



MESTRADO EM ENGENHARIA DE SEGURANÇA E HIGIENE OCUPACIONAIS

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre
Engenharia de Segurança e Higiene Ocupacionais
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL EM BAILARINOS: EFEITO GENOTÓXICO

Filipa Coelho Esteves

Orientador: Professor Doutor João Paulo Teixeira (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.)

Coorientador: Professor Doutor João Manuel Abreu dos Santos Baptista (Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto)

Arguente: Doutora Solange Costa (Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto)

Presidente do Júri: Professor Doutor João Manuel Abreu dos Santos Baptista (Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto)

2016



Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Rua Dr. Roberto Frias, s/n 4200-465 Porto PORTUGAL

VoIP/SIP: feup@fe.up.pt

ISN: 3599*654



Telephone: +351 22 508 14 00



Fax: +351 22 508 14 40



URL: <http://www.fe.up.pt>



Correio Electrónico: feup@fe.up.pt

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e aos meus irmãos, que estiveram sempre presentes, que me deram todo o apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos desta etapa.

Em especial, ao meu orientador e amigo Professor Doutor João Paulo Teixeira, pela oportunidade de ter desenvolvido este estudo no Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Agradeço todo o apoio, disponibilidade, orientação e carinho que me deu durante este período. Foi uma honra trabalhar com o Professor.

Ao meu coorientador, Professor Doutor João dos Santos Baptista, o meu sincero agradecimento pela sua disponibilidade, apoio e sorriso com que sempre me recebe.

A toda a equipa do Departamento de Saúde Ambiental o meu imensurável obrigado, por todo o apoio, paciência e dedicação que sempre me foi dada durante o desenvolvimento deste estudo.

Às minhas colegas de laboratório e amigas, Ana Paula, Ana Isabel, Mai Lan e Raquel, que sempre me apoiaram e ajudaram face a obstáculos que surgiram durante este período e com quem foi um privilégio trabalhar.

A todos os meus amigos, em especial à Cláudia Monteiro e Diogo Alexandrino que me acompanharam nos últimos anos, agradeço a grande amizade, força, coragem e carinho em todos os momentos. Ao Ricardo por toda a paciência, carinho e apoio.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente permitiram a realização deste estudo.

RESUMO

É consensual que a prática regular de exercício físico constitui um fator imprescindível na manutenção de um estilo de vida saudável pois além de reduzir o risco de diversas doenças, promove o bem-estar psicológico.

No entanto, a prática de exercício físico intensivo induz o incremento de espécies reativas de oxigénio (ROS) que por sua vez pode levar a alterações no metabolismo humano. De facto, existem diversos estudos que defendem que o exercício físico praticado acima de um determinado nível de duração e intensidade pode levar ao aumento de ROS e por sua vez aumentar os níveis de *stress* oxidativo.

Este estudo teve como objetivo analisar o impacto do exercício físico intensivo afeto à prática de bailado no dano do ADN, neste caso, em bailarinos profissionais da Companhia Nacional de Bailado (CNB) portuguesa.

A amostra do estudo consistiu num total de 28 participantes composta por 14 bailarinos e 14 indivíduos do grupo controlo, com idades compreendidas entre os 22 e 57 anos de idade. Informação individual considerada relevante foi avaliada através de questionários autoadministrados.

Para quantificar o dano no ADN em bailarinos, colheitas de sangue foram realizadas antes e após a época de bailado (Setembro a Julho). A técnica utilizada foi a versão alcalina do teste do cometa para avaliar o dano primário no ADN e a versão enzimática com a enzima de restrição formamidopirimidina ADN-glicolase (FPG) que deteta purinas oxidadas sendo possível assim quantificar o dano oxidativo no ADN.

Os resultados obtidos revelaram um aumento estatisticamente significativo ($p < 0.001$) do dano oxidativo em bailarinos após a época de bailado (1.06 ± 0.16 para 4.67 ± 0.68) comparativamente ao dano oxidativo presente antes da época. No entanto, os níveis de dano oxidativo no ADN antes da época não apresentam diferença estatisticamente significativa relativamente ao grupo controlo. Verificou-se ainda que no grupo de bailarinos o dano primário diminui com a idade através de uma correlação ($r = -0.553$) significativa ($p < 0.05$) e que os bailarinos fumadores têm um aumento significativo ($p < 0.05$) do dano oxidativo no ADN após a época.

Os bailarinos profissionais sofrem um aumento do dano oxidativo no ADN após época, facto que deve ser tido em atenção através da implementação de medidas de controlo como a biomonitorização periódica. No entanto, verifica-se uma diminuição do dano primário no ADN com o aumento da idade bem como a diminuição do dano oxidativo no ADN após dois meses de descanso o que pode pela adaptação do sistema antioxidante face à prática de exercício físico regular. Estudos devem ser feitos a fim de prescrever as recomendações ideais para a prática segura de exercício físico.

Palavras-chave: Dano no ADN; *Stress* Oxidativo; Exercício físico; Bailado; Saúde Ocupacional

ABSTRACT

It is consensual that regular physical activity is crucial to maintain a healthy lifestyle because it reduces the risk of numerous health disorders and it is determinant to achieve a psychological well-being.

Nevertheless, the practice of physical activity also seems to be related with the increase of Reactive Oxygen Species (ROS) that could induce alterations in the human metabolism. In fact, there is consistent evidence supporting that above a certain level of intensity and duration, exercise may induce an increase in the generation of ROS and consequently increase oxidative stress levels.

The aim of this study was to analyze the impact of intensive physical exercise related with dancing on DNA damage, in this case, in professional dancers from the Portuguese National Company of Dance.

The study population consisted on 14 professional dancers and 14 subjects from the control group, totaling 28 subjects, with ages between 22 and 57 years old. Relevant individual information was also assessed using self-administrated questionnaires.

To quantify the DNA damage among professional dancers, blood samples were taken before and after the season (from September to July). The technique used in the present study were the alkaline version, to investigate the primary DNA damage, and the enzymatic version, through the incubation of a restriction enzyme (formamidopyrimidine DNA-glycosylase) that is able to detect oxidized purines, serving as an indicator of oxidative DNA damage.

The obtained results showed a statistically significant increase ($p < 0.001$) of the oxidative DNA damage after the season (1.06 ± 0.16 to 4.67 ± 0.68) comparing with the oxidative DNA damage before the season. However, DNA damage levels among dancers, before the season did not show any statistically significant difference from the control group. It was also observed that in the dancers group, primary DNA damage decreased with age through a significant ($p < 0.05$) correlation ($r = -0.553$) and that the oxidative DNA damage was significantly ($p < 0.05$) higher among smokers after the season.

There is a sharp increase on oxidative DNA damage after the season among professional dancers, situation that needs to be considered through implementation of various measures like periodic biomonitoring. However, a decrease of primary DNA damage with age as well a decrease of oxidative DNA damage after a rest period was observed, which could be explained due the regular practice of physical exercise. Overall, deeper research should be conducted to prescript the ideal recommendations for safe practice of exercise.

Keywords: DNA damage; Oxidative Stress; Physical Activity; Dance; Occupational Health

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	3
2	ESTADO DA ARTE	5
2.1	Caraterização da atividade.....	5
2.2	Exercício físico e <i>stress</i> oxidativo	7
2.2.1	Exercício físico.....	7
2.2.2	<i>Stress</i> oxidativo	10
2.2.3	Sistema antioxidante	13
2.2.4	<i>Stress</i> oxidativo e exercício físico intensivo (revisão sistemática)	15
2.2.5	Genotoxicidade do <i>stress</i> oxidativo	22
2.3	Avaliação da exposição	23
2.4	Monitorização biológica.....	24
2.4.1	Biomarcadores de exposição.....	25
2.4.2	Biomarcadores de suscetibilidade	25
2.4.3	Biomarcadores de efeito.....	26
2.5	Teste do cometa.....	26
2.5.1	Tratamento enzimático	28
2.5.2	Procedimento de leitura.....	29
2.5.3	Sistema de 12 géis	29
2.5.4	Teste do cometa com sangue total.....	30
3	OBJETIVOS, MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Objetivos da Dissertação	31
3.2	Materiais e Métodos	31
3.2.1	Caraterização da população.....	31
3.2.2	Metodologia	32
3.2.3	Tratamento estatístico	33
4	RESULTADOS	37
5	DISCUSSÃO	41

6	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	45
6.1	Conclusões.....	45
6.2	Perspetivas Futuras.....	46
7	BIBLIOGRAFIA.....	47
8	ANEXOS.....	1
8.1	Questionário aplicado ao grupo controlo	1
8.2	Questionário aplicado aos bailarinos.....	3

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Regularidade com que os Europeus praticam desporto.....	8
Figura 2 - Frequência com que os Europeus praticam desporto? Resposta: Nunca	9
Figura 3 - Distribuição dos eletrões na orbital externa da molécula de oxigénio e redução da molécula a água, com o conjunto de reações intermédias não enzimáticas que justificam a formação de ROS na cadeia de transporte de eletrões	11
Figura 4 - Conceito de <i>stress</i> oxidativo baseado no desequilíbrio entre as ações pró-oxidante e antioxidantes teciduais	13
Figura 5 - Diagrama PRISMA da revisão sistemática efetuada sobre stress oxidativo.	17
Figura 6 - 8-ODdG	23
Figura 7 - Monitorização ambiental e monitorização biológica	24
Figura 8 - Representação das três categorias de biomarcadores	25
Figura 9 - Cometas obtidos a partir do teste do cometa	27
Figura 10 - Procedimento da versão alcalina e enzimática do teste do cometa	28
Figura 11 - Câmara com sistema de 12 géis.....	29

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies reativas de oxigénio, radicais e não radicais	12
Tabela 2 - Origem, localização e mecanismos de ação dos principais antioxidantes orgânicos...	14
Tabela 3 - Alterações no sistema antioxidante	15
Tabela 4 - Caraterização dos estudos da revisão sistemática.	18
Tabela 5 - Caraterização geral da população de estudo.	31
Tabela 6 - Dano primário/oxidativo por grupo de estudo.	37
Tabela 7 - Dano primário/oxidativo no ADN em bailarinos.....	38
Tabela 8 - Correlações entre os biomarcadores em bailarinos.....	39
Tabela 9 - Correlações entre as variáveis de estudo no grupo de bailarinos.....	40

ABREVIATURAS

ADN - Ácido desoxirribonucleico

CAE – Classificação das Atividades Económicas

CNB - Companhia Nacional de Bailado

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA- Deoxyribonucleic Acid

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FPG - Formamidopirimidina ADN-glicolase

HO[•] - Radical Hidróxilo

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

INE – Instituto Nacional de Estatística

KCL – Cloreto de potássio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

O₂ – Oxigénio

O₂^{•-} - Radical Superóxido

PRISMA - Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses

RNA – Ácido ribonucleico

RNS – Espécies reativas de azoto

ROS - Espécies reativas de oxigénio

RSS – Espécies reativas de enxofre

UE – União Europeia

8-OHdG – 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

PARTE 1

1 INTRODUÇÃO

A saúde ocupacional tem um papel fundamental no seio de qualquer empresa, uma vez que atua na prevenção dos riscos profissionais, na proteção e promoção da saúde dos trabalhadores e consequentemente diminui os encargos financeiros resultantes de acidentes e doenças relacionadas com o trabalho na sociedade (DGS, 2013).

Os riscos ocupacionais variam de acordo com a natureza da atividade, podendo ser biológicos, físicos, químicos, psicossociais e outros relacionados com o trabalho ou a atividade (ARS, 2010).

Ao encontro destes últimos destaca-se uma atividade enquadrada na CAE¹ 90010, que diz respeito a Atividades das Artes do Espetáculo, mais especificamente a Dança. Esta atividade é extremamente exigente tanto a nível físico como psicológico (Azevedo et al., 2007).

No que respeita a esta atividade, na literatura científica encontram-se fundamentalmente estudos que abordam a perspetiva ergonómica, nomeadamente o risco de lesões músculo-esqueléticas. Um estudo realizado em Portugal no ano de 2007 mostrou que, durante um ano, quase sete em cada dez bailarinos profissionais de companhias de dança teve uma lesão, tratando-se de uma prevalência² de 68% (Azevedo et al., 2007).

No entanto, apesar de este parecer ser o risco mais óbvio, não se pode descurar outros associados à prática de exercício físico intensivo.

Atualmente, o *stress* oxidativo é um termo bastante conhecido principalmente no mundo dos desportistas. Este é nada mais, nada menos do que a condição em que a produção de radicais livres excede a capacidade fisiológica do sistema antioxidante conseguir tornar estas espécies reativas inativas (Bloomer & Goldfarb, 2004). O dano celular resultante do *stress* oxidativo é representado por alterações em diversas macromoléculas e encontra-se associado a algumas doenças graves, como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e cancro (Valko et al., 2007).

Estudos indicam, que o dano celular ocorre em resultado de exercícios de alta intensidade e de moderada a longa duração (Silva et al., 2013; Sjödín et al., 1990) como é o exemplo da dança profissional.

A dança é uma atividade de carácter severo e os profissionais vivem diariamente tentando alcançar a perfeição (Berardi, 2005), daí ser compreensível o número restrito de profissionais afetos a esta atividade. De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE), em 2014 apenas existiam 48 diplomados em Dança. No entanto, em Portugal esta atividade continua a contribuir para a economia do país, sendo que as atividades das artes e espetáculo perfazem cerca de 29% das empresas inseridas nas atividades culturais e recreativas (INE, 2014).

¹ Classificação Atividade Económica de acordo com o Decreto-Lei n.º 381/2007, de 14 de Novembro.

² Proporção de indivíduos acometidos por um problema de saúde durante um determinado período de tempo (Wagner 1998).

Os lucros para esta atividade apenas advêm do número de bilhetes vendidos por espetáculo, o que indiretamente contribui para uma maior dedicação e esforço por parte dos profissionais que fazem desta a sua ocupação.

Estes vivem diariamente sob pressão em busca de mais e melhor e o facto de não valorizarem os sinais e sintomas anormais no seu corpo resulta num agravamento das suas lesões (Camargo & Ghirotto, 2003). Prova disto é um estudo realizado em bailarinos, em que estes inclusive ignoraram quase metade das lesões (44,5%) sem sequer interromperem por um dia a sua atividade profissional (Azevedo et al., 2007).

Mediante o exposto, se por um lado, a conduta entre bailarinos apela à urgência de estudos ocupacionais para o conhecimento dos riscos inerentes à atividade, também o facto de ser uma ocupação com elevada exigência a nível físico requer particular atenção, uma vez que apesar do *stress* oxidativo e o exercício físico serem alvo de muita pesquisa científica, na área do bailado esta ainda é uma área a explorar.

Assim, é de todo pertinente, um sistema de monitorização de doenças com suspeita de origem profissional, de forma a contribuir para a deteção precoce e consecutiva sensibilização e implementação de medidas preventivas.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Caraterização da atividade

A dança é uma profissão que ao longo da história tem vindo a ser reconhecida como uma atividade que favorece não só o aspetos socioafetivos e psicológicos como também os fatores estéticos, físicos e fisiológicos (Trevisan & Schwartz, 2012). Esta modalidade é um emprego de dedicação integral. Os bailarinos passam, cerca de 17 a 29 horas por semana em ensaios e 8 a 20 horas por semana em aulas técnicas, além das apresentações que têm ao longo do ano (Batson, 2007).

A típica rotina de trabalho de um bailarino consiste principalmente em: aulas, ensaios e as apresentações. O ballet por exemplo é um tipo de dança caraterizado por três fases, nomeadamente os exercícios de barra, o exercício no centro de intensidade moderada e os exercícios de centro de elevada intensidade (Schantz & Astrand, 1984). Os exercícios incluem saltos, giros, elevações, flexões, extensões entre outros no que refere ao uso dos membros superiores e inferiores de acordo com o que é exigido (Trevisan & Schwartz, 2012). No entanto, para que este tipo de dança atinja um nível técnico satisfatório, torna-se necessário um longo e árduo treino (Cigarro et al., 2006).

De facto, a dança vai ao encontro de exigentes componentes nomeadamente a adequada composição corporal, cardiorrespiratória e musculoesquelética assim como a força, flexibilidade e resistência muscular (Prati & Prati, 2006).

Os esforços exigidos por esta prática fazem com que os músculos trabalhem na sua capacidade máxima (Trevisan & Schwartz, 2012), em algumas sequências de treino inclusive as frequências cardíacas podem ser próximas das máximas (P. Burckhardt et al., 2011) solicitando o metabolismo aeróbio e anaeróbio (Russell, 2013).

O ballet clássico, apesar de ser uma arte graciosa, é considerado uma das atividades mais exigentes a nível do sistema musculoesquelético (Albisetti et al., 2010). Por isso, estes são considerados além de artistas, atletas (Gamboa et al., 2008) com rotinas artísticas extremamente complexas que requerem um elevado nível de habilidade assim como exigências físicas para as realizar (Solomon et al., 1999).

A dança possui exigências físicas equiparadas a outros desportos, o ballet clássico, por exemplo está considerado um desporto predominantemente intermitente, similar a desportos como o futebol ou ténis, nos quais existem períodos de exercício extremamente intensivo (Schantz & Astrand, 1984). Um bailado requer uma elevada dimensão artística com exigências a nível físico idênticas às de desportistas de elite (Amorim, 2014).

Os bailarinos estão sujeitos a uma elevada pressão devido às exigências da profissão e por isso estes têm carreiras relativamente curtas (Shah, 2008). Ostwald et al. (1994) sustentam que tal ocorre devido ao declínio de força e às lesões cumulativas ou até incapacitantes.

- **Prevalência e incidência de lesões**

As lesões são muito comuns em profissionais de dança, tendo em conta não só as exigências físicas mas também a pressão psicológica com que diariamente estes profissionais têm de lidar. Dados, sugerem que muitos, quando se lesionam se mantêm a trabalhar pois existe o risco de perderem o lugar, o que para eles se traduz numa perda de identidade profissional, pois a dança é um mundo em que perseverança, dor e lesões são parte da sua cultura laboral (Mainwaring et al., 2001).

Estudos referem que o treino intensivo é um fator de lesões crónicas e agudas em bailarinos (Strassel et al., 2011) sendo que o tipo de lesões mais comuns nesta atividade são as musculoesqueléticas (Hincapie et al., 2008).

Em Inglaterra, Bowling (1989) concluiu que, durante seis meses, quase metade (42%) de uma amostra de 142 bailarinos sofreram pelo menos uma lesão. Em Portugal, um estudo epidemiológico, constatou que, durante o período de um ano, sete em dez bailarinos profissionais de companhias de dança portuguesas se lesionou, tratando-se de uma prevalência de 68% (Azevedo et al., 2007).

No Reino Unido, as estatísticas de um inquérito nacional sobre saúde e lesões em bailarinos relatou que 85% destes profissionais apontam para pelo menos uma lesão no período de um ano (Laws et al., 2006) sendo 50% destas lesões musculares, 50% englobando as articulações, mais de 20% serem relacionadas com tendões, 15% relacionadas com a estrutura óssea e 5% categorizadas como “outras”.

Num outro estudo realizado na Austrália, Negus et al., (2005) ao investigarem o histórico de lesões numa amostra de 29 bailarinos de dança clássica (cinco do sexo masculino e 24 do sexo feminino) concluíram que todos reportaram ter tido pelo menos uma lesão na sua carreira nos dois últimos anos.

