figures

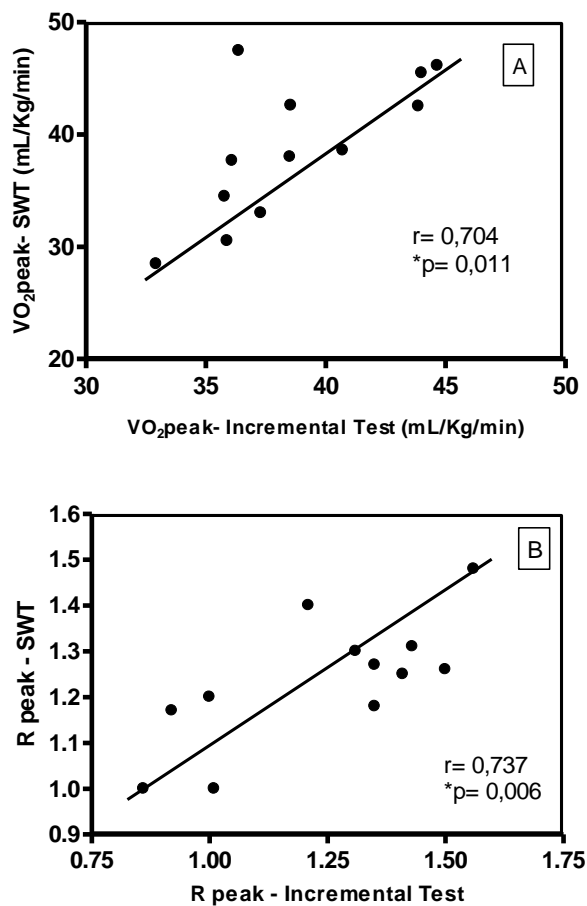


Figure1. (A) Correlation between of VO_{2peak} and (B) correlation of R_{peak} of the Shuttle Walking Test and Incremental Test. VO_2 = uptake oxygen; R = respiratory exchange ratio.

