



Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PRORAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA BIOMÉDICA**

GINO FELLIPE SANTORO

**A INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ACE I/D
E CK-MM A/G NCOL EM ATLETAS DE FUTEBOL AMERICANO
DO BRASIL**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2019

GINO FELLIPE SANTORO

**A INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ACE I/D
E CK-MM A/G NCOL EM ATLETAS DE FUTEBOL AMERICANO
DO BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito para obtenção do título de “Mestre em Ciências” – Área de Concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Bassan
Co-Orientador: Prof. Dr. Fabiano de Macedo Salgueirosa

CURITIBA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Santoro, Gino Fellipe

A influência de polimorfismos genéticos ace I/D e CK-MM em atletas de futebol americano do Brasil [recurso eletrônico] / Gino Fellipe Santoro.-- 2020.

1 arquivo texto (63 f.): PDF; 2,64 MB.

Modo de acesso: World Wide Web

Título extraído da tela de título (visualizado em 30 mar. 2020)

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, Curitiba, 2019

1. Engenharia biomédica - Dissertações. 2. Futebol - Brasil - Desempenho. 3. Futebol americano. 4. Jogadores de futebol - Desempenho. 5. Aptidão física do atleta. 6. Genética molecular. 7. Polimorfismo (Genética). 8. Genética de populações. I. Bassan, Júlio Cesar. II. Salgueirosa, Fabiano de Macedo. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

CDD: Ed. 23 – 610.28

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba
Bibliotecário: Adriano Lopes CRB-9/1429

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº136

A Dissertação de Mestrado intitulada “A INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ACE I/D E CK-MM A/G NCOL EM ATLETAS DE FUTEBOL AMERICANO DO BRASIL”, defendida em sessão pública pelo candidato Gino Fellipe Santoro, no dia 11 de dezembro de 2019, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Engenharia Biomédica, linha de pesquisa Engenharia Clínica e Gestão e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Julio Cesar Bassan - UTFPR

Prof. Dr. João Antônio Palma Setti – UTFPR

Prof. Dr. Ricardo Corrêa da Cunha - UP

Prof. Dr. Zair Candido Oliveira Netto - UP

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 11 de dezembro de 2019.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Gino e Sandra que sempre me incentivaram e apoiaram em todas as áreas da minha vida, que não importa quão difícil seja o obstáculo, eles sempre estarão ao meu lado me dando forças e me lembrando que sou capaz de superar tudo. Muito obrigado por fazerem parte da minha vida, sinto-me extremamente abençoado por ter vocês.

Ao meu irmão Gilberto que, mesmo sendo o oposto de mim, nunca deixou de me apoiar, torcer e celebrar comigo minhas conquistas. Agradeço muito seus conselhos e sua parceria.

Aos meus avós por serem meus exemplos de vida e por me ensinarem que a parte boa da vida é estar próximo de quem amamos e assim conseguimos ultrapassar momentos difíceis.

À minha querida e paciente esposa Patricia pelo seu amor incondicional, por me ajudar em cada momento de minha vida, escutar meus medos e me dar um conforto para que eu possa superá-los. Obrigado por compreender minha dedicação ao projeto de pesquisa e por ser essa mulher incrível.

A todos os mestres que contribuíram com a minha formação acadêmica e profissional durante a minha vida, em especial o professor Dr. Fabiano Salgueirosa que me orientou no caminho acadêmico desde o momento da graduação e esteve ao meu lado me ensinando a importância da dedicação e do constante aprendizado. Muito obrigado por tudo e se estou hoje aqui é porquê o senhor fez parte dessa trajetória.

Também agradeço ao professor Dr. Júlio Cesar Bassan que me aceitou na pós-graduação e me guiou nesse segundo estágio da vida, no qual precisamos ser mais independentes e mais dedicados. Obrigado por aguentar minhas inúmeras perguntas e principalmente por me manter no caminho.

Agradeço à UTFPR por ser uma instituição pública e de qualidade, possibilitando que o conhecimento científico seja cada vez mais universal.



Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Também agradeço à Universidade Positivo e aos seus docentes que me incentivaram a percorrer o caminho da pesquisa científica oferecendo seu laboratório e seus funcionários para que fosse possível realizar o experimento.

RESUMO

SANTORO, GINO FELLIPE. A influência de polimorfismos genéticos ace I/D e CK-MM em atletas de futebol americano do Brasil. 2019. 52 folhas. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

No Brasil, o Futebol Americano (FA) é a modalidade esportiva com maior crescimento no número de atletas e espectadores. Com o intuito de obter o melhor desempenho físico, equipes nacionais investem cada vez mais na preparação física dos atletas e na montagem de comissões técnicas especializadas e multidisciplinares. O desempenho físico advém de uma multiplicidade de propriedades biológicas e mecânicas. Estes diversos fenótipos estão associados através da interação complexa entre o ambiente e o perfil genético individual. A hipótese é que há um elemento hereditário que interfere na aptidão física. Dentre os genes retratados que podem influenciar nesta resposta distingue-se os genes da enzima conversora de angiotensina (ACE) e enzima creatina quinase (MM CK-MM A/G NcoI). O objetivo é determinar o perfil da distribuição genotípica e alélica dos genes ACE e CK – MM em atletas brasileiros de Futebol Americano em um time da Cidade de Curitiba-PR. A coleta de DNA foi feita a partir de células da mucosa jugal de 45 atletas e 37 não atletas, do sexo masculino. A genotipagem dos polimorfismos do ACE I/D e da CK-MM A/G NcoI foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase e analisadas pela técnica de eletroforese. Para comparar as frequências dos genótipos entre os atletas e o controle foi utilizado o teste Qui-quadrado. A associação entre as frequências dos alelos foi verificada através de tabelas de contingência 2X2 analisadas pelo teste de Qui-quadrado com correção de Yates. Para todas as análises, foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. A distribuição do genótipo do gene da ACE I/D teve uma diferença significativa entre os dois grupos, tendo o grupo de atletas uma representação superior do genótipo DD (51,1%) em relação ao grupo controle (18,9%), $p < 0,001$, uma diferença significativa para a frequência alélica do gene da ACE I/D também foi observada quando houve a comparação entre grupos, para o polimorfismo do gene da CK-MM A/G NcoI também encontrou-se diferenças significativas tanto para a distribuição genotípica quanto para a alélica quando comparado os grupos. Evidencia-se um possível favorecimento genético tanto alélico quanto genotípico do polimorfismo da ACE e da CK-MM A/G NcoI em atletas de Futebol Americano no Brasil.

Palavras-chave: Genética. Futebol Americano. Treinamento Esportivo. Esporte Coletivo. Potência.

ABSTRACT

SANTORO, GINO FELLIPE. The influence of genetic polymorphisms ACE I/D and CK-MM in American football athletes in Brazil. 2019. 52 pages. Dissertation – Biomedical Engineer Post-Graduation Program, Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2019.

In Brazil, American Football is the fastest growing sport in number of athletes and spectators. In order to achieve the best physical performance, national teams are increasingly investing in the physical preparation of athletes and the setting up of specialized and multidisciplinary technical committees. Physical performance comes from a multitude of biological and mechanical properties. These diverse phenotypes are associated through the complex interaction between the environment and the individual genetic profile. The hypothesis is that there is an inherited element that interferes with physical fitness. Among the portrayed genes that may influence this response are the angiotensin converting enzyme (ACE) and creatine kinase enzyme (MM CK-MM A / G NcoI) genes. The objective is to determine the genotypic and allelic distribution profile of ACE and CK - MM genes in Brazilian American Football athletes in a team from Curitiba - PR. DNA was collected from jugal mucosa cells of 45 athletes and 37 non-athletes, all male. The genotyping of ACE I / D and CK-MM A / G NcoI polymorphisms was performed by polymerase chain reaction and analyzed by electrophoresis technique. The Chi-square test was used to compare genotype frequencies between athletes and control. The association between allele frequencies was verified through 2x2 contingency tables analyzed by Chi-square test with Yates correction. For all analyzes, p-value of ≤ 0.05 values were considered significant. ACE I / D gene genotype distribution had a significant difference between the two groups, with the athlete group having a higher representation of the DD genotype (51.1%) compared to the control group (18.9%), p-value of ≤ 0.001 , a significant difference for the allele frequency of the ACE I / D gene was also observed when comparing groups; for the polymorphism of the CK-MM A / G NcoI gene we also found significant differences for both the distribution genotypic as for allelic when compared the groups. A possible genetic allelic and genotypic favoring of ACE and CK-MM A / G NcoI polymorphism is evidenced in American Football athletes in Brazil.

Keywords: Genetics. Football. Sports Training. Team Sport. Power.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da localização e estrutura do gene da <i>ACE</i>	24
Figura 2 - Distribuição de fibras (vasto lateral) de um indivíduo II e um DD.....	27
Figura 3 - Representação esquemática da creatina quinase (CK) fosfocreatina (pcr) no músculo.....	29
Figura 4 - Ilustração da esquematização da eletroforese.....	37
Figura 5 - Padrão esperado de eletroforese para o gene da <i>ACE</i> pb - pares de bases; II; ID; DD.....	39
Figura 6 - Padrão de eletroforese para o genótipo id após reavaliação pb – pares de bases.....	40
Figura 7 - Padrão esperado de eletroforese para o gene da CK-MM pb - pares de bases; AA; AG; GG.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Indicador utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene ACE.....	38
Quadro 2 - Indicador específico utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene ACE.....	39
Quadro 3 - Indicador específico utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene CK-MM.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela	1	-	Distribuição	genotípica	de	ACE	
I/D.....							43
Tabela	2	-	Distribuição	alélica	de	ACE	
I/D.....							44
3		-	Distribuição	genotípica	de	CK-MM	
A/G.....							44
Tabela	4	-	Distribuição	alélica	de	CK-MM	
A/G.....							45

LISTA DE ABREVIATURAS

FA	Futebol Americano
$VO_{2máx}$	volume de oxigênio máximo
DNA	ácido desoxirribonucleico
ACE	enzima conversora de angiotensina
CK-M	enzima creatina quinase M
SRA	renina-angiotensina
Ang II	angiotensina II
VE	ventrículo esquerdo
RAS	sistema renina-angiotensina
ATP	adenosina trifosfato
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
NCAA	<i>National Collegiate Athletic Association</i>
NFL	<i>National Football League</i>
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCr	Fosfocreatina
pb	Pares de bases
Kbp	Pares de base
μ L	Microlitro
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
TBE	solução base de Trisborato-EDTA
SNP	polimorfismo de nucleotídeo simples

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. JUSTIFICATIVA	18
3. PROBLEMA	19
4. OBJETIVO	20
4.1 Objetivo geral	20
4.2 Objetivos específicos	20
5. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
5.1 Conceito de polimorfismo e mutação	21
5.2 Fisiologia da modalidade esportiva futebol americano	21
5.3 Sistema renina-angiotensina.....	23
5.4 Polimorfismo id do gene <i>ACE</i>	24
5.5 <i>ACE</i> e desempenho físico.....	24
5.6 Relação <i>ACE</i> I/D e desempenho esportivo	26
5.7 Creatina quinase CK.....	27
5.8 CK-MM	29
5.9 Polimorfismo A/G NcoI do gene CK-MM	29
5.10 Relação CK-MM A/G e desempenho esportivo.....	30
6. METODOLOGIA.....	33
6.1 Tipo de estudo	33
6.2 Local	33
6.3 População e amostra	33
6.3.1 Critérios de inclusão	34
6.3.2 Critérios de exclusão	34
6.4 Delineamento experimental	34
6.4.1 Procedimentos.....	34
6.4.2 Coleta da mucosa jugal.....	35
6.4.3 Extração do dna genômico dos atletas	35

6.4.4	Gel de agarose	36
6.4.5	Eletroforese	36
6.4.6	Aconselhamento genético, acompanhamento clínico e psicológico ...	37
7.	GENOTIPAGEM	38
7.1	Genotipagem do polimorfismo I/D do íntron 16 do gene <i>ACE</i>	38
7.2	Genotipagem do polimorfismo CK-MM A/G Ncol do éxon 8 E íntron 7, do gene CK.....	40
7.3	Análise estatística	42
8.	RESULTADOS.....	43
9.	DISCUSSÃO	46
10.	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	59
	ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP.....	61
	ANEXO B – DETERMINAÇÃO VISUAL DO GENE DA ACE I/D.....	63
	ANEXO C- DETERMINAÇÃO VISUAL DO GENE DA CK-MM A/G NCOL	63

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o Futebol Americano (FA) é uma das modalidades esportivas com maior crescimento no número de atletas e espectadores. Equipes nacionais cada vez mais investem na preparação física dos atletas e na montagem de comissões técnicas especializadas e multidisciplinares, com o intuito de obter a melhor *performance* (SOUZA, SILVA & PICOLI 2015).

