



**Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica**

Zair Candido de Oliveira Netto

**ESTUDO MOLECULAR DOS GENES ALFA ACTININA 3 E ECA I/D EM
ATLETAS DE ESPORTES DE COMBATE, ARTES MARCIAIS E LUTAS DE
ALTO RENDIMENTO – ÊNFASE EM LUTA DE PERCUSSÃO**

Dissertação – Mestrado

**Curitiba
2014**

ZAIR CÂNDIDO DE OLIVEIRA NETTO

**ESTUDO MOLECULAR DOS GENES ALFA ACTININA 3 E ECA I/D EM ATLETAS
DE ESPORTES DE COMBATE, ARTES MARCIAIS E LUTAS DE ALTO
RENDIMENTO – ÊNFASE EM LUTA DE PERCUSSÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Bassan

Co-orientação: Prof. Dr. Bertoldo Schneider Júnior

CURITIBA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

O48e
2014 Oliveira Netto, Zair Candido de
Estudo molecular dos genes alfa actinina 3 e ACE I/D em
atletas de esportes de combate, artes marciais e alto rendimento
: ênfase em luta de percussão / Zair Cândido de Oliveira Netto
.-- 2014.
52 f.: il.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Biomédica, Curitiba, 2014.
Bibliografia: f. 38-44.

1. Genes - Pesquisa. 2. Genótipo. 3. Atletas - Genética
molecular. 4. Aptidão física do atleta. 5. Combate (Esporte). 6.
Artes marciais. 7. Luta (Esporte). 8. Esportes - Aspectos
fisiológicos. 9. Engenharia biomédica - Dissertações. I. Bassan,
Júlio Cesar, orient. II. Schneider Junior, Bertoldo, coorient.
III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de
Pós-graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

CDD 22 -- 610.28

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba



Universidade Tecnológica Federal do
Paraná Campus Curitiba



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA BIOMÉDICA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação Nº (Número)

**ESTUDO MOLECULAR DOS GENES ALFA ACTININA 3 E ACE I/D EM ATLETAS
DE ESPORTES DE COMBATE, ARTES MARCIAIS E LUTAS DE ALTO
RENDIMENTO – ÊNFASE EM LUTA DE PERCUSSÃO**

por

Zair Candido de Oliveira Netto

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de **MESTRE EM CIÊNCIAS (M.Sc.)**, com área de concentração em Engenharia Biomédica, pelo **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica (PPGEB)**, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (**UTFPR**), *Campus Curitiba*, às 16h00min do dia 17 de Novembro de 2014. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo citados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Júlio Cesar Bassan
(Presidente/UTFPR)

Prof. Dr. Fabiano de Macedo Salgueirosa
(UTP)

Prof. Dr. Ricardo Cunha
(UP)

Prof. Dr. Júlio Cesar Bassan
(UTFPR) - Orientador

Prof. Dr. Eloy Izquierdo Rodriguez
(Universidad de Valência)

Prof. Dr. Bertoldo Schneider Jr (UTFPR)
Coordenador do PPGEB

Visto da Coordenação

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a minha esposa Sandra Moreira Oliveira, incentivadora e apoiadora incondicional em todos os desafios da vida.

As minhas filhas, Fernanda e Paula Oliveira instigam o aprimoramento da excelência profissional.

Aos meus pais Luiz Fernando e Zeila Oliveira por acreditarem nos meus objetivos.

Ao professor e orientador Júlio Cesar Bassan, visionário e íntegro em suas ponderações, incentivador da pesquisa e na postura profissional. Agradeço pela oportunidade única oferecida na Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Ao Professor Marcelo Romanovitch Ribas, colega de laboratório e estudos. Agradeço sua paciência e persistência na busca de nossos objetivos.

Aos amigos professores que apoiaram e auxiliaram na busca da minha qualificação profissional.

RESUMO

OLIVEIRA NETTO, Zair Candido. **Estudo molecular dos genes alfa actinina 3 e ACE I/D em atletas de esportes de combate, artes marciais e alto rendimento – ênfase em luta de percussão** (Dissertação) programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2014.

Os fatores genéticos e o meio ambiente são pontos relevantes no que tange a capacidade física do ser humano. O objetivo deste estudo foi avaliar o genótipo dos genes, ACTN3 e da ACE I/D, em lutadores de alto rendimento na modalidade de percussão. Neste estudo fizeram parte do conjunto amostral 15 atletas de alto rendimento da esportes de combate e arte marcial, sendo sendo 6 lutadores de Karatê, 4 lutadores de Taekwondo, 4 lutadores de Muay Thai e 1 lutador de Boxe, todos do sexo masculino com idade média de 25,06 anos, com experiência nacional e internacional em suas respectivas modalidades e categorias de peso. A genotipagem dos polimorfismos do ACTN3 e ACE I/D foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA genômico. As frequências genotípicas e alélicas foram comparadas com populações controle e de atletas pelos testes do Qui-Quadrado, e exato de Fisher, para todas as análises foi adotado $p < 0,05$. Os resultados obtidos para as frequências genotípicas e alélicas do ACTN3 (RR=35,71%,RX=57,14% e XX=7,14%; R=64,28% e X=33,71%) e do ACE I/D (DD=30,76%, ID=50,84% e II=15,36%; D=65,2% e I=34,8%) não diferiram significativamente da população controle e com estudos relacionados a força. Em conclusão os dados da presente pesquisa seguem os padrões esperados para população no que tange a frequência genotípicas e em sua distribuição alélica nos genes da ACTN3 e da ACE I/D com lutadores de percussão.

Palavras-chave: Luta de percussão. α actinina. Enzima conversora de angiotensina.

ABSTRAT

OLIVEIRA NETTO, Zair Candido. **Molecular study of genes alpha actinin 3 and ACE I / D in athletes of combat sports, martial arts and high performance - emphasis on percussion fight** (Dissertação) programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2014.

Genetic factors and the environment are relevant points regarding the physical capacity of the human being. The objective of this study was to evaluate the genotype of genes, ACTN3 and ACE I / D with fighters in high yield in the form of percussion. In this study were part of the sample set of 15 high-level athletes in combat sports and martial arts, 6 fighters from Karate, 4 fighters Taekwondo, 4 fighters Muay Thai and 1 boxing. All fighters being present, all males with average age of 25.06 years with national and international experience in their respective weight classes and methods. Genotyping of polymorphisms of ACTN3 and ACE I / D was performed by polymerase chain reaction (PCR) chain from the genomic DNA. The genotypic and allelic frequencies were compared with control populations and athletes by *Qui-Quadrado* and Fisher exact tests for all analyzes was adopted $P=0.05$. The results obtained for genotypic and allelic frequencies of ACTN3 (RR = 35.71%, 57.14% and RX = XX = 7.14%; R = X = 64.28% and 33.71%) and ACE I / D (DD = 30.76%, 50.84% and ID = II = 15.36%; D = I = 65.2% and 34.8%) did not differ significantly from the control population e power sports In conclusion the data of this study follow the expected population in relation to genotypic and allelic frequency distribution in the ACTN3 gene and ACE I / D fighters of percussion.

keywords: Percussion fight. α actinin. Angiotensin converting enzyme

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Identificação do sarcômero.	21
Figura 2 - Determinação visual de análise em gel de agarose para ACTIN3.....	31
Figura 3 - Determinação visual de análise em gel de agarose para ACE.	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Indicador utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene ACTN3	30
Quadro 2 - Indicador utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene ACE	31
Quadro 3 - Indicador específico utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene ACE	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição genotípica do gene ACTN3 dos 14 atletas de percussão	34
Tabela 2 - Distribuição alélica do gene ACTN3 dos 14 atletas de percussão	35
Tabela 3 - Distribuição genotípica do gene ACE I/D dos 13 atletas de percussão.....	36
Tabela 4 - Distribuição alélica do gene ACE I/D dos 13 atletas de percussão	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTN3	Alfa actinina 3
α	Letra grega alfa
AT1R	Angiotensina do tipo 1
AT2R	Angiotensina do tipo 2
β	Letra grega beta
BK 1 R	Bradicinina tipo receptor-1
BK 2 R	Bradicinina tipo receptor-2
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês deoxyribonucleic acid)
ACE	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EPO	Eritropoietina
GH	Growth hormone
IGF-1	Insuline-like growth factor
μ L	microlitro
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPAR δ	Peroxisome proliferator activated receptor delta
RTIs	Repetições terminais invertidas
SRA	Sistema renina-angiotensina
TBE	solução base de Trisborato-EDTA
TGF β	Transforming growth fator β
VEGF	Fator de crescimento epitelial vascular
VEFG	Vascular endotelial growth factor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. PROBLEMA.....	16
2.1 Ojetivos.....	16
2.1.1Objetivo Geral	16
2.2.2Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1Classificação das artes marciais.....	16
3.2Demandas fisiológicas dos esportes de combate de percussão	17
3.3A Genética e a <i>performance</i> física.....	18
3.4Sistema renina-angiotensina	19
3.5Sistema metabólico relacionado ao gene ACE I/D.....	19
3.6Sistema muscular relacionado ao gene alfa actinina 3.....	21
3.7 <i>Doping</i> genético	23
3.7.1 PPAR δ Gene Potencial.....	24
3.7.2VEFG Gene Potencial.....	25
3.7.3 IGF-1 e GH Genes Potenciais.....	25
3.7.4 EPO – Gene Potencial.....	26
3.7.5 Miostatina Gene Potencial.....	26
4. METODOLOGIA	28
4.1Tipo de Estudo.....	27
4.2Local	28
4.3População e Amostra.....	28
4.4 Critérios de Inclusão	28
4.5 Critérios de Exclusão	28
4.6 Delineamento Experimental	28
4.7 Procedimentos.....	29
4.7.1 Coleta Sanguínea	29
4.7.2 Extração do DNA Genômico dos atletas.....	29
4.7.3 Genotipagem do polimorfismo R577X no gene ACTN3.....	30

4.7.4 Genotipagem do polimorfismo I/D do íntron 16 do gene da ACE	31
4.8 Gel de Agarose	33
4.9 Aconselhamento Genético e acompanhamento Clínico.....	33
4.10 Análise Estatística.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE A Termo de consentimento Livre e Esclarecido.....	45
ANEXO A Parecer de aprovação	49

1. INTRODUÇÃO

O treinamento esportivo é um foco de pesquisa constante, tem sido alvo intenso de várias pesquisas até a atualidade, sempre focando o objetivo de buscar novos conhecimentos e metodologias que proporcionem o aumento e a qualidade do desempenho físico de atletas das mais diversas modalidades esportivas. Este processo de estudo tem por objetivo fomentar as descobertas das várias áreas do treinamento esportivo, como: os sistemas energéticos, processos neuromotores, alterações fisiológicas, movimentos biomecânicos, formulas nutricionais e também no segmento de psicológico.