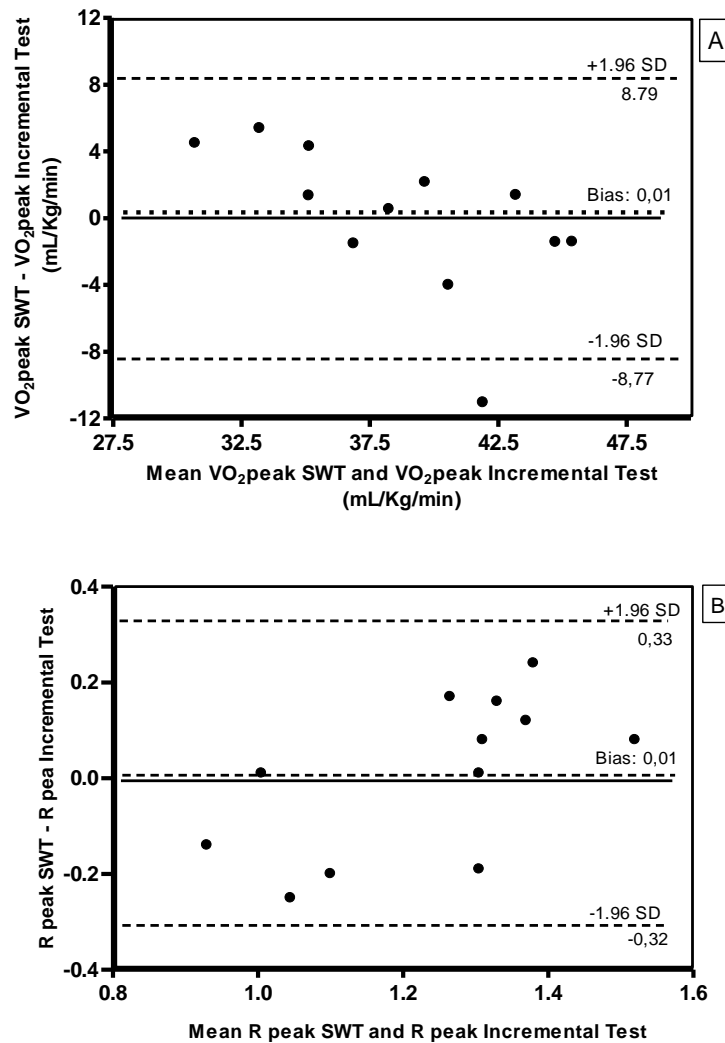


Figure 2. Bland-Altman plot of the difference between the VO_{2peak} of the Shuttle Walking Test and Incremental Test plotted against the mean VO_{2peak} of the Shuttle Walking Test and Incremental Test (A) and difference R_{peak} of Shuttle Walking Test and Incremental Test plotted against the mean R_{peak} of the Shuttle Walking Test and Incremental Test (B). VO₂ = uptake oxygen; R = respiratory exchange ratio.

Tables

Table 1. Comparison between the results of cardiorespiratory variables and Borg at the end of the test, obtained in SWT and Incremental Test.

	SWT	Incremental Test	p-value
VO _{2peak} (mL/kg/min)	38.7 (3.8)	38.7 (6.3)	0.993
R _{peak}	1.3 (0.24)	1.3 (0.14)	0.877
% FC _{max} (%)	97.6 (6.1)	98.3 (4.1)	0.700
RPE end (points)	17.7 (1.6)	19.7 (0.5)	0.007*

Data are presented as mean (SD). *p<0.05. SWT= Shuttle Walking Test; VO₂ = uptake oxygen; R = respiratory Exchange ratio; Hr = heart rate; RPE = rating of perceived exertion.

Table2. General characteristics of the subjects of the second step.

General characteristics	n= 53
Age (years)	32.42 (7.38)
Weight (kg)	69.3 (8.2)
Height (m)	1.75 (0.06)
BMI (kg/m ²)	22.66 (2.1)
Body fat percentage (%)	11.5 (5.6)
Distance walked (m)	1069 (152)
Gait Speed (m/s)	2.36 (0.2)
% HR max.	98.75 (6.1)

Data are presented as mean (SD). BMI = Body mass index; HR = heart rate.

Table 3. Multiple linear regression analysis with VO_{2peak} as the dependent variable.

	Unstandardized coefficients (B)	Standard error	p-value
VO_{2 peak}			
R ² = 0.406			
Constant	37.44	9.85	0.000
BMI (kg/m ²)	- 1.081	0.261	0.000
Gait Speed (m/s)	10.151	2.981	0.001

Reference equation for the VO_{2peak} in mL/kg/min = 37.44 – (1.081 x BMI) + (10.151 x Gait Speed). Standard error of the estimate = 3.91 mL/Kg/min

VO₂ = uptake oxygen; BMI = Body mass index.

References

1. ERS Task Force, Palange P, Ward SA, Carlsen KH, Casaburi R, Gallagher CG, et al. Recommendations on the use of exercise testing in clinical practice. *Eur Respir J* 2007; 29: 185-209.
2. Nici L, Donner C, Wouters E, Zuwallack R, Ambrosino N, Borbeau J, et al. American Thoracic Society/European respiratory Society statement on pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Care Med* 2006; 173: 1390-1413.
3. American College of Sports Medicine. *Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
4. Singh SJ, Morgan MD, Scott S, Walters D, Hardman AE. Development of a Shuttle Walking Test of disability in patients with chronic airways obstruction. *Thorax* 1992; 47: 1019-1024.
5. Onorati P, Antonucci R, Valli G, Berton E, De Marco F, Serra P, et al. Non-invasive evaluation of gas exchange during a shuttle walking test vs. a 6-min walking test to assess exercise tolerance in COPD patients. *Eur J Appl Physiol* 2003; 89: 331–336.
6. Morales FJ, Montemayor T, Martinez A. Shuttle versus six-minute walk test in the prediction of outcome in chronic heart failure. *J Sci Med Sport* 2001; 4: 292-300.
7. Singh SJ, Morgan MD, Hardman AE, Rowe C, Bardsley PA. Comparison of oxygen uptake during a conventional treadmill test and the Shuttle Walking Test in chronic airflow limitation. *Eur Respir J* 1994; 7: 2016-2020.
8. Dourado VZ, Guerra RL, Tanni SE, Antunes LC, Godoy I. Reference values for the incremental shuttle walk test in healthy subjects: from the walk distance to physiological responses. *J Bras Pneumol* 2013; 39: 190-197.
9. Harrison SL, Greening NJ, Houchen-Wolloff L, Bankart J, Morgan MD, et al. Age-specific normal values for the incremental shuttle walk test in a healthy British population. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 2013; 33: 309-313.