O FA é uma modalidade esportiva, basicamente composta de exercícios respetivos em intensidade máxima. O jogo é realizado em quatro tempos de 15 minutos com um intervalo de 20 minutos entre o segundo e terceiro tempo. As equipes são compostas por onze jogadores por vez divididos em ataque ou defesa. Todavia raramente um atleta joga em ambas as posições e quando isso ocorre em geral é breve e por uma razão estratégica específica (TREXLER. *et al* 2017; KRAEMER *et al.*, 2000).

Cabe enfatizar que cada posição no campo tem responsabilidades específicas durante a partida. Sendo assim, as demandas físicas que são exigidas de cada jogador são bem distintas. Devido a tal particularidade, o FA é caracterizado por uma variedade de capacidades físicas, sendo as mais relevantes força e potência e estas, por sua vez, acabam por modular o desempenho físico dos atletas. (MCMASTER *et al.*, 2013)

A respeito do desempenho físico, este vem sendo estudado ao longo dos anos por vários cientistas do esporte. Tais pesquisadores comprovaram com o passar dos anos, por intermédio de suas pesquisas que o desempenho físico, necessita de inúmeras propriedades biológicas e biomecânicas (BOUCHARD e HOFFMAN, 2011). Tais atributos podem ser tanto metabólicos quanto anatômicos como, por exemplo, produção de força, capacidade cardiorespiratória, comprimento e elasticidade dos tendões, propriedades de tensão muscular e das fibras. Estes vários fenótipos estão conectados por uma interação complexa entre o ambiente e o perfil genético de cada ser humano. Acredita-se que o componente hereditário influencia a aptidão física, cerca de 66% (De Moor *et al.*, 2007), e este componete é capaz de interagir com fatores ambientais e em particular com o treinamento físico (MAFFULLI *et al.*, 2013).

Pesquisas genéticas aplicadas ao desempenho desportivo têm sido realizadas nessa linha desde a década de 1950, entretanto os estudos só receberam atenção crescente nas décadas de 1970 e 1980 (BOUCHARD e MALINA, 1983, MALINA e BOUCHARD, 1989). A investigação dessas características abstrusas constituía-se em análises de gêmeos, famílias e em estudos de associação. Prud'homme *et al.* (1984) expressou em sua pesquisa que gêmeos monozigóticos, provenientes de um único óvulo, responderam de forma semelhante ao treinamento. Ainda, foi verificado uma variação quase oito vezes maior no VO₂máx (volume de oxigênio máximo) entre pares de gêmeos dizigóticos, provenientes da fecundação de dois óvulos diferentes, quando comparados aos pares de gêmeos monozigóticos.

No entanto, somente a partir do sequenciamento do genoma humano em 2003 foi possível o estudo dos possíveis genes envolvidos com a *performance* humana. Uma alteração nas sequências de bases do DNA (polimorfismos) pode influenciar na expressão e atividade de determinadas proteínas e, assim, estar de várias formas envolvida na variação do fenótipo de performance física (BRAY *et al.* 2009). Hoje, acredita-se que aproximadamente 350 variações genéticas (genes candidatos) estão relacionadas com fenótipos de performance e aptidão física e saúde (SARZYNSKI *et al.*, 2016).

Assim, por intermédio da utilização de técnicas da biologia molecular, tem sido viável investigar particularidades complexas, como o desempenho físico (MAFFULLI *et al.*, 2013; SHARP, 2008; BRAY *et al.* 2009). Condição que viabiliza a construção do mapa genético e seus genes candidatos e seus polimorfismos humanos para o desempenho esportivo e os fenótipos de *fitness* relacionados com a saúde (BRAY *et al.*, 2009).

Dentre os genes candidatos e os seus polimorfismos, um destaque será dado ao polimorfismo de inserção (I) / deleção (D) no gene da enzima conversora de angiotensina (ACE I/D) e o polimorfismo do gene da enzima creatina quinase - músculo esquelético adenina (A)/ guanina (G) (CK-MM A/G Ncol). Tais genes estão tanto associados a força e potência muscular quanto a resistência cardiorrespiratória (WOODS *et al.*, 2001, NAZAROV *et al.*, 2001).

Como comentado anteriormente o FA é um esporte que preconiza as valências físicas, força e, principalmente, potência, sendo assim esses genes podem ter uma relação direta com o perfil favorável dos atletas na modalidade.

Neste cenário, acredita-se que o perfil genético favorável para ser um atleta de rendimento no FA seja uma combinação de genótipos dos genes da *ACE* e *CK-MM A/G NcoI*. Mas enquanto para o gene da *ACE* um genótipo DD aparenta ser o mais apropriado, para o gene da *CK – MM A/G NcoI* um genótipo GG acredita-se ser o mais adequado.

Desta forma, a presente pesquisa teve por objetivo determinar o perfil da distribuição genotípica e alélica dos genes da *ACE* e *CK – MM A/G NcoI* em atletas de Futebol Americano em um time da cidade de Curitiba-PR.

2. JUSTIFICATIVA

A pesquisa ajuda a quantificar a distribuição genotípica e alélica dos genes da *ACE I/D* e da *CK-MM A/G Ncol* de um time de futebol americano da cidade de Curitiba-PR e ajudar a entender se esses polimorfismos genéticos influenciam de alguma maneira a modalidade de Futebol Americano.

3. PROBLEMA

Qual seria o perfil genético e alélico para os polimorfismos nos genes da Enzima Conversora de Angiotensina I/D e da Enzima Creatina Quinase MM NcoI A/G, para atletas competidores na modalidade esportiva Futebol Americano?

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

- Determinar o perfil da distribuição genotípica e alélica dos genes ACE e CK – MM em atletas brasileiros de Futebol Americano em um time da cidade de Curitiba-PR.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência genotípica e alélica dos genes da enzima conversora de angiotensina em atletas brasileiros de Futebol Americano e compará-las em relação ao grupo controle.
- Determinar a frequência genotípica e alélica dos genes da enzima creatina quinase MM A/G Ncol em atletas brasileiros de Futebol Americano e compará-las em relação ao grupo controle.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Conceito de polimorfismo e mutação

Entre os seres vivos, os cromossomos homólogos são muito semelhantes entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (loci) é possível haver variabilidade na sequência do DNA. Caso a variação seja encontrada em uma frequência maior que 1% da população, esta é denominada polimorfismos de DNA (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2004). De maneira simples entende-se polimorfismos de DNA como sequências de pares de bases púricas: Adenina e Guanina e pirimídicas: Citosina, Timina e Uracila, que diferem dos arranjos esperados, que por sua vez apresentam menor frequência em uma determinada população (HARTLY *et al.*, 2008). Essas sequências alteradas nos genes podem influenciar a expressão de proteínas e estas por sua vez podem influenciar diretamente nos fenótipos, que alteram características que modificam o desempenho esportivo (BRAY *et al.*, 2009). Em complemento, tais variações na performance esportiva podem, muito provavelmente, ocasionar vantagens em atividades que exijam força, potência muscular ou resistência aeróbia (WOELLNER *et al.*, 2016). Assim embora o treinamento, a nutrição e fatores psicológicos sejam contribuintes importantes para alcançar o sucesso atlético, sugere-se um papel da genética para os atletas que alcançam o auge dos esportes escolhidos (OSTRANDER, HUSON e OSTRANDER, 2009).

5.2 Fisiologia da modalidade esportiva futebol americano

O Futebol Americano (FA) é o esporte coletivo mais popular nos Estados Unidos. Acredita-se que sua popularidade se deva ao estilo físico intenso e rápido do jogo (HOFFMAN *et al.*, 2008). Para jogar a modalidade exige-se dos atletas altos níveis de força muscular, potência, velocidade e agilidade. Características marcantes deste esporte dizem respeito às colisões e movimentos intensos de alta intensidade de curta duração, porém frequentes durante um jogo de 60 min. (FULLAGAR *et al.*, 2017).

Essas ações curtas, porém, repetidas de alta intensidade, ao longo de um período prolongado, sugerem uma combinação de contribuições energéticas de 90% do sistema energético da fosfocreatina e da via glicolítica anaeróbia (HOFFMAN,2008; KRAEMER *et. al.*, 2000: 795-813).

A respeito do jogo de FA, o mesmo pode ser separado em uma série de jogadas chamados *Drives*. Em uma análise de uma temporada de FA da Divisão III da NCAA (*National Collegiate Athletic Association*), houve em média 14,4 *drives* ofensivos por equipe, com média de 4,6 jogadas por *drive*. Isso é um pouco mais do que o número médio de *drives* relatados em temporadas da NFL (*National Football League*). No entanto, as equipes da NFL executam aproximadamente mais uma jogada por *Drive* do que o relatado para os times de FA da faculdade (entre 5,3 e 5,6 jogadas por *Drive*) (HOFFMAN, 2002:93–108; PLISK *et al.*, 1997).

No que se refere ao tempo de duração das jogadas, estas têm duração média de 5,49 s no FA universitário (HOFFMAN, 2002; PLISK *et al.*,1997), enquanto a média de duração da jogada na NFL é de 5,0 s (BURKE *et al.*, 1980). Entre cada jogada, as equipes têm um máximo de 25 segundos para começar a próxima jogada. No entanto, o relógio de jogo não começa até que o árbitro tenha definido a posição da bola. Assim, o intervalo de descanso entre cada jogada geralmente excede 25 segundos. Em relatos limitados, o tempo médio entre as jogadas em um jogo de FA universitário é de 32,7 segundos (HOFFMAN,2008; KRAEMER *et. al.*, 2000: 795-813) enquanto na NFL o intervalo médio de descanso entre as jogadas é de 26,9 a 36,4 segundos (BURKE *et al.*, 1980). Cabe enfatizar que o tempo médio de jogo e descanso entre as jogadas permite uma compreensão mais precisa das demandas fisiológicas da partida.

Por fim, apesar das pesquisas mostrarem que variáveis como potência muscular, tamanho corporal, força muscular e velocidade de uma equipe para outra influenciarem em qual divisão no FA universitário esse time está competindo, apenas a capacidades física potência muscular tem sido considerada para diferenciar as equipes dentro de uma mesma divisão em relação ao desempenho do atleta (GARSTECKI, *et al* 2004).