Embora a tríade, treinamento, nutrição e fatores psicológicos, sejam contribuintes importantes para o sucesso atlético (OSTRANDER; HUSON; OSTRANDER, 2009), (MYBURGH, 2003) (JEUKENDRUP; CRONIN, 2011) foi verificado ao longo dos anos que tais fatores são insuficientes para caracterizar um fenótipo de status de desempenho físico em humanos (DIAS et al., 2007). Talvez, a capacidade que alguns indivíduos apresentam em se sobressaírem em suas modalidades esportivas pode estar relacionada à predisposição genética e não apenas condicionadas a tais fatores ((YAMADA, 2010) (STEWART; RITTWEGGER, 2006).

Por meio da genética no esporte é possível identificar os atletas com a fisiologia necessária para responder ou adaptar-se ao treinamento com menores chances de sofrerem lesões (LIPPI; LONGO; MAFFULLI, 2010). O atual mapa genético humano apresenta uma lista de mais de 200 genes candidatos a alta *performance* e suas regiões genéticas associadas com o desempenho físico humano, o exercício e a saúde (BRAY et al., 2003). De todos estes, dois genes candidatos e seus polimorfismos serão objeto de interesse neste estudo, devido aos seus polimorfismos ou mutações estarem relacionados com o aumento dos níveis de força e velocidade, dentre eles estarão: alfa actinina 3 (ACTN3) e enzima conversora de angiotensina (ACE).

Em relação à alfa actinina 3 (ACTN3), a proteína está relacionada a um melhor desempenho em atividades que exigem velocidade (NORMAN et al., 2009). No entanto a presença do seu polimorfismo R577X leva indivíduos homocigotos a não produzirem a proteína alfa actinina 3 no músculo esquelético, ocasionando a

diminuição de massa muscular em se tratando de fibras do tipo II (MACARTHUR et al., 2008), (CRISTINA et al., 2014) e (CHAN et al., 2008). Em estudos com a população europeia, aproximadamente 18% da população é homocigota para o alelo X, estimando-se mais de 1 bilhão de pessoas no mundo (MILLS et al., 2001a), porém esta mutação na alfa actinina 3 não parecer ser considerada uma patologia em função da alfa actinina 2 suprir esta deficiência na atividade muscular. No que tange o gene da enzima conversora de angiotensina (ACE) e seu polimorfismo I /D estarem atraído considerável atenção a respeito de sua associação com o desempenho físico humano. Estudos recentes demonstraram que o alelo I é mais frequente em atletas de resistência, enquanto que o alelo D, em atletas de força e explosão muscular (JONES; MONTGOMERY; WOODS, 2002).

A partir de tal constatação, surgiu o interesse pela predisposição genética, e sua influência para o desempenho esportivo, que pode levar certos indivíduos a se sobressair em suas modalidades esportivas específicas, bem como a possibilidade de detectar talento nas categorias de iniciação. Os testes genéticos no esporte permitem identificar os indivíduos com a fisiologia e morfologia ideal apresentando assim, uma capacidade de responder ou adaptar-se ao treinamento com menores chances de sofrerem de lesões (LIPPI; LONGO; MAFFULLI, 2010).

Estudos realizados no período pós-genoma, sobre genética e qualidades físicas tem demonstrado a confiabilidade de marcadores genéticos moleculares para prognóstico do desempenho físico humano. Porém, faz-se necessário uma acuidade em relação à raça e etnia das amostras estudadas, pois os efeitos fenotípicos de alguns polimorfismos do gene podem ser diferentes em diferentes populações (EYNON et al., 2011).

Alguns estudos já foram realizados, em outros esportes, velocistas gregos (MORAN et al., 2007), atletas de força e velocidade (NIEMI; MAJAMAA, 2005), atletas russos de potência (DRUZHEVSKAYA et al., 2008), ciclistas de estrada (FIUZA-LUCES et al., 2011), brasileiros que realizavam musculação (GENTIL et al., 2011) corredores britânicos (MYERSON et al., 1999a), atletas russos de natação, esquiadores, triatletas e corredores de pista (NAZAROV et al., 2001), no entanto pesquisas não foram realizadas com atletas de esportes de combate, deste fato inédito nasce o interesse e a necessidade de se verificar a incidência destes genes de força e potência muscular na população de lutadores.

Ao realizar uma revisão da literatura, percebe-se que os genes ACTN3 e ACE, e seus respectivos polimorfismos, estão muito bem documentados no que alude os mais diferentes esportes e populações, porém não foram encontradas menções de trabalhos científicos com esportes de combate de percussão, sendo assim, o interesse desta dissertação nasce na necessidade de se verificar a incidência destes genes de força e potência muscular na população de lutadores.

Seria a incidência dos polimorfismos ou mutações nos genes alfa actinina 3 e da enzima conversora de angiotensina, um fator sinalizador e determinante para o sucesso dos atletas de esportes de rendimento em percussão?

2. PROBLEMA

Seria a incidência dos polimorfismos nos genes ACTN3 e da ACE em lutadores de percussão de alto rendimento, um fator sinalizador e determinante para o sucesso dos atletas de esportes de combate de percussão?

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo geral

Avaliar o genótipo dos genes, alfa actinina 3, e da enzima conversora de angiotensina, em lutadores de percussão de alto rendimento.

2.1.2 Objetivos Específicos

Determinar a frequência alélica do genótipo dos genes alfa actinina3 e enzima conversora de angiotensina, em lutadores de percussão;

Comparar os resultados encontrados no grupo de atletas e coma a população brasileira.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Classificação das artes marciais.

Historicamente as artes marciais tiveram sua origem no âmbito militar, com o objetivo de proporcionar técnicas eficazes de combate para atingir a eficiência na derrotar do seu oponente (ACEVEDO; CHEUNG, 2009). Como a maioria dos esportes de combate tiveram sua origem no mundo oriental, constituindo uma filosofia que transcende o simples ato vencer seu oponente através da força física, gerando uma reflexão ética de como esta vitória deve ser considerada. O impacto cultural das artes marciais promoveu um grande impacto na sociedade contemporânea, provocando um aumento significativo no número de praticantes no mundo, este movimento matemático no aumento de praticantes de lutas, colocou algumas das artes marciais mais praticadas no mundo como esportes olímpicos (KO; YANG, 2009).

Dentro das mais variadas modalidades de artes marciais, classificamos estas práticas em duas vertentes: As artes marciais caracterizadas pelo combate na posição ereta na qual o lutador mantém uma distancia de ataque ao adversário, denominadas de percussão. As artes marciais na qual a característica é dominar seu oponente pelo contato físico e na maioria dos casos o combate é decidido no solo, são denominadas de domínio (FRANCHINI; VECCHIO, 2011).

3.2 Demandas fisiológicas dos esportes de combate de percussão.

As artes marciais de percussão tem como característica *rounds* com duração aproximada de 3 minutos de alta intensidade, dependendo da modalidade podemos ter lutas com até 5 *rounds* com intervalo de 2 minutos cada, estudos estatísticos mostram que há geração de até 20 golpes utilizando membros superiores e inferiores de alta intensidade em 01 minuto de luta, desta forma em um combate de 03 minutos atletas de percussão chegam a gerar até 60 golpes de alta intensidade, totalizando cerca de 180 golpes em uma combate completo (BENEKE et al., 2004). De acordo com estas estatísticas podemos afirmar que um atleta chega a desferir um golpe com potencia máxima cada 05 segundos, caracterizando uma atividade física de predominância anaeróbia (NUNAN, 2006).

Esportes com predominância anaeróbia estão ligados ao tipo de fibra muscular envolvido na contração muscular, especificamente no musculo esquelético. O quantidade total de músculo esquelético representa cerca de 40% do corpo

humano sendo 10% destinado aos músculos lisos e esqueléticos (HALL; GUYTON, 2011).

Dentro desta distribuição no músculo esquelético a literatura mostra uma divisão específica que abrange uma classificação de dois tipos de fibras musculares existentes, as fibras de contração lenta e as de contração rápida, de acordo com sua predominância no músculo esquelético estes tipos de fibras musculares determinam sua ação metabólica, gerando sua função contrátil e determinando a especificidade de cada modalidade esportiva (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2008). As fibras de contração rápida possuem uma alta capacidade de gerar energia rapidamente e produzir contrações rápidas e vigorosas essenciais na prática de esportes de alta intensidade (BOCALINI; RICA; SERRA, 2010).

3.3 A Genética e a *performance* física.

Com o avanço da biologia molecular através do descobrimento da estrutura do DNA (WATSON; CRICK, 2003) os avanços das pesquisas relacionadas com a identificação de genes proporcionaram uma relação entre as heterogeneidades gênicas com os diferentes fenótipos existentes (WOLFARTH et al., 2000). De acordo com esta evolução técnica no campo da genética, iniciou a busca de possíveis relações entre genes candidatos com o desempenho físico, abrindo desta forma um amplo campo de possíveis descobertas. No início da década de 90 teve início os processos que investigaram a associação entre as evidências genéticas e o desempenho físico, baseados nos polimorfismos genéticos. Um polimorfismo pode ser definido como uma alteração na sequência de bases do DNA de um gene específico, que codifica uma proteína podendo provocar uma influência em sua expressão ou em sua atividade estrutural no organismo (DIAS et al., 2007), ocorrendo estatisticamente na população com uma frequência igual ou superior a 1% (HOUSMAN, 1995).

Há um grande número de genes marcadores relacionados com o desempenho físico, estudos mostram que mais de 200 genes estão ligados a expressões fenotípicas relacionadas ao exercício físico (BRAY et al., 2003), portanto não podemos relacionar apenas um gene como um agente determinante no processo que determina o fenótipo de um atleta. Apesar da variedade poligênica dos fenótipos relacionados ao desempenho físico, destacamos para este estudo dois

genes responsáveis pelo controle do sistema renina-angiotensina, particularmente o polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina e a alfa actinina 3 como possíveis fatores genético que pode determinantes no desempenho físico (MONTGOMERY et al., 1997) e (DRUZHEVSKAYA et al., 2008).