Como se pode verificar através da literatura, estes profissionais são acometidos por uma grande incidência³ e prevalência de lesões (Hincapie et al., 2008) sendo os membros inferiores os mais afetados (Bronner et al., 2003). Estudos referem que a maioria das lesões ocorre no início da temporada e sobretudo nos ensaios (Solomon et al., 1999) razão esta que pode ser explicada pela maior repetição em busca da perfeição técnica e pela fadiga (Scialom et al., 2006; Bronner et al., 2003).

Estas lesões têm consequências bastante negativas para a saúde dos bailarinos, pois prejudicam o seu desempenho, o que é uma preocupação omnipresente para estes profissionais. No entanto, apesar da elevada prevalência das lesões estar bem documentada, os estudos que analisam o impacto dos riscos nesta atividade a nível metabólico são escassos.

³ Risco de um ou mais indivíduos saudáveis desenvolverem uma doença num determinado momento (Wagner, 1998).

2.2 Exercício físico e *stress* oxidativo

2.2.1 Exercício físico

O exercício físico pode ser definido como qualquer atividade estruturada e planeada que leva ao aumento da frequência cardíaca e ao gasto de energia (Gomes, Silva, & de Oliveira, 2012).

Existem diferentes tipos de exercício que dependem da intensidade (anaeróbios e aeróbios), da contração muscular e da frequência (aguda ou crónica) (Gomes et al., 2012). A principal diferença fisiológica entre o exercício aeróbio e anaeróbio é a fonte de energia, sendo que, o metabolismo aeróbio primeiramente produz energia através das gorduras e do oxigénio, sem muita acumulação de ácido láctico no sangue, enquanto que o exercício anaeróbio é caracterizado por curtos períodos de elevados esforços em que a energia é fornecida pelo sistema anaeróbio, ou seja, sem recurso a oxigénio, resultando numa grande acumulação de ácido láctico no sangue (Gomes et al., 2012).

A prática regular de exercício, constitui um dos estilos de vida mais importantes no que diz respeito à melhoria do desempenho funcional, na diminuição da morbilidade e também das causas de morte prematura (Soares et al., 2015). Estudos confirmam que há evidências irrefutáveis do efeito da atividade física regular na prevenção não só da morte prematura, como também na prevenção primária e secundária de muitas doenças crónicas como doenças cardiovasculares (o que tem sido alvo de bastante pesquisa científica), diabetes do tipo II, cancro (em particular o cancro da mama e do cólon), hipertensão, obesidade, depressão e até mesmo da osteoporose, uma vez que a prática de exercício físico promove a manutenção da estrutura óssea (Warburton et al., 2006).

Além destes benefícios, a saúde cognitiva também é privilegiada no que respeita à prática de exercício físico regular (Hillman et al., 2008). Avanços recentes nas técnicas de neuroimagem mostram que o exercício físico afeta a estrutura e função do cérebro (Heinonen et al., 2014). Assim, o desporto está diretamente relacionado não só com a prevenção das doenças como também na manutenção cognitiva e neurológica, o que por acréscimo resulta numa diminuição de encargos económicos para a sociedade (Hillman et al., 2008). A prática de exercício físico reduz ainda os sintomas de depressão, *stress*, ansiedade e aumenta os níveis de autoconfiança e autoestima (Morgan et al., 2012).

A saúde, no que respeita à aptidão física, está relacionada com um conjunto de fatores, nomeadamente o estado de saúde, a aptidão cardiovascular, o perfil musculoesquelético, a composição corporal e o metabolismo (Warburton et al., 2006). Por esta razão, existem vários mecanismos biológicos que podem ser responsáveis pela redução das doenças crónicas e pela morte prematura associada com a rotina de exercício físico (Warburton et al., 2006). No entanto, frisa-se que, todas estas variáveis poderão ser influenciadas por outros fatores, como por exemplo os fatores ambientais e até mesmo genéticos (Blair et al., 2001).

Para colmatar a incidência de doenças relacionadas com o sedentarismo e incentivar a prática de exercício físico, existem diretrizes mundiais e europeias com base em evidências empíricas que definem comportamentos mínimos para manter a saúde para diferentes grupos etários (Hills et al., 2015). Neste sentido, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (2010),

para os adultos, com idades compreendidas entre os 18-64 anos, a atividade física inclui a que é realizada através de atividades de lazer, de transporte (caminhar ou andar de bicicleta), as atividades de foro ocupacional, tarefas domésticas, desportos, exercícios planeados no contexto diário ou de família e atividades comunitárias (WHO, 2010). Ainda mediante as mesmas orientações, os adultos (18-65 anos) devem praticar, no mínimo, 150 minutos de atividade física moderada durante a semana, ou se preferível, 75 minutos de atividade física intensiva para o mesmo período. A atividade física pode ainda ser combinada entre exercícios intensos e moderados (WHO, 2010).

Um relatório sobre o desporto e a atividade física na Europa, publicado em Março (Comissão Europeia, 2014) constatou que, 59% dos europeus, nunca ou raramente fazem exercício físico. Através das mesmas estatísticas observa-se que esse comportamento tem aumentado, pelo que as estatísticas de 2009 apontavam para uma porção de 39% de população que nunca praticou exercício ou algum desporto e as de 2013 para 42% (Figura 1).

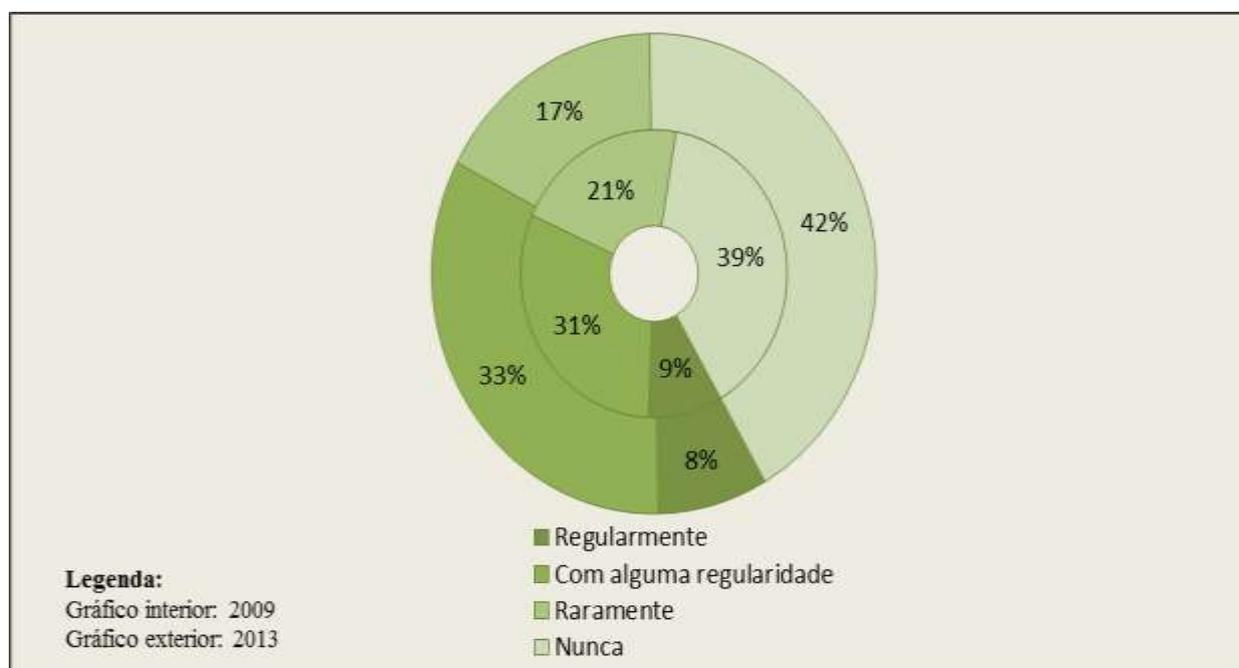


Figura 1 - Regularidade com que os Europeus praticam desporto (Comissão Europeia, 2014).

Os cidadãos do Norte da Europa são os que praticam mais exercício físico (Comissão Europeia, 2014). A proporção que pratica exercício físico ou algum tipo de desporto pelo menos uma vez por semana é de 70% na Suécia, 68% na Dinamarca, 66% na Finlândia, 58% nos Países Baixos e 54% no Luxemburgo (Comissão Europeia, 2014).

Pelo contrário, os cidadãos do Sul da Europa são os que menos atividade física praticam (Figura 2), pelo que a proporção que nunca pratica exercício ou algum tipo de desporto encontra-se em

Portugal (64%), Itália (60%), Malta (75%), Roménia (60%) e Bulgária (78%) (Comissão Europeia, 2014).

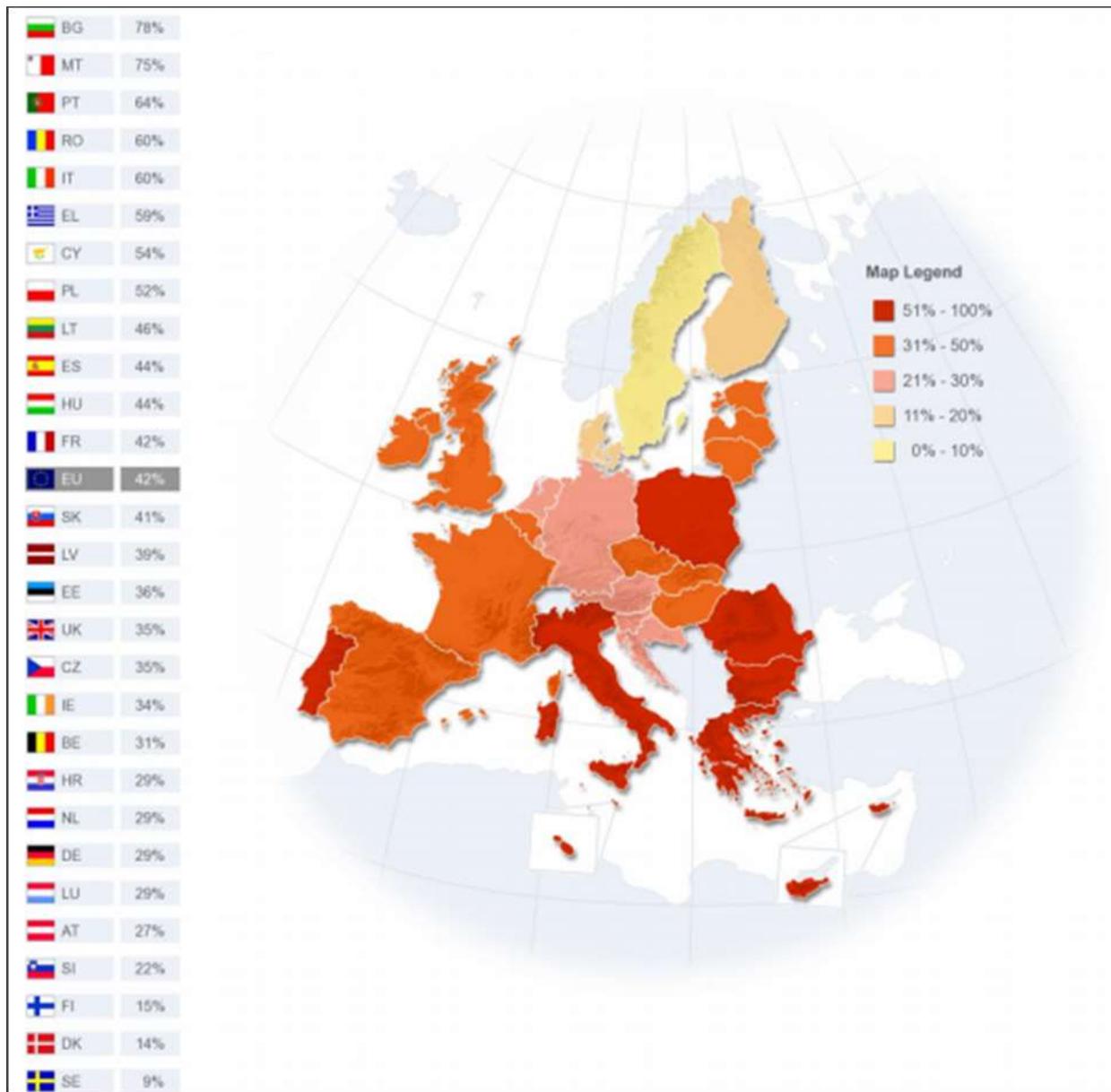


Figura 2 - Frequência com que os Europeus praticam desporto? Resposta: Nunca (Comissão Europeia, 2014).

No entanto, apesar de todos os benefícios associados à prática de exercício físico, este, quando praticado mediante condições desfavoráveis para a manutenção do estado de homeostasia, está associado a um estado de *stress* oxidativo, este que pode resultar em diversas alterações metabólicas (Heinonen et al., 2014).

Enquanto o treino físico regular acarreta benefícios para a saúde, o exercício agudo⁴ e extenuante tanto aeróbio como anaeróbio pode induzir a superprodução de espécies reativas de oxigénio (ROS) e conseqüentemente elevar os níveis de *stress* oxidativo (Pingitore et al., 2015). Este por sua vez tem impactos negativos na saúde, inclusive pode induzir danos em diversas macromoléculas e promover o desenvolvimento de doenças crónicas como diabetes, arteriosclerose e cancro (Wu et al., 2004).

- **Resposta física ao exercício físico**

Sempre que o corpo humano é desafiado a exercer atividades físicas, este responde através de vários, senão de todos os sistemas fisiológicos. Por exemplo, o movimento requer ativação e controlo por parte do sistema musculoesquelético enquanto que os sistemas cardiovascular e respiratório são os responsáveis por suportar esta exigência durante longos períodos de tempo (Heinonen et al., 2014).

O sistema respiratório responde de acordo com as necessidades fisiológicas e o tipo de exercício praticado, traduzindo-se basicamente através da ventilação pulmonar e respiratória. Durante o exercício intensivo ou prolongado, uma consequência do aumento da ventilação pulmonar é o aumento da produção de dióxido de carbono, iões de hidrogénio e da temperatura corporal (Heinonen et al., 2014).

A resposta do sistema cardiovascular é diretamente proporcional às exigências do músculo esquelético no que respeita às necessidades de oxigénio, sendo que o mesmo aumenta linearmente com as exigências do exercício (Heinonen et al., 2014).

A nível celular várias alterações podem ocorrer, nomeadamente a superprodução de ROS que por sua vez interferem com a integridade das proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (Valko et al., 2007).

2.2.2 Stress oxidativo

Em 1982, Davies e os seus colaboradores foram os primeiros a estabelecer uma relação de causa-efeito entre a produção de ROS e a prática de exercício físico, mais concretamente após uma experiência de laboratório em que submetteram um grupo de roedores a um treino intensivo (Davies et al., 1982). No sistema biológico os radicais livres podem ser derivados da molécula de oxigénio, azoto e enxofre. Essas moléculas são partes ou grupos de moléculas denominadas espécies reativas de oxigénio (ROS), espécies reativas de azoto (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS) (Rahman, 2007).

Como referido anteriormente, a superprodução destas espécies está associada a várias doenças entre as quais o cancro, a arteriosclerose, doenças cardiovasculares, neurológicas, doenças renais e hepáticas, hipertensão, a artrite reumatoide, doenças autoimunes, inflamação, diabetes, autismo,

⁴ Caraterizado pelo exercício que produz respostas metabólicas e fisiológicas com duração de alguns minutos até várias horas e pode ser realizado de forma aeróbia ou anaeróbia (Gomes et al., 2012).

doença de Alzheimer, Parkinson, lúpus, úlceras gástricas entre outras (Lerman et al., 1991; Lü et al., 2010; Rahman, 2007; Shahar et al., 2011).

Um radical livre é definido como a molécula ou o átomo que tem na sua estrutura elétrons desemparelhados e por isso se torna altamente instável e reativo com outras moléculas (Clarkson & Thompson, 2000; Horenstein et al., 2000).

Para adquirir a estabilidade química, o radical livre interage com outras moléculas na sua proximidade, através da captação ou da cedência de elétrons e/ou de átomos de hidrogénio (Fridovich, 1995; Shan et al., 1990; Yu, 1994). Além deste, existem outros compostos celulares que apesar de não possuírem qualquer elétron desemparelhado na sua estrutura química, são extremamente reativos e facilmente geram radicais livres (Ascensão et al., 2003). Desta forma, utiliza-se a denominação mais abrangente de espécies reativas, para englobar não só os radicais livres mas também os compostos não radicais seus precursores (Ascensão et al., 2003).

O exercício físico é um fator que favorece o incremento de ROS que resultam do consumo de oxigénio (O_2) (Ascensão et al., 2003). Isto porque, de acordo com a configuração eletrónica desta molécula, o O_2 pode ser considerado um bi-radical uma vez que possui na sua orbital externa dois elétrons desemparelhados com spins paralelos e por isso é considerada uma molécula potencialmente oxidativa pela sua tendência em captar elétrons (Morel & Barouki, 1999) (Figura 3).

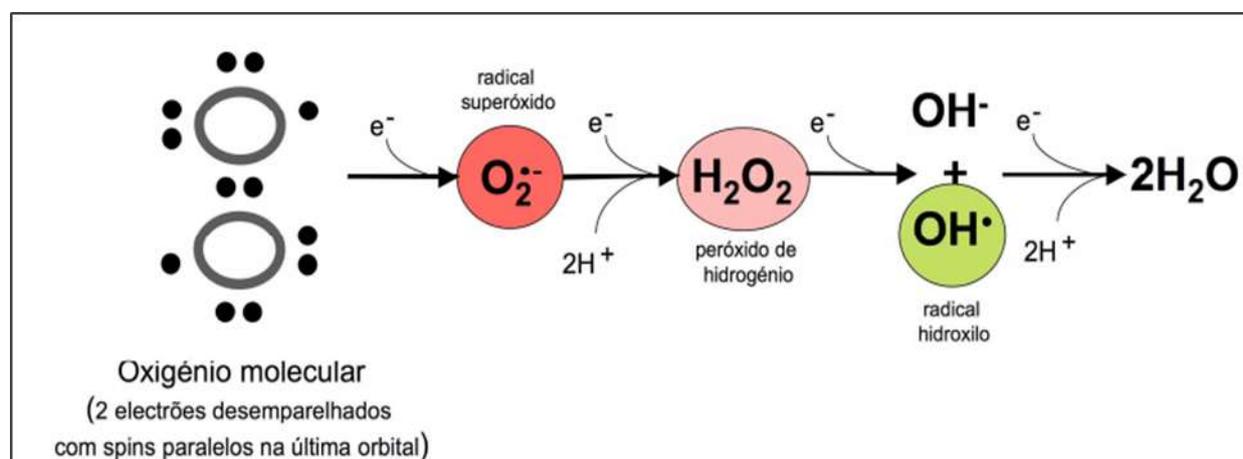


Figura 3 - Distribuição dos elétrons na orbital externa da molécula de oxigénio e redução da molécula a água, com o conjunto de reações intermédias não enzimáticas que justificam a formação de ROS na cadeia de transporte de elétrons (Ferreira et al., 2007).

Estas espécies formadas durante o metabolismo celular e durante outras atividades funcionais têm um importante papel na sinalização celular, apoptose, expressão génica e transporte iónico (Carocho & Ferreira, 2013), no entanto quando em elevadas concentrações, podem traduzir-se em alterações na estrutura de moléculas fundamentais para a manutenção da homeostasia celular (Evans, 2000; Lee et al., 2004; Mota et al., 2004). Estas moléculas incluem proteínas, lípidos e bases púricas e pirimídicas, considerando que são excessivamente pequenas e altamente reativas (Carocho & Ferreira, 2013).