5.3 Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é relacionado com valências físicas há algum tempo (COATES D *et al.*, 2003), esse sistema endócrino exerce importante função na regulação da homeostasia do sistema circulatório humano (MYERSON S *et al.*, 1999). Produzida pelas células renais justaglomerulares, um tipo modificado de célula muscular lisa situada nas arteríolas aferentes, a renina atua mediante a globulina angiotensinogênio, liberando um peptídeo, a angiotensina I (DIAS, *et al.*, 2007). Esse peptídeo contém características vasoconstritoras leves, porém, quando clivada a outro peptídeo, angiotensina II (Ang II), por ação da (ACE), obtêm capacidade vasoconstritora mais pertinentes.

A angiotensina II tem sido associada a hipertrofia cardíaca e de músculos lisos quando induzidos a sobrecarga desde os anos 80, criando uma possível interação direta a adaptação o exercício (BERK BC *et al.*, 1989, GEISTERFER *et al.*, 1988, MONTGOMERY *et al.*, 1997).

Mais uma plausível interação do SRA com o exercício é a função determinante da ACE concentrada na hidrólise da bradicinina pela extração de um dipeptídeo da região C terminal (COATES D *et al.*, 2003), o que resulta em sua desativação. A bradicinina é um peptídeo de função vasodilatadora e inibidora do crescimento celular e promove seu efeito por ação em receptores próprios B1R e B2R (WILLIAMS *et al.*, 2004).

Em 1997 Douglas *et al.*, demonstrou em seu estudo que a hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) é uma propriedade marcante em atletas de elite. Entretanto, foram verificados, em atletas de resistência submetidos a regime de treinamento parecidos, níveis variados de hipertrofia do VE, indicando que essa adaptação é mediada geneticamente.

Em seus estudos Douglas *et al.*, 1997 constatou em atletas que o polimorfismo da ACE I/D tinha relação com o índice de massa ventricular esquerda, relatando que atletas do genótipo DD apresentaram valores significativamente superior quando comparados com os atletas com genótipo ID.

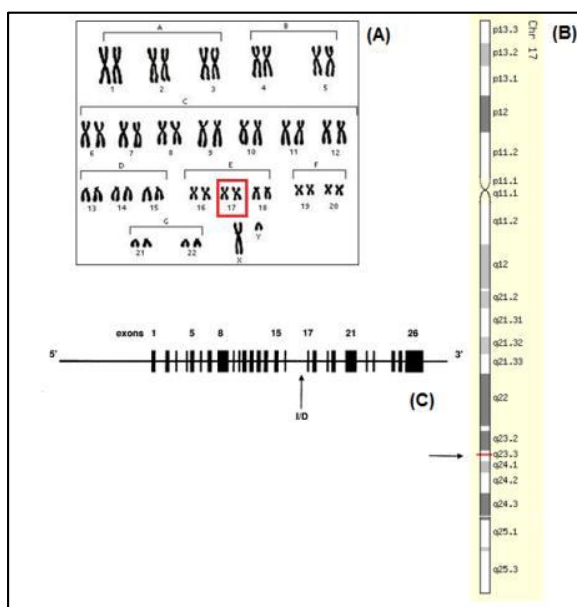
Pesquisas (KINUGAWA T *et al.*, 1997) ressaltam que a ativação do SRA local pelo exercício físico encontra-se acentuado em sujeitos homozigotos para o alelo D, resultando em maior degradação da bradicinina. Conforme comentado anteriormente, a bradicinina tem efeito antiproliferativo e inibidor do crescimento.

Assim, quanto maior for a degradação da bradicinina, maior será a chance de facilitar a hipertrofia e sugerindo assim um papel importante para a angiotensina II na hipertrofia do músculo esquelético.

5.4 Polimorfismo id do gene *ACE*

A respeito do gene da *ACE* (21 Kbp), ele está localizado no cromossomo 17 q23 e é composto de 26 éxons (COATES D *et al.*, 2003). O gene que codifica a enzima conversora da angiotensina (*ACE I/D*) manifesta um polimorfismo que consiste na ausência (deleção, D) ou presença (inserção, I) de 287 pares de base (RIGAT *et al.*, 1990) como mostra a figura a seguir.

Figura 1 - Representação da localização e estrutura do gene da *ACE*. Representação esquemática da localização e estrutura do gene da *ACE*. Em (A) um cariótipo masculino evidenciando os pares de cromossomos homólogos 17; (B) representação do cromossomo 17, evidenciando a localização do gene da *ACE* no braço longo, especificamente na região 17q23.3 (seta). (C) Localização da região polimórfica presente no íntron 16 (seta).



Fonte: Alonso (2012).

5.5 *ACE* e desempenho físico

A *ACE* foi primeiramente associada a performance por Montgomery e seu grupo de pesquisa em 1998, e foi a primeira variante genética a ser relacionada com a performance física humana. Resultados mostraram que o alelo I

apresentou maior frequência em montanhistas, enquanto o alelo D apresentaram menor frequência quando comparados com o grupo controle. Os portadores do genótipo II obtiveram melhores resultados em um teste de resistência muscular localizada pós-treinamento em relação aos outros genótipos (ID e DD). Desde então o polimorfismo da *ACE* ganhou atenção dos pesquisadores da área da atividade física e do esporte.

Autores como Woods e Nazarov, têm evidenciado resultados significativos da hegemonia do alelo D com eventos de força/potência (WOODS *et al.*, 2001), como no estudo realizado com nadadores europeus de elite, de várias distâncias, que apresentou excesso do alelo D quando comparados ao grupo controle.

A pesquisa de Nazarov *et al.* (2001) buscou determinar a frequência do alelo I e D em 217 atletas russos (nadadores, esquiadores, triatletas e corredores de pista e campo), onde os atletas foram analisando levando em conta o tempo de realização da prova, < 1 min. 1 a 20 min. e mais de 20 min., os valores indicaram uma frequência maior do alelo D, 72% para atletas que participavam de provas cujo tempo era inferior a 1 min., e uma frequência maior do alelo I 63% para os atletas cujas provas estavam compreendidas em um intervalo de tempo de 1 a 20 min.

Esses mesmos achados foram encontrados pelos pesquisadores Costa *et al.* (2009) quando pesquisaram nadadores de curta distância, encontrando também uma relação do alelo D a melhores níveis de potência.

Por outro lado, pesquisa realizada com triatletas do exército indiano Shenoy *et al.* (2010), observaram não haver nenhuma associação da potência ou resistência muscular com o polimorfismo *ACE*.

Indo de encontro com inúmeros estudos, Gineviciene *et al.* (2010) analisaram 193 atletas, 152 homens e 41 mulheres divididos em esportes de resistência, mistos, velocidade e potência e de equipes, encontrando uma frequência de genótipo II maior 42,4% para os atletas de esportes mistos, uma frequência ID maior 59,6% para esportes de velocidade e potência e um frequência de genótipo DD maior para o grupo de resistência 32,8%, os autores, sugerem uma associação positiva entre o alelo D e a probabilidade de atletas Lituanos se tornarem atletas de *endurance* de elite.

No que diz respeito ao sistema metabólico anaeróbico, especificamente no ganho de força e potência muscular o alelo (D) demonstrou uma relação com a maior produção de *ACE* nos tecidos musculares bem como a circulação sistêmica, relacionando este polimorfismo com a força e velocidade (DIET *et al.*, 2001).

Schalfeubeger em 1998 verificou adaptações neurais, através de ativação de unidades motoras e hipertrofia muscular relacionados com a *ACE* após um período de treinamento.

Efeitos da *ACE* nos sistemas neurais proporcionados pelo treinamento de força devem estar relacionados com sua ação sobre o sistema nervoso simpático, instigados pelo efeito da angiotensina II nos receptores pré-sinápticos, esta resposta no aumento da angiotensina II é uma resposta do aumento da ativação do sistema nervoso simpático (YONEMOCHI *et al.*, 1998).

Em um estudo recente apresenta do alelo D do gene da *ACE* foi novamente a relacionado com as qualidades físicas de força e potência. Esse estudo foi feito com 100 atletas da Polônia de modalidades com essas valências físicas predominantes, registrando à hegemonia do alelo (DD) nos resultados obtidos na amostra com níveis de 77,6% para a presença deste alelo (EIDER *et al.*, 2013).

5.6 Relação *ACE* I/D e desempenho esportivo

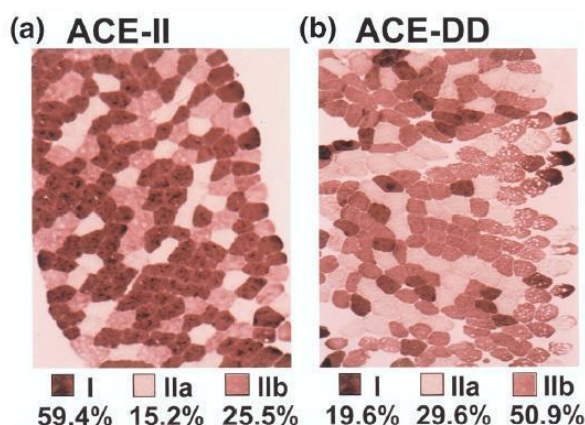
Como mencionado anteriormente, o alelo I aparenta estar associado com eventos de resistência, fato este mediado pela maior eficiência mecânica da musculatura esquelética e por seu efeito na proporção das fibras musculares. Por outro lado, o alelo D tem demonstrado relação com eventos de força/potência, mediado pelo efeito hipertrófico muscular, secundário ao aumento na concentração plasmática e tecidual de Ang II. (MYERSON *et al.*, 1999).

Cabe enfatizar que o alelo D está congruente à maior atuação da enzima conversora da angiotensina tanto no plasma, quanto nos tecidos (PUTHUCHEARY *et al.*, 2011), assim, homozigotos para o alelo D (genótipo DD)

apresentam maior atividade da *ACE* quando comparados com os genótipos ID e II.

Ainda, é possível que o polimorfismo *ACE* I/D influencie de alguma maneira a distribuição de fibras musculares. Zhang *et al.* (2003) evidenciaram que sujeitos do genótipo II apresentavam uma porcentagem significativamente maior de fibras do tipo I ($50,1 \pm 13,9\%$ vs $30,5 \pm 13,3\%$) e menor de fibras do tipo IIb ($16,2 \pm 6,6\%$ vs $32,7,4\%$) quando comparados aos do genótipo DD (Figura 2), o que pode explicar, em parte, a associação da *ACE* I/D com a performance de *endurance* e força/potência.

Figura 2 - Distribuição de fibras (vasto lateral) de um indivíduo II e um DD



Fonte: (ZHANG *et al.*, 2003)

5.7 Creatina quinase CK

Em esportes com exercícios intensos e de curta duração que requerem apenas alguns segundos para serem concluídos e, assim, necessitam de um suprimento rápido de ATP. O sistema metabólico ATP-CP é importante pois é o que fornece essa energia rápida (POWERS, 2014.p.51).

As diferentes isoformas da Creatina quinase simultaneamente com a creatina fosfato (PCr) formam um importante sistema metabólico de tamponamento em células com dramáticas flutuações de exigência energética (DIAS, *et al.*, 2007).

Creatina quinase é uma proteína enzimática que está localizada tanto no citosol como na mitocôndria, na sua forma ativa, é composta de duas subunidades expressas por genes distintos.