3.4 Sistema renina-angiotensina

Para que possamos entender o funcionamento do gene da enzima conversora de angiotensina (ACE), precisamos organizar seu ciclo de formação, o sistema renina-angiotensina (SRA) é considerado com sendo a chave da regulação homeostática cardiovascular e renal (PUTHUCHEARY et al., 2011), a renina produzida pelas glândulas supra renais através das células justaglomerulares, está circulante no sangue ela atua sobre o angiotensinogênio, substância produzida pelo fígado, uma vez secretado e lançado na circulação sanguínea este angiotensinogênio é clivado pela renina, formando o dACE-peptídeo angiotensina I, este polipeptídeo tem como características a propriedade de ser um vasoconstritor leve (PAYNE; MONTGOMERY, 2003), posteriormente sob a ação da ACE a angiotensina I resulta na formação de octa-peptídeo angiotensina II o qual possui uma característica de ser um vasoconstritor mais relevante (MYERSON et al., 1999b). A ACE também é um potencial influenciador nas atividades da bradicinina, que tem por função ser um vasodilatador e inibidor do crescimento celular, sua ação de hidrólise provoca uma desativação da bradicinina (COATES, 2003) e (WILLIAMS et al., 2004).

3.5 Sistema metabólico relacionado ao gene ACE I/D

Para que possamos entender o funcionamento dos polimorfismos da ACE nos sistemas metabólicos aeróbicos e anaeróbicos que são responsáveis pelas valências físicas da resistência e da força muscular é necessário associar o mACEnismo de funcionamento da ACE especificamente no tecido muscular esquelético, entendendo que este sistema age em outros tecidos importantes para mensurar o desempenho físico.

A participação do alelo (II) na melhora do sistema metabólico aeróbico pode gerar em alterações metabólicas interessantes para o aprimoramento desta capacidade física, como reposição e armazenamento de substratos energéticos utilizados pela fibra muscular, melhora do débito cardíaco, vascularisogênese nas fibras musculares do tipo I e aumento da densidade mitocondrial (MONTGOMERY H, MARSHALL R, 1998).

Quanto a alterações no tipo de fibra muscular do tipo I, caracterizadas como específicas para as atividades aeróbicas devido a sua estrutura funcional pode ser precipitado afirmar que o alelo (II) poderia estar relacionado com esta distribuição na composição das fibras musculares podendo ser o treinamento físico como um agente modificador neste recrutamento de fibras do tipo I (MA et al., 2013), porém estudos demonstraram a incidência do Alelo (II) com a fibra muscular do tipo I, através de biópsia muscular verificando a proporção de fibras musculares, os resultados obtidos mostraram uma significativa proporção de alelo (II) com fibra muscular tipo I em relação ao Alelo (DD) (ZHANG et al., 2003).

Em outro estudo observou maior frequência do alelo (II) entre corredores de elite de longa distância quando comparados com indivíduos sedentários saudáveis (MYERSON et al., 1999b). No caso a relevância a deste estudo foi que os atletas de elite tinham nível olímpico, apresentando uma tendência na frequência do alelo (II): 0,35 0,53 e 0,62 nas seguintes provas do atletismo $\leq 200\text{m}$ ($n = 20$), $400\text{-}3.000\text{m}$ ($n = 37$) e $\geq 5.000\text{m}$ ($n = 34$) (09), demonstrando uma possível incidência do polimorfismo (II) maior para os atletas especialistas de corridas de 3000 a 5000 metros, provas em que o sistema aeróbico é predominante, na frequência do alelo (II).

Outro estudo, utilizando um programa de ciclismo e corridas de seis semanas com uma população de origem suíça, esta pesquisa revelou uma possível melhora no metabolismo lipídico mitocondrial e uma provável melhora na modulação capilar no tecido muscular esquelético (VAUGHAN et al., 2013).

No que diz respeito ao sistema metabólico anaeróbio, especificamente no ganho de força e potencia muscular o alelo (DD) demonstra uma associação com a elevada produção de ACE nos tecidos musculares bem como a circulação sistêmica, relacionando este polimorfismo com a força e velocidade (DIET et al., 2001). Verificaram-se adaptações neurais, através de ativação de unidades motoras e hipertrofia muscular relacionados com a ACE após um período de treinamento

(SCHALFEUBERGER M, DREKLER H, CHEKINFER E, 1998). Efeitos da ACE nos sistemas neurais promovidos pelo treinamento de força podem estar relacionados com sua ação sobre o sistema nervoso simpático, influenciados pelo efeito da angiotensina II nos receptores pré sinápticos, esta resposta no aumento da angiotensina II é resultado do aumento do e conseqüentemente a ativação do sistema nervoso simpático (YONEMOCHI et al., 1998). Estudo recente com 100 atletas de *polish* uma modalidade de esporte de força da Polônia, verificou a predominância do alelo (DD) nos resultados obtidos na amostra com níveis significativos de 77,6% para a presença deste alelo, fortalecendo a hipótese deste polimorfismo da ACE para esportes que exijam aplicação de força (EIDER et al., 2013a). Em estudo com 58 nadadores e triatletas observou-se dados significativos da presença do polimorfismo (DD), em especial este estudo mostrou estes referenciais em ambos os sexos para provas aquáticas inferior a 200 metros que exigem do metabolismo aeróbico e conseqüentemente o uso da força muscular (COSTA et al., 2009).

3.6 Sistema muscular relacionado ao gene alfa actinina 3

Na estrutura do musculo esquelético, cada fibra muscular contém milhares de miofibrilas, sendo que cada miofibrila é composta por cerca de 1500 filamentos de miosina e 3000 filamentos de actina, sendo classificada como filamentos mais espessos de miosina e os filamentos mais finos de actina. Os filamentos de actina estão ligados a chamada banda ou disco Z. O segmento da miofibrila situado entre duas bandas ou disco Z é denominado sarcômero (HALL; GUYTON, 2011), (Figura 1).

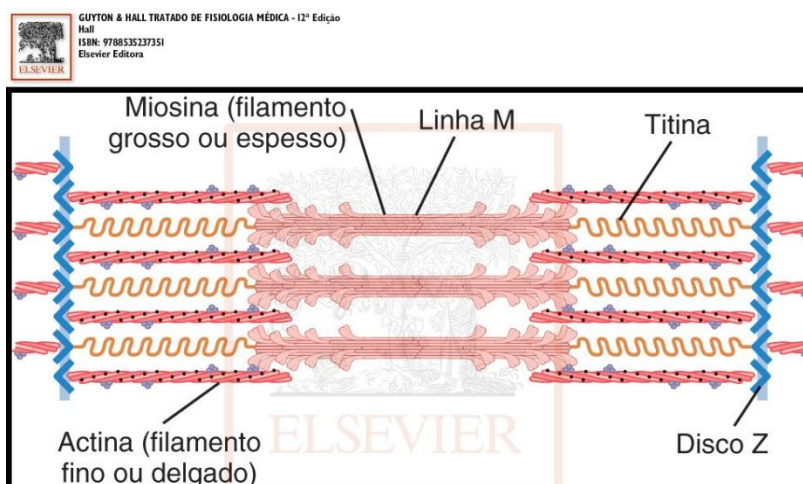


Figura 1 – Estrutura do sarcômero (HALL; GUYTON, 2011)

stop codon Nas estruturas da banda Z encontram as alfa actininas que juntamente com outras proteínas fazem a sustentação dos filamentos de actina dentro do sarcômero (SQUIRE, 1997). Nos humanos duas isoformas de alfa actinina são encontradas no musculo esquelético a alfa actinina 2 e 3 (MILLS et al., 2001a), sendo que a alfa actinina 2 é encontrada em dois tipos musculo, o esquelético e cardíaco e ainda pode ser encontrada em todos os tipos de fibras musculares. A alfa actinina 3 é exclusiva da musculatura esquelética (MILLS et al., 2001a) localizada apenas nas fibras de contração rápida do tipo II (NORTH ET AL, 1999).

A primeira evidência de uma diferente alteração de um mononucleotídeo dentro da sequência de DNA relacionada com a força muscular foi no aminoácido 577 (R577X) um polimorfismo do gene alfa actinina 3, explicado pela transversão de duas bases nitrogenadas citosina e timina, provocando um resíduo de arginina (R) em um *stop códon* (X) no aminoácido 577, provocando duas versões funcionais do gene alfa actinina 3, a versão selvagem 577R e a mutante 577X (CIESZCZYK et al., 2012).

De acordo com os cruzamentos genéticos da raça humana, herdados pelo lado paterno e materno existem 3 combinações possíveis para o genótipo do gene da alfa actinina 3 (RR, RX ou XX), sendo que o genótipo XX determina a não produção de alfa actinina 3 (MACARTHUR; NORTH, 1992). A ausência da alfa actinina 3 parece não ser considerado como uma deficiência patológica, sendo suprida pela alfa actinina 2, contudo a não presença do gene alfa actinina 3 nas fibras de contração rápida podem ter perda nas propriedades funcionais nas fibras do tipo II (MACARTHUR; NORTH, 2004).

Com a possibilidade da ausência do gene alfa actinina 3 em fibras de contração rápida em 18% da população europeia e projetando que tenhamos mais de 1 bilhão de pessoas homozigotas para o alelo X (MILLS et al., 2001b) hipóteses começam a ser testadas para verificar a possibilidade do gene alfa actinina 3 relacionado com a performance física, especialmente em atividades de força/potência com a frequência homozigota RR.

Em estudo realizado com 633 atletas, sendo 278 de resistência e 355 de força e um grupo controle de 808 indivíduos observou um favorável tendência para atividades de resistência o genótipo XX (EYNON et al., 2012). Resultados

semelhantes foram observados com atletas russos de potência, onde a frequência do gene XX foi significativamente menor ao se comparar com o grupo controle (DRUZHEVSKAYA et al., 2008).

Em análise dos genótipos de atletas de força de nível olímpico quando comparados com um grupo controle de não atletas, verificou uma frequência significativa menor do genótipo XX com 6% quando comparados ao grupo controle de 18% e nenhum atleta apresentou o genótipo XX (YANG et al., 2001). Em estudo com 141 atletas, sendo 52 atletas de resistência e 89 de velocidade observou uma menor frequência do genótipo XX nos velocistas (NIEMI; MAJAMAA, 2005).

Em estudo recente realizado com 80 remadores poloneses e um grupo controle de 205 participantes, verificou uma diferença significativa entre o grupo de atletas com genótipo XX apresentando um resultado de 7,4% no grupo de atletas e 17,6% no grupo controle (CIESZCZYK et al., 2012).

Os estudos analisados mostram uma baixa tendência do alelo X quando associado a atividades físicas que exijam força/potência, devido a mutação apresentada na versão mutante 577X associando a não produção de alfa actinina 3.

3.7 *Doping genético*

É uma característica do ser humano estar sempre procurando melhorar, seja na sua vida social, cultural, espiritual, profissional e orgânica. Como a ciência está apresentando constantemente novas técnicas e alternativas para melhorar a saúde do ser humano com a cura e a prevenção das doenças, também oferece inovações na estética humana, na qual incluímos novos modelos de treinamentos físicos para melhorar a *performance* e a saúde das pessoas. Diante deste cenário evolutivo apresenta-se um conjunto de drogas que podem facilitar ou acelera o processo de melhora condição física humana.

