

O treino intensivo pode levar ao aumento de dano oxidativo no ADN em bailarinos profissionais?

Can intensive physical exercise increase DNA oxidative damage among professional dancers?

Filipa Esteves^{1,2,3}, Eduardo Teixeira⁴, Tânia Amorim⁴, Carla Costa^{1,2,3}, Joana Madureira^{1,2,3}, João Paulo Teixeira^{1,2,3}, Solange Costa^{1,2,3}

filipa.esteves@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(2) Unidade de Investigação em Epidemiologia. Instituto de Saúde Pública, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(3) Laboratório para a Investigação Integrativa e Translacional em Saúde Populacional, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(4) Centro de Investigação em Actividade Física, Saúde e Lazer. Faculdade de Desporto, Universidade do Porto, Porto, Portugal

_Resumo

A prática de exercício físico é imprescindível para a manutenção de um estilo de vida saudável. No entanto, quando praticado acima de uma determinada intensidade e duração, este pode levar à produção excessiva de espécies reativas de oxigénio e consequentemente à indução de *stress* oxidativo; este, por sua vez, pode desencadear alterações em diversas estruturas biológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar o dano oxidativo no ADN em bailarinos da Companhia Nacional de Bailado antes e depois da temporada de bailado (setembro a julho). A população de estudo consistiu num total de 28 participantes: 14 bailarinos profissionais e 14 indivíduos da população geral (grupo controlo). O dano primário e o dano oxidativo no ADN foram avaliados em amostras de sangue total através do teste do cometa. Os resultados obtidos revelam um aumento significativo do dano oxidativo no ADN após a temporada de bailado ($p < 0.001$; 1.1 ± 0.2 para 4.7 ± 0.7). Os níveis de dano oxidativo no ADN avaliados antes do início da temporada de bailado não mostraram diferenças significativas em relação ao grupo controlo ($p > 0.05$; 1.1 ± 0.2 vs 2.2 ± 0.5 , respetivamente). Os resultados deste estudo reforçam a necessidade da implementação de medidas por forma a mitigar o risco ocupacional afeto à prática de exercício físico intensivo nestes profissionais.

_Abstract

Despite the numerous health benefits of physical activity, some studies reported that increased intensity and duration may induce oxidative stress in several cellular components. The aim of this study was to evaluate the DNA oxidative damage among a group of professional dancers from the National Ballet Company of Portugal, before and after a ballet season (September to July). The study population consisted of a total of 28 subjects: 14 professional dancers and 14 control subjects from the general population. To quantify the DNA damage among ballet dancers, blood samples were taken before and after the dancing season. The technique used in the present study to investigate the primary DNA damage and the oxidative DNA damage was the comet assay. The levels of oxidative DNA damage in dancers were significantly increased after the ballet season ($p < 0.001$; 1.1 ± 0.2 to 4.7 ± 0.7). Pre-season levels of

oxidative DNA damage did not significantly differ from obtained in the general population ($p > 0.05$; 1.1 ± 0.2 vs 2.2 ± 0.5 , respectively). Results of the present biomonitoring study indicate the need for more effective measures to protect ballet dancers from potential occupational health risks related to regular intensive physical exercise.

_Introdução

É consensual que a prática de exercício físico acarreta múltiplos benefícios para a saúde. Porém, o exercício físico – acima de uma determinada intensidade e duração – favorece a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) que, ao não serem neutralizadas pelo sistema antioxidante, resultam em *stress* oxidativo (1). Este, por sua vez, pode induzir danos em diversas macromoléculas tais como proteínas, lípidos e ADN (2). Estudos referem que o *stress* oxidativo está associado a várias patologias como a diabetes, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e cancro (2). Neste sentido, vários trabalhos têm avaliado indicadores de *stress* oxidativo em atletas de diversas modalidades (ex., atletismo, andebol, futebol, basquetebol) (3-5), avaliando o impacto de um treino (3-6) ou até mesmo de uma temporada desportiva (6).

Os bailarinos profissionais, além de artistas, são considerados atletas (7) devido ao elevado grau de exigência física da sua atividade (8,9). No contexto de saúde ocupacional, encontram-se, fundamentalmente, estudos que relacionam esta atividade com o risco de lesões músculo-esqueléticas (9), mas poucos analisaram o impacto do *stress* oxida-



tivo associado à prática de *ballet* (10), e até à data nenhum avaliou o efeito de uma temporada de bailado nos níveis de dano primário e oxidativo do ADN.