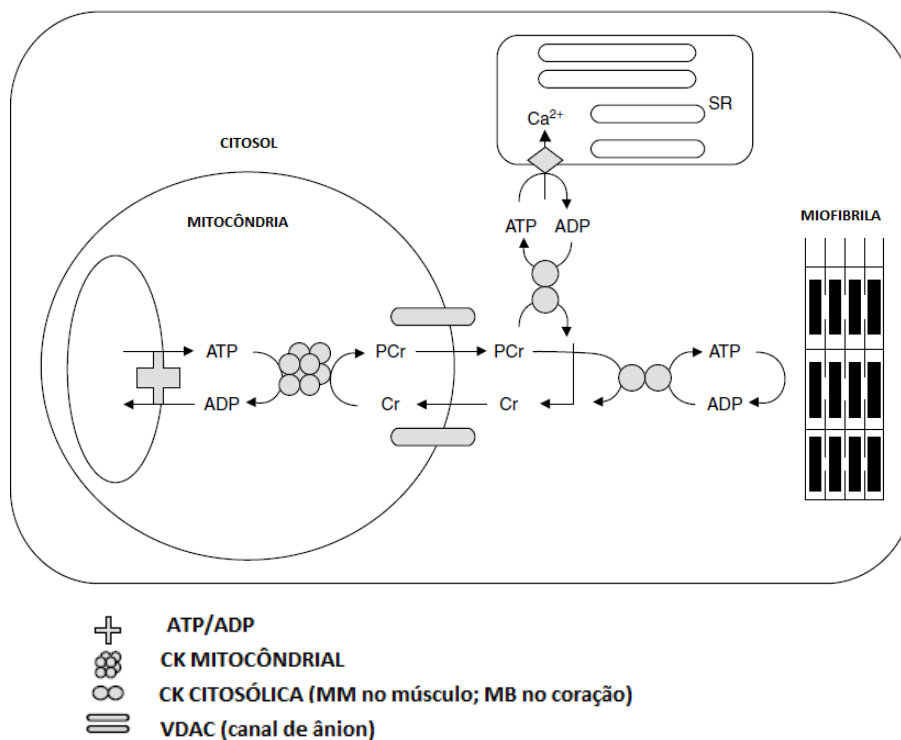
O gene da subunidade M (CK-M), com 17,5 Kbp oito éxons e sete íntrons, que está localizado no cromossomo 19 q13.2-q13.3 (WOLFARTH B *et al.*, 2005), Tal subunidade é uma enzima essencial para o suprimento energético do músculo, pois ela acelera a transferência reversível do fosfato da fosfocreatina para a adenosina difosfato, gerando adenosina trifosfato (EIDER *et al.*, 2015 e AHMETOV *et al.*, 2015); e o gene da subunidade B (CK-B; B = Brain) está localizado no cromossomo 14 q32.3 (ECHEGARAY M *et al.*, 2001).

Essas subunidades estruturam-se em três isoenzimas teciduais específicas: CK-MM, CK-BB (músculo esquelético e cérebro - homodímeros) e CK-MB (músculo cardíaco - heterodímero), (BAIRD *et al.*, 2012, ECHEGARAY M *et al.*, 2001). Todas as isoformas são expressas de maneira diferenciada por variados tecidos, CK-MM é abundante no músculo esquelético, sustentando alta concentração de ATP na região da cabeça da miosina, enquanto a CK-MB tem alta atividade no músculo cardíaco e menor atividade no músculo esquelético (FONTANET *et al.*, 1991).

Como relatado a função primária do sistema CK-PCr é manter energia no máximo tempo possível, ainda desempenha uma atribuição de tamponamento espacial, encarregada no transporte do composto fosforil de alta energia da mitocôndria e das enzimas glicolíticas, para os sítios de hidrólise do ATP (STEEGHS K *et al.*, 1997).

Obtendo uma alta concentração celular de PCr e alta atividade da CK há a possibilidade, dessa forma, tamponar o acúmulo de ADP, dando suporte à manutenção favorável da relação ATP/ADP durante períodos de atividade metabólica intensa, assim prolongando o desempenho como mostra a Figura 3 (DIAS, *et al.*, 2007).

Figura 3: Representação esquemática da creatina quinase (CK) fosfocreatina (PCr) no músculo. Nas mitocôndrias, a isoforma mitocondrial sarcomérica das formas CK (Scmit-CK) um complexo funcional com a translocase ATP / ADP e o dependente de voltagem canal aniônico (VDAC). A creatina é fosforilada e o PCr é transportado para os locais que exigem energia da célula, como miofibrilas e retículo sarcoplasmático (SR), onde as isoformas da CK citosólica (predominantemente homodímero MM em músculo ou o dímero MB no músculo cardíaco) use-o para refosforilar ADP em ATP.



Fonte: (DIAS, *et al.*, 2007).

5.8 CK-MM

Uma isoforma da CK, a CK específica do músculo (CK-MM), está localizada na linha M e no retículo sarcoplasmático das miofibrilas (ROMAN BB *et al.* 1997, WALLIMANN T *et al.* 1992). A CK-MM tenta manter a homeostase energética, fornecendo um suprimento constante de fosfato de creatina, essencial para a manutenção da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático e de outras enzimas dependentes de energia (FIELD *et al.* 2006). A concentração de CK-MM difere entre os tipos de fibras musculares, tendo uma maior representação em tipos de fibra II (YAMASHITA K *et al.* 1991).

5.9 Polimorfismo A/G NcoI do gene CK-MM

O gene que codifica a CK-MM foi mapeado para o cromossomo 19q13.2–13.3, se estende acima de 17,5 pares de kilobases e inclui 8 éxons e 7 íntrons (OLGA *et al.*, 2013).

O polimorfismo no gene da CK-MM foi detectado por reação de polimerase em cadeia e digestão do DNA com a enzima endonuclease de restrição NcoI. O alelo com sítio suscetível à digestão para NcoI foi designado como alelo A (985+185pb), enquanto que o alelo sem o sítio de restrição para NcoI foi designado como alelo G (1170pb) pois há uma substituição de guanina por adenina (RIVERA *et al.* 1999). Essa variante definida como NcoI está localizada na região 3' do gene (COERWINKEL-DRIESSEN M *et al.* 1988).

A região 3' não traduzida do gene CK-MM apresenta um polimorfismo A/G, o que pode ter uma influência na estabilidade do mRNA e uma mudança na expressão do gene levando a crer que os alelos A e G determinariam diferentes atividades da CK-MM nos miócitos. (LUCIA *et al.*, 2005;)

Curiosamente, o gene CK-MM está localizado na mesma região no cromossomo 19 que outros dois genes relacionados à função muscular e miopatias específicas: a distrofia miotônica proteína quinase (DMPK) (BRUNNER HG *et al.* 1989) e o receptor de rianodina 1 (RYR1) (ROBINSON R *et al.* 2006).

5.10 Relação CK-MM A/G e desempenho esportivo

O gene da creatina quinase M ou CK-M (M = muscle) é um candidato possível modulador do desempenho esportivo, sendo capaz de ter efeitos positivos no consumo máximo de oxigênio, contribuindo em eventos de *endurance*, bem como atuar como molécula reguladora de pH, visto que ao se ligar a fosfocreatina (CP), consome um próton e, portanto, diminui a concentração de H⁺ no sarcoplasma muscular (DIAS *et al.*, 2007; e HOUSTON, 2009).

Dahlstedt *et al.* (2000) mostraram em suas pesquisas que a atividade da CK-MM em esforços de longa duração poderia instalar um quadro de fadiga pelo acúmulo de fosfato inorgânico, tal fato não ocorre em esforços curtos de alta intensidade.

Apesar de a CK-MM aparecer preferencialmente no músculo esquelético, a ação dessa enzima demonstrou ser pelo menos duas vezes menor em fibras musculares do tipo I quando comparado com as fibras do tipo II (RIVERA, *et al.*, 1997). Curioso o fato de que fibras musculares do tipo I, predominantemente

recrutadas em atividades de resistência e reconhecidas pela predominância de atividade enzimática oxidativa, exibem relação inversa com a atividade da CK-MM.

Em estudo conduzido por Apple e Billardelo (1994), impressionados com a expressão dos genes da CK, verificaram aumento de 40% no RNAm da CK-B e redução de 42% no RNAm da CK-M no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos ao treinamento de resistência. Esses relatos com modelos animais são consolidados, com a não verificação do aumento da atividade da CK-MM nos estudos com humanos, indicando que essa isoforma desempenha sua principal ação em células musculares glicolíticas e está negativamente relacionada, eventualmente limitando, ao metabolismo aeróbio (ECHEGARAY M *et al.*, 2001).

Rivera em 1997, experimentou a hipótese da presença de uma relação entre o polimorfismo A/G da CK-MM e sua influência na variável VO_2 ; submetendo 240 sujeitos (80 pais, 80 mães e 80 filhos) a um programa de treinamento de resistência por 20 semanas. Nessa amostra, a frequência dos genótipos AA, AG e GG foram de 0.49, 0.44 e 0.07, respectivamente.

Quando a resposta ao programa de treinamento associada aos diferentes genótipos da CK-MM foi adequada para as co-variáveis sexo, idade, peso corporal e $VO_{2máx.}$ inicial, foi encontrada diferença significativa para os 160 pais ($p = 0,0004$) e 80 filhos ($p = 0,025$). Os homozigotos para o raro alelo (GG) mostraram menor $\Delta VO_{2máx.}$ quando comparado com os homozigotos e heterozigotos para o alelo comum A (genótipos AG e AA).

A relevância da diferença foi de pelo menos três vezes menor para os 160 pais e 1,5 vez menor para os 80 filhos homozigotos para o raro alelo comparado com os outros dois genótipos. Esses resultados dão suporte, em parte, a heterogeneidade na resposta do $VO_{2máx.}$ ao treinamento de resistência e amparam a hipótese da influência do componente genético nessa variável.

Zhou *et al.* (2006) e Heled *et al.* (2007) apresentaram em seus estudos que o alelo A está associado com um melhor desempenho em provas de resistência, e o alelo G, um melhor desempenho em atletas que executam ações que exigem mais força muscular e potência (Y. HELED *et al.*, 2007, ZHOU, D *et al.*, 2006).

Outros estudos como de Miranda-Vilela *et al.* (2012) e Yamin *et al.* (2010) não apoiam um papel do polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) Ncol do gene da creatina quinase muscular na explicação da variabilidade da CK entre indivíduos. No entanto, o mecanismo permanece pouco compreendido e é confundido pelos diferentes desenhos metodológicos implementados pelos pesquisadores.

6. METODOLOGIA

6.1 Tipo de estudo

Refere-se a um estudo descritivo transversal, porque procurou descrever características sobre uma população determinada, ou ainda estabelecer relações entre variáveis; envolvendo a utilização de técnicas pré-determinadas (RAUPP, 2006). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos da Faculdade Dom Bosco sob parecer nº 489.086.

6.2 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.

6.3 População e amostra

Fizeram parte do presente estudo 45 atletas, todos do sexo masculino com idade média de $25,94 \pm 7,12$ anos, com experiência nacional em Futebol Americano e 37 indivíduos voluntários, do sexo masculino, do estado do Paraná com idade média de $22,19 \pm 4,76$ anos, os quais representaram o grupo controle. Todos os 45 atletas foram testados para o gene da *ACE* e *CK-MM*, 37 não-atletas foram testados para o gene da *ACE* e 32 não-atletas foram testados para o gene *CK-MM*. Tal perda amostral para o gene da *CK-MM* se deu pelo fato da não amplificação de cinco amostras.

6.3.1 Critérios de inclusão

Fizeram parte da amostra jogadores de Futebol Americano com pelo menos 1 ano de experiência na modalidade, que tenham participado de um campeonato estadual e nacional com idade entre 18 e 40 anos.