De todos os radicais livres de oxigénio, aqueles que apresentam uma maior relevância biológica, não só devido à sua toxicidade como também por serem os mais prevalentes, são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidróxilo (HO^{\cdot}) (Halliwell, 1991; Pryor, 1986). Quanto aos restantes compostos não radicais, potenciais geradores de radicais livres, encontram-se por exemplo o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (FREI, 1999; Halliwell, 1991; Lee et al., 2004; Pryor, 1986).

O $O_2^{\cdot-}$ dificilmente consegue atravessar as membranas celulares (Evans, 2000) no entanto desencadeia uma série de reações químicas com os ácidos gordos dos fosfolípidos e dessa forma compromete o normal funcionamento da célula (Evans, 2000; Ji, 1999; Pryor, 1986).

Já o H_2O_2 pelo contrário, possui capacidade de atravessar facilmente as membranas celulares, mas no entanto esta é uma espécie menos reativa pois a sua estabilidade esta dependente de outros fatores como a presença de iões metálicos livres nas suas proximidades (Halliwell, 1991; Lee et al., 2004; Pryor, 1986).

O HO^{\cdot} tem uma elevada reatividade com as biomoléculas próximas, pelo que é uma das espécies reativas de oxigénio que mais alterações provocam nos sistemas biológico (Lee et al., 2004; Pryor, 1986; Shan et al., 1990). Na tabela 1 encontram-se as espécies reativas de oxigénio radicais e não radicais.

Tabela 1 - Espécies reativas de oxigénio, radicais e não radicais

Espécies Reativas de Oxigénio			
Radicais:		Não-Radicais:	
$O_2^{\cdot-}$	Superóxido	H_2O_2	Peróxido de hidrogénio
HO^{\cdot}	Hidroxilo	$HOCl^{\cdot}$	Ácido hipocloroso
RO_2^{\cdot}	Peroxilo	O_3	Ozono
RO^{\cdot}	Alcoxilo	1O_2	Singleto de oxigénio
HO_2^{\cdot}	Hidroperoxilo	$ONOO^{\cdot}$	Peroxinitrito

(Ferreira, Ferreira, & Duarte, 2007).

Estas espécies são produzidas em diferentes locais da célula, nomeadamente nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático, nos lisossomas, nas membranas celulares, nos peroxissomas e no citosol (Ames et al., 1993; Beckman & Ames, 1998; Lee et al., 2004; MOREL & BAROUKI, 1999).

De acordo com a literatura, a mitocôndria constitui a principal fonte de espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético, tanto em esforço agudo como em repouso (Ames et al., 1993; Beckman & Ames, 1998; Di Meo & Venditti, 2001; Tonkonogi & Sahlin, 2002).

Uma vez que a formação de espécies reativas de oxigênio é proporcional à quantidade de oxigênio consumido, com o aumento do exercício muscular e com o consequente aumento do consumo de oxigênio, a síntese de espécies reativas de oxigênio aumenta (Ji, 2002; Vollaard et al., Cooper, 2005).

Aquando a prática de exercício físico a produção de ROS ocorre fundamentalmente em resultado da contração muscular, no entanto existem outros mecanismos que também têm um determinado peso na produção de ROS como a cadeia transportadora de elétrons e a reperfusão isquêmica (Gomes et al., 2012).

O equilíbrio entre a produção e a neutralização das ROS por agentes antioxidantes, é muito delicado e se esse balanço tende a uma superprodução de ROS, as células consequentemente sofrem as consequências do *stress* oxidativo (Wiernsperger, 2003).

O *stress* oxidativo é portanto, nada mais, nada menos do que um desequilíbrio entre a ação dos agentes oxidantes e dos antioxidantes (Morel & Barouki, 1999; Pryor, 1986; Shan et al., 1990; Vollaard et al., 2005), o qual podemos ver esquematizado na figura 4.

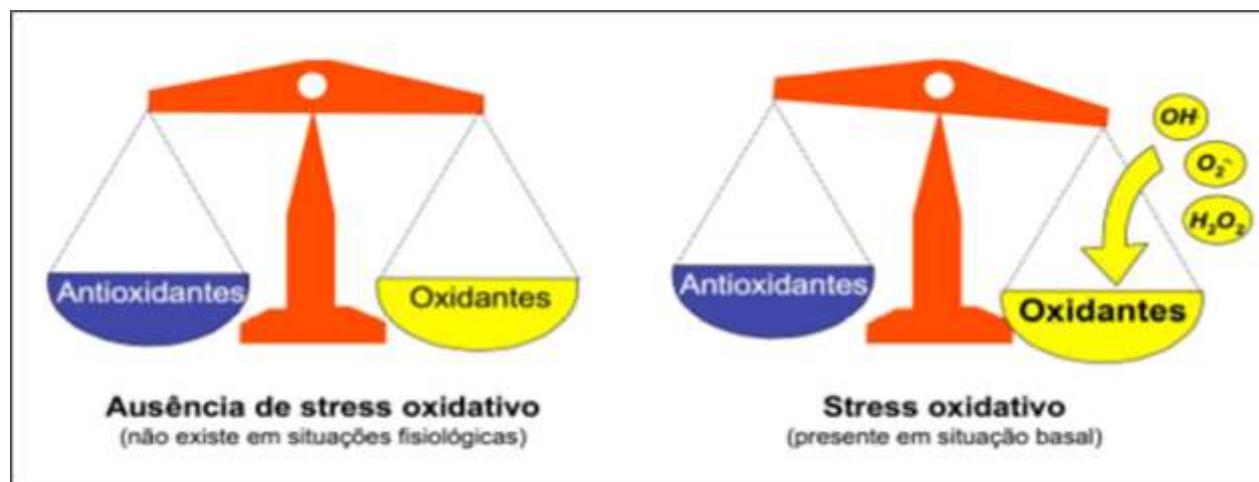


Figura 4 - Conceito de *stress* oxidativo baseado no desequilíbrio entre as ações pró-oxidante e antioxidantes teciduais (Ferreira et al., 2007).

Com o objetivo de prevenir ou reduzir o dano oxidativo causado pelas ROS, o organismo humano e outros seres vivos, desenvolveram um sistema de defesa antioxidante.

2.2.3 Sistema antioxidante

O elevado potencial de toxicidade do oxigênio exige aos organismos aeróbios a existência de um sistema de proteção munido de antioxidantes a fim de proteger as suas células e efeitos das ROS

(Ferreira et al., 2007). Isto porque, quando os níveis de *stress* oxidativo ultrapassam a capacidade do sistema de defesa, situação que geralmente acontece em atividades que requerem exercício físico intensivo (Kyparos et al., 2009) as estruturas celulares são afetadas, situação que promove o desenvolvimento de doenças (Wu et al., 2004).

Um antioxidante é qualquer substância capaz de reduzir o dano causado pelo radical livre ou capaz de tornar o próprio radical menos ativo (Knez et al.,). Estas substâncias são capazes de fornecer elétrons/átomos de hidrogênio às ROS sem se tornarem moléculas instáveis (Ferreira et al., 2007).

Como se pode verificar na tabela 2, o sistema antioxidante é constituído por sistemas enzimáticos e não enzimáticos (Goldfarb, 1999), estes que podem ser classificados em função do seu mecanismo de ação (antioxidantes de prevenção, de interceção e reparação), da sua localização (intracelulares ou extracelulares) e da sua proveniência (através da dieta, antioxidantes exógenos e da síntese endógena, antioxidantes endógenos) (Ferreira et al., 2007).

Tabela 2 - Origem, localização e mecanismos de ação dos principais antioxidantes orgânicos

<u>Antioxidantes Exógenos</u>	<u>Antioxidantes Endógenos</u>	
	<u>Extracelulares</u>	<u>Intracelulares</u>
Prevenção Zinco Selénio	Prevenção Albumina Bilirrubina Ceruloplasmina Ferritina Mioglobina	Prevenção Glutationa Peroxidase Superóxido Dismutase Catalase Glutationa Redutase
Interceção Ácido Ascórbico Alfa-tocoferol Carotenoides	Metalotioneína Metalotioneína Haptoglobina	Interceção Glutationa Ácido Úrico Coenzima Q
		Reparação Metaloenzimas

(Ferreira et al., 2007).

Os antioxidantes de prevenção têm a capacidade de criar condições favoráveis a fim de evitar a formação de ROS, os de interceção reagem com as ROS transformando-as em substâncias menos reativas ou não reativas o que evita o ataque às estruturas celulares. Os antioxidantes de reparação, por sua vez, favorecem a remoção dos danos moleculares causados pelas ROS e a reconstituição da estrutura e da homeostasia celular (Dröge, 2002; Gassen et al., 2003).

Assim, durante o exercício intensivo, à medida que os picos de produção de ROS vão sucedendo é de esperar que a taxa de síntese dos antioxidantes também aumente, garantindo às células uma maior capacidade de defesa a fim de manter a homeostasia no organismo (Giimiistas, 2003; Smolka et al., 2000).

A aparente contradição entre o *stress* oxidativo causado pelo exercício agudo e os benefícios na saúde associados à prática regular de exercício, podem ser explicados pelas adaptações

metabólicas induzidas pelo *stress* oxidativo quando este é praticado regularmente (Radak, Chung, & Goto, 2008).

De facto, o exercício físico regular não só desenvolve a resistência física como também promove adaptações no sistema de antioxidante, reforçando-o e consecutivamente reduzindo a produção de oxidantes (Radak et al., 2008; Radak et al., 2001) permitindo uma proteção adicional contra o *stress* oxidativo (Knez et al., 2006).

Além das adaptações e aumento das defesas do sistema antioxidante, existe uma resposta de adaptação às ROS após exercício físico na expressão génica e na regulação de proteínas (Alessio et al., 2000; Ji, 2002; S. Reichhold et al., 2009). Existem cada vez mais evidências de que os radicais livres mediam a regulação das enzimas de reparação de ADN (Alessio et al., 2000; Ji, 2002; S. Reichhold et al., 2009).

No entanto, os inúmeros benefícios do exercício físico regular contrastam com o exercício exaustivo em tecidos não adaptados, o que pode levar a perigosas consequências na saúde como doenças como a arteriosclerose, doenças cardíacas, cancro, entre outras (Valko et al., 2007). A tabela 3 apresenta as alterações no organismo perante um caso esporádico de exercício e exercício físico regular.

Tabela 3 - Alterações no sistema antioxidante

	Treino esporádico	Exercício físico regular
ROS	↑	↓
Dano oxidativo	↑	↓
Atividade de enzimas antioxidantes	↑	↑
Resistência ao <i>stress</i> oxidativo	↓	↑
Reparação de dano oxidativo	↑ ← →	↑
Função fisiológica	↓	↑

(Radak et al., 2008).

2.2.4 *Stress* oxidativo e exercício físico intensivo (revisão sistemática)

Vários estudos têm-se debruçado sobre a temática do exercício físico e do *stress* oxidativo, e de facto existem fortes evidências de que existe produção de ROS após uma sessão de exercícios aeróbios, anaeróbios e mistos (Finaud et al., 2006; Fisher-Wellman & Bloomer, 2009; Mastaloudis et al., 2004).

Para verificar a relação entre o *stress* oxidativo e a prática de exercício físico intensivo, realizou-se uma revisão sistemática detalhada do tema que teve por base a metodologia de revisão sistemática referenciada no modelo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) no decorrer do ano letivo de 2014-2015. A pesquisa dos artigos científicos foi efetuada com o auxílio da ferramenta de interface de pesquisa do sistema de metapesquisa da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP) em 34 revistas científicas (ACM Digital Library, ACS Journals, AHA Journals, AIP Journals, AMA Journals, Annual Reviews, ASME Digital Library, Biomed Central, Cambridge Journals Online, CE Database, Directory of Open Access Journals, Emerald Fulltext, Geological Society of America, Highwire Press, IEEE Xplore, Informaworld, Ingenta, IOP Journals, MetaPress, nature.com, Oxford Journals, Political Science: A SAGE Full-Text Collection, Royal Society of Chemistry, SAGE Journals Online, SciELO, Science Magazine, ScienceDirect, Scitation, SFX A-Z, SIAM, Sociology: A SAGE Full-Test Collection, SpringerLink, The Chronicle of Higher Education, Wiley Online Library) e 24 bases de dados (Academic Search Complete, AGRICOLA Articles, AGRICOLA Books, Beilstein via SCIRUS, Business Source Complete, CiteSeerX, Compendex, Criminal Justice Periodicals, Current Contents, Energy Citations, ERIC, Inspec, Library, Information Science & Technology Abstracts, MEDLINE, PsycArticles, PsycCRITIQUES, PubMed, Science & Technology Proceedings, ScienceDirect, SCOPUS, Social Sciences & Humanities Proceedings, SourceOECD, TRIS Online, Web of Science, Zentralblatt MATH) pré-definidas. Foi definido um conjunto de palavras-chave para proceder à primeira pesquisa, sendo que a cada par de pesquisa foi procurado por título e/ou assunto com o elo de ligação “AND”. As palavras-chave utilizadas na primeira pesquisa foram “physical activity” e “oxidative stress”.

Após a primeira pesquisa de artigos científicos, foram aplicados diferentes critérios de exclusão e inclusão através de filtros num formulário criado no *software* MSEXcel. A importância deste passo foi assegurar que os estudos fossem ao encontro do objetivo da revisão. Assim por razões de qualidade e relevância científica, excluíram-se os artigos anteriores ao ano de 2012, artigos com título não relevante, artigos redigidos em línguas que não o inglês, artigos sem revisão por pares e artigos sem autor e/ou data. Com o intuito de excluir possíveis fatores de confundimento ao estudo excluíram-se ainda artigos que envolvessem indivíduos não saudáveis, não atletas, estudos em animais e estudos com dietas à base de suplementos antioxidantes. Foram também excluídos todos os artigos repetidos.

Após a filtragem de artigos em função dos critérios de exclusão, foram aplicados diferentes critérios de inclusão, nomeadamente, artigos com consentimento informado, comissão ética, inquéritos validados (caso aplicável), questionários assistidos (caso aplicável) e atividade física regular. Foram ainda incluídos todos os artigos relevantes que constassem nas referências bibliográficas. Após a aplicação dos critérios de inclusão, foi novamente realizada uma nova pesquisa através de novas palavras-chave pertinentes que constassem nos artigos filtrados, tendo sido estas “sports” e “athletes”. De referir que ambas foram combinadas com a palavra-chave definida na primeira pesquisa mais especificamente “oxidative stress”. Por fim, os artigos resultantes da segunda pesquisa sofreram os passos supramencionados.

Como pode ser observado na figura 5, foram identificados 332 artigos, dos quais 102 foram excluídos por serem repetidos e 213 foram excluídos após aplicados os restantes critérios de exclusão. Assim, dos 17 artigos restantes e após a aplicação dos critérios de inclusão, obteve-se uma amostra de 11 estudos (n=11). De referir que o recurso de pesquisa que apresentou mais resultados mostrou ser a base de dados Pubmed.

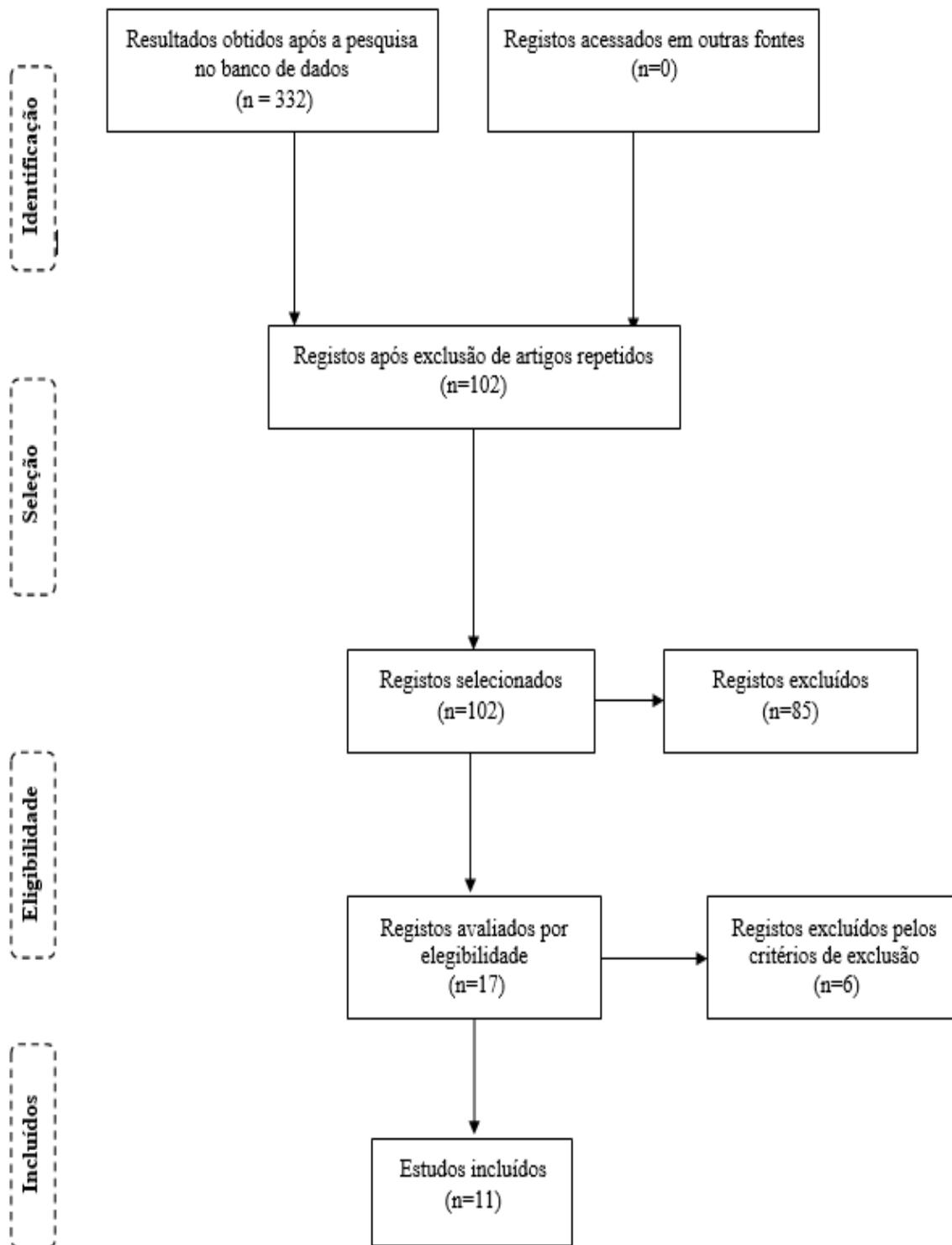


Figura 5 - Diagrama PRISMA da revisão sistemática efetuada sobre *stress* oxidativo.

As características dos estudos incluídos na revisão sistemática e os principais resultados no que respeita à resposta oxidativa são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização dos estudos da revisão sistemática.