_Objetivo

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar os efeitos do *stress* oxidativo – associado à prática de bailado - no ADN de bailarinos profissionais da Companhia Nacional de Bailado de Portugal. Para tal, analisou-se o dano no ADN, primário e oxidativo, antes e após uma temporada de bailado, comparando os níveis de dano com um grupo controlo.

_Métodos

A população de estudo consistiu num total de 28 indivíduos composta por bailarinos profissionais da Companhia Nacional de Bailado (CNB) (n=14) e uma população controlo (n=14), constituída por indivíduos saudáveis com características sociodemográficas semelhantes ao grupo em estudo, trabalhadores do sector terciário (tabela 1). As categorias referentes ao Índice de Massa Corporal (IMC) apresentam-se de acordo com as classes definidas pela Organização Mundial de Saúde (11).

A avaliação decorreu na temporada de bailado 2014/2015 que teve a duração de 10 meses, com treinos de 5 dias/semana e 8 horas/dia e espetáculos durante o fim-de-semana. O tipo de dança destes profissionais recai sobre dança clássica e contemporânea.

Todos os indivíduos que aceitaram participar neste estudo foram informados dos objetivos do mesmo. Após manifestado o seu consentimento informado por escrito, responderam a um questionário autoadministrado visando a avaliação de fatores demográficos e estilos de vida. O estudo foi submetido à Comissão de Ética e desenvolvido de acordo com a Declaração de Helsínquia e a Convenção de Oviedo.

No que respeita aos hábitos tabágicos, 24 participantes reportaram ser não fumadores; os restantes (n=4, pertencentes ao grupo dos bailarinos) referiram ter cessado há mais de três anos e foram considerados ex-fumadores (resultados não apresentados). Nos bailarinos, as colheitas de sangue foram realizadas antes (setembro 2014) e imediatamente após o término da temporada de bailado (julho 2015); as amostras de sangue dos indivíduos controlo foram colhidas ao longo da temporada de bailado. Após colheita, as amostras de sangue foram imediatamente transportadas até ao laboratório (30 min – 1h) nas

Tabela 1: Caracterização geral da população de estudo.

	Controlo (n=14)	Bailarinos (n=14)
Sexo		
Feminino	11 (78,6%)	11 (78,6%)
Masculino	3 (21,4%)	3 (21,4%)
Idade (anos) ^a	39.4 ± 8.6 (24.0 – 57.0)	32.5 ± 6.34 (22.0 – 42.0)
IMC (kg/m ²) ^a	25.2 ± 4.4 (19.0 – 33.0)	19.3 ± 2.8 (15.0 – 26.0)*
Baixo peso (>18.5 kg/m ²)	–	5 (35,7%)
Peso normal (18.5 – 24.9 kg/m ²)	9 (64,3%)	8 (57,1%)
Excesso peso (25.5 – 29.9 kg/m ²)	3 (21,4%)	1 (7,1%)
Obeso (>30.0 kg/m ²)	2 (14,3%)	–
Anos de prática ^a	–	21.2 ± 8.2 (2.0 – 33.0)

^a média ± desvio padrão (min. – max.); IMC – índice de Massa Corporal.

* $p < 0.05$, Teste t-Student.



devidas condições de refrigeração (4°C). Para efeitos de criopreservação do sangue, adicionou-se uma solução de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) a 80% (pH 7.2) e dimetilsulfóxido (DMSO) a 20%. As amostras de sangue total com solução de criopreservação foram armazenadas a -80°C para posterior análise.

O dano genético, primário e oxidativo, foi avaliado através do teste do cometa realizado de acordo com Singh, *et al.* (12) com algumas alterações (13). Os níveis de dano oxidativo no ADN foram obtidos via incubação com a endonuclease formamidopirimidina-ADN glicosilase (FPG) para a deteção de purinas oxidadas (14). A quantificação do dano foi efetuada através do programa *Comet Assay IV – Instem*; o parâmetro usado foi a percentagem de ADN na cauda (% TDNA). A descrição geral da população do estudo foi realizada através de análise univariada. As variáveis dependentes (dano primário e dano oxidativo no ADN) não seguiram uma distribuição normal e por isso utilizaram-se testes não paramétricos, nomeadamente o teste de Wilcoxon (amostras emparelhadas; antes vs após temporada de bailado) e Man-Whitney (amostras independentes; grupo controlo vs bailarinos).