Neste pacote de evolução da ciência acrescentou a terapia gênica (SCHMIDT et al., 2006), como a mais recente técnica na cura e prevenção de doenças. A terapia gênica, portanto poder ser um instrumento de auxílio ao esporte, onde a reconstrução de tecidos lesionados auxiliaria na recuperação funcional, por outro lado este tipo de tratamento pode ser usado de forma ilegal, com o objetivo de melhorar a *performance* e conseqüentemente tenham sucesso e recompensa financeira (FRIEDMANN; RABIN; FRANKEL, 2004).

Após a conclusão do projeto genoma humano em 2004, algumas descobertas sobre os genes começaram a gerar pesquisas e descobertas significativas na função bioquímica dos genes. Antes do projeto genoma acreditava-se que a raça humana possuía cerca de 100.000 genes e chegou a descoberta que há entre 20.000 e 30.000 genes no organismo humano (CAMARGO, 2003). Dentre estes genes descobertos o mapa genético apresenta mais de 200 genes candidatos e suas regiões genéticas associadas com o desempenho físico humano (BRAY et al., 2003).

Com o avanço nos estudos nesta área da ciência encontra-se em um estágio inicial de desenvolvimento sendo que ainda não foi comprovado nenhum caso de doping genético, pode-se comentar sobre alguns genes importantes em processos que desencadeiam uma melhora na capacidade física e podem ser usados indevidamente no esporte (SWEENEY, 2004a). São eles: PPAR δ *peroxissome proliferator activated receptor*, VEGF *vascular endothelial growth factor*, IGF-1 GH *insulin-like growth factor and growth hormone*, EPO eritropoetina bloqueador de miostatina.

3.7.1 PPAR δ Gene Potencial

É uma proteína reguladora do processo de oxidação de lipídios, com seu ponto de atuação sendo o musculo esquelético, especificamente na mitocôndria da célula muscular e também no fígado. O interesse de atletas neste processo de doping genético está relacionado a diminuição do tecido adiposo através da queima metabólica de ácidos graxos e conseqüentemente a preservação do glicogênio hepático e muscular resultando no aumento do tempo de esforço durante a atividade física (BAAR, 2004). O PPAR δ também está associado na conversão de fibras musculares do tipo II em fibras musculares do tipo I aumentando desta forma a capacidade oxidativa, devido as características deste tipo de fibra rica em mitocôndrias com produção energética oriunda da queima de glicose e ácidos graxos, gerando maior resistência muscular benéfica em exercícios físicos de longa duração (AZZAZY; MANSOUR; CHRISTENSON, 2009). Devido a estes benefícios bioquímicos esta possibilidade de doping genético está intimamente ligada a atletas de resistência. Esta exposição ao gene PPAR δ pode acarretar riscos a saúde do

atleta provocando disfunções hormonais e alterações metabólicas enzimáticas (BOCHER et al., 2002).

3.7.2 VEGF Gene Potencial

Este gene está relacionado ao endotélio vascular sendo uma proteína responsável pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, que proporcionam maior vascularização nos tecidos orgânicos., a inserção deste gene pode acarretar agentes cancerígenos no organismo bem como baixar a imunidade biológica (UNAL; OZER UNAL, 2004). A inserção de um vetor do VEGF pode causar a vascularização dos tecidos, especialmente o muscular, resultando em um maior suprimento de nutrientes bem como de oxigênio. Estas alterações no tecido muscular pode provocar um retardo na fadiga muscular, melhorando a capacidade física de atletas de resistência que necessitam de energia e oxigênio nas fibras musculares para manutenção do alto consumo energético por um tempo prolongado. (SWEENEY, 2004b). O procedimento de terapia genética com o VEGF já é utilizado em seres humanos, em doenças coronarianas e de circulação periférica, portanto abrindo precedentes para uma possível utilização por parte de atletas.

3.7.3 IGF-1 e GH Genes Potenciais

O gene IGF-1 é um importante carreador do processo de crescimento muscular, reparo de lesões em fibras musculares e na obtenção de força contrátil do músculo (AZZAZY; MANSOUR; CHRISTENSON, 2009). Esta proteína também está ligada na produção do hormônio do crescimento (GH), este hormônio tem ação direta no crescimento muscular gerando aumento no tamanho e na força, a inserção genética desta proteína para indiretamente proporcionar aumento do GH, pode ser um dos maiores doping da atualidade pois este é um produto que injetado em condições normais é detectado facilmente pela WADA (AZZAZY; MANSOUR; CHRISTENSON, 2009).

Estudos em ratos após a inserção do gene IGF-1 representou um resultado positivo de 20 a 30% no aumento da massa muscular e conseqüentemente na força (LEE et al., 2004). A inserção do IGF-1 pode acarretar múltiplos riscos a saúde

dentre eles a diabetes, resistência a insulina, câncer e hipertensão arterial (HARRIDGE; VELLOSO, 2009).

3.7.4 EPO – Gene Potencial

A eritropoetina (EPO) é um gene classificado como uma glicoproteína hormonal sua produção se dá nas glândulas supra renais e é responsável pela produção de glóbulos vermelhos do sangue, denominadas de hemácias. Com o aumento do vetor EPO pode ocasionar um aumento de glóbulos vermelhos no sangue, gerando maior número de hemácias e conseqüentemente maior transporte de oxigênio as células, no caso o tecido muscular recebendo maior quantidade de oxigênio sua produção energética pode ter um aumento através da presença de oxigênio nos processos oxidativos que acontecem no interior da mitocôndria proporcionando maior produção de ATP via ciclo de krebs e cadeia respiratória (LIPPI; FRANCHINI; GUIDI, 2006).

Recentes estudos em ratos e macacos já foi observado com sucesso a transferência da cópia do EPO com sucesso (ZHOU et al., 1998), este estudo abre a possibilidade de doping para a EPO sendo que pode ser direcionada para atletas de resistência que necessitam de energia em exercícios de longa duração. O EPO pode gerar riscos para a saúde pois o aumento de glóbulos vermelhos aumenta a viscosidade do sangue acarretando possíveis obstruções em capilares, aumento da pressão arterial em função do aumento da resistência periférica e pode baixar a imunidade biológica devido ao desequilíbrio de componentes sanguíneos (FALLAHI; RAVASI; FARHUD, 2011).

3.7.5 Miostatina Gene Potencial

A miostatina é uma proteína que regula o aumento das fibras musculares limitando o crescimento muscular (HARRIDGE; VELLOSO, 2009). O bloqueio da miostatina sinaliza um potencial abuso no doping esportivo através da genética, com o bloqueio na produção desta proteína reguladora o tecido muscular não terá um freio e seu desenvolvimento (LEE, 2004). O bloqueio da miostatina pode ocasionar aumento do tecido muscular o que agregado ao treinamento desportivo suas potencialidades amentam significativamente na relação massa muscular mais força

agregada com velocidade resulta em potência, que se classifica como a principal valência física na maioria dos esportes individuais e coletivos.

O bloqueio da miostatina pode gerar danos a saúde pois envolve alterações nas fibra cardíacas e sobre carga em ligamentos e tendões (JESPERSEN et al., 2011).

O mercado esportivo mundial atualmente tem um investimento financeiro e uma de exposição de mídia que envolve bilhões de dólares, com esta magnitude alguns atletas, técnicos e dirigentes esportivos buscam alternativas ilícitas para conquistar posições que lhe proporcionem sucesso. O doping genético com o avanço da ciência pode ser o novo desafio do esporte, gerando debates éticos sobre o assunto.

A genética esta em plena evolução com o objetivo de curar doenças e melhorar a qualidade de vida do ser humano. O uso e a manipulação genética desenvolvida para aumentar o desempenho físico devem ser tratados com muita cautela, pois pode ser usada como doping e ser caracterizada como uma ação criminosa.

Os estudos ainda estão muitos recentes e os riscos para saúde ainda estão sendo avaliados pela ciência e podem causar danos irreversíveis para o indivíduo. Os métodos tradicionais não vão conseguir identificar possíveis casos de doping genético e se faz necessário estudos para gerar debate e pesquisa sobre esta área. Ainda não tivemos nenhum caso de doping genético identificado até o momento, contudo quando identificarmos o primeiro caso de fato, será um marco negativo no âmbito esportivo que certamente trará um questionamento ético sobre o valor filosófico do esporte.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo descritivo transversal, pois visou descrever características sobre uma população determinada, ou ainda estabelecer relações entre variáveis; envolvendo a utilização de técnicas pré-determinadas (GIL, 1999). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos da Faculdade Dom Bosco sob parecer nº 489.086. (Anexo A).

4.2 Local

O estudo foi realizado no Laboratório Bioquímico e Densitométrico - LABDEN, nas dependências da Universidade Federal Tecnológica do Paraná – UTFPR e no Laboratório de Genética da Universidade Positivo (UP), ambos no município de Curitiba - PR.

4.3 População amostra

Fizeram parte da presente pesquisa 15 atletas, sendo 6 lutadores de Karatê, 4 lutadores de Taekwondo, 4 lutadores de Muay Thai e 1 lutador de Boxe, todos do sexo masculino com idade média de 25,06 anos, com experiência nacional e internacional em suas respectivas modalidades e categorias de peso. Destes 14 atletas foram testados para o gene ACTN3 e 13 atletas foram testados para o gene da ACE. Tal perda amostral para o gene da ACE se deu pelo fato da não amplificação de duas amostras.

4.4 Critérios de inclusão

Lutadores de percussão de alto rendimento com resultados nacionais ou internacionais com idade entre 18 e 44 anos.

4.5 Critérios de exclusão

Lutadores que não tivesse sido pelo menos uma vez campeão nacional ou mundial em suas modalidades desportivas (*Karatê, Taewondo, Muay Thai* e Boxe), conforme informações fornecidas por suas respectivas federações e atletas que não apresentaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) assinado no dia da coleta.

4.6 Delineamento experimental

Os atletas foram avaliados em apenas uma intervenção, pré-determinada para não interferir na rotina de treinamento e descanso dos lutadores.

4.7 Procedimentos

As coletas de sangue foram realizadas no Laboratório Bioquímico e Densitométrico - LABDEN, nas dependências da Universidade Federal Tecnológica do Paraná – UTFPR e posteriormente as amostras sanguíneas foram levadas ao Laboratório de Genética da Universidade Positivo para a extração do DNA.