Referência	Amostra	Média de idades	Exposição ao exercício físico	Meio biológico	Parâmetros analisados	Técnica	Breves resultados
(Ascensão et al., 2008)	16 Atletas de futebol	21.3	Uma partida de futebol	Sangue	Malondialdeído	HPLC	+ (primeiros 30 minutos)
					Capacidade Antioxidante Total (CAT)	Espectrofotometria	+ (primeiras 72 horas)
(Kyparos et al., 2009)	19 Atletas de remo	22	Simulação de corrida de remo de 2000 metros	Sangue	Glutationa oxidada	Espectrofotometria	+
					Proteínas carboniladas	Espectrofotometria	+
					Catalase	Espectrofotometria	+
					CAT	Espectrofotometria	+
(Chatzinikolaou et al., 2014)	20 Atletas de basquetebol	23.2	Partida de basquetebol	Sangue	Malondialdeído	HPLC	+ (primeiras 24h)
					Proteínas carboniladas	Espectrofotometria	+ (primeiras 24 horas)
					CAT	Espectrofotometria	+ (primeiras 24 horas)
					Glutationa Oxidada	Espectrofotometria	+ (primeiras 24 horas)
					Catalase	Espectrofotometria	+ (primeiras 24 horas)
					Glutationa Peroxidase	Espectrofotometria	+ (primeiras 24 horas)

Referência	Amostra	Média de idades	Exposição ao exercício físico	Meio biológico	Parâmetros analisados	Técnica	Breves resultados
(Marin et al., 2013)	10 Atletas de andebol	25	Época de andebol	Sangue	Atividade de enzimas oxidativas	Espectrofotometria	+
(Rowlands et al., 2012)	16 Atletas do sexo masculino e quatro do feminino	37	Corrida de vários dias	Sangue e urina	Isoprostano	ELISA	+
					CAT	Espectrofotometria	+
(Orhan et al., 2004)	18 Atletas	24.6	Uma hora de exercício	Urina	Peroxidação lipídica	HPLC	+
					Oxidação proteica	Espectrofotometria	+
					Danos no ADN	ELISA	+
(Silva et al., 2013)	14 Atletas de futebol	25.7	Época de futebol	Sangue	Superóxido dismutase	Espectrofotometria	+(durante a época)
					Malondialdeído	HPLC	+(durante a época)
					Glutationa redutase	Espectrofotometria	+(fim da
					Proteína no Plasma	Espectrofotometria	+

Referência	Amostra	Média de idades	Exposição ao exercício físico	Meio biológico	Parâmetros analisados	Técnica	Breves resultados
(Marin et al., 2011)	14 Atletas de andebol	---	Uma partida de andebol	Sangue	CAT Glutationa Proteínas Carboniladas	 Espectrofotometria	+ + +
(Hadzovic-Dzuvo et al., 2014)	12 Atletas de luta livre, 13 de futebol e 14 de basquetebol	22.1	Luta livre, futebol e basquetebol	Sangue	Malondialdeído Produtos de oxidação proteica CAT	HPLC Espectrofotometria Espectrofotometria	+ (nos jogadores basquetebol) + +
(Shadab et al., 2014)	60 Atletas de futebol, hóquei e corrida	22.5	Um treino da modalidade	Sangue	Malondiadeído	HPLC	+
(Palazzetti et al., 2003)	Nove Triatletas	31.9	Um treino de triatlo	Sangue	Glutationa Superóxido dismutase Glutationa oxidada CAT	Espectrofotometria Espectrofotometria Espectrofotometria Espectrofotometria	+ ~ + -

Legenda: + aumenta; ~ mantêm; - diminui; CAT (Capacidade Antioxidante Total)

Os estudos que integram esta revisão sistemática suportam não só uma resposta oxidativa positiva face à prática de exercício físico intensivo, como também uma resposta adaptativa por parte do sistema antioxidante.

No que respeita à resposta oxidativa positiva, Orhan et al., (2004), realizaram um estudo a fim de avaliar os biomarcadores de *stress* oxidativo em 18 atletas após uma hora de bicicleta. No dia seguinte ao exercício, observaram um aumento da concentração dos produtos de carbonilação proteica ($p < 0.025$), de peroxidação lipídica ($p < 0.025$) e de oxidação do ADN ($p < 0.05$). Também Palazzetti et al., (2003), Shadab et al., (2014) e Hadzovic et al., (2014) obtiveram os mesmos resultados no que refere ao aumento significativo ($p < 0.05$, $p < 0.05$ e $p < 0.003$ respetivamente) dos produtos de peroxidação lipídica após submeterem um grupo de atletas a um período de exercício físico intensivo.

Ao contrário do que acontece nos estudos referidos, outros verificam além de uma resposta oxidativa, um aumento da capacidade antioxidante total como é o caso de um estudo realizado no Canadá por Rowlands et al., (2012). Estes apesar de terem verificado um aumento dos produtos de peroxidação lipídica, nomeadamente do isoprostano (84.9 para 112.6 $\mu\text{mol}/\text{creatina}$), após um período de corrida de 894 km faseado em várias etapas e com a duração de 95 horas verificaram um aumento da capacidade antioxidante total. Estes resultados vêm ao encontro de um estudo realizado por Marin et al., (2013) que ao verificar o comportamento dos biomarcadores de *stress* oxidativo em 10 atletas de andebol durante uma época de seis meses, observaram que apesar de haver um aumento significativo ($p < 0.05$) destes aquando períodos de treino intensivo, estes acabam por diminuir e a atividade das enzimas antioxidantes por aumentar ($p < 0.05$) o que sugere uma adaptação do sistema antioxidante.

De facto, são vários os estudos que apesar de verificarem uma resposta oxidativa positiva após o período de atividade física, referem também uma adaptação a essas alterações metabólicas. Silva et al., (2013) analisaram diferentes biomarcadores num grupo de jogadores de futebol. A análise foi realizada em quatro diferentes momentos da época, nomeadamente, na pré-época, a meio da época, no fim da época e no período de recuperação. Os biomarcadores de *stress* oxidativo mostraram ser superiores ($p < 0.05$) a meio e no fim da época. No entanto, no período de recuperação os valores dos produtos de oxidação diminuíram significativamente ($p < 0.05$) assim como houve um aumento significativo ($p < 0.05$) de antioxidantes como a glutathione redutase.

Marin et al., (2011) verificaram o comportamento dos biomarcadores de *stress* oxidativo e a resposta do sistema antioxidante em 14 atletas de andebol após uma partida. Os biomarcadores de *stress* oxidativo aumentaram imediatamente após e 24 horas depois da partida, nomeadamente os subprodutos de oxidação lipídica ($p < 0.05$) e proteica ($p < 0.05$). No entanto também se verificou um aumento da capacidade antioxidante total e das enzimas antioxidantes sendo que os valores dos biomarcadores de *stress* oxidativo normalizaram logo após as 24 horas posteriores à partida. Ascensão et al., (2008) também verificaram que apesar de um aumento ($p < 0.05$) dos biomarcadores de *stress* oxidativo logo após uma partida de futebol, estes diminuem logo após 48 horas assim como também há um aumento ($p < 0.05$) da capacidade antioxidante total.

Outros estudos como o de Kyparos et al., (2009) e o de Chatzinikolaou et al., (2014) também verificaram que após um treino físico intensivo, existe um aumento dos produtos de oxidação ($p < 0.05$), no entanto também verificaram um aumento ($p < 0.05$) da capacidade antioxidante total.

Existe uma relação clara entre a prática de exercício físico intensivo e os biomarcadores de *stress* oxidativo que pode ser observada através dos resultados desta revisão, pois existem alterações metabólicas induzidas pelo *stress* oxidativo em todos os estudos. Apesar de se verificarem alterações tanto a nível lipídico, proteico e no ADN, verifica-se em contrapartida um aumento da atividade do sistema antioxidante. Além deste fenómeno, verifica-se que em parte dos estudos os biomarcadores de *stress* oxidativo são mais altos num período próximo ao término da atividade física independentemente do tipo de exercício que é desempenhado, pelo que posteriormente os valores tendem a voltar ao normal.

Esta evidência aponta para uma adaptação do organismo perante o *stress* oxidativo que pode estar relacionada com o aumento das defesas do sistema antioxidante (uma vez que os indivíduos são atletas e por isso fazem atividade física de forma regular) e com o aumento da capacidade de reparação de dano.

2.2.5 Genotoxicidade do *stress* oxidativo

A genotoxicidade é um termo abrangente que se refere à capacidade de um agente danificar o ADN e/ou os componentes celulares que regulam a integridade do genoma, incluindo os efeitos adversos que este pode ter sobre o material genético (Eastmond et al., 2009).

O dano genético pode ser causado por inúmeros fatores, estes que podem ser exógenos (fatores relacionados com estilos de vida como por exemplo o tabagismo) e fatores endógenos (Holland et al., 2008). O dano quando não devidamente reparado pode dar origem a alterações genéticas que podem mesmo desencadear neoplasias (Rueff et al., 2002).

Alguns fatores ocupacionais e ambientais podem danificar o ADN de diversas maneiras, levando a uma série de lesões no ADN tais como danos de oxidação, de alquilação, danos em bases de ADN (purinas e pirimidinas) entre outras (Ersson, 2011).

Os danos oxidativos no ADN são um dos tipos mais comuns no que respeita a lesões genéticas em seres humanos (Azqueta et al., 2009) sendo que a principal causa é a presença de ROS (Djordjević, 2004). Vários estudos identificaram mais de uma centena de modificações no ADN relacionados com ROS como modificações em purinas, pirimidinas, quebras de ADN de cadeia simples e dupla (Kryston et al., 2011). Algumas das reações causadas por ROS que contribuem para o dano no ADN são a metilação, a depurinação e depirimidinação e oxidação (Kryston et al., 2011).

Os locais onde ocorrem mais danos oxidativos são sobretudo no ADN nuclear e mitocondrial de tecidos e linfócitos (Cooke et al., 2002) e ocorrem principalmente na base azotada, guanina. Neste caso, uma vez acontecendo a oxidação, um grupo hidroxilo é adicionado à 8ª posição da estrutura molecular da guanina. O 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) é um dos principais produtos de

oxidação no ADN induzidos pelos radicais livres (Kushwaha et al., 2011; Wallace, 2002). O ADN oxidado sob a forma de 8-OHdG (Figura 6) pode ser quantificado em tecidos ou linfócitos para indicar a extensão do dano no ADN (Wu et al., 2004).

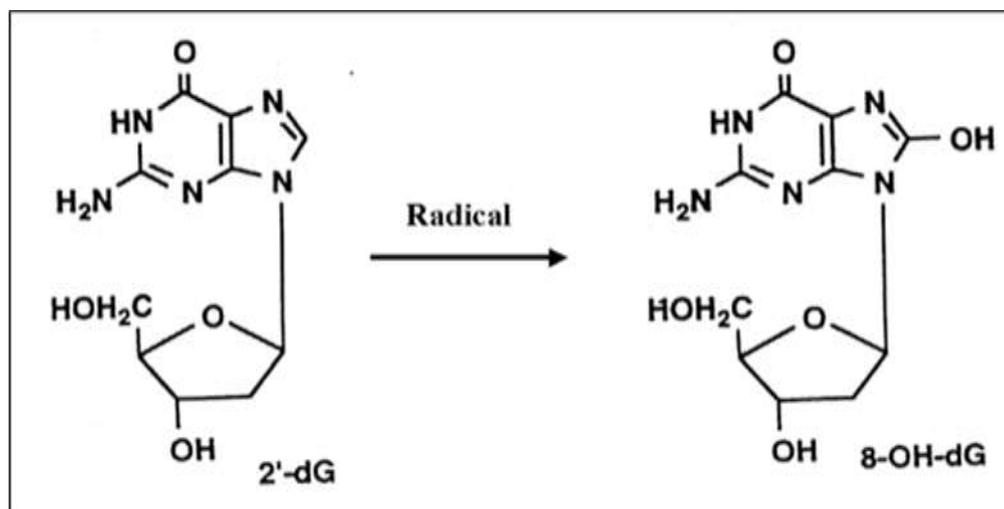


Figura 6 - 8-ODdG
(Hattori et al., 1997).

2.3 Avaliação da exposição

A avaliação da exposição ocupacional consiste numa rotina de monitorização de parâmetros ambientais e/ou biológicos que visam detetar possíveis riscos para a saúde, antes que a saúde e bem-estar do indivíduo exposto fiquem comprometidos (Amorim, 2003).

Alguns autores entendem por monitorização “a observação, medição e avaliação contínua e repetida da saúde ou de fatores de risco profissionais, com objetivos pré-definidos em programas específicos, usando métodos comparáveis de deteção e quantificação de dados” (Prista & Uva, 2006).

A monitorização humana é uma abordagem frequentemente utilizada na deteção precoce de potenciais perigos resultantes de uma exposição excessiva a substâncias tóxicas ou na previsão de potenciais riscos para a saúde (Teixeira et al., 2004). A exposição essa, pode ser avaliada pela medição da concentração do agente químico através de amostras ambientais (monitorização ambiental) ou através da medição de parâmetros biológicos (monitorização biológica) denominados biomarcadores ou indicadores biológicos (Prista & Uva, 2006). As informações provenientes destes dois tipos de monitorização complementam-se e favorecem a definição e implementação de medidas de prevenção e controlo apropriadas (Prista & Uva, 2006). Na figura 7 encontram-se esquematizados os dois tipos de monitorização.

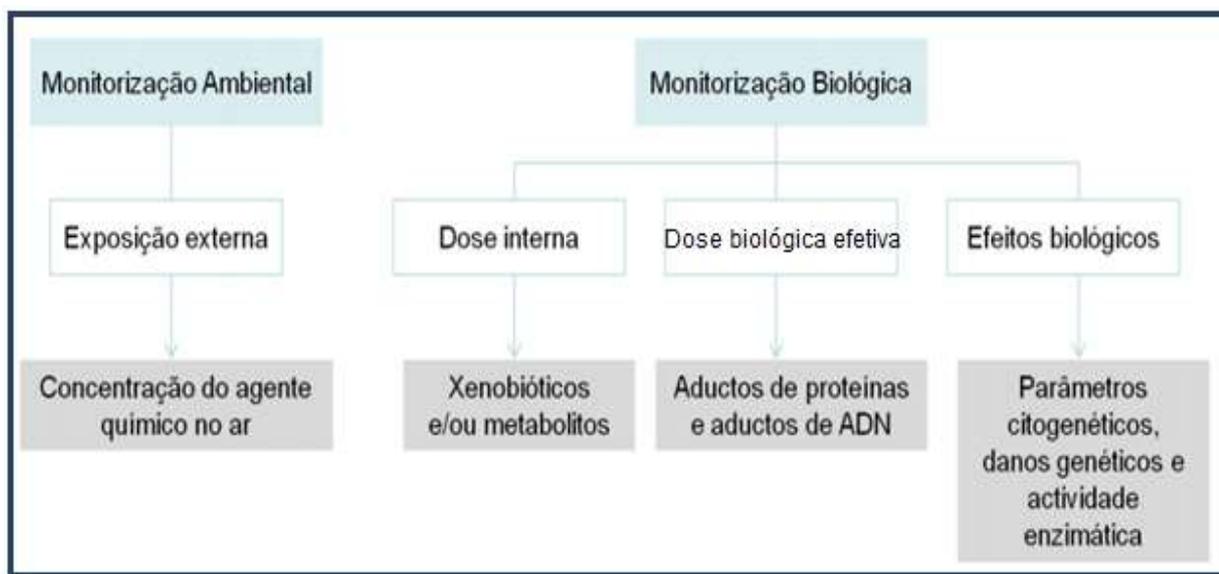


Figura 7 - Monitorização ambiental e monitorização biológica (Timbrell, 1998).

2.4 Monitorização biológica

A monitorização biológica visa avaliar o risco ocupacional resultante da exposição a um fator de risco, não pela sua presença no meio ambiente mas pela quantidade que efetivamente penetrou o organismo (Prista & Uva, 2006). Uma das vantagens da monitorização biológica em relação à monitorização ambiental é que a biológica permite avaliar a exposição global ao agente tóxico no organismo, pois é capaz de prever variações individuais no que respeita à absorção, metabolismo, excreção e distribuição do composto tóxico (IEH, 1996).

A monitorização biológica, realizada sobre o indivíduo exposto, consiste na quantificação e avaliação, sistemática ou repetitiva, de substâncias ou dos seus metabolitos medidos em meios biológicos como tecidos, secreções, excreções, sangue e urina, a fim de avaliar a exposição e o risco para a saúde de acordo com referências apropriadas (Amorim, 2003; Hoet & Haufroid, 1997). Esta quantificação e avaliação são realizadas através de indicadores biológicos ou biomarcadores que permitem conhecer a exposição do indivíduo ao agente tóxico (Timbrell, 1998). Estes são nada mais nada menos que “toda a substância, estrutura ou processo que pode ser quantificado no organismo ou nos seus meios biológicos, que influencia ou prediz a incidência de um acontecimento ou de uma doença” (Prista & Uva, 2006).

Por si só, não são indicadores de uma situação de doença mas sim indicam a exposição do organismo, constituindo uma ferramenta fundamental em programas de vigilância de saúde (Amorim, 2003).

Os biomarcadores são convencionalmente classificados em três tipos, nomeadamente em biomarcadores de exposição, efeito e suscetibilidade. Na figura 8 encontram-se representados os três tipos de biomarcadores e o percurso entre a exposição e manifestação clínica no organismo.

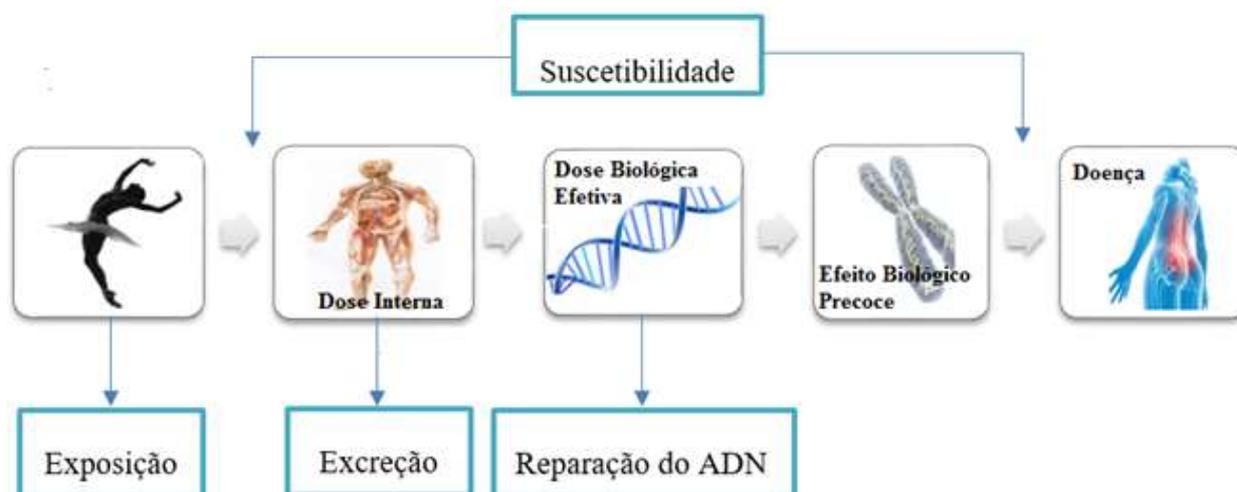


Figura 8 - Representação das três categorias de biomarcadores (Costa et al., 2008).

2.4.1 Biomarcadores de exposição

Os biomarcadores de exposição são qualquer substância exógena, os seus metabolitos ou produtos da sua associação com moléculas alvo, como proteínas ou ADN, que é passível de ser quantificada no organismo (Ahlborg & Hanberg, 1994). Estes podem ser subdivididos em bioindicadores de dose interna ou de dose biológica efetiva. Um biomarcador de dose interna quantifica um composto ou os seus metabolitos em tecidos ou fluidos biológicos (urina, sangue entre outros) (Coggon & Friesen, 1997) sendo que estes são especialmente úteis quando fornecem informações sobre a exposição cancerígena a longo prazo (Coggon & Friesen, 1997).