Para verificar a associação entre os biomarcadores e as outras variáveis contínuas foi utilizada a correlação de Spearman. Na análise estatística dos resultados foi utilizado o IBM SPSS *Statistics 22 software*® e estipulado um nível de significância de 0.05.

_Resultados

Pela análise dos resultados (tabela 2) é possível observar que, no que concerne ao dano primário no ADN, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos do grupo controlo e os bailarinos, quer antes ou após a temporada. O mesmo resultado foi observado no grupo dos bailarinos, quando comparados os valores obtidos antes e após a temporada de bailado.

No entanto, foi observado um aumento significativo nos níveis de dano oxidativo entre o grupo controlo e os valores obtidos nos bailarinos após temporada.

Os níveis de dano oxidativo após temporada de bailado também se revelaram superiores aos níveis avaliados no período antes da temporada. Em contrapartida, não se verificou qualquer diferença entre os níveis de dano oxidativo avaliados antes da temporada (período de pausa) e o grupo controlo.

Nos bailarinos, embora não se tenha verificado qualquer correlação entre o número de anos de prática de *ballet* e o dano no ADN (tanto primário como oxidativo), observou-se uma correlação negativa ($r = -0.6$) estatisticamente significativa ($p = 0.04$) entre a idade e o dano primário no ADN avaliado após o término da temporada (resultados não apresentados). Não foi observado efeito do sexo e hábitos tabágicos (bailarinos não fumadores vs bailarinos ex-fumadores) nos níveis dos de dano genético determinados.

Tabela 2: Valores médios (\pm erro padrão) dos níveis de dano primário e oxidativo no ADN, encontrados no grupo controlo e bailarinos (antes e após a temporada).

	Controlo		Bailarinos		
	N	Média \pm EP	Antes Temporada		Após Temporada
			N	Média \pm EP	Média \pm EP
Dano primário (% TDNA)	14	5.2 \pm 0.3	14	6.1 \pm 0.5	6.5 \pm 0.6
Dano oxidativo (% TDNA)	14	2.2 \pm 0.5 ^a	14	1.1 \pm 0.2 ^b	4.7 \pm 0.7 ^{ab}

EP = Erro Padrão; ^a Significativamente diferente dos valores médios do grupo controlo; teste Man-Whitney.

^b Significativamente diferente dos valores médios antes da temporada; teste de Wilcoxon. * $p < 0.05$



_Discussão

Os dados deste estudo revelam que os bailarinos profissionais da CNB apresentaram um aumento do dano oxidativo no ADN após a temporada de bailado 2014/2015. Estes resultados estão em linha com outros estudos que avaliaram o impacto de uma temporada desportiva nos níveis de *stress* oxidativo de atletas (4-5). Silva, *et al.* (5), por exemplo, observou um aumento significativo nos níveis urinários de malondialdeído (MDA), indicador de *stress* oxidativo, num grupo de jogadores de futebol durante e imediatamente após a temporada. Os mesmos autores verificaram ainda que estes valores diminuíram no período de férias (antes do início da nova temporada). Esta tendência para um equilíbrio redox após um período de pausa também se verificou no presente estudo, uma vez que os níveis de dano oxidativo avaliados antes da temporada de bailado não diferiram significativamente do grupo controlo. Além destes resultados, verificou-se ainda uma associação negativa entre o dano primário no ADN (após a temporada de bailado) dos bailarinos e a idade, no entanto a influência da idade nos indicadores do teste do cometa ainda não é consensual. Apesar de alguns autores terem observado um aumento do dano primário no ADN com a idade (15), outros não verificaram qualquer influência deste parâmetro (16).

A diferença do IMC observada entre bailarinos vs grupo controlo ($p < 0.05$) pode ser explicada pela prática de exercício físico regular (17). De acordo com Santos, *et al.* (18) os bailarinos tendem a procurar diminuir o seu peso corporal de forma a facilitar determinados movimentos de dança.

Este estudo teve algumas limitações, nomeadamente no número limitado de participantes e a falta de outras informações, como a dieta. De referir, no entanto, que foi estudada cerca de 30% da população de bailarinos profissionais da CNB e que este estudo é pioneiro no que refere à avaliação de uma temporada de bailado nos níveis de dano primário e oxidativo no ADN.

_Conclusão

Os bailarinos profissionais são considerados atletas e artistas com elevadas exigências físicas. No presente estudo verificou-se um aumento significativo dos níveis de dano oxidativo no ADN em bailarinos profissionais após a temporada de bailado comparativamente aos níveis de dano avaliados antes da mesma.