4.7.1 Coleta sanguínea

Um enfermeiro devidamente treinado realizou a coleta sanguínea, foram coletados 10 ml de amostra sanguínea de cada atleta, por meio, de agulhas de calibre 21 ou 23 (0,8 ou 0,7mm) indicadas para uso em adultos com veias finas. Para a obtenção da amostra sanguínea foi realizado no braço um garrote suficientemente apertado para distender a veia, sem causar desconforto. O garrote foi mantido durante toda a aspiração do sangue, para assegurar fluxo adequado e contínuo. O sangue foi aspirado para dentro da seringa por meio da pressão negativa mínima. Pós-coleta o garrote foi liberado, antes de ser retirada a agulha, e aplicado pressão diretamente no local da punção, com algodão ou gaze esterilizada, mantendo o braço reto ou um pouco elevado.

O sangue coletado foi dividido em dois frascos etiquetados. Cada frasco recebeu 5 ml de amostra sanguínea, 4 ml com anticoagulante (EDTA – ácido etileno diamino tetracético - Vacuette EDTAK3®). A amostra sanguínea com anticoagulante foi misturada suavemente, realizando inversão quatro ou cinco vezes do frasco sem realizar agitação do mesmo para evitar hemólise. Os tubos foram então armazenados sob refrigeração (2 a 8 °C) por no máximo 3 dias até a ocasião da extração do DNA.

4.7.2 Extração do DNA genômico dos atletas

As amostras sanguíneas foram levadas ao Laboratório de Genética da Universidade Positivo para a extração, e inicialmente as amostras foram

centrifugadas a 3000 r.p.m. por 10 minutos. Em seguida ocorreu a extração do DNA genômico dos atletas, feita a partir dos leucócitos do sangue periférico pela técnica de salting out com auxílio do kit BioPur Spin 50 (Biometrix, Curitiba) segundo instruções do fabricante.

4.7.3 Genotipagem do polimorfismo R577X no gene ACTN3

A genotipagem do polimorfismo R577X do gene ACTN3 foi realizada pela técnica RFLP-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase associada ao polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição). Os atletas foram divididos em grupos de mesmo genótipo: RR, RX e XX. O éxon 15 do gene ACTN3, onde se encontra o polimorfismo, foi amplificado utilizando os seguintes iniciadores:

Quadro 1 - Indicador utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene ACTN3

Polimorfismo	Sequência
R577X	direto 5` CTGTTGCCTGTGGTAAGTGGG `3 reverso 5` TGGTCACAGTATGCAGGAGGG `3

Fonte: o autor (2014).

ancorados nas sequências intrônicas adjacentes (MILLS et al., 2001a). O sistema reacional teve um volume total de 25 µL, sendo composto por 1x Tampão para Taq, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1,0 µM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 100 ng de DNA genômico como molde. O programa de amplificação foi composto dos seguintes passos: 95°C por 5 minutos de desnaturação inicial e liberação da enzima, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos. Terminados os 30 ciclos, houve 5 minutos de extensão final a 72°C. Após a amplificação, 10 µL do produto da PCR foram digeridos por 10 unidades da enzima Ddel por 4 horas em banho-maria a 37°C. Os alelos R ou X (códon CGA e TGA) foram distinguidos pela presença (577X) ou ausência (577R) do sítio de restrição da enzima Ddel (5'-C↓TNA G-3') (MILLS et al., 2001). Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% e revelados com brometo de etídeo a 5 µg/mL. O alelo ACTN3 577R gera fragmentos de 205 e 86 pares de bases

(pb), enquanto o alelo ACTN3 577X gera fragmentos de 108, 97 e 86 pb (YANG et al., 2001) (Figura 2).

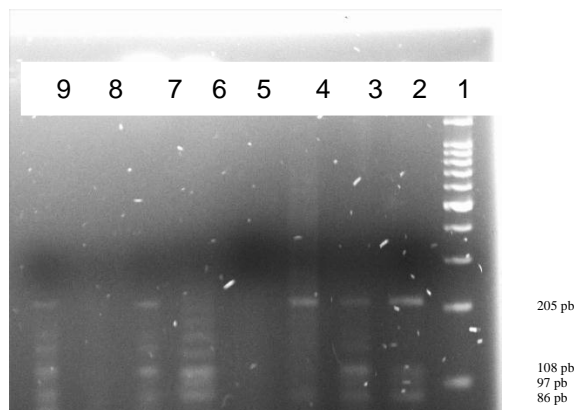


Figura 1 - Determinação visual de análise de eletroforese para o gene de ACTN3. Agarose 3% para caracterização dos genótipos ACTN3. Poço 1 – Ladder de 50pb; poço 6 – genótipo XX; poços 2,3,7 e 9 – genótipo RX; poços 3,4 genótipo RR; poços 5 e 8 não amplificou.

4.7.4 Genotipagem do polimorfismo I/D do íntron 16 do gene ACE

A genotipagem do polimorfismo I/D do gene ACE foi realizada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os atletas foram divididos em grupos de mesmo genótipo: D/D, I/D e I/I. O polimorfismo I/D do gene ACE consiste na ausência (deleção ou alelo “D”) ou presença (inserção ou alelo “I”) de 287 pares de base no íntron 16. Dessa forma, parte do íntron 16 foi amplificada utilizando os seguintes iniciadores:

Quadro 2 - Indicador utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene ACE

Polimorfismo	Sequência
ACE	direito 5` CTGGAGAGCCACTCCCATCCTTTCT `3 reverso 5` GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT `3

Fonte: o autor (2014).

(RIGAT, 1992). O sistema reacional teve um volume total de 25 µL, sendo composto por 1X Tampão para Taq, 3,0 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1,0 µM de cada iniciador, 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), 1 unidade de Taq DNA polimerase e 100 ng de DNA genômico como molde. O programa de amplificação foi composto dos seguintes passos: 95°C por 5 minutos de desnaturação inicial e liberação da enzima,

seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto. Terminados os 30 ciclos, houve 5 minutos de extensão final a 72°C. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% e revelados com brometo de etídeo a 5 µg/mL. O alelo D do gene ACE gera um fragmento de 191 pares de bases, enquanto o alelo I gera um fragmento de 478 pares de base, contendo a inserção de 287 pb (Figura 3).

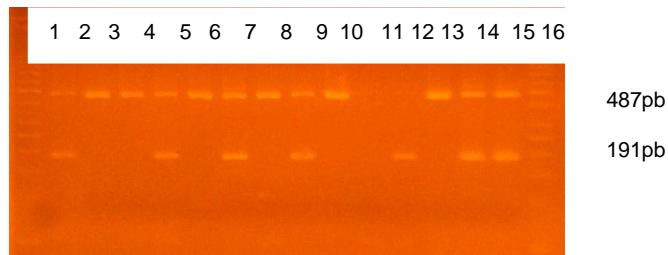


Figura 2 - Determinação visual de análise em gel de agarose para ACE. Gel para caracterização dos genótipos ACE I/D. Poço 1 – Ladder de 50pb; poços 3,4,6,8,10 e 13 – genótipo II; poço 12– genótipo DD e poços 1,5,7,9,14 e 15 genótipo ID.

De acordo com a literatura, a classificação errônea de heterozigotos D/I como sendo homozigotos D/D pode ocorrer devido à amplificação preferencial do alelo D e ineficiência de amplificação do alelo I (SHANMUGAM; SELL; SAHA, 1993). Portanto, para aumentar a especificidade da genotipagem, as amostras que apresentarem genótipo D/D foram reavaliadas por uma nova PCR utilizando um iniciador direto específico para a inserção:

Quadro 3 - Indicador específico utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene ACE

Polimorfismo	Sequência
ACE	direito 5' TTTGAGACGGAGTCTCGCTC `3 reverso 5` GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT `3

Fonte: o autor (2014).

(SHANMUGAM; SELL; SAHA, 1993) e o iniciador reverso 5'- -3'. A reação adicional (específica para a inserção) teve as mesmas concentrações dos reagentes da primeira PCR. O programa de amplificação foi: 95°C por 5 minutos de desnaturação inicial e liberação da enzima, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto.

Terminados os 35 ciclos, houve 5 minutos de extensão final a 72°C. Os resultados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 3% e revelados com brometo de etídeo a 5 µg/mL. O aparecimento de uma banda de 408 pares de base é indicativo da presença do alelo I, ou seja, as amostras anteriormente genotipadas como D/D passaram a ser classificadas como I/D. Amostras classificadas como I/D ou I/I na primeira reação foram utilizadas como controle positivo da reação específica para a inserção.

4.8 Gel de Agarose

O gel foi preparado a partir de uma solução estoque de agarose 2.5:1(3,7 g de agarose, 120 ml de TBE 1X). A solução tampão (TBE 1X) usada na cuba eletroforese foi preparada a partir de uma solução estoque (TBE 10X). O gel foi submetido a 120 V, por cerca de 1 hora, ou até o corante atingir o final do gel. Após, 8 s foi removida a moldura do gel, e o gel foi transferido para o tanque de Brometo de Etídio µl/ml. Foi corado por 10 min. a fim de visualização das bandas e finalmente, ser fotografar o gel no transiluminador.

4.9 Aconselhamento Genético, acompanhamento Clínico e Psicológico

Considerando que a presença dos polimorfismos dos genes, ACTN3 e ACE, não trazem comprometimentos clínicos para seus portadores e não portadores, não foi necessidade realizar aconselhamento genético, acompanhamento clínico e psicológico dos atletas estudados. A presença ou ausência dos mesmos permitiu apenas um direcionamento do treinamento empregado.

4.10 Análise estatística

As associações entre as frequências dos alelos foram verificadas através de tabelas de contingência 2X2 analisadas pelo teste de Qui-quadrado com correção de Yates. Para verifica a distribuição dos genótipos dos genes ACTN3 e ACE I/D foi utilizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para tanto foi utilizado o software BioState 5.0 ano 2007, sendo considerado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa teve como objetivo avaliar o genótipo dos genes, ACTN3 e da ACE I/D, em lutadores de percussão. Sendo assim, neste capítulo são apresentados os resultados e sua discussão com dos dados coletados confrontando com a literatura.