6.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa os atletas de Futebol Americano e os participantes do grupo controle que: 1º) não assinaram o TCLE; 2) no decorrer da pesquisa retiraram seu consentimento para continuar participando da mesma; 3) suas amostras da mucosa jugal, por motivos técnicos não foram extraídas o DNA ou o mesmo não amplificou.

6.4 Delineamento experimental

Em um primeiro momento, a Federação Paranaense de Futebol Americano, foi contatada, para fornecer o ranking do melhor time do estado em atividade, com resultados estaduais e nacionais. Em uma segunda fase, ocorreu o contato com o time para informá-los do estudo e obter a autorização do estudo. Na terceira fase foi realizado o contato com os atletas para: 1) informar os objetivos da pesquisa; 2) entregar o termo de consentimento livre e esclarecido; 3) agendar os dias e horários das coletas, para não acontecer interferência na rotina de treinamento e descanso dos atletas.

6.4.1 Procedimentos

As coletas da mucosa jugal foram realizadas no local de treino do time, no 27º batalhão logístico, localizado no bairro do Bacacheri e posteriormente as amostras foram levadas ao Laboratório de Genética da Universidade Positivo para a extração do DNA.

6.4.2 Coleta da mucosa jugal

A coleta da saliva foi realizada em campo, em uma sala de apoio, montada para dar suporte aos atletas, com os participantes selecionados para o estudo, posicionados sentados em uma cadeira com os pés apoiados. Inicialmente foi depositada uma solução de glicose 3% na boca dos participantes e solicitados que eles realizassem bochechos por dois minutos. Após a realização dos bochechos, os participantes cuspiram o líquido em um copo plástico de cafezinho.

O pesquisador, com o auxílio de uma espátula de madeira raspou a mucosa jugal e lavou a espátula no copo onde estava a solução cuspidada, em seguida transferiu todo o conteúdo para um tubo Falcon de 15ml.

Após a coleta, as amostras foram levadas em um isopor com placas de gelo, ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular de uma Instituição de Ensino Superior Privada, em Curitiba/PR, onde, foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos.

6.4.3 Extração do dna genômico dos atletas

Após a centrifugação das amostras foi adicionado tampão de extração (TRIS 10mM, EDTA 4mM, SDS 0,5% pH 7,76). Em seguida as amostras foram submetidas a digestão durante a noite com proteinase K (20 mg/mL). O DNA foi separado dos resíduos celulares através da centrifugação por gradiente de densidade utilizando acetato de amônio (8M em EDTA 1mM). O DNA genômico foi então precipitado com álcool isopropílico e álcool etílico 70%, isolado por centrifugação e por fim, ressuspenso em tampão de eluição (TRIS 10mM; EDTA 1 mM; pH 7,76). A quantificação de DNA foi realizada utilizando um espectrofotômetro (NanoK, Kasvi, 2015), e a concentração foi ajustada para 1 mg/ mL para armazenamento subsequente em -20°C.

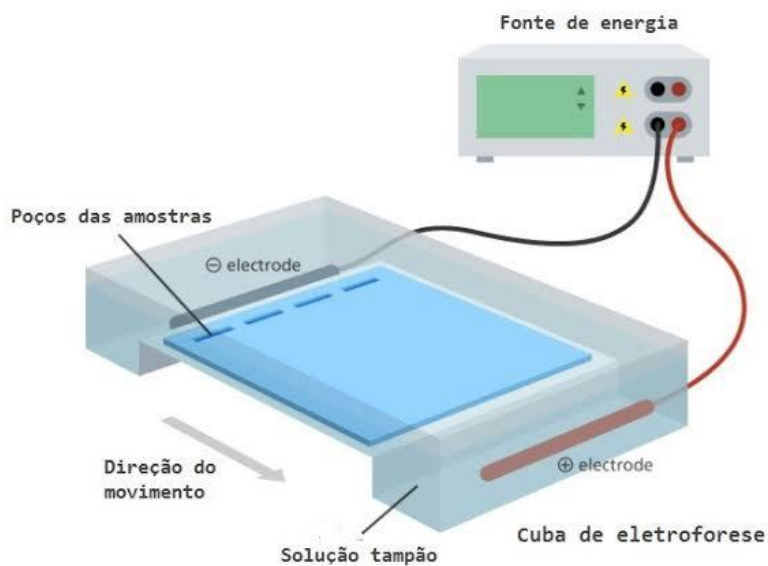
6.4.4 Gel de agarose

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 $\mu\text{l/ml}$. Foi corado por 10 min. a fim de visualização das bandas e finalmente, ser fotografar o gel no transiluminador.

6.4.5 Eletroforese

Os métodos de manipulação dos ácidos nucleicos baseiam-se em suas propriedades intrínsecas, ou seja, o fato de serem naturalmente carregados negativamente devido à presença dos grupos fosfatos (ECKERSALL, 2008). A carga e o tamanho são as duas propriedades moleculares dos ácidos nucleicos frequentemente utilizadas na detecção e separação. Uma das técnicas mais utilizadas em biologia molecular é a eletroforese em gel, que emprega essas duas propriedades. A eletroforese baseia-se na movimentação das partículas carregadas em um campo elétrico em função da razão entre sua carga e sua massa. Assim, quando uma amostra for aplicada em um suporte (gel), uma corrente elétrica passará por esse meio e induzirá a separação. Os ácidos nucleicos possuem carga negativa em pH neutro e, quando colocados em um campo elétrico entre eletrodos, migrarão em direção ao eletrodo positivo. Os fragmentos de ácido nucleicos menores deslocam-se mais que os maiores em uma separação eletroforética (MCPHERSON, 2011). (Figura 4)

Figura 4: Ilustração da esquematização da eletroforese.



Fonte: Google Imagens

6.4.6 Aconselhamento genético, acompanhamento clínico e psicológico

Ponderando que a presença dos polimorfismos dos genes, *ACE* e *CK-MM*, não trazem implicações clínicas para seus portadores e não portadores, não foi necessário realizar aconselhamento genético, acompanhamento clínico e psicológico dos atletas estudados. A presença ou ausência deles permitiu apenas um direcionamento do treinamento empregado.

7. GENOTIPAGEM

7.1 Genotipagem do polimorfismo I/D do íntron 16 do gene *ACE*

A genotipagem do polimorfismo I/D do gene *ECA* foi realizada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os atletas e controles 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 conforme Rigat (*RIGAT et al.*, 1992).

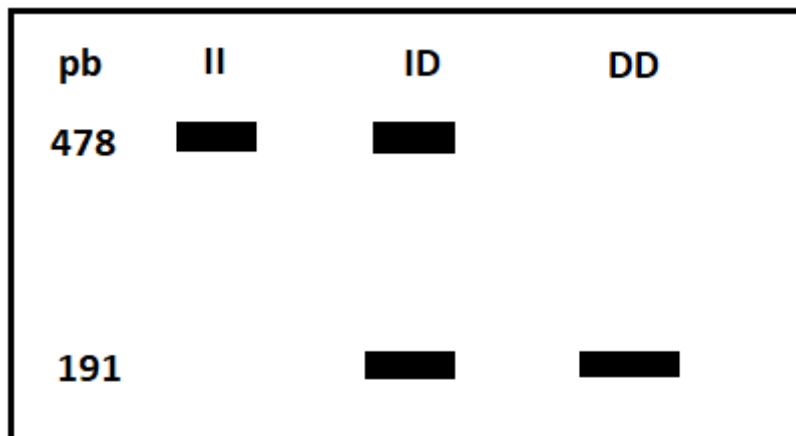
Quadro 1 - Indicador utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene *ACE*

Polimorfismo	Sequência
<i>ACE</i>	direito 5` CTGGAGAGCCACTCCCATCCTTTCT `3 reverso 5` GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT `3

Fonte: O autor (2019).

Para cada reação utilizou-se Tampão 1X para Taq, 3,0 mM de 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, totalizando 25µL. Para amplificação do material genético foi utilizado o seguinte programa: 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, 5 minutos de extensão final a 72°C. Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e revelados com brometo de etídeo a 5 µg/mL. O alelo D do gene *ACE* gera um amplicon de 191 pares de bases, enquanto o alelo I gera um amplicon de 478 pares de base, contendo a inserção de 287 pb (Figura 3) (Anexo B).

Figura 5: Padrão esperado de eletroforese para o gene da ACE pb - pares de bases; II; ID; DD



Fonte: O autor (2019).

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

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

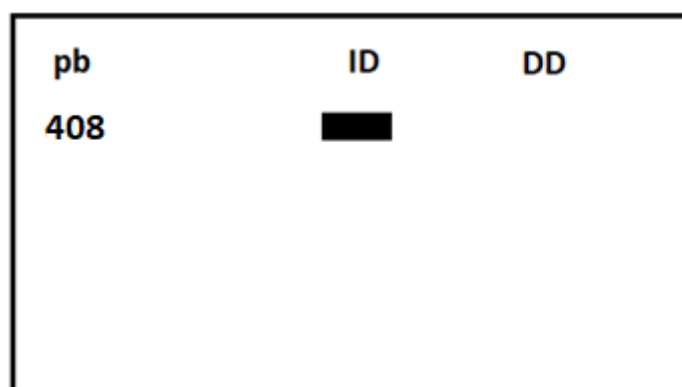
Polimorfismo	Sequência
ACE	direito 5` TTTGAGACGGAGTCTCGCTC `3 reverso 5`GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT `3

Fonte: O autor (2019).

(SHANMUGAM et al., 1993) 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 (Figura 6). Amostras classificadas como I/D ou I/I na primeira reação foram utilizadas como controle positivo da reação específica para a inserção.

Figura 6: Padrão de eletroforese para o genótipo ID após reavaliação; pb - pares de bases; ID; 408; DD – em branco.



Fonte: O autor (2019).

7.2 Genotipagem do polimorfismo CK-MM A/G NcoI do éxon 8 E íntron 7, do gene CK

A genotipagem do polimorfismo CK MM do gene da CK foi realizada pela técnica RFLP – PCR (Reação em Cadeia da Polimerase associada ao polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição). Os atletas e controles foram divididos em grupos de mesmo genótipo: GG, AG e AA. O éxon 8 e o íntron 7 do gene CK, onde se encontra o polimorfismo, será amplificado utilizando os seguintes indicadores:

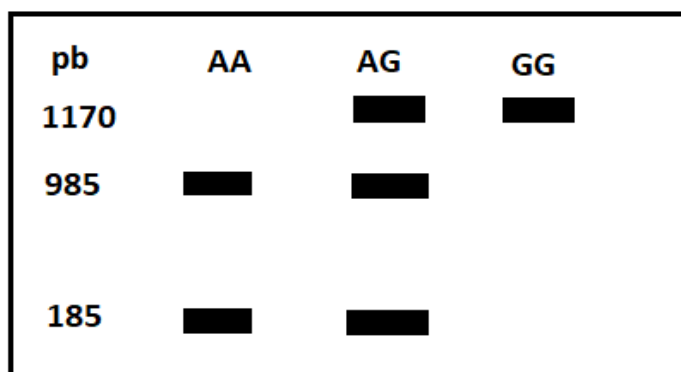
Quadro 3 - Indicador específico utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene CK-MM A/G NcoI

Polimorfismo	Sequência
CK-MM	direto: 5` GTGCGGTGGACACAGCTGCCG `3 reverso: 5` CAGCTTGGTCAAAGACATTGAGG `3

Fonte: O autor

O sistema reacional foi para 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: 1) um ciclo de desnaturação a 95 ° C durante 5 min; 2) 30 ciclos de desnaturação a 95° C durante 30 s, emparelhamento a 60 ° C durante 30 s e extensão a 72 ° C durante 45 s; e 3) um ciclo de alongamento final de 5 min a 72° C. Medidas preventivas de contaminação foram tomadas pela inclusão de mistura de reação PCR sem DNA (controle negativo) em cada corrida de amplificação (RIVERA *et al.*, 1997). Após cada amplificação, o produto de PCR foi digerido com 10U da enzima de restrição NcoI, conforme o que recomenda o fabricante da enzima. Os fragmentos resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio. O alelo sem o sítio de restrição da NcoI foi designado como alelo de 1170 pb (alelo G), enquanto o alelo com a polimórfica NcoI sítio foi designado como alelo 985 + 185 pb (alelo A) (figura 7) (RIVERA *et al.*, 1997).