Uma desvantagem deste tipo de indicador biológico é que este não revela até que ponto o agente metabolizado afetou os tecidos ou as células alvo (Amorim, 2003).

Os biomarcadores de dose biológica efetiva fornecem informação sobre a extensão da exposição ao xenobiótico no local alvo. Tal é obtido através da quantificação das espécies químicas reativas que interagem com esses locais, tecidos, células, organelos ou macromoléculas (ex. ADN e proteínas) (Costa et al., 2008).

2.4.2 Biomarcadores de suscetibilidade

A suscetibilidade refere-se à forma de como as variações genéticas influenciam, aumentando ou diminuindo, a suscetibilidade individual face a fatores nocivos, como compostos químicos, radiação e determinados estilos de vida (Amorim, 2003).

Os biomarcadores de suscetibilidade incluem polimorfismos em genes que codificam as enzimas do metabolismo dos xenobióticos, em genes que codificam as enzimas de reparação do ADN e em genes que codificam proteínas que regulam o crescimento celular (Teixeira et al., 2004).

A suscetibilidade genética é um fator preponderante, no entanto existem outros fatores com igual importância, como por exemplo o consumo de medicação e a exposição a agentes ambientais (IEH, 1996). Patologias como a diabetes, hipertensão e cancro, são exemplos de doenças multifatoriais que podem ser resultado da interação de fatores ambientais e genéticos (Rueff et al., 2002).

2.4.3 Biomarcadores de efeito

Um biomarcador de efeito é capaz de refletir alterações, reversíveis ou não, que precede danos estruturais ou funcionais progressivos a nível molecular, celular e tecidual, face à exposição do indivíduo a um determinado agente de risco (Prista & Uva, 2006). Dependendo da magnitude pode ser reconhecido como estando associado a uma deficiência na saúde ou como fator preditor de uma possível doença (WHO, 1989). Este tipo de indicadores biológicos permite a deteção precoce de doenças, permitindo a intervenção atempada em situações de risco (WHO, 1989).

As alterações citogenéticas encontram-se entre os biomarcadores de efeito mais utilizados em estudos de biomonitorização humana (Au, 2007). Uma técnica inovadora que permite detetar o dano genético a nível do ADN celular é o teste do cometa.

2.5 Teste do cometa

Nos últimos 30 anos, o teste do cometa tornou-se um dos métodos mais usados para avaliar os danos no ADN (Andrew R Collins, 2004). Devido à sua simplicidade, sensibilidade, versatilidade, rapidez e custo económico, o teste do cometa é utilizado em diversas áreas de investigação que vão desde pesquisas de biomonitorização humana (danos no ADN) a pesquisas de epidemiologia molecular e ecogenotoxicidade (Azqueta & Collins, 2013; Andrew R Collins, 2004).

O teste do cometa é uma ferramenta valiosa na quantificação do dano do ADN em populações expostas a diferentes tipos e doses de agentes genotóxicos ocupacionais e ambientais (Collins et al., 2014).

Os primeiros a quantificar o dano no ADN, em células individuais, foram Rydbeg e Johanson (1978), embebendo-as em agarose e solução de lise sob condições alcalinas o que permite o desenrolamento parcial do ADN. Alguns anos mais tarde, em 1984, Johanson e Ostling (1984) a fim de melhorar a sensibilidade de deteção dos danos no ADN em células individuais, desenvolveram uma técnica eletroforética de microgel, a que hoje chamamos teste do cometa.

Mais tarde, o procedimento de Ostling e Johanson foi adaptado em condições alcalinas por Singh et al. (pH > 13) (1988), tornando possível desta forma detetar quebras de fita no ADN, bem como

locais abásicos, ligações cruzadas e locais de reparação de ADN incompletos (Costa & Teixeira, 2014).

No entanto, embora algumas alterações tenham sido introduzidas, as principais etapas do processo foram mantidas. O procedimento é relativamente simples, as células são suspensas em LMA (agarose de baixo ponto de fusão) e colocadas sobre uma lâmina previamente revestida com agarose de alto ponto de fusão (Andrew R Collins, 2015; Liao et al., 2009). De seguida, as lâminas são tratadas numa solução de lise (solução básica detergente) para remover membranas, constituintes celulares e nucleares e a maior parte das histonas. O nucleóide formado é preenchido apenas por ADN (Andrew R Collins, 2015; Liao et al., 2009). As lâminas são depois sujeitas a tratamento com uma solução alcalina, o que permite o desenrolamento da cadeia de ADN e expressão do dano. As lâminas são colocadas num tanque de eletroforese e o ADN é submetido a uma corrente elétrica sob condições alcalinas (Andrew R Collins, 2015; Liao et al., 2009). Se o ADN (carregado negativamente) possuir qualquer quebra, os fragmentos que contêm a quebra (de menores dimensões e mais leves) vão migrar mais rapidamente para o ânodo (carregado positivamente) formando desta forma o cometa, em que a “cabeça” é constituída pelo ADN intacto e a “cauda” pelo ADN danificado (Andrew R Collins, 2015; Liao et al., 2009) (Figura 9).

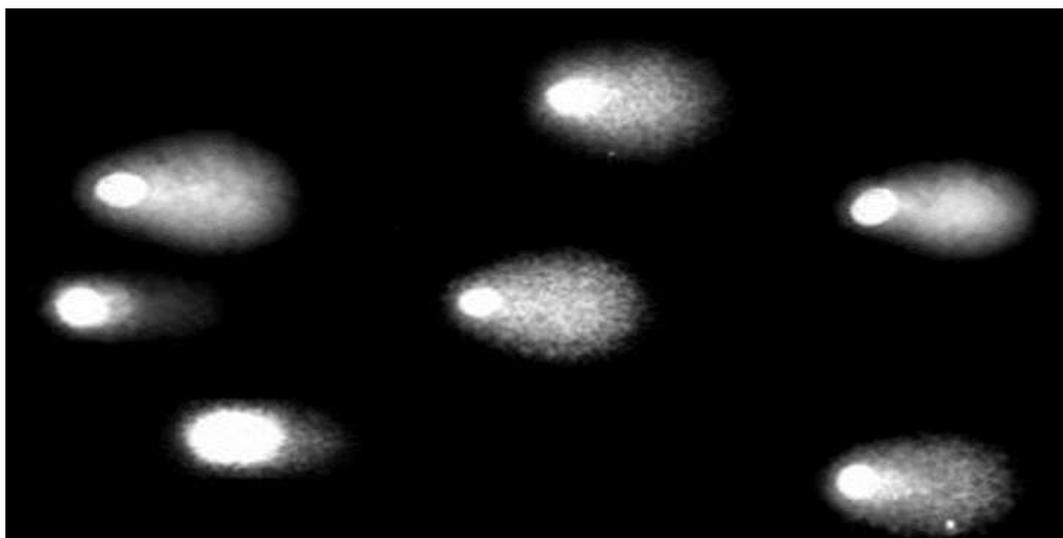


Figura 9 - Cometas obtidos a partir do teste do cometa (Azqueta & Collins, 2014).

Após coloração com um corante específico para ADN (ex. Brometo de etídio, acridina laranja, SYBR®*Gold*) o cometa resultante pode ser visualizado com recurso a um microscópio de fluorescência (Andrew R Collins, 2015; Liao et al., 2009; Bajpayee et al., 2002). O tamanho e a forma do cometa, bem como a distribuição do ADN está relacionada com a quantidade de dano presente na célula individual (Andrew R Collins, 2015; Costa & Teixeira, 2014).

2.5.1 Tratamento enzimático

Com o objetivo de tornar o teste do cometa mais específico, Collins et al. (1996), desenvolveram a versão enzimática do teste do cometa, onde basicamente são incluídas enzimas (endonucleases de reparação) para a detecção de danos no ADN específicos, como é o exemplo do dano oxidativo. Das mais conhecidas encontra-se a FPG (Dusinska & Collins, 1996) que é capaz de reconhecer purinas oxidadas, a endonuclease III (EndoIII) que deteta pirimidinas oxidadas (Andrew R Collins et al., 1993) e a 8-hidroxi guanina ADN glicosilase (hOOG1) que reconhece produtos como 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8oxo-G) (Dusinska & Collins, 1996). A enzima mais comumente utilizada é a FPG que reconhece produtos como a 8-oxoguanina (principais produtos de oxidação do ADN) assim como outras lesões (Azqueta et al., 2009). A versão alcalina e enzimática do teste do cometa encontra-se representada na figura 10.

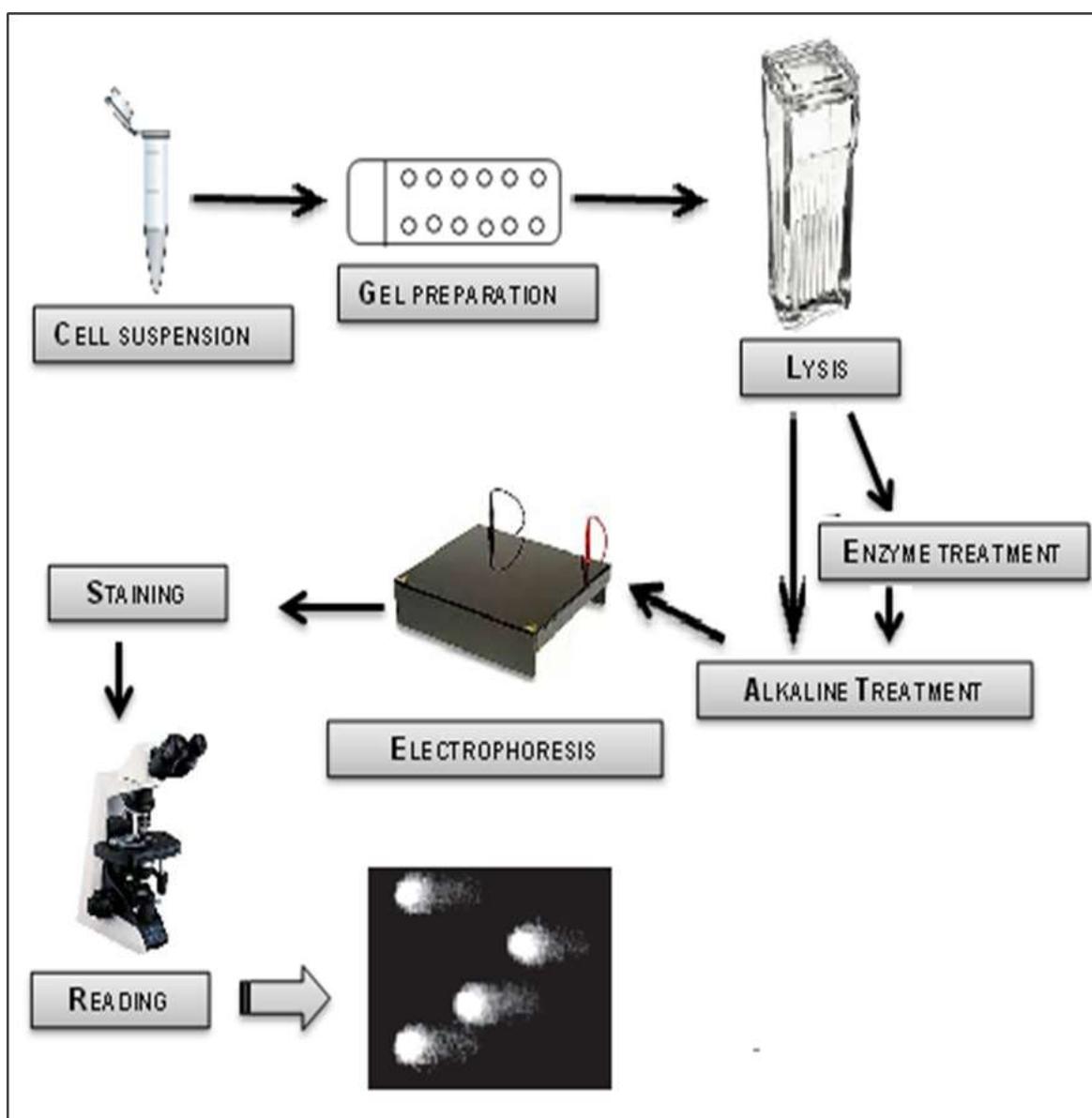


Figura 10 - Procedimento da versão alcalina e enzimática do teste do cometa (Ersson, 2011).

2.5.2 Procedimento de leitura

Vários métodos podem ser utilizados para a medição quantitativa dos cometas. Existem, principalmente duas formas: contagem visual (Garcia et al., 2004) e análise de imagem (Bocker et al., 1997). Através da contagem visual os cometas podem ser classificados de acordo com cinco categorias: 0 representa células sem qualquer dano e de 1 a 4 representam diferentes níveis de dano, sendo o 4 o mais danoso. A análise da imagem é realizada através da conexão de uma câmara do microscópio de fluorescência ao computador, utilizando um *software* específico que permite, após uma contagem manual dos cometas no programa, a memorização de determinados parâmetros relativos aos mesmos (ex. percentagem de dano na cauda, comprimento da cauda, entre outros) (A. R. Collins et al., 2008). Existem diversos *softwares* disponíveis para a leitura dos cometas sendo que um dos mais utilizados é o Comet Assay IV™ (Perceptive Instruments, Suffolk, UK).

2.5.3 Sistema de 12 géis

O formato tradicional do teste do cometa é realizado apenas com um ou dois géis, limitando o número de amostras que pode ser analisado de cada vez. Nos últimos 15 anos, várias abordagens tentaram adaptar este método para a capacidade de analisar um maior número de amostras na mesma experiência (Shaposhnikov et al., 2010). O sistema de 12 géis permite não só analisar mais amostras na mesma experiência como também fazer tratamentos individuais a cada um (Shaposhnikov et al., 2010) (Figura 11).

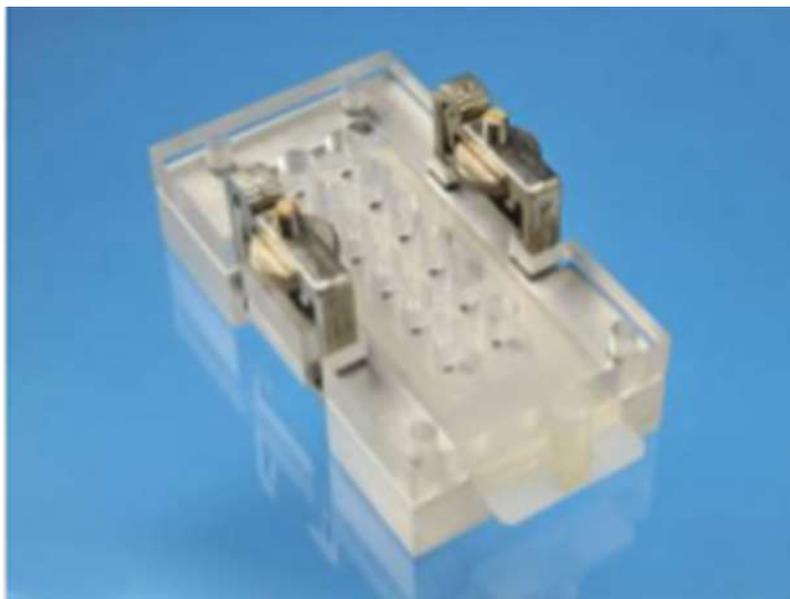


Figura 11 - Câmara com sistema de 12 géis (Azqueta & Collins, 2014).

2.5.4 Teste do cometa com sangue total

A atratividade deste teste deve-se sobretudo ao facto de qualquer célula eucariótica em suspensão poder ser utilizada, são exemplo células isoladas a partir de sangue, de biópsias, de culturas, células bucais e sangue total (Costa & Teixeira, 2014). Na maioria dos ensaios de genotoxicidade humanos, os linfócitos são as células preferenciais, uma vez que são células sentinela que informam sobre os eventos que ocorrem em tecidos-alvo e desta forma fornecem sinais de possíveis afeções na saúde (Costa & Teixeira, 2014). No entanto, o isolamento de linfócitos envolve um conjunto de técnicas laboratoriais e conseqüentemente mais tempo e recursos (Al-Salmani et al., 2011).

Assim, muito estudos sugerem que o sangue total pode ser diretamente usado no teste do cometa, pois é um indicador geral do estado de saúde do indivíduo, excluindo a necessidade de isolar as células e tornando este método rápido, simples e eficaz. A utilização do sangue total no teste do cometa permite evita ainda qualquer dano adicional no ADN ou até a perda de células, aquando o isolamento dos linfócitos (A. Collins et al., 2014).

3 OBJETIVOS, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Objetivos da Dissertação

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar o risco ocupacional, no que respeita à genotoxicidade, em bailarinos da Companhia Nacional de Bailado portuguesa.

Com objetivos específicos, pretendeu-se:

- Avaliar o efeito do exercício físico inerente à atividade de bailado no dano primário e oxidativo no ADN;
- Verificar a relação de variáveis independentes como sexo, IMC, hábitos tabágicos, anos de prática e idade com o dano oxidativo e primário no ADN;
- Relacionar os resultados do presente estudo com a revisão sistemática realizada no âmbito do mesmo tema;
- Mediante os resultados obtidos propor sugestões para trabalhos futuros.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Caracterização da população

A população em estudo (Tabela 5) foi constituída por um total de 28 indivíduos, 14 bailarinos profissionais da Companhia Nacional de Bailado (CNB) e 14 indivíduos saudáveis pertencentes ao grupo controlo.

Tabela 5 - Caracterização geral da população de estudo.

	N	Controlo	N	Bailarinos
Sexo	14		14	
Feminino		11 (78.6%)		11 (78.6%)
Masculino		3 (21.4%)		3 (21.4%)
Idade (anos) ^a	14	39.36 ± 8.58 (24 – 57)	14	32.50 ± 6.38 (22 – 42)
Índice de Massa Corporal ^a		25.23 ± 4.37 (19 – 33)		19.30 ± 2.84 (15.20 - 25.80)*
Baixo peso		-		5 (35.7%)
Peso Normal		9 (64.3%)		8 (57.1%)
Excesso peso		3 (21.4%)		1 (7.1%)
Obeso		2 (14.3%)		-
Hábitos tabágicos	14		14	
Fumadores		-		4 (28.6%)
Não fumadores		14 (100%)		10 (71.4%)
Anos de prática ^a		-		21.21 ± 8.21 (2 – 33)

^a Média ± desvio padrão (Min. – Max.)

* p < 0.001

O tipo de dança destes profissionais recai sobre dança clássica e contemporânea. O horário dos bailarinos consiste em cinco dias por semana com oito horas de treino diário, sendo por vezes manipulado de forma a aumentar as horas de treino. Os espetáculos são apresentados durante o fim-de-semana e a temporada desportiva começa em Setembro e termina em Julho. Todos os participantes foram devidamente informados sobre o objetivo deste estudo através de um consentimento informado. O estudo foi submetido à Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e desenvolvido de acordo com a Declaração de Helsínquia de 1975, revista em 1989.

Todos os indivíduos que aceitaram participar neste estudo foram informados dos objetivos do trabalho em curso e, uma vez manifestado o seu consentimento por escrito, responderam a um questionário, visando a avaliação de fatores demográficos e sociais bem como outros possíveis riscos que possam afetar o ADN (Anexo).