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 homeostasia. Através deste trabalho, constatou-se que os níveis de dano oxidativo no ADN antes da época de bailado não diferiram significativamente dos níveis avaliados no grupo-controlo (população geral), apontando para um declínio dos níveis de dano oxidativo após o período de descanso destes profissionais (~2 meses).

Os resultados aqui obtidos reforçam a necessidade de estudos futuros e da implementação de medidas preventivas que visem mitigar os impactos negativos afetos à prática desta atividade.

Referências bibliográficas:

- (1) Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, et al. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. 2015 Jul-Aug;31(7-8):916-22. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.02.005>
- (2) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- (3) Rowlands DS, Pearce E, Aboud A, et al. Oxidative stress, inflammation, and muscle soreness in an 894-km relay trail run. *Eur J Appl Physiol*. 2012 May;112(5):1839-48. <https://doi.org/10.1007/s00421-011-2163-1>. Epub 2011 Sep 16
- (4) Marin DP, Bolin AP, Campoio TR, et al. Oxidative stress and antioxidant status response of handball athletes: implications for sport training monitoring. *Int Immunopharmacol*. 2013 Oct;17(2):462-70. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.07.009>
- (5) Silva JR, Rebelo A, Marques F, et al. Biochemical impact of soccer: an analysis of hormonal, muscle damage, and redox markers during the season. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2014 Apr;39(4):432-8. <https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0180>. Epub 2013 Oct 28.
- (6) Chatzinikolaou A, Draganidis D, Avloniti A, et al. The microcycle of inflammation and performance changes after a basketball match. *J Sports Sci*. 2014;32(9):870-82. <https://doi.org/10.1080/02640414.2013.865251>
- (7) Rodrigues-Krause J, Krause M, Cunha Gdos S, et al. Ballet dancers cardiorespiratory, oxidative and muscle damage responses to classes and rehearsals. *Eur J Sport Sci*. 2014;14(3):199-208. <https://doi.org/10.1080/17461391.2013.777796>. Epub 2013 May 17.
- (8) Allen N, Nevill A, Brooks J, et al. Ballet injuries: injury incidence and severity over 1 year. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2012 Sep;42(9):781-90. <https://doi.org/10.2519/jospt.2012.3893>



- (9) Azevedo A, Oliveira R, Fonseca J. Lesões no sistema músculo-esquelético em bailarinos profissionais em Portugal, na temporada 2004/2005. *Rev Port Fisioterapia no Desporto*. 2007;1(1):32-7.
- (10) Borges Lda S, Bortolon JR, Santos VC, et al. Chronic inflammation and neutrophil activation as possible causes of joint diseases in ballet dancers. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:846021. <https://doi.org/10.1155/2014/846021>
- (11) World Health Organization. A healthy lifestyle - WHO recommendations: Body mass index - BMI [online]. [consult. 20/10/2022]. <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/a-healthy-lifestyle---who-recommendations>
- (12) Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar;175(1):184-91. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- (13) Costa S, Coelho P, Costa C, et al. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology*. 2008 Oct 30;252(1-3):40-8. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.07.056>
- (14) Azqueta A, Collins AR. The Comet Assay: High Throughput Use of FPG. In: Sierra L, Gaivão I (eds). *Genotoxicity and DNA Repair. Methods in Pharmacology and Toxicology*. New York NY, Humana Press, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1068-7_12
- (15) Møller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res*. 2006 Mar;612(2):84-104. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.10.001>. Epub 2005 Nov 28.
- (16) Londoño-Velasco E, Martínez-Perafán F, Carvajal-Varona S, et al. Assessment of DNA damage in car spray painters exposed to organic solvents by the high-throughput comet assay. *Toxicol Mech Methods*. 2016 May;26(4):238-42. <https://doi.org/10.3109/15376516.2016.1158892>
- (17) Koutedakis Y, Jamurtas A. The dancer as a performing athlete: physiological considerations. *Sports Med*. 2004;34(10):651-61. <https://doi.org/10.2165/00007256-200434100-00003>
- (18) Santos JA, Amorim T. Desafios nutricionais de bailarinos profissionais. *Rev Port Ciências do Desporto*. 2014;14(1). https://rpcd.fade.up.pt/_arquivo/artigos_soltos/2014-1/07.pdf