10. Dourado VZ, Vidotto MC, Guerra RLF. Reference equations for the performance of healthy adults on field walking tests. *J Bras Pneumol* 2011; 37: 607-614.
11. Jürgensen SP, Antunes LCO, Tanni SE, Banov MC, Lucheta PA, Bucceroni AF, et al. The Incremental Shuttle Walk Test in Older Brazilian Adults. *Respiration* 2011; 81: 223–228.
12. Dourado VZ, Guerra RLF. Reliability and validity of heart rate variability threshold assessment during an incremental shuttle-walk test in middle-aged and older adults. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46: 194-199.
13. Dourado VZ, Banov MC, Marino MC, de Souza VL, Antunes LC, McBurnie MA. A simple approach to assess VT during a field walk test. *Int J Sports Med* 2010; 31: 698-703.
14. Garrow JS, Webster J. Quetelet's index (W/H²): as a measure of fatness. *Int J Obesity* 1985; 9: 147-53.
15. Jackson AS, Pollock, ML. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutrition* 1978; 40: 497-504.
16. Siri WE. *Body composition from fluid space and density. Techniques for measuring body composition*. Washington: National Academy of Science; 1961.
17. Probst VS, Hernandez NA, Teixeira DC, Felcar JM, Mesquita RB, Gonçalves CG, et al. Reference values for the incremental shuttle walking test. *Respir Med* 2012; 106: 243-248.
18. Borg GA. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc* 1982; 14: 377-381.
19. Robergs RA, Dwyer D, Astorino T. Recommendations for improved data processing from expired gas analysis indirect calorimetry. *Sports Med* 2010; 40: 95-111.
20. Sawyer BJ, Blessinger JR, Irving BA, Weltman A, Patrie JT, Gaesser GA. Walking and running economy: inverse association with peak oxygen uptake. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42: 2122–2127.

21. Karvonen MJ, Kental E, Mustala O. The effects of on heart rate a longitudinal study. *Ann Med Exper Fenn* 1957; 35: 307-315.
22. Moloney ED, Clayton N, Mukherjee DK , Gallagher CG , Egan JJ . The shuttle walk exercise test in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2003; 97: 682-687.
23. Green DJ, Watts K, Rankin S, Wong P, O'Driscoll JG. A comparison of the shuttle and 6 min walking tests with measured peak oxygen consumption in patients with heart failure. *J Sci Med Sport* 2001; 4: 292-300.
24. Seixas DM, Seixas DMT, Pereira MC, Moreira MM, Paschoal IA. Oxygen desaturation in healthy subjects undergoing the incremental shuttle walk test. *J Bras Pneumol* 2013; 39: 440-446.
25. Léger LA, Lambert J. A maximal multistage 20-m shuttle run test to predict VO₂ max. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1982; 49: 1-12.
26. Loe H, Rognmo O, Saltin B, Wisløff U. Aerobic Capacity Reference Data in 3816 Healthy Men and Women 20–90 Years. *PLOS ONE* 2013; 8: 1-11.