Este foi o primeiro estudo no âmbito da avaliação da genotoxicidade, nomeadamente na avaliação do dano primário e oxidativo no ADN, em bailarinos profissionais. Este trabalho constitui uma parte importante de um estudo maior que envolve outras instituições, nomeadamente a Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

3.2.2 Metodologia

- **Recolha de amostras biológicas**

Foram obtidas amostras de sangue através de punção venosa com sistema de tubos anticoagulantes com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) antes da época de bailado e um mês após o término da mesma. O sangue foi imediatamente transportado para laboratório nas devidas condições de refrigeração (4°C) e tratado para efeitos de criopreservação com uma solução de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) a 80% a um pH de 7.2 e dimetilsulfóxido (DMSO) a 20%. Depois disso, as amostras de sangue foram congeladas em microtubos (contendo 200µl cada) a -80°C para posterior análise.

- **Teste do cometa**

A fim de avaliar os danos no ADN foi utilizado o teste do cometa versão alcalina com o sistema de 12 géis por lâmina (cada lâmina com duas réplicas por indivíduo). Esta versão foi utilizada e descrita por Singh et al. (1988) com algumas alterações (Costa et al., 2008). O teste foi realizado com a introdução de um passo, a incubação de uma enzima de restrição FPG (Azqueta & Collins, 2014).

No dia da análise, as amostras foram descongeladas em gelo e posteriormente centrifugadas a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos numa solução de Dulbecco's Modified Eagle's Medium com 2% de soro fetal bovino a fim de remover o DMSO. O pellet de células foi ressuspenso em 600µl de agarose com baixo ponto de fusão a 0.6% e foi feita a pipetagem de 5

µl para cada um dos doze minigéis numa lâmina pré tratada com 1% de agarose com ponto de fusão normal.

As lâminas foram colocadas no frigorífico durante 10 minutos para permitir a solidificação dos minigéis de agarose. Seguidamente as lâminas foram imersas numa solução de lise fria (2.5 M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10mM Tris-base, 0.25 M NaOH, a um pH 10; 1% Triton X100) durante uma hora a 4°C no escuro. Após a lise, as lâminas foram tratadas com Buffer F (40mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5mM EDTA, 0.2 mg/mL de albumina de sêrum bovino, a um pH de 8.0) e a enzima FPG foram lavadas três vezes (a 4°C) com Buffer F durante cinco minutos cada. Depois da lavagem, as lâminas foram transferidas para o sistema de 12 géis (Severn Biotech Ltd.) e as câmaras devidamente montadas para proceder à incubação do Buffer e da FPG e posteriormente seguirem para incubação a 37°C durante 30 minutos.

Após a incubação, as lâminas foram colocadas horizontalmente num tanque de eletroforese em banho gelado com uma solução de eletroforese alcalina (1mM Na₂EDTA, 300mM NaOH, a um pH de 13) durante 20 minutos e em condições de pouca luminosidade para permitir o desenrolamento do ADN.

Posteriormente a eletroforese foi realizada a 30 volts e 300 miliamperes durante 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas durante 10 minutos em PBS (tampão fosfato salino a um p.H de 7.2) e lavadas durante 10 minutos com água fria desionizada, foram ainda desidratadas, a temperatura ambiente, com etanol a 70% durante 15 minutos e 15 minutos com etanol a 96%.

As lâminas secas foram coradas com SYBR®Gold na diluição recomendada pelo distribuidor. Após 30 minutos de submersão na solução de coloração, as lâminas foram lavadas duas vezes com água desionizada e deixadas a secar a temperatura ambiente. No dia da análise, foi colocada uma gota de água em cada lâmina e uma lamela para facilitar a leitura dos cometas. Foi utilizado o sistema de análise de imagem semi-automática, Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK) e foi feita a contagem de 150 cometas por minigel. A análise microscópica foi realizada por um microscópio de fluorescência modelo Nikon Eclipse E400. A percentagem de ADN na cauda foi o parâmetro utilizado para interpretar o cometa.

3.2.3 Tratamento estatístico

As variáveis independentes consideradas para o estudo foram o sexo, idade, hábitos tabágicos, IMC e duração da exposição, neste caso anos de prática. O IMC foi dividido em diferentes grupos de acordo com as recomendações da OMS, sendo que inferior a 18.5 kg/m² corresponde a um baixo peso corporal, entre 18.5 kg/m² e 24.9 kg/m² corresponde ao peso de um indivíduo normal, de 25.5 kg/m² a 29.9 kg/m² o indivíduo é considerado com excesso de peso e de 30.0 kg/m² a 34.9 kg/m² é considerado obesidade (Classe I). Foram consideradas como variáveis dependentes, o dano primário e o dano oxidativo.

A descrição geral da população do estudo foi realizada através de análise univariada. A análise dos fatores sociodemográficos e estilos de vida entre os grupos de estudo foi avaliada através do teste t-Student para variáveis contínuas e através do teste do Qui-quadrado para variáveis categóricas.

O pressuposto da normalidade foi testado através do teste de Shapiro-Wilk tendo em conta a dimensão da amostra ($n=28$). A diferença entre médias, em variáveis normais, foi verificada através do teste t-Student para amostras independentes e emparelhadas. Nas variáveis não normais, a diferença entre médias foi verificada através dos testes não paramétricos de Man-Whitney (amostras independentes) e de Wilcoxon (amostras emparelhadas).

Para verificar as diferenças entre as variâncias de variáveis com três ou mais grupos foi utilizado a ANOVA (variáveis normais) e o Kruskal-Wallis (variáveis não normais).

Para verificar a associação entre variáveis independentes e dependentes foi utilizada a correlação de Pearson para variáveis normais e a de Spearman para variáveis não normais.

Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas com um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). O programa estatístico utilizado foi o IBM SPSS Statistics 22 software®.

PARTE 2

4 RESULTADOS

A tabela 5 apresenta as características do grupo de estudo, o qual é composto por 28 indivíduos, 14 bailarinos profissionais e 14 indivíduos do grupo controlo. Cada grupo é constituído por 11 indivíduos do sexo feminino (78.6%) e por apenas três do sexo masculino (21.4%). A média de índice de massa corporal dos bailarinos é de $19.30 \pm 2.84 \text{ kg/m}^2$ sendo que esta tem uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$) da média do grupo controlo $25.23 \pm 4.37 \text{ kg/m}^2$.

A média dos valores relativos aos biomarcadores de dano primário e oxidativo em ambos os grupos de estudo encontram-se apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Dano primário/oxidativo por grupo de estudo.

		<i>N</i>	Controlo (média±EP)	<i>N</i>	Bailarinos (média±EP)
Dano primário (% ADN na cauda)	Total	14	5.16±0.34	14	6.10±0.52
	Sexo				
	Feminino	11	5.26±0.44	11	5.99±0.56
	Masculino	3	4.80±0.33	3	6.53±1.53
	Idade				
	≤35	4	5.58±0.44	8	6.27±0.75
	>35	10	4.99 ±0.46	6	5.88 ±0.76
	Hábitos tabágicos				
	Fumador	0	-	4	5.55±0.58
	Não fumador	14	-	10	7.49±0.82
Dano oxidativo (% ADN na cauda)	IMC				
	Baixo peso	-	-	5	6.19±1.16
	Peso normal	9	4.74±0.43	8	6.12±0.63
	Excesso peso	3	6.47±0.53	1	5.57
	Obeso	2	5.07±0.70	-	-
	Total	14	2.21 ±0.50	14	1.06±0.16
	Sexo				
	Feminino	11	2.43±0.58	11	1.19±0.17
	Masculino	3	1.40±0.91	3	0.61±0.27
	Idade				
≤35	4	1.17±0.31	8	1.18±0.20	
>35	10	2.61±0.64	6	0.90±0.26	
Hábitos tabágicos					
Fumador	0	-	4	0.57±0.23	
Não fumador	14	-	10	1.26±0.17	
IMC					
Baixo peso	-	-	5	1.10±0.25	
Peso normal	9	2.44±0.57	8	1.12±0.22	
Excesso peso	3	2.08±1.72	1	0.45	
Obeso	2	1.32±0.52	-	-	

EP-Erro Padrão

* $p < 0.05$, diferença estatisticamente significativa entre grupos.

** $p < 0.001$.

A tabela 7 apresenta os valores relativos ao dano primário e oxidativo no grupo de bailarinos antes da época (fase de repouso) e imediatamente após a época. Verifica-se que existe uma diferença

estatisticamente significativa ($p < 0.001$) do dano oxidativo entre o antes e após a temporada de bailado (1.06 ± 0.16 e 4.67 ± 0.68 respetivamente). Tal já não acontece com o dano primário, uma vez que o aumento deste após época não é estatisticamente significativo em relação ao dano primário antes da época ($p=0.551$).

Tabela 7 - Dano primário/oxidativo no ADN em bailarinos.

	<i>N</i>	Antes de época (média \pm EP)	Após época (média \pm EP)
Total	14	6.10 \pm 0.52	6.55 \pm 0.64
Sexo			
Feminino	11	5.99 \pm 0.56	6.36 \pm 0.47
Masculino	3	6.53 \pm 1.53	7.24 \pm 2.87
Idade			
≤ 35	8	6.27 \pm 0.75	6.54 \pm 0.56
> 35	6	5.88 \pm 0.76	5.57 \pm 1.39
Hábitos tabágicos			
Fumador	4	5.55 \pm 0.58	7.90 \pm 1.82
Não fumador	10	7.49 \pm 0.82	6.02 \pm 0.53
IMC			
Baixo peso	5	6.19 \pm 1.16	7.02 \pm 0.88
Peso normal	8	6.12 \pm 0.63	6.32 \pm 1.02
Excesso peso	1	5.57	6.03
Obeso	-	-	-
Total	14	1.06 \pm 0.16	4.67 \pm 0.68**
Sexo			
Feminino	11	1.19 \pm 0.17	4.85 \pm 0.58
Masculino	3	0.61 \pm 0.27	4.02 \pm 1.58
Idade			
≤ 35	8	1.18 \pm 0.20	5.61 \pm 0.86
> 35	6	0.90 \pm 0.26	3.42 \pm 0.94
Hábitos tabágicos			
Fumador	4	0.57 \pm 0.23	2.76 \pm 1.24*
Não fumador	10	1.26 \pm 0.17	5.43 \pm 0.71
IMC			
Baixo peso	5	1.10 \pm 0.25	5.00 \pm 0.84*
Peso normal	8	1.12 \pm 0.22	3.78 \pm 0.75
Excesso peso	1	0.45	10.19
Obeso	-	-	-

EP-Erro Padrão

* $p < 0.05$, diferença estatisticamente significativa em relação à pré-época.** $p < 0.001$.

Verifica-se ainda que, existe uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.034$) entre a média do dano oxidativo no ADN dos fumadores antes de época em relação ao término da mesma. Existe uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.039$) entre as médias do dano oxidativo das

várias categorias de IMC após época, sendo que o indivíduo acima do peso apresenta mais dano (10.19) do que os indivíduos com baixo peso (5.00 ± 0.84) e com peso normal (3.78 ± 0.75). No entanto, estes resultados devem ser cuidadosamente interpretados tendo em conta a pequena dimensão da amostra de estudo.

Através da análise da tabela 8, verifica-se que não existe qualquer correlação significativa entre as variáveis referentes ao dano primário e oxidativo biomonitorizadas tanto antes da época como no fim da mesma.

Tabela 8 - Correlações entre os biomarcadores avaliados no grupo de bailarinos.

Variáveis		Dano primário (DE)	Dano primário (AE)	Dano oxidativo (DE)
Dano oxidativo (AE)	<i>r</i>	- 0.248	- 0.332	0.345
	p-value	0.392	0.246	0.227
Dano primário (DE)	<i>r</i>	-	- 0.055	- 0.349
	p-value	-	0.852	0.221
Dano primário (AE)	<i>r</i>	-	-	- 0.191
	p-value	-	-	0.513

Legenda:

r – Grau de correlação linear
DE – Depois da época
AE – Antes da época

No entanto, através da tabela 9 verifica-se que algumas variáveis de estudo se encontram relacionadas. Após a época de bailado verifica-se que a idade tem uma correlação negativa (-0.553) estatisticamente significativa ($p < 0.05$) com o dano primário, o que significa que há medida que a idade aumenta o dano primário tende a diminuir.

Tabela 9 - Correlações entre as variáveis de estudo no grupo de bailarinos.

Variáveis		Idade	IMC	Fumador	Anos de prática	Dano primário (AE)	Dano oxidativo (AE)	Dano oxidativo (DE)	Dano primário (DE)
Género	<i>r</i>	-0.524	-0.305	-0.055	0.146	-0.119	0.357	0.139	0.151
Idade	<i>r</i>	-	0.310	0.231	0.371	0.175	-0.297	-0.257	-0.553*
IMC	<i>r</i>	-	-	-0.265	0.305	0.202	-0.152	0.341	-0.270
Fumador	<i>r</i>	-	-	-	0.343	0.455	-0.192	-0.493	0.353
Anos de prática	<i>r</i>	-	-	-	-	0.473	-0.192	-0.385	-0.157

Legenda:*r* – Grau de correlação linear* $p < 0.05$, correlação estatisticamente significativa.

5 DISCUSSÃO

A prática regular de exercício é um fator que contribui significativamente para a manutenção do bem-estar do ser humano, permitindo um conjunto de benefícios fisiológicos e psicossociais (Blair et al., 2001; Haskell et al., 2007; Hills et al., 2015; Powers & Jackson, 2008). No entanto, a prática de exercício físico intensivo está associada a um aumento da produção de radicais livres, os quais podem ser indutores de dano celular caso o sistema antioxidante não seja capaz de manter o estado de homeostasia do organismo. São inúmeros os estudos que avaliam o dano no ADN após um treino ou uma temporada em diferentes desportos com diferentes intensidades e durações, sendo que a maior parte dos dados indicam que o exercício físico intensivo aumenta os níveis de *stress* oxidativo (Clarkson & Thompson, 2000; Fisher-Wellman & Bloomer, 2009; Knez et al., 2006; Vollaard et al., 2005).

A dança é caracterizada por um repertório de atributos desde o controlo motor, prontidão psicológica, coordenação, agilidade, velocidade, exercícios aeróbios e anaeróbios até ao limiar de exigências musculares (Russell, 2013). Os bailarinos são considerados tanto artistas como atletas, pois fazem frequentemente atuações artísticas complexas que exigem um elevado nível de habilidades atléticas (Allen et al., 2012).

A fim de avaliar o impacto do exercício físico no dano do ADN, foi realizada a versão alcalina do teste do cometa para quantificar os danos primários no ADN. Foi ainda realizada a versão enzimática, com o uso da enzima FPG, a fim de reconhecer especificamente dano oxidativo purínico (Azqueta et al., 2009).

Os resultados obtidos a partir da versão enzimática através do teste do cometa sugerem um aumento significativo do dano oxidativo imediatamente após a temporada de bailado (1.06 ± 0.16 para 4.67 ± 0.68), sendo que este aumento exponencial se aplica quase à totalidade do grupo de bailarinos (86%). Estes resultados vão a encontro da revisão sistemática realizada no âmbito deste estudo. Os estudos verificam que existe um aumento dos biomarcadores de *stress* oxidativo, nomeadamente produtos de peroxidação lipídica, proteica ou danos no ADN, após um treino físico intensivo de curta ou longa duração (Ascensão et al., 2008; Chatzinikolaou et al., 2014; Marin et al., 2011; Orhan et al., 2004; Palazzetti et al., 2003; Rowlands et al., 2012; Silva et al., 2013).

No entanto, estes estudos parecem apontar para um equilíbrio redox, pois os níveis dos biomarcadores de *stress* oxidativo são mais elevados nas horas/dias próximas ao término do período de exercício mas acabam por normalizar. Tal também se verificou neste estudo, pois os níveis do dano oxidativo (1.06 ± 0.166) e dano primário (6.10 ± 0.52) no ADN dos bailarinos no período de repouso não têm diferenças estatisticamente significativas do grupo controlo que não pratica qualquer desporto (2.21 ± 0.50 e 5.16 ± 0.34 respetivamente).

Ao encontro desta tendência de equilíbrio redox, estudos registaram um aumento da atividade do sistema antioxidante após períodos de exercício físico (Kyparos et al., 2009; Marin et al., 2013; Marin et al., 2011) assim como também há evidências de que o exercício físico contínuo, em atletas por exemplo, estimula a reparação do ADN através de sistemas de reparação (Cash et al., 2014).

Após época de bailado, existe uma correlação negativa ($r = -0.553$), estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre a idade e dano primário no ADN o que significa que à medida que a idade e consecutivamente os anos de prática do bailarino aumentam, o dano primário diminui e tal facto pode estar relacionado com o aumento das defesas do sistema antioxidante, o aumento da capacidade de reparação do ADN e da capacidade de expressão génica necessária ao metabolismo celular. Pode também traduzir-se na redução da intensidade de treino a partir de uma certa idade.

Muitos estudos têm-se debruçado sobre o aumento da idade e o dano celular. Dados publicados sobre danos no ADN relacionados com a idade encontram-se em conflito (Alija et al., 2016; Møller, 2006). O dano no ADN tem sido inclusive relacionado com o processo de envelhecimento. A acumulação de dano no ADN associado com a idade está relacionada com o aumento de ROS e o declínio da capacidade de reparação do ADN por parte do sistema antioxidante (Chen et al., 2007).

No entanto estudos a longo prazo mostram que o treino intensivo pode aumentar a capacidade de defesa do sistema antioxidante, este que atua na prevenção e reparação do dano oxidativo (Knez et al., 2006; Vollaard et al., 2005; Wagner et al., 2011).

O *stress* oxidativo em atletas de alta competição, tendem a ser superiores imediatamente após períodos de treino, no entanto normalmente estes níveis tendem a voltar ao normal horas, ou dias depois (Aguiló et al., 2005; Cases et al., 2006; Ji, 2002; Kabasakalis et al., 2011; Margaritis et al., 1997; Stefanie Reichhold et al., 2008; Stefanie Reichhold et al., 2009; Serrano et al., 2010; Shing et al., 2007; Wagner et al., 2010).

Os resultados deste estudo sugerem que o exercício físico regular, apesar de intensivo, induz efeitos protetores contra o dano no ADN facto possivelmente relacionado com o aumento da capacidade do sistema antioxidante (Soares et al., 2015). Este resultado é positivo no que respeita à redução de risco de doenças (Boccatonda et al., 2016).

No presente estudo a média do IMC verificada no grupo controlo foi de $25.23 \pm 4.37 \text{ kg/m}^2$ e nos bailarinos foi de $19.30 \pm 2.84 \text{ kg/m}^2$. A diferença observada entre as médias de ambos os grupos de estudo é significativa ($p < 0.001$), sendo que mais de um terço dos bailarinos profissionais se encontra abaixo do peso de acordo com as recomendações da OMS.

De acordo com a mesma, a média global do IMC em 2014 foi de 24.4 kg/m^2 , o sexo feminino com uma média de 24.6 kg/m^2 e o sexo masculino de 24.3 kg/m^2 . Na Europa, a média do IMC foi de 26.4 kg/m^2 , pelo que o sexo masculino apresentou uma média de 26.7 kg/m^2 e o feminino 21.1 kg/m^2 . Em particular em Portugal, a média do IMC foi de 26.2 kg/m^2 (WHO, 2010). Um outro estudo com uma amostra representativa da população portuguesa adulta verificou uma média de IMC de $25.7 \pm 4.2 \text{ kg/m}^2$ (Sardinha et al., 2012).