Figura 7: Padrão esperado de eletroforese para o gene da CK-MM pb - pares de bases; AA; AG; GG



Fonte: O autor (2019).

7.3 Análise estatística

Para comparar as frequências dos genótipos entre grupos foi realizado o teste de Qui-quadrado de Pearson. As associações entre as frequências dos alelos foram verificadas por meio de tabelas de contingência 2X2 analisadas pelo teste de Qui-quadrado com correção de Yates. Para verifica a distribuição dos genótipos dos genes CK-MM NcoI e ECA I/D foi utilizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Todas as análises foram realizadas no software SPSS 20.0. Foi considerado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

8. RESULTADOS

A distribuição genotípica absoluta e relativa do gene da ACE I/D dos 45 atletas e dos 37 controles que fizeram parte da presente pesquisa, são apresentadas na Tabela 1. A distribuição do genótipo do gene da ACE I/D teve uma diferença significativa entre os dois grupos, tendo o grupo de atletas uma representação superior do genótipo DD de (51,1%) em relação ao grupo controle de apenas (18,9%) $p \leq 0,001$. Mostrando, que a frequência genotípica encontrada no grupo de atletas, no presente estudo foi diferente dos valores observados na população geral, assim mostrando um possível fator genético seletivo para a amostra de jogadores de Futebol Americano que fizeram parte da amostra.

Tabela 1 - Distribuição genotípica para o gene ACE I/D.

Grupo	D / D	I / D	I / I	P-Valor
Controle (n=37)	7 (18,9%)	23 (62,1%)	7 (18,9%)	
Atletas (n=45)	23 (51,1%)	16 (35,5%)	6 (13,4%)	0,001

Para diferença da distribuição genotípica entre grupos foi usado o teste de Qui-quadrado de Pearson, assim encontrando um $p \leq 0,001$.

A Tabela 2 apresenta os dados referentes à frequência alélica para o gene da ACE I/D dos 45 atletas e 37 não-atletas que fizeram parte do estudo. Foi revelada uma diferença significativa para a frequência alélica do gene da ACE I/D, quando o grupo atletas foi comparado com o grupo controle o alelo D (68,8%) vs (50%) ($p \leq 0,05$). Em relação a frequência do alelo I o grupo controle apresentou uma maior frequência do alelo I (50%) quando comparados com o grupo atletas (31,2%) $p < 0,05$. Portanto, presume-se que há relevância desse polimorfismo com a compatibilidade das qualidades físicas exigidas na modalidade.

Tabela 2 - Distribuição da frequência alélica para o gene ACE I/D.

Grupo	D	I	P-Valor
Controle (n=37)	37 (50%)	37 (50%)	0,05
Atletas (n=45)	62 (68,8%)	28 (31,2%)	

Para diferença da distribuição das frequências alélicas entre grupos foram verificadas por meio de tabelas de contingência 2X2 analisadas pelo teste de Qui-quadrado com correção de Yates, encontrando um $p \leq 0,05$.

A frequência genotípica absoluta e relativa do gene CK-MM A/G Ncol dos 45 atletas e dos 32 controles que fizeram parte da presente pesquisa, é apresentada na Tabela 3. A distribuição do genótipo do gene da CK-MM apresentou uma diferença significativa entre os dois grupos, a frequência do grupo de atletas no genótipo AA foi de (55,51%) contra o grupo controle (24,3%) ($p \leq 0,04$). Esse resultado, para a frequência genotípica sugere um favorecimento genético para a amostra de jogadores de Futebol Americano.

Tabela 3 - Distribuição genotípica para o gene CK-MM A/G.

Grupo	A / A	A / G	G / G	P-valor
Controle (n=32)	9 (28,1%)	15 (46,9%)	8 (25,0%)	0,04
Atletas (n=45)	25 (55,5%)	15 (33,3%)	5 (11,1%)	

Para diferença da distribuição genotípica entre grupos foi usado o teste de Qui-quadrado de Pearson, assim encontrando um $p \leq 0,04$.

A Tabela 4 exibe os dados referentes à distribuição alélica para o gene da CK-MM A/G dos 45 atletas e 32 não-atletas que fizeram parte do estudo. Os valores mostraram uma diferença significativa quando comparado a frequência alélica entre os dois grupos, os atletas apresentaram uma frequência para o alelo A de (72,2%) e alelo G (27,8%) e o grupo controle tendo uma frequência do alelo A (53%) e alelo G (37%) $p \leq 0,04$.

Tabela 4 - Distribuição alélica para o gene CK-MM A/G.

Grupo	A	G	P-valor
Controle (n=32)	35 (50,7%)	31 (49,3%)	0,04
Atletas (n=45)	65 (72,2%)	25 (27,8%)	

Para diferença da distribuição das frequências alélicas entre grupos foram verificadas por meio de tabelas de contingência 2X2 analisadas pelo teste de Qui-quadrado com correção de Yates, encontrando um $p \leq 0,04$.

9. DISCUSSÃO

A presente pesquisa teve por objetivo analisar a distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos do gene da ACE e da CK-MM A/G Ncol em atletas de Futebol Americano Brasileiros comparados com a população não atletas. Cabe enfatizar que o presente estudo foi o primeiro a investigar a genotipagem do gene da ACE e da CK-MM A/G Ncol em atletas de Futebol Americano Brasileiro.

Ao comparar a distribuição genotípica absoluta e relativa do gene da ACE I/D Tabela 1, verificou-se uma possível seleção natural genética para a amostra de jogadores de Futebol Americano, com uma prevalência significativa do genótipo DD comparado com o grupo controle (51,1% vs. 18,9%). Esses resultados vão ao encontro de outros estudos que relacionam o genótipo DD com desportos em que as capacidades físicas dominantes são força e potência, tais como o futebol americano (WOODS et al., 2001, SHANMUGAM et al., 1993). Adicionalmente, uma investigação com atletas nadadores de curta e média distância corrobora com estes resultados, pois demonstrou que, tanto em homens quanto em mulheres, os atletas do genótipo DD exibiram maior de força de preensão manual do que os do genótipo II.

Em relação à frequência alélica para o gene da ACE I/D (Tabela 2), os resultados encontrados, presumem que há relevância desse polimorfismo com a compatibilidade das qualidades físicas exigidas na modalidade Futebol Americano. Estudos mostram que a maior presença do alelo D está relacionado com melhor resposta a testes de força / potência, tornando os portadores deste alelo, especialmente o genótipo DD, superiores em desportos associados com estes fenótipos, pelo aumento dos níveis de ACE e, por conseguinte, a angiotensina II, e redução nos níveis da bradicinina, que podem influenciar a resposta hipertrófica ao exercício (WOODS DR et al. 2002, MURPHEY LJ et al. 2000), ou o provável efeito do polimorfismo I / D da ACE na proporção de fibras musculares (ZHANG et al., 2003).

Estudos do polimorfismo do gene da ACE em atletas de vários esportes revelaram uma maior taxa de ocorrência das variantes I / D e principalmente D / D em esportes de força e potência (WANG P et. al 2008),

como relatado nesse estudo com atletas de futebol americano. 45 Ao comparar a distribuição genotípica absoluta e relativa do gene da CKMM A/G Ncol (Tabela 3), verificou-se uma frequência significativamente superior do genótipo AA em atletas quando comparado com o grupo controle (55,5% vs. 28,2%). Assim sugerindo um favorecimento genético para a amostra de jogadores de Futebol Americano.

Esses resultados vão contra os achados de Popov (2012), que associou o genótipo AA à predisposição para esportes voltados principalmente para o desenvolvimento da endurance, diferente das principais qualidades físicas do futebol americano. Acredita-se que o alelo A da CK-MM A/G Ncol provavelmente influencia a expressão do gene e pode resultar em uma diminuição da atividade da CK-MM nos miócitos, levando a uma ativação mais intensa da fosforilação oxidativa e, assim, priorizando o desenvolvimento da resistência (POPOV et al. 2012).

Quando contrapostos os dois grupos para a frequência alélica também é evidenciado uma representação significativa do Alelo A para o grupo de atletas, tendo uma prevalência de 72,2% vs. 50,7% (Tabela 4). Esses achados novamente vão de encontro aos de Fedotovskaia et al. (2012), que demonstram em um estudo com 384 atletas russos e 1116 controles não-atletas, uma relação do alelo A do polimorfismo do gene da CK-MM A/G Ncol e genótipo AA com esportes relacionados a capacidade física de resistência e o genótipo GG com desportos de força e potência.

Fedotovskaia et al. (2012) também relataram maior incidência do alelo G em atletas de combate poloneses e russos (entre os principais componentes do desporto se encontra a potência) quando comparados ao controle (41,2% vs. 35,6%), assim mostrando uma relevância ao alelo G para esportes de potência, e diferindo dos achados do presente estudo que associou a maior incidência do alelo A aos atletas de futebol americano do que no grupo controle.

Não está claro como o polimorfismo CK-MM A / G Ncol pode afetar a regulação da expressão do gene e conseqüentemente a transcrição da proteína. Provavelmente, sua localização na Região não segmentada 3' é a causa direta da associação com alguns fenótipos (RIVERA, et al. 1997), esse polimorfismo também pode influenciar a localização intracelular de seu

RNAm e afetar sua estabilidade e a taxa de transcrição, levando a diferenças em sua expressão (WILSON et. al 1995).

Ainda, o polimorfismo do gene da CK-MM A/G Ncol precisa ser mais estudado, sobretudo em relação ao esporte presente neste estudo, tendo em vista que essa pesquisa apresentou resultados que vão de encontro aos encontrados em outros esportes. Assim, futuros estudos que relacionem esses polimorfismos com o FA devem procurar utilizar amostras maiores e com atletas de diferentes níveis de desempenho.

10. CONCLUSÃO

De acordo com os achados e, levando em consideração as possíveis limitações do estudo. Pode-se concluir que: há uma diferença significativa na distribuição genotípica e alélica tanto para o polimorfismo do gene da ACE I/D quanto para o da CK-MM A/G NcoI quando comparado o grupo de atletas com o grupo controle.

Assim podendo indicar uma predisposição genética, para atletas de Futebol Americano, tendo os alelos D do gene da ACE e o alelo A do gene da CK-MM A/G NcoI dominantes entre os jogadores e, fazendo os portadores dos genótipos DD da ACE e o genótipo AA da CK-MM A/G NcoI sujeitos supostamente geneticamente favorecidos para participar desta modalidade. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo confirmam a relevância do gene da ACE I/D e CK-MM A/G NcoI em atletas de FA na cidade de CuritibaPR como um marcador genético útil na seleção e preparação dos atletas de Futebol Americano.