A frequência genotípica absoluta e relativa do gene ACTN3 dos 14 atletas de percussão que fizeram parte da presente pesquisa, é apresentada na Tabela 1. Para tanto os resultados foram comparados com estudos da literatura, população geral (COELHO, 2011), usado com grupo controle, quanto com atletas de lutas. A distribuição do genótipo do gene ACTN3 não apresenta diferenças significativas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg onde apresentou $p=0,3604$

Tabela 1 - Distribuição genotípica do gene ACTN3 dos 14 atletas de percussão

	RR	RX	XX	P
	n (%)	n (%)	n (%)	
Dados da Pesquisa	5 (35,71%)	8 (57,14%)	1 (7,14%)	0,3604
Coelho controle (2011)	40 (40%)	46 (46%)	14 (14%)	0,8942
Oliveira (2013)	6 (33,33%)	9 (50%)	3 (16,66%)	0,9035
Kikuchi (2012)	38 (28%)	68 (50%)	29 (22%)	0,8900

A Tabela 2 apresenta os dados referentes à distribuição alélica para o gene ACTN3 dos 14 atletas de luta de percussão que fizeram parte da pesquisa. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas distribuições alélicas dos dados da presente pesquisa quando comparadas com estudo de Coelho (COELHO, 2011), controle com população geral, utilizando o teste estatístico Qui-Quadrado e nos estudo realizado por Kinkuchi 2010 com lutadores japoneses (KIKUCHI, 2012) e Oliveira 2012 com lutadores de múltiplas artes marciais (OLIVEIRA, 2013).

Tabela 2 - Distribuição alélica do gene ACTN3 dos 14 atletas de percussão

	R	X	P
	n (%)	n (%)	
Dados da Pesquisa	18 (64,28%)	10 (33,71%)	0,9598
Coelho (2011) controle	126 (63%)	74 (37%)	0,8949
Oliveira (2013)	21 (58,33%)	15 (41,66%)	0,6283
Kikuchi (2012)	144 (53%)	126 (47%)	0,2681

O primeiro estudo que caracterizou o genótipo do ACTN3 como um fator de alteração do desempenho físico e constatou que as associações de seus alelos estavam ligados e poderiam influenciar fenótipos relacionados à melhora da qualidade física (YANG et al., 2001), tivemos vários autores que identificaram relações do alelo R com atividades de força/potência e do alelo X com atividades com característica aeróbica ou de resistência, sugerindo que a deficiência da α -actinina-3 (genótipo XX) pode oferecer uma desvantagem em atividades ligadas a força/potência, nesta linha de estudos vários autores apresentaram a evidência de que alelo R poderia estar ligado a exercício de força (DRUZHEVSKAYA et al., 2008) (OLIVEIRA, 2013) (YANG et al., 2001).

Comparando os dados obtidos na distribuição alélica deste estudo, com os dados apresentados na literatura, Yang et al. (YANG et al., 2001) demonstrou uma frequência significativamente menor do genótipo XX (6%) em atletas de força/potência, 64,28% dos atletas de alto rendimento do experimento apresentam a presença do alelo R e 33,71% o alelo X evidenciando uma possível tendência a genotípica favorável a atividade de potência e força, especificamente por se tratar de uma amostra de referência no estudo, com atletas de alto e com conquistas esportivas de reconhecimento.

Segundo Eynon (EYNON et al., 2012) em um estudo realizado com 633 atletas de alto rendimento sendo 278 atletas de resistência e 355 atletas de força/potência, pode se verificar um resultado significativo para o genótipo XX relacionado atividade físicas de *endurance*, comparando este estudo com a proposta experimental proposta com atletas de luta de alto rendimento observou-se a presença 7,14% dos atletas com a genotipagem XX, demonstrando uma possível predominância do genótipo RR e RX nos atletas testados.

A frequência genotípica absoluta e relativa do gene ACE I/D dos 13 atletas que fizeram parte da presente pesquisa, é apresentada na Tabela 3. Para tanto os resultados foram comparados com estudos da literatura, população geral (MEIRA-LIMA et al., 2000) grupo controle, quanto com atletas de lutas. A distribuição do genótipo do gene ACE I/D não foi significativo seguindo os padrões esperados pela população de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg onde apresentou $p=0,7103$

Tabela 3 - Distribuição genotípica do gene ACE I/D dos 13 atletas de percussão

	DD	ID	II	P
	n (%)	n (%)	n (%)	
Dados da Pesquisa	4 (30,76%)	7 (53,84%)	2 (15,36%)	0,7103
Meira-Lima et. al. (2000)	104 (32,2%)	155 (48%)	64 (19,8%)	0,6493
Kikuchi et al. (2012)	68 (50,3%)	39 (28,9%)	28 (20,8%)	0,6481
Eider (2013)	36 (36%)	48 (48%)	13 (13%)	0,6318

A Tabela 4 apresenta os dados referentes à distribuição alélica para o gene ACE I/D dos 13 atletas de luta de percussão que fizeram parte da pesquisa. Não foram encontradas diferenças estatísticas nas distribuições alélicas dos dados da presente pesquisa quando comparadas com estudo de Meira-Lima (MEIRA-LIMA et al., 2000), controle coma população geral , utilizando o teste estatístico Qui-Quadrado e nos estudos de Kikuchi et al.(KIKUCHI, 2012), com lutadores japoneses e com Eider (EIDER et al., 2013b) em atletas de foça poloneses.

Tabela 4 - Distribuição alélica do gene ACE I/D dos 13 atletas de percussão.

	D	n	I	P
	(%)		n (%)	
Dados da Pesquisa	15 (57,69%)	11	(42,30%)	0,8951
Meira-Lima et al., (2000)	363 (63%)	283	(37%)	0,8789
Kikuchi et al. (2012)	175 (53,4%)	95	(46,6%)	0,4694
Eider (2013)	120 (61,85%)	72	(37,11%)	0,6356

O polimorfismo I/D da ACE, foi o primeiro gene específico a ser relacionado com a *performance* física (WILLIAMS et al., 2000), devido a este pioneirismo há uma vasta produção literária, demonstrando evidências que o alelo I é mais frequente em atletas de resistência, enquanto que o alelo D, em atletas de força e explosão muscular (PUTHUCHEARY et al., 2011).

Apesar de muitos estudos de associação positiva, sugerindo que ocorra uma influência do genótipo da ACE sobre o desempenho físico, pesquisas como a de Gineviciene et al. (2010) com atletas lituanos, reportaram um genótipo II de 42,4% para os atletas de esportes mistos, um genótipo ID de 59,6% para esportes de velocidade e uma frequência maior do genótipo DD para o grupo de resistência 32,8%, apresentam valores conflitantes com a literatura.

Na dificuldade de buscar fontes na literatura que possam comparar dados do gene ACE relacionado especificamente a lutadores de combate e artes marciais com característica de percussão, comparamos os resultados desta proposta experimental com um estudo realizado por Kikuchi et al. (KIKUCHI, 2012), no qual trabalhou com judocas japoneses de elite, obtiveram valores de 50,3 % para o genótipo DD, 28,9% para o genótipo ID e 20,8% para os genótipos II, demonstrando uma associação entre os lutadores de percussão deste estudo e o alelo D, sendo que na distribuição alélica do experimento obtivemos 57,69% de alelos D.

Assim como observado no polimorfismo do ACTN3, não foram encontradas diferenças significativas nas distribuições genotípica e alélica quando os dados do presente estudo foram comparados ao controle utilizado (MEIRA-LIMA et al., 2000).

Estudo realizado por Eider (EIDER et al., 2013b), mostrou resultados significativos para o genótipo DD entre 100 atletas de elite poloneses de força/potência 13.0% para o genótipo II, 48.0% para o genótipo ID e 39.0% genótipo DD, baseado nestes resultados podemos confrontar os dados experimentais da pesquisa, que apontaram 30,76% para o genótipo DD e 53,84% para o genótipo ID, estes dados podem sugerir uma projeção interessante para o perfil da amostra de lutadores de percussão de alto rendimento podendo projetar um perfil dominante para força.

O tratamento estatístico demonstrou valores não significativos tanto na escala genotípica quanto na distribuição alélica para os genes ACTN3 e ACE quando comparados com a população (COELHO, 2011); (COELHO, 2011) e quando comparados a estudo específicos na classificação de atividades físicas com característica de força/potência (OLIVEIRA, 2013);(EIDER et al., 2013b). Porém após análise e comparação com a literatura o estudo experimental sinalizou uma tendência em ambos os genes para genótipos ligados a alelos que representam a característica de força/potência.

6. CONCLUSÃO

Como considerações finais este estudo é pioneiro na análise genotípica e alélica dos polimorfismos da ACTN3 e ACE I/D em uma população de lutadores de percussão brasileira de alto rendimento, com certificação de conquistas nacionais e internacionais.

No que tange os valores obtidos nas frequências genotípicas dos genes ACTN3 e do ACE I/D, os resultados não diferiram significativamente quando comparadas à população geral e aos estudos recentes com atletas de força e potência. Os valores dos genótipos relacionados a distribuição alélica dos genes ACTN3 e ACE I/D, apresentaram resultados não significativos quando comparados a população geral e quando comparados aos estudos com atletas de força e potência.

Os resultados alcançados confirmam a importância dos estudos relacionados aos genes ACTN3 e ACE, classificando ambos como marcadores genéticos de utilidade na observação de lutadores de percussão. O presente estudo também sugere o aprimoramento do experimento com um número maior de atletas de lutas e artes marciais de alto rendimento na modalidade de percussão, pois pode haver uma possibilidade de obter valores significativos com uma amostra maior em um futuro estudo.

7. REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, W.; CHEUNG, M. Chinese Martial Arts in the Republican Era. **Revista de Artes Marciales Asiáticas**, v. 4, p. 22–37, 2009.
- AZZAZY, H. M. E.; MANSOUR, M. M. H.; CHRISTENSON, R. H. Gene doping: of mACE and men. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 435–441, 2009.
- BAAR, K. Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 269–273, 2004.
- BENEKE, R. et al. Energetics of karate kumite. **European Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 518–523, 2004.
- BOCALINI, D.; RICA, R. L.; SERRA, A. J. EFEITOS DO TREINAMENTO DE FORÇA ESPECÍFICO NO DESEMPENHO DE. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 32, p. 217–227, 2010.
- BOCHER, V. et al. PPARs: Transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 967, p. 7–18, 2002.
- BRAY, M. S. et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 41, n. 1, p. 1248–1264, 2003.
- CAMARGO, A. A. O seqüenciamento do genoma humano, uma nova forma de fazer ciência? **Rev Kairós**, v. 6, p. 21–36, 2003.
- CHAN, S. et al. A gene for speed: contractile properties of isolated whole EDL muscle from an alpha-actinin-3 knockout mouse. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 295, n. 4, p. C897–904, out. 2008.
- CIESZCZYK, P. et al. ACTN3 R577X polymorphism in top-level Polish rowers. **Journal of Exercise Science & Fitness**, v. 10, n. 1, p. 12–15, jun. 2012.
- COATES, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, p. 769–773, 2003.
- COELHO, D. B. Determinação da frequência genótipica do ACTN3 e da sua relação com o desempenho físico, respostas hormonais e indicadores do dano muscular em jogadores de futebol. **Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.**, 2011.
- COSTA, A. M. et al. Angiotensin-converting enzyme genotype affects skeletal muscle strength in elite athletes. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 8, p. 410–418, 2009.
- CRISTINA, A. et al. Genetics and sport performance : current challenges and directions to the future. v. 28, n. 1, p. 177–193, 2014.