Este facto pode ser justificado pelo tipo de exigências físicas que são requisitadas num bailarino, sendo que estes tendem a procurar diminuir o seu peso corporal, por vezes de formas menos adequadas para conseguir executar determinados movimentos (Amorim, 2014).

Quanto mais pesado o corpo de um bailarino, maiores serão as forças de impacto no solo, pelo que muitas lesões resultam disso mesmo (Amorim, 2014). Este é um fator preocupante pois uma

alimentação fraca e inadequada juntamente com fatores de *stress* psicológicos, contribuem para a incidência de desordens alimentares e deficiências nutricionais neste tipo de população (Gonen et al., 2001).

O grupo controlo pelo contrário, tem uma média de IMC dentro dos valores normais ao que este aumenta neste grupo com a idade através de uma correlação positiva (0.631) estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

A tendência a ganhar peso corporal ao longo da idade tem vindo a ser estudada e suportada por alguns estudos. Um estudo realizado na Noruega verificou a alteração no IMC numa amostra de 1169 indivíduos passados 11 anos com um aumento de 23.7 kg/m^2 para 25.4 kg/m^2 , equivalente para os dois sexos em 68% da população (Reas et al., 2007).

O género não mostrou ter impacto na percentagem de dano primário e oxidativo no ADN. Estudos mostram que esta relação tem sido alvo de controvérsia (Giovannelli et al., 2002; Kasai et al., 2001) pois diferentes estudos reportam resultados contraditórios.

Um outro importante resultado deste estudo é o facto do grupo de bailarinos fumadores apresentarem maior dano oxidativo após a época de bailado (0.57 ± 0.23 para 2.76 ± 1.24), sendo que essa diferença é estatisticamente significativa ($p = 0.034$).

O tabagismo é um dos hábitos mais comuns dos tempos modernos. Sabe-se que o hábito de fumar constitui um grave risco para a saúde e para a vida humana. O fumo de um cigarro induz a formação de ROS que podem causar danos no ADN (Kulikowska-Karpinska & Czerw, 2015).

Tal como este estudo, são muitos outros que mostram que o fumo de tabaco causa um decréscimo da capacidade antioxidante e diminuem a capacidade de reparação do ADN, levando a um aumento do *stress* oxidativo (Cao et al., 2016).

Os testes citogenéticos são de extrema importância uma vez que predizem o efeito genotóxico face à exposição a um determinado fator de risco. Existem diferentes métodos citogenéticos, no entanto estes são mais complexos e morosos que o teste do cometa que consiste num método que permite avaliar o dano no ADN de forma rápida, simples e económica.

A ação dos ROS tem sido amplamente estudada no meio dos desportistas, no entanto nesta atividade profissional são os escassos os estudos que avaliam os efeitos genotóxicos face à exposição ao exercício físico intensivo. Este estudo é pioneiro no que refere à avaliação dos danos primários e oxidativos no ADN, sendo que apesar das limitações é fundamental para a perceção dos riscos que estes profissionais.

São necessários mais estudos no que refere a esta temática para que sejam implementadas medidas a fim de salvaguardar a saúde dos bailarinos, medidas estas que incluem ações de biomonitorização periódicas, ações de vigilância médica, ações de sensibilização e definição de determinados protocolos e políticas.

6 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

6.1 Conclusões

A atividade física é um fator imprescindível à manutenção de um estilo de vida saudável. No entanto, o exercício físico intensivo, comum à prática do bailado e a outras atividades desportivas, constitui um potencial fator na produção de ROS que por sua vez estão associados a diversas doenças pela interação que estas têm no organismo.

Os estudos que se têm debruçado sobre os testes citogenéticos em humanos, são uma mais-valia pois permitem verificar o efeito de um determinado fator de risco. A análise de biomarcadores continua a ser uma fundamental ferramenta na epidemiologia sendo que o teste utilizado (teste do cometa) mostrou ser uma mais-valia por ser relativamente simples, rápido e acarretar poucos custos. Apesar de existirem vários estudos sobre esta temática, a área do bailado profissional ainda não se encontra bem explorada, pelo que este estudo é pioneiro no que refere à análise do dano primário e oxidativo no ADN.

Os bailarinos profissionais são considerados atletas e artistas com elevadas exigências físicas e por isso estão expostos diariamente a uma carga física que pode induzir um incremento dos níveis de *stress* oxidativo e de facto, através deste estudo verificou-se que existe um aumento significativo dos níveis de dano oxidativo no ADN após a época de bailado. Esta situação sugere um potencial fator de risco para a saúde desta população, no entanto, existem mecanismos para contornar esta situação.

Sabe-se que, o principal mecanismo de proteção contra o *stress* oxidativo recai sobre a ação do sistema antioxidante que atua em prol de um estado de equilíbrio redox. Através deste estudo, verificamos que o dano primário e oxidativo no ADN antes da época não tem diferença estatisticamente significativa do grupo controlo, o que significa que os níveis de *stress* oxidativo tendem a diminuir após o pico verificado logo após o período de bailado. Assim, é de todo fundamental controlar esses níveis de biomarcadores de *stress* oxidativo e tentar perceber durante quanto tempo se prolongam para que seja criado um conjunto de recomendações que possa ajudar a prescrição bem-sucedida de exercício e a devida orientação profissional a fim de manter o estilo de vida saudável.

Os dados revelaram um efeito benéfico do exercício físico regular, pois verificou-se uma associação entre a idade e o dano primário em bailarinos, em que o dano primário analisado após a temporada de bailado tende a diminuir com a idade. Entre outras hipóteses como os mecanismos de reparação do ADN ou a expressão génica, tal facto pode dever-se a uma adaptação do sistema antioxidante ao exercício, diminuindo os danos originados pelos ROS, o que se observa na maioria dos estudos nesta área.

O aumento de ROS está relacionado com o tabagismo, pelo que é importante alertar e insistir nas consequências deste estilo de vida no meio destes atletas. Assim como é importante também haver um controlo periódico através de consultas de nutrição para que se evitem problemas nutricionais devido ao défice de peso nestes profissionais.

Este estudo aponta para a necessidade de mais pesquisas acerca do impacto da atividade física intensiva no organismo assim como a capacidade do sistema antioxidante após um período de bailado, para que possam ser prescritas medidas a fim de evitar possíveis danos celulares. Estas medidas, podem passar por atividades de monitorização regulares, como controlo médico, campanhas de boas práticas, programas de treino e implementação de determinados procedimentos e políticas.

Apesar dos resultados deste estudo, devem ser tidas em consideração algumas limitações. Uma das principais limitações diz respeito ao tamanho da amostra ($n=28$), facto que contribuiu para uma diminuição da precisão na aplicação dos testes estatísticos. Além desta também o facto da amostra ser constituída maioritariamente por indivíduos do sexo feminino pode ser um viés, sendo que seria importante estudar o comportamento dos biomarcadores de *stress* oxidativo em ambos os sexos. Uma outra limitação do estudo vai ao encontro da falta de informações relevantes no grupo de bailarinos, nomeadamente o conhecimento da dieta dos mesmos e a possível toma de suplementos alimentares. No entanto, apesar de todas as limitações encontradas neste estudo, é importante referir que foi estudada cerca de 30% da população de bailarinos profissionais da CNB.

Este estudo pode ser interpretado com pioneiro no que respeita ao impacto do exercício físico intensivo no dano do ADN em bailarinos profissionais.

6.2 Perspetivas Futuras

No seguimento do trabalho desenvolvido no presente estudo e como perspetiva futura sugere-se ainda o seguinte:

- Aumentar o tamanho da amostra de estudo para que possa ser mais representativa;
- Aplicar questionários com outras variáveis pertinentes como a dieta;
- Realizar outros testes de genotoxicidade para entender os mecanismos de adaptação do sistema antioxidante face a prática de exercício físico regular;
- Analisar além de biomarcadores de dano no ADN, biomarcadores de peroxidação lipídica e proteica;
- Realizar colheitas de sangue em diferentes momentos para analisar o dano primário e oxidativo após o término do período de dança e desta forma perceber durante quanto tempo os níveis de *stress* oxidativo se mantêm elevados;
- Realizar medições do volume de oxigénio máximo durante a atividade física assim como verificar o batimento cardíaco do indivíduo e desta forma perceber o esforço que é realizado;
- Abranger diferentes atividades físicas com diferentes intensidades e tipologias para tentar perceber qual o tipo de desporto ideal e a partir disso prescrever determinadas orientações;
- Realizar estudos que ao invés de estudar os efeitos na saúde em períodos curtos de exercício físico intensivo, estudem o efeito face à exposição ao *stress* oxidativo a longo prazo.

7 BIBLIOGRAFIA

- Aguiló, A., Tauler, P., Fuentespina, E., Tur, J. A., Córdova, A., & Pons, A. (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & behavior*, *84*(1), 1-7.
- Ahlborg, U., & Hanberg, A. (1994). Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Environmental Science and Pollution Research*, *1*(2), 67-68.
- Al-Salmani, K., Abbas, H. H., Schulpen, S., Karbaschi, M., Abdalla, I., Bowman, K. J., . . . Godschalk, R. W. (2011). Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(3), 719-725.
- Albisetti, W., Perugia, D., De Bartolomeo, O., Tagliabue, L., Camerucci, E., & Calori, G. M. (2010). Stress fractures of the base of the metatarsal bones in young trainee ballet dancers. *International orthopaedics*, *34*(1), 51-55.
- Alessio, H. M., Hagerman, A. E., Fulkerson, B. K., Ambrose, J., Rice, R. E., & Wiley, R. L. (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, *32*(9), 1576-1581.
- Alija, A. J., Collins, A. R., Dreshaj, S., Asllani, F., Bajraktari, I. D., Bresgen, N., & Eckl, P. M. (2016). Differences in basal DNA damage in blood cells from men and women. *Age (years, mean)*, *50*(52.3), 45.42.
- Allen, N., Nevill, A., Brooks, J., Koutedakis, Y., & Wyon, M. (2012). Ballet injuries: injury incidence and severity over 1 year. *journal of orthopaedic & sports physical therapy*, *42*(9), 781-A781.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(17), 7915-7922.
- Amorim, T. (2014). Desafios nutricionais de bailarinos profissionais. *RPCD*, *14*(1), 112-126.
- Amorim, L. C. A. (2003). O uso dos biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas.
- ARS. (2010). Gestão dos riscos profissionais em estabelecimentos de saúde *Orientação técnica Nº1 -DSP*. Lisboa.
- Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., . . . Kasai, H. (1997). Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis*, *18*(9), 1763-1766.
- Ascensão, A., Magalhães, J., Soares, J., Oliveira, J., & Duarte, J. A. (2003). Exercício e Stress Oxidativo Cardíaco [48]. *Rev Port Cardiol*, *22*(5), 651-678.
- Ascensão, A., Rebelo, A., Oliveira, E., Marques, F., Pereira, L., & Magalhães, J. (2008). Biochemical impact of a soccer match—analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. *Clinical biochemistry*, *41*(10), 841-851.
- Au, W. W. (2007). Usefulness of biomarkers in population studies: from exposure to susceptibility and to prediction of cancer. *International journal of hygiene and environmental health*, *210*(3), 239-246.

-
- Azevedo, A. P., Oliveira, R., & Fonseca, J. P. (2007). Lesões no sistema músculo-esquelético em bailarinos profissionais em Portugal, na temporada 2004/2005. *Rev Port Fisioterapia Desp*, 11, 33-37.
- Azqueta, A., & Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of toxicology*, 87(6), 949-968.
- Azqueta, A., & Collins, A. R. (2014). The Comet Assay: High Throughput Use of FPG. *Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach*, 199-217.
- Azqueta, A., Shaposhnikov, S., & Collins, A. R. (2009). DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1), 101-108.
- Bajpayee, M., Dhawan, A., Parmar, D., Pandey, A. K., Mathur, N., & Seth, P. K. (2002). Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline Comet assay. *Mutat Res*, 520(1-2), 83-91.
- Batson, G. (2007). Revisiting overuse injuries in dance in view of motor learning and somatic models of distributed practice. *Journal of Dance Medicine & Science*, 11(3), 70-75.
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78(2), 547-581.
- Belayachi, J., Rkain, I., Rkain, H., Madani, N., Amlaiky, F., Zekraoui, A., . . . Abouqal, R. (2016). Burnout Syndrome in Moroccan Training Resident: Impact on Quality of Life. *Iran J Public Health*, 45(2), 260-262.
- Berardi, G. M. (2005). *Finding Balance: Fitness, Training, and Health for a Lifetime in Dance*: Routledge.
- Blair, S. N., Cheng, Y., & Holder, J. S. (2001). Is physical activity or physical fitness more important in defining health benefits? *Med Sci Sports Exerc*, 33(6 Suppl), S379-399; discussion S419-320.
- Bloomer, R. J., & Goldfarb, A. H. (2004). Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Canadian journal of applied physiology*, 29(3), 245-263.
- Boccatonda, A., Tripaldi, R., Davì, G., & Santilli, F. (2016). Oxidative stress modulation through habitual physical activity. *Current pharmaceutical design*.
- Bocker, W., Bauch, T., Muller, W. U., & Streffer, C. (1997). Image analysis of comet assay measurements. *Int J Radiat Biol*, 72(4), 449-460.
- Bowling, A. (1989). Injuries to dancers: prevalence, treatment, and perceptions of causes. *Bmj*, 298(6675), 731-734.
- Bronner, S., Ojofeitimi, S., & Rose, D. (2003). Injuries in a modern dance company effect of comprehensive management on injury incidence and time loss. *The American journal of sports medicine*, 31(3), 365-373.
- Burckhardt, P., Wynn, E., Krieg, M.-A., Bagutti, C., & Faouzi, M. (2011). The effects of nutrition, puberty and dancing on bone density in adolescent ballet dancers. *Journal of Dance Medicine & Science*, 15(2), 51-60.
- Burckhardt, P., Wynn, E., Krieg, M. A., Bagutti, C., & Faouzi, M. (2011). The effects of nutrition, puberty and dancing on bone density in adolescent ballet dancers. *J Dance Med Sci*, 15(2), 51-60.
- Camargo, H., & Ghirotto, F. (2003). Uma visão da dança e suas lesões. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*.
-

- Cao, C., Lai, T., Li, M., Zhou, H., Lv, D., Deng, Z., . . . Shen, H. (2016). Smoking-promoted oxidative DNA damage response is highly correlated to lung carcinogenesis. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.7810
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*, 15-25.
- Cases, N., Sureda, A., Maestre, I., Tauler, P., Aguiló, A., Córdova, A., . . . Pons, A. (2006). Response of antioxidant defences to oxidative stress induced by prolonged exercise: antioxidant enzyme gene expression in lymphocytes. *European journal of applied physiology*, *98*(3), 263-269.
- Cash, S. W., Beresford, S. A., Vaughan, T. L., Heagerty, P. J., Bernstein, L., White, E., & Neuhouser, M. L. (2014). Recent physical activity in relation to DNA damage and repair using the comet assay. *Journal of physical activity & health*, *11*(4), 770.
- Chatzinikolaou, A., Draganidis, D., Avloniti, A., Karipidis, A., Jamurtas, A. Z., Skevaki, C. L., . . . Kambas, A. (2014). The microcycle of inflammation and performance changes after a basketball match. *Journal of sports sciences*, *32*(9), 870-882.
- Chen, J.-H., Hales, C. N., & Ozanne, S. E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic acids research*, *35*(22), 7417-7428.
- Clarkson, P. M., & Thompson, H. S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*, *72*(2 Suppl), 637s-646s.
- Coggon, D., & Friesen, M. D. (1997). Markers of internal dose: chemical agents. *IARC Sci Publ*(142), 95-101.
- Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., . . . Coskun, E. (2014). The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *759*, 27-39.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, *26*(3), 249-261.
- Collins, A. R. (2015). The comet assay: a heavenly method! *Mutagenesis*, *30*(1), 1-4.
- Collins, A. R., Duthie, S. J., & Dobson, V. L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, *14*(9), 1733-1735.
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., . . . Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, *23*(3), 143-151. doi:10.1093/mutage/gem051
- Cooke, M. S., Lunec, J., & Evans, M. D. (2002). Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, *33*(12), 1601-1614.
- Costa, S., Coelho, P., Costa, C., Silva, S., Mayan, O., Santos, L. S., . . . Teixeira, J. P. (2008). Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Tóxicology*, *252*(1), 40-48.
- Costa, S., & Teixeira, J. (2014). *Comet assay*. Retrieved from
- Cumming, J., & Duda, J. L. (2012). Profiles of perfectionism, body-related concerns, and indicators of psychological health in vocational dance students: An investigation of the 2 × 2 model of perfectionism. *Psychology of Sport and Exercise*, *13*(6), 729-738. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.psychsport.2012.05.004>

-
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., & Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and biophysical research communications*, 107(4), 1198-1205.
- DGS. (2013). Programa Nacional de Saúde Ocupacional (PNSOC) – 2º Ciclo 2013/2017. Lisboa. N.026/2013
- Di Meo, S., & Venditti, P. (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Neurosignals*, 10(1-2), 125-140.
- Djordjević, V. B. (2004). Free radicals in cell biology. *International review of cytology*, 237, 57-89.
- Cigarro, N. M., Ferreira, R. E., & de Mello, D. B. (2006). AVALIAÇÃO DA FLEXIBILIDADE DA ARTICULAÇÃO DO QUADRIL EM BAILARINAS CLÁSSICAS ANTES E APÓS UM PROGRAMA ESPECÍFICO DE TREINAMENTO.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Dusinska, M., & Collins, A. R. (1996). Detection of Oxidized Purines and UV-Induced Photoproducts in DNA of Single Cells, by Inclusion of Lesion-Specific Enzymes in the Comet Assay: Alternative to laboratory animals: ATLA.
- Eastmond, D. A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W. A., Cimino, M. C., Dobrev, I., . . . Vickers, C. (2009). Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis*, 24(4), 341-349.
- Ellegaard, P. K., & Poulsen, H. E. (2016). Tobacco smoking and oxidative stress to DNA: a meta-analysis of studies using chromatographic and immunological methods. *Scand J Clin Lab Invest*, 76(2), 151-158. doi:10.3109/00365513.2015.1127407
- Ersson, C. (2011). International validation of the comet assay and a human intervention study. Sweden: Karolinska Institutet.
- Comissão Europeia (2014). *Special Eurobarometer 412 “Sport and physical activity”*. Retrieved from
- Evans, W. J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *The American journal of clinical nutrition*, 72(2), 647s-652s.
- Fang, J. C., Kinlay, S., Beltrame, J., Hikiti, H., Wainstein, M., Behrendt, D., . . . Selwyn, A. P. (2002). Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *The Lancet*, 359(9312), 1108-1113.
- Ferreira, F., Ferreira, R., & Duarte, J. A. (2007). Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de ciências do desporto*, 7(2), 257-275.
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*, 36(4), 327-358.
- Fisher-Wellman, K., & Bloomer, R. J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*, 8, 1. doi:10.1186/1476-5918-8-1
- FREI, B. (1999). Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *The FASEB journal*, 13(9), 963-964.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 97-112.
-

- Gamboa, J. M., Roberts, L. A., Maring, J., & Fergus, A. (2008). Injury patterns in elite preprofessional ballet dancers and the utility of screening programs to identify risk characteristics. *Journal of orthopaedic & sports physical therapy*, 38(3), 126-136.
- Garcia, O., Mandina, T., Lamadrid, A. I., Diaz, A., Remigio, A., Gonzalez, Y., . . . Alvarez, A. (2004). Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat Res*, 556(1-2), 25-34. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.035
- Gassen, M., Lamensdorf, I., Armony, T., Finberg, J., & Youdim, M. (2003). Attenuation of methamphetamine induced dopaminergic neurotoxicity by flupirtine: microdialysis study on dopamine release and free radical generation. *Journal of neural transmission*, 110(2), 171-182.
- Gaziano, J. M., Sesso, H. D., Christen, W. G., Bubes, V., Smith, J. P., MacFadyen, J., . . . Buring, J. E. (2012). Multivitamins in the prevention of cancer in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *Jama*, 308(18), 1871-1880.
- Giimiistas, M. K. (2003). Lipid peroxidation, erythrocyte superoxide-dismutase activity and trace metals in young male footballers. *Yonsei Medical Journal*, 44(6), 979-986.
- Giovannelli, L., Saieva, C., Masala, G., Testa, G., Salvini, S., Pitozzi, V., . . . Palli, D. (2002). Nutritional and lifestyle determinants of DNA oxidative damage: a study in a Mediterranean population. *Carcinogenesis*, 23(9), 1483-1489.
- Goldfarb, A. H. (1999). Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 24(3), 249-266.
- Gomes, E. C., Silva, A. N., & de Oliveira, M. R. (2012). Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 756132. doi:10.1155/2012/756132
- Gonen, E., Madar, Z., Weexler, I. D., & Dolev, E. (2001). Unique Nutritional Aspects Associated With Professional Dancing. In E. S. Lebenthal, *Nutrition in the female life cycle* (pp. 27-37). ISAS International Seminars Ltd.
- Hadžović-Džuvo, A., Valjevac, A., Leparo, O., Pjanić, S., Hadžimuratović, A., & Mekić, A. (2014). Oxidative stress status in elite athletes engaged in different sport disciplines. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(2), 56.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*, 91(3), S14-S22.
- Haskell, W. L., Lee, I. M., Pate, R. R., Powell, K. E., Blair, S. N., Franklin, B. A., . . . Bauman, A. (2007). Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*, 39(8), 1423-1434. doi:10.1249/mss.0b013e3180616b27
- Hattori, Y., Nishigori, C., Tanaka, T., Uchida, K., Nikaido, O., Osawa, T., . . . Toyokuni, S. (1997). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *Journal of Investigative Dermatology*, 107(5), 733-737.
- Heinonen, I., Kalliokoski, K. K., Hannukainen, J. C., Duncker, D. J., Nuutila, P., & Knuuti, J. (2014). Organ-specific physiological responses to acute physical exercise and long-term training in humans. *Physiology (Bethesda)*, 29(6), 421-436. doi:10.1152/physiol.00067.2013
- Hillman, C. H., Erickson, K. I., & Kramer, A. F. (2008). Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nature reviews neuroscience*, 9(1), 58-65.