REFERÊNCIAS

APPLE, Fred S.; BILLADELLO, Joseph J. Expression of creatine kinase
Apêndice A – termo de consentimento livre

BAIRD, Marianne F. et al. Creatine-kinase-and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2012, 2012.

BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 30, n. 6, p. 593-601, 2004.

BERK, Bradford C. et al. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 13, n. 4, p. 305-314, 1989.

BOUCHARD, Claude; HOFFMAN, Eric P. (Ed.). **Genetic and molecular aspects of sports performance**. Wiley-Blackwell, 2011.

BOUCHARD, Claude; MALINA, Robert M. Genetics of physiological fitness and motor performance. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 11, n. 1, p. 306, 1983.

BRAY, Molly 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. 34-72, 2009.

BRUNNER, H. G. et al. Myotonic dystrophy is closely linked to the gene for muscle-type creatine kinase (CKMM). **Human genetics**, v. 81, n. 4, p. 308-310, 1989.

BURKE, E. J.; WINSLOW, E.; STRUBE, W. V. Measures of body composition and performance in major college football players. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 20, n. 2, p. 173, 1980.

COATES, David. The angiotensin converting enzyme (ACE). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, n. 6, p. 769-773, 2003.

COERWINKEL-DRIESSEN, Marga et al. NcoI RFLP at the creatine kinase-muscle type gene locus (CKMM, chromosome 19). **Nucleic acids research**, v. 16, n. 17, p. 8743, 1988.

COSTA, Aldo Matos et al. Angiotensin-converting enzyme genotype affects skeletal muscle strength in elite athletes. **Journal of sports science & medicine**, v. 8, n. 3, p. 410, 2009.

DAHLSTEDT, ANDERS J. et al. Is creatine kinase responsible for fatigue? Studies of isolated skeletal muscle deficient in creatine kinase. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 7, p. 982-990, 2000.

DE MOOR, Marleen HM et al. Genome-wide linkage scan for athlete status in 700 British female DZ twin pairs. **Twin Research and Human Genetics**, v. 10, n. 6, p. 812-820, 2007.

DIAS, Rodrigo Gonçalves et al. Polimorfismos genéticos determinantes da performance física em atletas de elite. **Rev Bras Med Esporte**, v. 13, n. 3, p. 209-16, 2007.

DIET, F. et al. ACE and angiotensinogen gene genotypes and left ventricular mass in athletes. **European journal of clinical investigation**, v. 31, n. 10, p. 836-842, 2001.

DOUGLAS, Pamela S. et al. Left ventricular hypertrophy in athletes. **American Journal of Cardiology**, v. 80, n. 10, p. 1384-1388, 1997.

ECHEGARAY, Marcos; RIVERA, Miguel A. Role of creatine kinase isoenzymes on muscular and cardiorespiratory endurance. **Sports Medicine**, v. 31, n. 13, p. 919-934, 2001.

ECKERSALL, P. David et al. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. **Clinical biochemistry of domestic animals**, v. 6, p. 114-155, 2008.

EIDER, J. et al. The association between D allele of the ACE gene and power performance in Polish elite athletes. **Science & Sports**, v. 28, n. 6, p. 325-330, 2013.

EIDER, JERZY et al. CKM gene polymorphism in Russian and Polish rowers. **Russian Journal of Genetics**, v. 51, n. 3, p. 318-321, 2015.

FEDOTOVSKAIA, O. N. et al. Association of the muscle-specific creatine kinase (CKMM) gene polymorphism with physical performance of athletes. **Fiziologija cheloveka**, v. 38, n. 1, p. 105-109, 2012.

FIELD, Mark L. et al. Functional compartmentation of glycogen phosphorylase with creatine kinase and Ca²⁺ ATPase in skeletal muscle. **Journal of theoretical biology**, v. 238, n. 2, p. 257-268, 2006.

FONTANET, Hector L. et al. Regulation of expression of M, B, and mitochondrial creatine kinase mRNAs in the left ventricle after pressure overload in rats. **Circulation research**, v. 68, n. 4, p. 1007-1012, 1991.

FULLAGAR, Hugh HK; MCCUNN, Robert; MURRAY, Andrew. Updated review of the applied physiology of American college football: physical demands, strength and conditioning, nutrition, and injury characteristics of America's favorite game. **International journal of sports physiology and performance**, v. 12, n. 10, p. 1396-1403, 2017.

GARSTECKI, Marcus A.; LATIN, Richard W.; CUPPETT, Marchell M. Comparison of selected physical fitness and performance variables between NCAA Division I and II football players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 18, n. 2, p. 292-297, 2004.

GEISTERFER, A. A.; PEACH, Michael J.; OWENS, Gary K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. **Circulation research**, v. 62, n. 4, p. 749-756, 1988.

GINEVIČIENĖ, Valentina et al. Relating fitness phenotypes to genotypes in Lithuanian elite athletes. **Acta Medica Lituanica**, v. 17, n. 1-2, p. 1-10, 2010.

GLEIM, Gilbert W.; WITMAN, Philip A.; NICHOLAS, James A. Indirect assessment of cardiovascular "demands" using telemetry on professional football players. **The American journal of sports medicine**, v. 9, n. 3, p. 178-183, 1981.

HARTL, Daniel L.; CLARK, Andrew G. **Princípios de Genética de Populações-4**. Artmed Editora, 2010.

HELED, Yuval et al. CM-MM and ACE genotypes and physiological prediction of the creatine kinase response to exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 2, p. 504-510, 2007.

HOFFMAN, Jay R. et al. Performance, biochemical, and endocrine changes during a competitive football game. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 34, n. 11, p. 1845-1853, 2002.

HOFFMAN, Jay R. The applied physiology of American football. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 3, n. 3, p. 387-392, 2008.

HOUSTON, Michael E. Princípios de bioquímica para a ciência do exercício. **São Paulo: Ed. Roca**, 2009.

JONES, Alun; MONTGOMERY, Hugh E.; WOODS, David R. Human performance: a role for the ACE genotype?. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 30, n. 4, p. 184-190, 2002.

KINUGAWA, Toru et al. Responses of catecholamines, renin-angiotensin system, and atrial natriuretic peptide to exercise in untrained men and women. **General pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 225-228, 1997.

KRAEMER, W.J., and L.A. Gotshalk (2000). Physiology of American football. In Exercise and Sport Science. Garrett, W.E., and D.T. Kirkendall (eds). Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia, PA. pp. 795-813.

LUCIA, A. et al. Is there an association between ACE and CKMM polymorphisms and cycling performance status during 3-week races?. **International journal of sports medicine**, v. 26, n. 06, p. 442-447, 2005.

M and B mRNAs in treadmill trained rat skeletal muscle. **Life sciences**, v. 55, n. 8, p. 585-592, 1994.

MAFFULLI, Nicola et al. The genetics of sports injuries and athletic performance. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 3, n. 3, p. 173, 2013.

MAFFULLI, Nicola et al. The genetics of sports injuries and athletic performance. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 3, n. 3, p. 173, 2013.

MALINA, Robert M.; BOUCHARD, Claude. Genetic considerations in physical fitness. **Assessing physical fitness and physical activity in population-based surveys. DHHS Pub. No.(PHS)**, p. 89-1253, 1989.

MCMMASTER, Daniel Travis et al. The development, retention and decay rates of strength and power in elite rugby union, rugby league and American football. **Sports Medicine**, v. 43, n. 5, p. 367-384, 2013.

MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.; HENRY, S. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. **Appendix**, v. 5, p. 1406-14, 2011.

MIRANDA-VILELA, Ana Luisa et al. Creatine kinase MM TaqI and methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene polymorphisms influence exercise-induced C-reactive protein levels. **European journal of applied physiology**, v. 112, n. 1, p. 183-192, 2012.

MONTGOMERY, H. E. et al. Human gene for physical performance. **Nature**, v. 393, n. 6682, p. 221, 1998.

MONTGOMERY, Hugh E. et al. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. **Circulation**, v. 96, n. 3, p. 741-747, 1997.

MURPHEY, Laine J. et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. **Circulation**, v. 102, n. 8, p. 829-832, 2000.

MYERSON, Saul et al. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. **Journal of applied physiology**, v. 87, n. 4, p. 1313-1316, 1999.

NAZAROV, Igor B. et al. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. **European Journal of Human Genetics**, v. 9, n. 10, p. 797, 2001.

OLGA1AB, Fedotovskaya et al. Association of muscle-specific creatine kinase (CKM) gene polymorphism with combat athlete status in Polish and Russian cohorts. **Archives of Budo**, v. 9, n. 4, p. 233-237, 2013.

OSTRANDER, Elaine A.; HUSON, Heather J.; OSTRANDER, Gary K. Genetics of athletic performance. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 10, p. 407-429, 2009.

Plisk S, Gambetta V. Tactical metabolic training, part I. *Strength Cond.* 1997;19(2):44– 53.

POWERS, S. K., HOWLEY, E. T. *Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho*, 8. ed. Manole, 2014.

PRUD'HOMME, D.; FONTAINE, E. of maximal aerobic power to training is genotype-dependent. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 16, n. 5, p. 459-493, 1984

PUTHUCHEARY, Zudin et al. The ACE gene and human performance. **Sports medicine**, v. 41, n. 6, p. 433-448, 2011.

RAUPP, Fabiano Maury; BEUREN, Ilse Maria. *Metodologia da Pesquisa Aplicável às Ciências. Como elaborar trabalhos monográficos em contabilidade: teoria e prática*. São Paulo: Atlas, 2006.

RIGAT, Brigitte et al. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1)(dipeptidyl carboxypeptidase 1). **Nucleic acids research**, v. 20, n. 6, p. 1433, 1992.

Rivera MA, Dionne FT, Simoneau JA, Perusse L, Chagnon M, Chagnon Y, et al. **Muscle-specific creatine kinase gene polymorphism and VO₂max in the HERITAGE Family Study**. *Med Sci Sports Exerc.* 1997;29:1311-7.

RIVERA, Miguel A. et al. Linkage between a muscle-specific CK gene marker and VO₂max in the HERITAGE Family Study. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 31, n. 5, p. 698-701, 1999..

ROBINSON, Rachel et al. **Mutations in RYR1 in malignant hyperthermia and central core disease**. *Human mutation*, v. 27, n. 10, p. 977-989, 2006.

ROMAN, Brian B.; WIERINGA, Bé; KORETSKY, Alan P. Functional equivalence of creatine kinase isoforms in mouse skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17790-17794, 1997.

ROMUALDO, VICTOR. SALÃO OVAL, 2017. Disponível em: <http://www.salaooval.com.br/times/coritiba-crocodiles/> Acesso em: 30 de outubro de 2017.

SARZYNSKI, Mark A. et al. Advances in Exercise, Fitness, and Performance Genomics in 2015. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 48, n. 10, p. 1906-1916, 2016.

SCHALFEUBERGER, M.; DREXLER, H. Schieffer E, Swedberg K. Angiotensin-converting enzyme gene expression in skeletal muscle in patients with chronic heart failure. **J Card Fail.** v. 4, n. 3, p. 185-191, Sep. 1998.

SHANMUGAM, Vedapuri; SELL, Kenneth W.; SAHA, Bratin K. Mistyping ACE heterozygotes. **Genome Research**, v. 3, n. 2, p. 120-121, 1993.

SHARP, NC Craig. The human genome and sport, including epigenetics and athleticogenomics: a brief look at a rapidly changing field. **Journal of sports sciences**, v. 26, n. 11, p. 1127-1133, 2008.