DIAS, R. G. et al. **Polimorfismos genéticos determinantes da performance física em atletas de elite** *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 2007.

DIET, F. et al. ACE and angiotensinogen gene genotypes and left ventricular mass in athletes. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, p. 836–842, 2001.

DRUZHEVSKAYA, A. M. et al. Association of the ACTN3 R577X polymorphism with power athlete status in Russians. **European journal of applied physiology**, v. 103, n. 6, p. 631–4, ago. 2008.

EIDER, J. et al. The association between D allele of the ACE gene and power performance in Polish elite athletes. **Science and Sports**, v. 28, p. 325–330, 2013a.

EYNON, N. et al. Genes and elite athletes: a roadmap for future research. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 13, p. 3063–70, 1 jul. 2011.

EYNON, N. et al. The ACTN3 R577X polymorphism across three groups of elite male European athletes. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.

FALLAHI, A.; RAVASI, A.; FARHUD, D. Genetic doping and health damages. **Iranian Journal of Public Health**, v. 40, p. 1–14, 2011.

FIUZA-LUCES, C. et al. Are “endurance” alleles “survival” alleles? Insights from the ACTN3 R577X polymorphism. **PLoS one**, v. 6, n. 3, p. e17558, jan. 2011.

FRANCHINI, E.; VECCHIO, F. B. DEL. Estudos em modalidades esportivas de combate: estado da arte. **Rev. bras. Educ. Fís. Esporte**, v. V.25, p. p.67–81, 2011.

FRIEDMANN, T.; RABIN, O.; FRANKEL, M. S. Gene Doping and Sport. **Science**, v. 327, p. 30–31, 2004.

GENTIL, P. et al. ACTN3 R577X polymorphism and neuromuscular response to resistance training. n. May, p. 393–399, 2011.

GIL, A. C. **Métodos e técnicas de pesquisa social**. [s.l: s.n.]. v. 264p. 216

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiología médica**. [s.l: s.n.]. p. 303–06

HARRIDGE, S. D. R.; VELLOSO, C. P. IGF-I and GH: potential use in gene doping. **Growth hormone IGF research official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, v. 19, p. 378–382, 2009.

HOUSMAN, D. Molecular medicine, human DNA polymorphism. **N Engl J Med**, v. 2, p. 318–20, 1995.

JESPERSEN, J. G. et al. Myostatin expression during human muscle hypertrophy and subsequent atrophy: increased myostatin with detraining. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 21, p. 215–223, 2011.

JEUKENDRUP, A.; CRONIN, L. Nutrition and elite young athletes. **Medicine and Sport Science**, v. 56, p. 47–58, 2011.

JONES, A.; MONTGOMERY, H. E.; WOODS, D. R. Human performance: a role for the ACE genotype? **Exercise and sport sciences reviews**, v. 30, p. 184–190, 2002.

KIKUCHI, N. ET AL. ACTN3 R allele + ACE DD genotype in Japanese elite wrestlers. **J Strength Cond Res.**, v. 26, p. 3275–3280, 2012.

KO, Y. J.; YANG, J. B. The Globalization of Martial Arts: The Change of Rules for New Markets. **Revista de Artes Marciales Asiáticas**, v. 4, p. 8–19, 2009.

LEE, S. et al. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, p. 1097–1104, 2004.

LEE, S.-J. Regulation of muscle mass by myostatin. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, p. 61–86, 2004.

LIPPI, G.; FRANCHINI, M.; GUIDI, G. C. Blood doping by cobalt. Should we measure cobalt in athletes? **Journal of occupational medicine and toxicology London England**, v. 1, p. 18, 2006.

LIPPI, G.; LONGO, U. G.; MAFFULLI, N. **Genetics and sportsBritish Medical Bulletin**, 2010.

MA, F. et al. The association of sport performance with ACE and ACTN3 genetic polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e54685, jan. 2013.

MACARTHUR, D. G. et al. An Actn3 knockout mouse provides mechanistic insights into the association between alpha-actinin-3 deficiency and human athletic performance. **Human molecular genetics**, v. 17, n. 8, p. 1076–86, 15 abr. 2008.

MACARTHUR, D. G.; NORTH, K. N. Chapter 18 The ACTN3 Gene and Human Performance. p. 204–214, 1992.

MACARTHUR, D. G.; NORTH, K. N. A gene for speed? The evolution and function of alpha-actinin-3. **BioEssays news and reviews in molecular cellular and developmental biology**, v. 26, n. 7, p. 786–795, 2004.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do Exercício - Nutrição, Energia e Desempenho Humano**. [s.l: s.n.]. p. 1132

MEIRA-LIMA, I. V et al. Angiotensinogen and angiotensin converting enzyme gene polymorphisms and the risk of bipolar affective disorder in humans. **Neurosci Lett**, v. 293, p. 103–106, 2000.

MILLS, M. et al. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. **Human molecular genetics**, v. 10, p. 1335–1346, 2001a.

MONTGOMERY H, MARSHALL R, H. S. Human gene for physical performance. **Nature**, p. 393, 1998.

MONTGOMERY, H. E. et al. **Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training.** *Circulation*. [s.l: s.n.].

MORAN, C. N. et al. Association analysis of the ACTN3 R577X polymorphism and complex quantitative body composition and performance phenotypes in adolescent Greeks. **European journal of human genetics EJHG**, v. 15, n. 1, p. 88–93, 2007.

MYBURGH, K. H. What makes an endurance athlete world-class? Not simply a physiological conundrum. **Comparative biochemistry and physiology Part A Molecular integrative physiology**, v. 136, n. 1, p. 171–190, 2003.

MYERSON, S. et al. No Title. p. 1313–1316, 1999a.

MYERSON, S. et al. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 87, p. 1313–1316, 1999b.

NAZAROV, I. B. et al. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 9, p. 797–801, 2001.

NIEMI, A.-K.; MAJAMAA, K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 13, n. 8, p. 965–9, ago. 2005.

NORMAN, B. et al. Strength, power, fiber types, and mRNA expression in trained men and women with different ACTN3 R577X genotypes. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 106, n. 3, p. 959–65, mar. 2009.

NORTH ET AL. A common nonsense mutation results in α -actinin-3 deficiency in the general population. **Nature genetics**, v. vol 2, 1999.

NUNAN, D. Combat Sports Special Issue Research article DEVELOPMENT OF A SPORTS SPECIFIC AEROBIC CAPACITY TEST FOR KARATE – A PILOT STUDY. **Methods**, p. 47–53, 2006.

OLIVEIRA, E. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE INDICADORES DE DESEMPENHO E A VARIAÇÃO R577X DO GENE DA ALFA ACTININA-3 EM LUTADORES DE ARTES MARCIAIS MISTAS. **Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Paraná**, 2013.

OSTRANDER, E. A; HUSON, H. J.; OSTRANDER, G. K. Genetics of athletic performance. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 10, p. 407–29, jan. 2009.

PAYNE, J.; MONTGOMERY, H. The renin-angiotensin system and physical performance. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. Pt 6, p. 1286–1289, 2003.

PUTHUCHEARY, Z. et al. The ACE gene and human performance: 12 years on. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 41, p. 433–448, 2011.

RIGAT, B. ET AL. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene. **Nucleic Acids Res.**, 1992.

SCHALFEUBERGER M, DREKLER H, CHEKINFER E, S. K. Angiotensin-converting enzyme gene expression in skeletal muscle in patients with chronic heart failure. **J Card Fail.**, p. 185–91., 1998.

SCHMIDT, K. et al. Troponin I overexpression inhibits tumor growth, perfusion, and vascularization of morris hepatoma. **Journal of nuclear medicine official publication Society of Nuclear Medicine**, v. 47, p. 1506–1514, 2006.

SHANMUGAM, V.; SELL, K. W.; SAHA, B. K. Mistyping ACE heterozygotes. **Genome Research**, v. 3, n. 2, p. 120–121, 1 out. 1993.

SQUIRE, J. M. **architecture and function in; the muscle sarcomere**, 1997.

STEWART, C. E. H.; RITTWEGER, J. **Adaptive processes in skeletal muscle: Molecular regulators and genetic influences** **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, 2006.

SWEENEY, H. L. Gene doping. **Scientific American**, v. 291, p. 62–69, 2004a.

SWEENEY, H. L. Gene doping. **Scientific American**, v. 291, p. 62–69, 2004b.

UNAL, M.; OZER UNAL, D. Gene doping in sports. **Sports Medicine**, v. 34, p. 357–362, 2004.

VAUGHAN, D. et al. The angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism alters the response of muscle energy supply lines to exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 113, p. 1719–1729, 2013.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. 1953. **Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion**, v. 55, p. 108–109, 2003.

WILLIAMS, A. G. et al. The ACE gene and muscle performance. **Nature**, v. 403, p. 614, 2000.

WILLIAMS, A. G. et al. Bradykinin receptor gene variant and human physical performance. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 96, p. 938–942, 2004.

WOLFARTH, B. et al. A polymorphism in the alpha2a-adrenoceptor gene and endurance athlete status. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 32, p. 1709–1712, 2000.

YAMADA, A. K. Polimorfismos genéticos que influenciam no desempenho da musculatura esquelética. **Revista Digital**, v. 151, 2010.

YANG, N. et al. ACTN3 Genotype Is Associated with Human Elite Athletic Performance. p. 627–631, 2001.

YONEMOCHI, H. et al. Mechanism of beta-adrenergic receptor upregulation induced by ACE inhibition in cultured neonatal rat cardiac myocytes: roles of bradykinin and protein kinase C. **Circulation**, v. 97, p. 2268–2273, 1998.

ZHANG, B. et al. The I allele of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with an increased percentage of slow-twitch type I fibers in human skeletal muscle. **Clinical genetics**, v. 63, p. 139–144, 2003.

ZHOU, S. et al. Adeno-associated virus-mediated delivery of erythropoietin leads to sustained elevation of hematocrit in nonhuman primates. **Gene Therapy**, v. 5, p. 665–670, 1998.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite especial para que você participe voluntariamente da pesquisa intitulado de **ESTUDO MOLECULAR DOS GENES CANDIDATOS A MELHORA NOS NÍVEIS DE FORÇA E VELOCIDADE EM ATLETAS DE ESPORTES DE COMBATE**. As informações existentes neste documento são para que você entenda perfeitamente os objetivos da pesquisa, e saiba que a sua participação é espontânea. Se durante a leitura deste documento houver alguma dúvida você deverá fazer perguntas aos pesquisadores envolvidos (Marcelo Romanovitch Ribas, Zair Cândido de Oliveira, Julio Cesar Bassan, Oslei de Matos) para que possa entender perfeitamente do que se trata. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar assine ao final deste documento, que está em duas vias, sendo uma via sua e a outra do pesquisador responsável.