-
- Hills, A. P., Dengel, D. R., & Lubans, D. R. (2015). Supporting public health priorities: recommendations for physical education and physical activity promotion in schools. *Prog Cardiovasc Dis*, 57(4), 368-374. doi:10.1016/j.pcad.2014.09.010
- Hincapie, C. A., Morton, E. J., & Cassidy, J. D. (2008). Musculoskeletal injuries and pain in dancers: a systematic review. *Arch Phys Med Rehabil*, 89(9), 1819-1829. doi:10.1016/j.apmr.2008.02.020
- Hoet, P., & Haufroid, V. (1997). Biological monitoring: state of the art. *Occupational and environmental medicine*, 54(6), 361.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., & Fenech, M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1), 93-108.
- Horenstein, M. S., Vander Heide, R. S., & L'Ecuyer, T. J. (2000). Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Mol Genet Metab*, 71(1-2), 436-444. doi:10.1006/mgme.2000.3043
- IEH. (1996). *The use of biomarkers in environmental exposure assessment*. Retrieved from Leicester:
- INE. (2014). Estatísticas da Cultura.
- Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Experimental Biology and medicine*, 222(3), 283-292.
- Ji, L. L. (2002). Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959(1), 82-92.
- Kabasakalis, A., Kyparos, A., Tsalis, G., Loupos, D., Pavlidou, A., & Kouretas, D. (2011). Blood oxidative stress markers after ultramarathon swimming. *J Strength Cond Res*, 25(3), 805-811. doi:10.1519/JSC.0b013e3181d0b109
- Kasai, H., Iwamoto-Tanaka, N., Miyamoto, T., Kawanami, K., Kawanami, S., Kido, R., & Ikeda, M. (2001). Life style and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage: effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking. *Japanese journal of cancer research*, 92(1), 9-15.
- Knez, W. L., Coombes, J. S., & Jenkins, D. G. (2006). Ultra-endurance exercise and oxidative damage. *Sports Medicine*, 36(5), 429-441.
- Kruszewski, M., Wojewódzka, M., Iwanenko, T., Collins, A. R., & Szumiel, I. (1998). Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation: II. Base damage. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 416(1), 37-57.
- Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., & Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res*, 711(1-2), 193-201. doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016
- Kulikowska-Karpinska, E., & Czerw, K. (2015). [Estimation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) concentration in the urine of cigarette smokers]. *Wiad Lek*, 68(1), 32-38.
- Kushwaha, S., Vikram, A., Trivedi, P. P., & Jena, G. B. (2011). Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. *Mutat Res*, 726(2), 242-250. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.10.004
-

- Kyparos, A., Vrabas, I. S., Nikolaidis, M. G., Riganas, C. S., & Kouretas, D. (2009). Increased oxidative stress blood markers in well-trained rowers following two thousand-meter rowing ergometer race. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 23(5), 1418-1426.
- Laws, H., Apps, J., UK, D., Bramley, I., Parker, D., & Staff, D. U. (2006). *Fit to Dance 2: Report of the Second National Inquiry Into Dancers' Health and Injury in the UK*: Dance UK.
- Lee, J., Koo, N., & Min, D. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 21-33.
- Lerman, A., Edwards, B. S., Hallett, J. W., Heublein, D. M., Sandberg, S. M., & Burnett Jr, J. C. (1991). Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, 325(14), 997-1001.
- Liao, W., McNutt, M. A., & Zhu, W.-G. (2009). The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48(1), 46-53.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjønneland, A., Overvad, K., & Poulsen, H. E. (1992). Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis*, 13(12), 2241-2247.
- Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4), 840-860.
- Mainwaring, L. M., Krasnow, D., & Kerr, G. (2001). And the Dance Goes On Psychological Impact of Injury. *Journal of Dance Medicine & Science*, 5(4), 105-115.
- Margaritis, I., Tessier, F., Richard, M.-J., & Marconnet, P. (1997). No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *International journal of sports medicine*, 18(3), 186-190.
- Margonis, K., Fatouros, I. G., Jamurtas, A. Z., Nikolaidis, M. G., Douroudos, I., Chatzinikolaou, A., . . . Taxildaris, K. (2007). Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(6), 901-910.
- Marin, D. P., Bolin, A. P., Campoio, T. R., Guerra, B. A., & Otton, R. (2013). Oxidative stress and antioxidant status response of handball athletes: Implications for sport training monitoring. *International immunopharmacology*, 17(2), 462-470.
- Marin, D. P., dos Santos, M., de Cassia, R., Bolin, A. P., Guerra, B. A., Hatanaka, E., & Otton, R. (2011). Cytokines and oxidative stress status following a handball game in elite male players. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011.
- Mastaloudis, A., Yu, T. W., O'Donnell, R. P., Frei, B., Dashwood, R. H., & Traber, M. G. (2004). Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med*, 36(8), 966-975. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.012
- Mihajlović, B., & Mijatov, S. (2002). [Body composition analysis in ballet dancers]. *Medicinski preglod*, 56(11-12), 579-583.
- MOREL, Y., & BAROUKI, R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemical Journal*, 342(3), 481-496.

-
- Morgan, P., Saunders, K., & Lubans, D. (2012). Improving physical self-perception in adolescent boys from disadvantaged schools: psychological outcomes from the Physical Activity Leaders randomized controlled trial. *Pediatric obesity*, 7(3), e27-e32.
- Mota, M. P., Figueiredo, P. A., & Duarte, J. A. (2004). Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista portuguesa de ciências do desporto*, 4(1), 81-110.
- Møller, P. (2006). Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 612(2), 84-104.
- Morel & Barouki (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*. 342: 481-496.
- Negus, V., Hopper, D., & Briffa, N. K. (2005). Associations between turnout and lower extremity injuries in classical ballet dancers. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 35(5), 307-318.
- Orhan, H., van Holland, B., Krab, B., Moeken, J., Vermeulen, N. P., Hollander, P., & Meerman, J. H. (2004). Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free radical research*, 38(12), 1269-1279.
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123(1), 291-298.
- Ostwald, P. F., Baron, B. C., Byl, N. M., & Wilson, F. (1994). Performing arts medicine. *Western journal of medicine*, 160(1), 48.
- Palazzetti, S., Richard, M. J., Favier, A., & Margaritis, I. (2003). Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol*, 28(4), 588-604.
- Pingitore, A., Lima, G. P. P., Mastorci, F., Quinones, A., Iervasi, G., & Vassalle, C. (2015). Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*, 31(7), 916-922.
- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 88(4), 1243-1276. doi:10.1152/physrev.00031.2007
- Prati, S. R. A., & Prati, A. R. C. (2006). Níveis de aptidão física e análise de tendências posturais em bailarinas clássicas. *Rev. bras. cineantropom. desempenho hum*, 8(1).
- Prista, J., & Uva, A. d. S. (2006). A utilização de indicadores biológicos em Saúde Ocupacional. *Revista Portuguesa de Saúde Pública, Lisboa*, 6, 45-54.
- Pryor, W. A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annual Review of Physiology*, 48(1), 657-667.
- Pérez-Cadahía, B., Méndez, J., Pásaro, E., Lafuente, A., Cabaleiro, T., & Laffon, B. (2008). Biomonitoring of human exposure to Prestige oil: Effects on DNA and endocrine parameters. *Environmental health insights*, 2, 83.
- Radak, Z., Chung, H. Y., & Goto, S. (2005). Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology*, 6(1), 71-75.
- Radak, Z., Chung, H. Y., & Goto, S. (2008). Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 153-159.
- Radak, Z., Taylor, A. W., Ohno, H., & Goto, S. (2001). Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exercise immunology review*, 7, 90-107.
-

- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219.
- Reas, D. L., Nygard, J. F., Svensson, E., Sorensen, T., & Sandanger, I. (2007). Changes in body mass index by age, gender, and socio-economic status among a cohort of Norwegian men and women (1990-2001). *BMC Public Health*, 7, 269. doi:10.1186/1471-2458-7-269
- Reichhold, S., Neubauer, O., Bulmer, A. C., Knasmuller, S., & Wagner, K. H. (2009). Endurance exercise and DNA stability: is there a link to duration and intensity? *Mutat Res*, 682(1), 28-38. doi:10.1016/j.mrrev.2009.02.002
- Reichhold, S., Neubauer, O., Ehrlich, V., Knasmüller, S., & Wagner, K.-H. (2008). No acute and persistent DNA damage after an Ironman triathlon. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17(8), 1913-1919.
- Reichhold, S., Neubauer, O., Hoelzl, C., Stadlmayr, B., Valentini, J., Ferk, F., . . . Wagner, K.-H. (2009). DNA damage in response to an Ironman triathlon. *Free radical research*, 43(8), 753-760.
- Rowlands, D. S., Pearce, E., Aboud, A., Gillen, J., Gibala, M., Donato, S., . . . Tarnopolsky, M. (2012). Oxidative stress, inflammation, and muscle soreness in an 894-km relay trail run. *European journal of applied physiology*, 112(5), 1839-1848.
- Rueff, J., Gaspar, J., & Kranendonk, M. (2002). DNA polymorphisms as modulators of genotoxicity and cancer. *Biological chemistry*, 383(6), 923-932.
- Russell, J. A. (2013). Preventing dance injuries: current perspectives. *Open Access J Sports Med*, 4, 199-210. doi:10.2147/oajsm.s36529
- Rydberg, B., & Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. *DNA repair mechanisms*(03), 465-468.
- Sardinha, L. B., Santos, D. A., Silva, A. M., Coelho-e-Silva, M. J., Raimundo, A. M., Moreira, H., . . . Mota, J. (2012). Prevalence of overweight, obesity, and abdominal obesity in a representative sample of Portuguese adults. *PLoS One*, 7(10), e47883.
- Schantz, P. G., & Astrand, P. O. (1984). Physiological characteristics of classical ballet. *Med Sci Sports Exerc*, 16(5), 472-476.
- Scialom, M., Gonçalves, A., & Padovani, C. R. (2006). Work and injuries in dancers. *Med Probl Perform Art*, 21(1), 29-33.
- Serrano, E., Venegas, C., Escames, G., Sánchez-Muñoz, C., Zabala, M., Puertas, A., . . . Acuna-Castroviejo, D. (2010). Antioxidant defence and inflammatory response in professional road cyclists during a 4-day competition. *Journal of sports sciences*, 28(10), 1047-1056.
- Shadab, M., Islam, N., Khan, Z., Khan, F., & Mobarak, M. (2014). Oxidative Stress in Sports Persons after a bout of Intense Exercise: A Cross Sectional Study. *Biomedical Research*, 25(3), 387-390.
- Shah, S. (2008). Caring for the dancer: special considerations for the performer and troupe. *Current sports medicine reports*, 7(3), 128-132.
- Shahar, S., Shafurah, S., Hasan Shaari, N. S., Rajikan, R., Rajab, N. F., Golkhalkhali, B., & Zainuddin, Z. M. (2011). Roles of diet, lifetime physical activity and oxidative DNA damage in the occurrence of prostate cancer among men in Klang Valley, Malaysia. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(3), 605-611.
- Shan, X., Aw, T. Y., & Jones, D. P. (1990). Glutathione-dependent projection against oxidative injury. *Pharmacology & therapeutics*, 47(1), 61-71.

-
- Shaposhnikov, S., Azqueta, A., Henriksson, S., Meier, S., Gaivao, I., Huskisson, N. H., . . . Collins, A. R. (2010). Twelve-gel slide format optimised for comet assay and fluorescent in situ hybridisation. *Tóxicol Lett*, *195*(1), 31-34. doi:10.1016/j.toxlet.2010.02.017
- Shing, C. M., Peake, J. M., Ahern, S. M., Strobel, N. A., Wilson, G., Jenkins, D. G., & Coombes, J. S. (2007). The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, *32*(4), 677-685.
- Silva, J. R., Rebelo, A., Marques, F., Pereira, L., Seabra, A., Ascensão, A., & Magalhães, J. (2013). Biochemical impact of soccer: an analysis of hormonal, muscle damage, and redox markers during the season. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, *39*(4), 432-438.
- Sjödin, B., Westing, Y. H., & Apple, F. S. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Medicine*, *10*(4), 236-254.
- Smolka, M. B., Zoppi, C. C., Alves, A. A., Silveira, L. R., Marangoni, S., Pereira-Da-Silva, L., . . . Macedo, D. V. (2000). HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *279*(5), R1539-R1545.
- Soares, J. P., Silva, A. M., Oliveira, M. M., Peixoto, F., Gaivão, I., & Mota, M. P. (2015). Effects of combined physical exercise training on DNA damage and repair capacity: role of oxidative stress changes. *AGE*, *37*(3), 1-12.
- Solomon, R., Solomon, J., Micheli, L. J., & McGray Jr, E. (1999). The 'cost' of injuries in a professional ballet company. *Med Probl Perform Art*, *14*(4), 164.
- Strassel, J. K., Cherkin, D. C., Steuten, L., Sherman, K. J., & Vrijhoef, H. J. (2011). A systematic review of the evidence for the effectiveness of dance therapy. *Altern Ther Health Med*, *17*(3), 50-59.
- Teixeira, J. P., Gaspar, J., Silva, S., Torres, J., Silva, S. N., Azevedo, M. C., . . . Rueff, J. (2004). Occupational exposure to styrene: modulation of cytogenetic damage and levels of urinary metabolites of styrene by polymorphisms in genes CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1. *Tóxicology*, *195*(2-3), 231-242.
- Timbrell, J. A. (1998). Biomarkers in toxicology. *Tóxicology*, *129*(1), 1-12.
- Tonkonogi, M., & Sahlin, K. (2002). Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. *Exercise and sport sciences reviews*, *30*(3), 129-137.
- Trevisan, P. R. T. d. C., & Schwartz, G. M. (2012). Análise da produção científica sobre capacidades físicas e habilidades motoras na dança.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, *39*(1), 44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Vollaard, N. B., Shearman, J. P., & Cooper, C. E. (2005). Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med*, *35*(12), 1045-1062.
- Wagner, K. H., Reichhold, S., Holzl, C., Knasmuller, S., Nics, L., Meisel, M., & Neubauer, O. (2010). Well-trained, healthy triathletes experience no adverse health risks regarding oxidative stress and DNA damage by participating in an ultra-endurance event. *Tóxicology*, *278*(2), 211-216. doi:10.1016/j.tox.2009.09.006
- Wagner, K. H., Reichhold, S., & Neubauer, O. (2011). Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage. *Ann N Y Acad Sci*, *1229*, 115-123. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06106.x
-

- Wallace, S. S. (2002). Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med*, 33(1), 1-14.
- Warburton, D. E., Nicol, C. W., & Bredin, S. S. (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *Canadian medical association journal*, 174(6), 801-809.
- WHO. (1989). Formaldehyde.
- WHO. (2010). *Global recommendations on physical activity for health*.
- Wiernsperger, N. (2003). Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes & metabolism*, 29(6), 579-585.
- Wu, L. L., Chiou, C. C., Chang, P. Y., & Wu, J. T. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*, 339(1-2), 1-9.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 74(1), 139-162.
- Wagner, M. B. (1998). Medindo a ocorrência de doença: prevalência ou incidência? *Jornal de Pediatria: Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Vol. 74, n. 2 (abr. 1998), p. 157-62.*

8 ANEXOS

8.1 Questionário aplicado ao grupo controlo

QUESTIONÁRIO

A) CARATERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA

1. Ano de nascimento: ____/____/____
2. Sexo: Feminino Masculino
3. Peso: _____ Altura: _____

B) CARATERIZAÇÃO DO ESTILO DE VIDA E SAÚDE

4. Fumador: SIM NÃO Ocasionalmente
 5. Consome álcool? SIM NÃO Ocasionalmente
 6. A sua alimentação é à base de uma dieta saudável?
 SIM NÃO
 7. Faz alguma medicação?
 SIM NÃO
 8. Sofre algum problema de saúde?
 SIM NÃO
 - 8.1. Se sim qual?
-

9. Regularidade com que pratica exercício:
 Nunca Raramente

OBRIGADA PELA SUA COLABORAÇÃO!

Filipa Esteves
Aluna do Mestrado em Engenharia de Higiene e Segurança Ocupacionais

8.2 Questionário aplicado aos bailarinos⁵

QUESTIONÁRIO

C) CARATERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA

10. Ano de nascimento: ____/____/____

11. Sexo: Feminino Masculino

12. Peso: _____ Altura: _____

D) CARATERIZAÇÃO DO ESTILO DE VIDA E SAÚDE

13. Fumador: SIM NÃO Ocasionalmente

14. A sua alimentação é à base de uma dieta saudável?
 SIM NÃO

15. Faz alguma medicação?
 SIM NÃO

16. Sofre algum problema de saúde?
 SIM NÃO

16.1. Se sim qual?

17. Há quantos anos pratica bailado? _____

OBRIGADA PELA SUA COLABORAÇÃO!

⁵ O questionário aplicado ao grupo dos bailarinos foi administrado por outra parte envolvida neste projeto (FADEUP).