SHENOY, S. et al. Association of Angiotensin Converting Enzyme gene Polymorphism and Indian Army Triathletes Performance. *Asian J Sports Med*, v. 1, n. 3, p. 143-50, Sep 2010.

SOUZA JUNIOR, Tácito Pessoa de; PEREIRA, Benedito. Modelos quantitativos e qualitativos do treinamento físico-esportivo: sobrecarga, adaptação e ajustamento. **Brazilian Journal of Sports and Exercise**, v. 1, n. 2, p. 150-157, 2010.

Souza, Silva & Picoli (2015) Motivação de atletas brasileiros de futebol americano. *Lecturas Educación Física y Deportes (Buenos Aires)* 20 (211). 1-9.

Steeghs K, Heerschap A, de Haan A, Ruitenbeek W, Oerlemans F, van Deursen J, et al. **Use of gene targeting for compromising energy homeostasis in neuromuscular tissues**: the role of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J Neurosci Methods*. 1997;71:29-41.

TREXLER, Eric T. et al. Longitudinal body composition changes in NCAA Division I college football players. **Journal of strength and conditioning research**, v. 31, n. 1, p. 1, 2017.

WALLIMANN, Theo et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **Biochemical Journal**, v. 281, n. Pt 1, p. 21, 1992.

WANG, Pei; FEDORUK, Matthew N.; RUPERT, Jim L. Keeping pace with ACE. **Sports Medicine**, v. 38, n. 12, p. 1065-1079, 2008.

WILLIAMS, Alun G. et al. Bradykinin receptor gene variant and human physical performance. **Journal of applied physiology**, v. 96, n. 3, p. 938-942, 2004.

WILSON, Ian A.; BRINDLE, Kevin M.; FULTON, A. M. Differential localization of the mRNA of the M and B isoforms of creatine kinase in myoblasts. **Biochemical Journal**, v. 308, n. 2, p. 599-605, 1995.

WOELLNER, Glaucio Neves et al. Análise do Polimorfismo do Gene ACE em Atletas de Provas de Fundo e Potência no Atletismo. **Revista UNIANDRADE**, v. 17, n. 2, p. 63-69, 2016.

WOLFARTH, Bernd et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2004 update. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 37, n. 6, p. 881-903, 2005.

WOODS, D. et al. Endurance enhancement related to the human angiotensin I-converting enzyme ID polymorphism is not due to differences in the cardiorespiratory response to training. **European journal of applied physiology**, v. 86, n. 3, p. 240-244, 2002.

WOODS, David et al. Elite swimmers and the D allele of the ACE I/D polymorphism. **Human genetics**, v. 108, n. 3, p. 230-232, 2001.

Y.HELED, Yuval et al. CM-MM and ACE genotypes and physiological prediction of the creatine kinase response to exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 2, p. 504-510, 2007.

YAMASHITA, Katsumasa; YOSHIOKA, Toshitada. Profiles of creatine kinase isoenzyme compositions in single muscle fibres of different types. **Journal of Muscle Research & Cell Motility**, v. 12, n. 1, p. 37-44, 1991.

YAMIN, Chen et al. CK-MM gene polymorphism does not influence the blood CK activity levels after exhaustive eccentric exercise. **International journal of sports medicine**, v. 31, n. 03, p. 213-217, 2010.

YONEMOCHI, Hidetoshi et al. Mechanism of β -adrenergic receptor upregulation induced by ACE inhibition in cultured neonatal rat cardiac myocytes: roles of bradykinin and protein kinase C. **Circulation**, v. 97, n. 22, 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, n. 2, p. 139-144, 2003.

ZHOU, D. Q. et al. Muscle-specific creatine kinase gene polymorphism and running economy responses to an 18-week 5000-m training programme. **British journal of sports medicine**, v. 40, n. 12, p. 988-991, 2006.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor,

O Sr. está sendo convidado a participar da pesquisa: **“A INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ACE I/D E CK-M EM ATLETAS DE FUTEBOL AMERICANO DO BRASIL”** que tem por objetivo de entender a relação da genética com a predisposição em esportes coletivos como o futebol americano.

Essa pesquisa será realizada com homens do estado do paraná entre 18 há 34 anos que pratiquem pelo menos um ano de futebol americano para o grupo de atletas e homens que não fazem esportes para ser do grupo controle não-atletas.

Não participarão da pesquisa pessoas com menos de um ano de prática, atletas de outras modalidades esportivas. Sua participação no estudo consistirá em responder algumas questões/ceder saliva para a definição genética e assinar esse termo de consentimento livre esclarecido. A entrevista/coleta de dados terá uma duração de mais ou menos 20 minutos.

Os riscos com essa pesquisa são mínimos sendo que o Sr. pode se sentir desconfortável em responder alguma pergunta, mas o Sr. tem a liberdade de não responder ou interromper a entrevista/participar em qualquer momento, sem nenhum prejuízo para seu atendimento.

O Sr. tem a liberdade de não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, mesmo após o início da entrevista/coleta de dados, sem qualquer prejuízo. Está assegurada a garantia do sigilo das suas informações. O Sr. não terá nenhuma despesa e não há compensação financeira relacionada à sua participação na pesquisa.

Caso tenha alguma d vida sobre a pesquisa o Sr. poderá entrar em contato com o coordenador responsável pelo estudo: Gino Fellipe Santoro, que pode ser localizado no Universidade Tecnológica federal do Paraná (telefone 41- 98853-0512) das 8 às 17h (OU A HORA QUE TEM DISPONÍVEL PARA RESPONDER D VIDAS DA PESQUISA) ou pelo email gino.santoro@gmail.com. O Comitê de  tica em Pesquisa do Instituto de Saúde – CEPIS, também poderá ser consultado caso o Sr. tenha alguma consideração ou d vida sobre a  TICA da pesquisa pelo telefone 11-3116-8597 ou pelo email cepis@isaude.sp.gov.br. Sua participação é importante e voluntária e vai gerar

informações que serão úteis para conseguirmos entender melhor a influência da carga genética em atletas. Este termo será assinado em duas vias, pelo senhor e pelo responsável pela pesquisa, ficando uma via em seu poder.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do que li ou foi lido para mim, sobre a pesquisa: " A INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ACE I/D E CK-M EM ATLETAS DE FUTEBOL AMERICANO DO BRASIL ". Discuti com o pesquisador Gino Fellipe Santoro, responsável pela pesquisa, sobre minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim os propósitos do estudo, os procedimentos, garantias de sigilo, de esclarecimentos permanentes e isenção de despesas.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____ _/___/____

Assinatura do entrevistado.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste entrevistado para a sua participação neste estudo. _____

___/___/___ Assinatura do responsável pelo estudo.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

FACULDADE DOM BOSCO/ PR

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES ACTN3, ACE ID, CK, AMPD1, e NOS NOS DIFERENTES ESPORTES INDIVIDUAIS E COLETIVOS

Pesquisador: MARCELO ROMANOVITCH RIBAS

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 51717515.5.0000.5223

Instituição Proponente: Faculdades Dom Bosco/ PR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.572.571

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer 1.424.895

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer 1.424.895

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer 1.424.895

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A emenda inclui um pesquisador ao projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Paulo Martins, 332
Bairro: Mercês **CEP:** 80.710-010
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3218-5582 **Fax:** (41)3218-5529 **E-mail:** cep@dombosco.sebas.com.br

Continuação do Parecer: 1.572.571

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_708931 ET.pdf	01/05/2016 19:34:47		Aceito
Folha de Rosto	folharosto.docx	08/12/2015 12:06:37	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLConsentimentodosatletas.docx	08/12/2015 11:30:05	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLAssentimento.docx	08/12/2015 11:29:55	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLÉpais.docx	08/12/2015 11:29:40	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLControlle.docx	08/12/2015 11:29:22	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetooutorado.docx	08/12/2015 11:27:20	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao.docx	08/12/2015 11:26:04	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

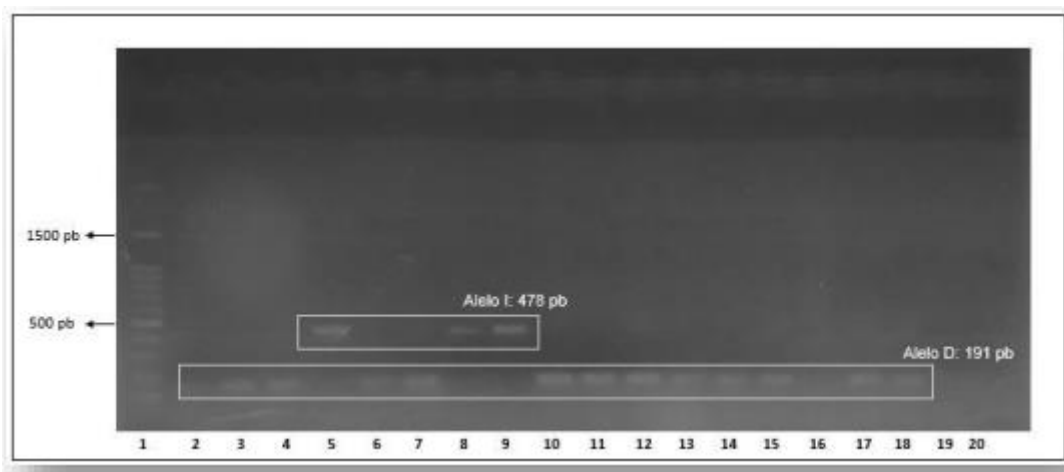
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

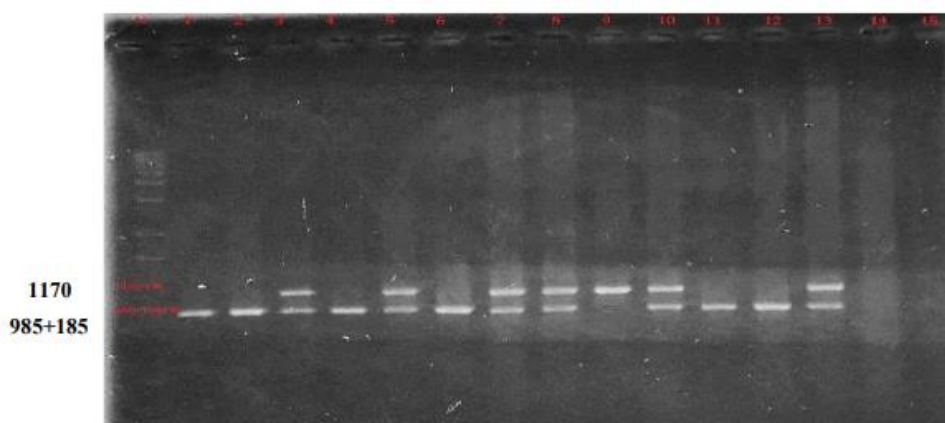
CURITIBA, 02 de Junho de 2016

Assinado por:
RENATA WASSMANSDORF
(Coordenador)

Endereço: Rua Paulo Martins, 332
Bairro: Mercês CEP: 80.710-010
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3218-5582 Fax: (41)3218-5559 E-mail: cnp@dombosco.aebaa.com.br

ANEXO B – DETERMINAÇÃO VISUAL DO GENE DA ACE I/D

Determinação visual da análise por eletroforese em gel de agarose para caracterização de genótipos da ACE I/D

ANEXO C- DETERMINAÇÃO VISUAL DO GENE DA CK-MM A/G NCOL

Determinação visual da análise por eletroforese em gel de agarose para caracterização de genótipos da CK-MM AG