A sua participação será no sentido de fornecer 10 ml de amostra sanguínea o que equivale a uma colher de sobremesa cheia, por meio de agulhas de calibre 21 ou 23 (0,8 ou 0,7mm) indicadas para uso em adultos com veias finas, a coleta do sangue, será realizada por um técnico em enfermagem devidamente treinado. Para a obtenção da amostra sanguínea será realizado em um dos braços um garrote suficientemente apertado para aumentar a largura da veia, sem causar desconforto. O garrote será mantido durante toda a aspiração do sangue, para assegurar fluxo adequado e contínuo. O sangue será aspirado para dentro da seringa por meio da pressão negativa mínima (pressão inferior a pressão de referência). Pós-coleta o garrote será liberado, antes de ser retirada a agulha, e aplicado pressão diretamente no local da punção, com algodão ou gaze esterilizada, mantendo o braço reto ou um pouco elevado. Este procedimento poderá ocasionar hematomas e flebite (inflamação da veia utilizada) os quais são passíveis de controle por meio de medidas preventivas, tais como uso de compressa quente.

A pesquisa justifica-se pelo simples fato de o treinamento, a nutrição e os fatores psicológicos não serem suficientes para formar um campeão. A partir de tal constatação, surgiu o interesse pela predisposição genética, e sua influência para o desempenho esportivo, que pode levar certos indivíduos a se sobressair em suas específicas modalidades esportivas, bem como detectar talento nas categorias de

iniciação. Os testes genéticos no esporte permitem identificar os indivíduos com a fisiologia e morfologia ideal (aspectos anatômicos como peso, estatura, circunferências corporais, diâmetros ósseos e dobras cutâneas dos indivíduos) bem como aqueles atletas com maior capacidade de responder ou adaptar-se ao treinamento com menores chances de sofrerem de lesões. O atual mapa genético humano apresenta uma lista de mais de 200 genes candidatos (são genes já sequenciados, com biologia conhecida e que estão envolvidos com o desenvolvimento ou da fisiologia do indivíduo) suas regiões genéticas associadas com o desempenho físico humano, o exercício e a saúde. Porém estaremos estudando apenas quatro genes (alfa actina 3; enzima conversora de angiotensina; enzima creatina quinase M, e AMP desaminase, estes estão ligados com melhores desempenhos de força e potência muscular, variáveis de suma importância no esporte moderno. Alguns estudos já foram realizados, em outros esportes, futebol, ginástica, atletismo, powerlifting, no entanto nada foi feito nos esportes de combate, deste fato inédito nasce o interesse desta pesquisa nasce na necessidade de se verificar a incidência destes genes de força e potência muscular na população de lutadores.

Considerando que a presença dos polimorfismos dos genes, ACTN3, ACE, CK-MM e AMPD1 não trazem comprometimentos clínicos para seus portadores e não portadores, não há necessidade da realização do aconselhamento genético e acompanhamento clínico dos atletas estudados. A presença ou ausência dos mesmos permitirá apenas um direcionamento do treinamento empregado.

Sendo assim, o objetivo geral da pesquisa será detectar a presença dos genes candidatos, alfa actina 3, da enzima conversora de angiotensina, da enzima creatina quinase M, AMP desaminase e seus respectivos polimorfismos em lutadores de percussão e domínio. Para tanto após a extração do sangue será realizada a extração do DNA e em sequência será realizada a genotipagem dos genes candidatos, cuja técnica empregada será de PCR em gel de agarose (método para amplificar o DNA). Como método alternativo poderia ser utilizado ao invés de sangue o fio do seu cabelo, porém não detemos de tal tecnologia para realizar as análises.

Em relação à pesquisa que será realizada, você poderá esperar como benefício receber treinamento direcionado o que conseqüentemente permitirá melhora em seu desempenho esportivo. O presente estudo não apresenta a você

riscos eminentes, em algumas situações poderá ocorrer a não adaptação por sua parte, ao novo treinamento proposto, o que em um primeiro momento poderá ocasionar diminuição em sua performance de treino.

Cabe salientar que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo, a fim de evitar tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva. Caso eu não concorde com o que foi exposto até o presente momento, eu poderei se recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e não sofrerei qualquer prejuízo. Cumpre ressaltar como esclarecido, que eu poderei optar por métodos alternativos, porém não é o objetivo da pesquisa avaliar o tema por outro instrumento.

Com relação aos pesquisadores envolvidos com o referido projeto, o Professor Marcelo Romanovitch Ribas tel: 92099267; Professor Zair Cândido de Oliveira Netto tel: 88141750 e Professor Dr. Julio Cesar Bassan tel: 99644220 lhe assegurarão a assistência durante toda pesquisa, bem como garantirão o meu livre acesso a todas as informações em se tratando das análises genéticas e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação, ou se eu não optar estas informações não me será repassadas.

Caso eu queira entrar em contato com o comitê de ética, responsável pela aprovação desta pesquisa, poderei contatar o Comitê de Ética e pesquisa da Faculdade Dom Bosco pelo telefone (041) 3218 – 5582 e conversar com a secretária Viviane Beatriz Dias. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, com “munus público”, que existe nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - Res. CNS n.º 196/96, II.4).

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de tudo aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo da já referida pesquisa, concedo meu livre consentimento para participar da referida pesquisa, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento em dinheiro. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei pelos pesquisadores Professor Marcelo Romanovitch Ribas tel: 92099267; Professor Zair Cândido de Oliveira Netto tel: 88141750 e Professor Dr. Julio Cesar Bassan tel: 99644220.

Data

Nome, CPF e assinatura do sujeito da pesquisa

Nome e (assinatura) do pesquisador responsável

Dr. Julio Cesar Bassan (CPF – 504.595.549-72) jcbassan@gmail.com

Nome e (assinatura) do(a) Mestrando em Engenharia Biomédica

Esp. Marcelo Romanovitch Ribas (CPF – 018.790.059-69)
mromanovitch@yahoo.com.br

Nome e (assinatura) do (a) Mestrando em Engenharia Biomédica

Esp. Zair Cândido de Oliveira Netto (CPF - 539.807.789-91) zair@up.com.br

Curitiba, ____ de _____ de 2013

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP

FACULDADES DOM BOSCO/
PR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO MOLECULAR DOS GENES CANDIDATOS A MELHORA NOS NÍVEIS DE FORÇA E VELOCIDADE EM ATLETAS DE ESPORTES DE COMBATE.

Pesquisador: MARCELO ROMANOVITCH RIBAS

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa em genética do comportamento.);

Versão: 4

CAAE: 11544312.5.0000.5223

Instituição Proponente: Faculdades Dom Bosco/ PR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Centro Universitário Positivo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 489.086

Data da Relatoria: 11/12/2013

Apresentação do Projeto:

A capacidade que alguns indivíduos apresentam em se sobressaírem em suas específicas modalidades esportivas pode estar relacionada à predisposição genética e não apenas condicionadas a tais fatores (FERREIRA et al., 2005; STEWART e RITTWEGER, 2006; OSTRANDER et al., (2009). Por meio da genética no esporte é possível identificar os indivíduos com a fisiologia e morfologia ideal, bem como aqueles atletas com maior capacidade de responder ou adaptar-se ao treinamento com menores chances de sofrerem lesões (LIPPI et al. 2010). O atual mapa genético humano apresenta uma lista de mais de 200 genes candidatos e suas regiões genéticas associadas com o desempenho físico humano, o exercício e a saúde (BRAY et al., 2009). De todos estes, quatro genes candidatos e seus polimorfismos serão objeto de interesse em nosso estudo, devido seus polimorfismos ou mutações estarem relacionados com o aumento dos níveis de força e velocidade, dentre eles estarão: alfa actina ζ 3 (ACTN3), enzima conversora de angiotensina (ECA), enzima creatina quinase M (CK-MM) e AMP desaminase (AMPD1). Tais genes e seus polimorfismos supra citados, estão muito bem documentado no que alude os mais diferentes esportes e populações, porém não foram encontradas menções de trabalhos científicos com esportes de combate sejam eles de percussão

Endereço: Rua Paulo Martins, 332

Bairro: Mercês

CEP: 80.710-010

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (413)218-5582

Fax: (413)218-5559

E-mail: cep@dombosco.com.br

FACULDADES DOM BOSCO/
PR



Continuação do Parecer: 489.086

ou domínio, sendo assim, o interesse desta pesquisa nasce na necessidade de se verificar a incidência destes genes de força e potência muscular na população de lutadores.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o genótipo dos genes, alfa actina 3, da enzima conversora de angiotensina, da enzima creatina quinase M, AMP1 desaminase em relação ao desempenho físico de lutadores de percussão e domínio.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos presentes na realização deste estudo estão relacionados à coleta da amostra sanguínea, tais como hematomas e flebite, os quais são passíveis de controle por meio de medidas preventivas. Indivíduos emotivos, subnutridos ou hipoglicêmicos poderão eventualmente apresentar lipotímia, caracterizada por debilidade geral, palidez e sudorese. Serão utilizados materiais esterilizados e descartáveis para a punção venosa (agulhas, seringas e luvas), assepsia prévia do local a ser puncionado por meio da utilização de álcool 70%. Para prevenção da formação de hematoma todos os indivíduos terão o local da punção comprimido de forma adequada ao ser retirada a agulha. Em caso de sinais de lipotímia os indivíduos serão colocados em posição confortável.

Benefícios:

Por meio da realização deste estudo será possível genotipar os genes candidatos da força e potência em lutadores de percussão e domínio para futura detecção de talentos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Tema relevante para a linha de pesquisa estudada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto apresentou todos os termos obrigatórios

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Paulo Martins, 332
Bairro: Mercês **CEP:** 80.710-010
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (413)218--5582 **Fax:** (413)218--5559 **E-mail:** cep@dombosco.com.br

FACULDADES DOM BOSCO/
PR



Continuação do Parecer: 489.086

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CURITIBA, 11 de Dezembro de 2013

Assinador por:
MARIA CRISTINA LEITE GOMES
(Coordenador)

Endereço: Rua Paulo Martins, 332

Bairro: Mercês

CEP: 80.710-010

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (413)218--5582

Fax: (413)218--5559

E-mail: cep@dombosco.com.br