

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA

MARCELO ROMANOVITCH RIBAS

**ESTUDO MOLECULAR DOS GENES CANDIDATOS A MELHORA
NOS NÍVEIS DE FORÇA E VELOCIDADE EM ATLETAS DE DOMÍNIO
DE ALTO RENDIMENTO**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2014

MARCELO ROMANOVITCH RIBAS

**ESTUDO MOLECULAR DOS GENES CANDIDATOS A MELHORA
NOS NÍVEIS DE FORÇA E VELOCIDADE EM ATLETAS DE DOMÍNIO
DE ALTO RENDIMENTO**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Engenharia Biomédica” – Área de concentração: Biotecnologia.

Orientação Prof. Dr. Júlio Cesar Bassan

Co-orientação do Prof. Dr. Oslei de Matos

CURITIBA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R482e Ribas, Marcelo Romanovitch
2014 Estudo molecular dos genes candidatos à melhora nos níveis de força e velocidade em atletas de domínio de alto rendimento / Marcelo Romanovitch Ribas.-- 2014.
63 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. 47-55.

1. Genes - Pesquisa. 2. Genótipo. 3. Atletas - Genética molecular. 4. Aptidão física do atleta. 5. Força (Esporte). 6. Velocidade. 7. Esportes - Aspectos fisiológicos. 8. Engenharia biomédica - Dissertações. I. Bassan, Júlio Cesar, orient. II. Matos, Oslei de, 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

**ESTUDO MOLECULAR DOS GENES CANDIDATOS A MELHORA NOS NÍVEIS
DE FORÇA E VELOCIDADE EM ATLETAS DE DOMÍNIO DE ALTO RENDIMENTO**

por

Marcelo Romanovitch Ribas

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de **MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA (M.Sc.)**, com área de concentração Biotecnologia, pelo **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica (PPGEB)**, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (**UTFPR**), *Campus Curitiba*, às 13h30min 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 Corrêa da Cunha
(UP)

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

Prof. Dr. Eloy Izquierdo Rodrigues
(Universidad de Valencia - Madri)

Visto da Coordenação

Prof. Dr. Bertoldo Schneider Jr (UTFPR)

AGRADECIMENTOS

Se você está lendo este texto, é porque tudo correu como o planejado. Tenho plena convicção que não foi fácil, e quem pensou que seria? O caminho a percorrer era longo e desafiador. Perdi algumas batalhas, mas ganhei outras tantas. Cai, me ajoelhei, agradei, levantei e segui; sim, mas a vida não é assim? Muitas coisas foram abdicadas, o convívio da minha amada família e dos grandes amigos, muitas e muitas noites foram viradas, pois tenho total convencimento que travei uma batalha contra o tempo. Por isso venho aqui e agora, fazer uma pequena, porém verdadeira, homenagem às pessoas que de uma forma direta ou indireta, estiveram comigo, me ajudando, ensinando, confortando, orientando para que eu vencesse esta etapa em minha vida.

Agradeço em primeiro lugar a minha amada, idolatrada esposa, amiga, parceira, cúmplice, meu anjo e porto seguro, Priscila Fernandes. Muito obrigado amor, por ter entrado na minha vida, sei o quanto você se esforça para que eu possa fazer o que tem que ser feito. Amo você e todas as coisas que você faz, amo nossa vida, nosso filho Gabriel que está chegando, seu sorriso que me ilumina e me fortalece, sou seu fã minha Nega.

Meu agradecimento aos meus pais Iaroslava Romanovitch Ribas e Nelson Ribas (in memoria). Gostaria de confabular com você pai, sobre tudo que está acontecendo em minha vida, sinto falta de nossa histórias e risadas. Obrigado por terem me dado estudo, formado meu caráter e minha personalidade, sou eternamente grato. Aproveitando, agradeço minha irmã Danieli Isabel Romanovitch Ribas, minha super parceira, que me ajudou nos momentos que o processo estava atravancado. Que disponibilizou seus sábados mesmo estando com sua Tese por concluir e foi comigo ao laboratório para acharmos onde estavam os erros da metodologia.

E o que falar do meu companheiro e amigo Zair Cândido de Oliveira Neto. Quantos finais de semanas, feriados, horas e horas no laboratório. Quantos cafés, almoços, quantas risadas, piadas e passagens de nossas vidas compartilhadas, em quanto aguardávamos a conclusão das etapas da extração e genotipagem do DNA. Começamos como estranhos e finalizamos como amigos, grato meu nobre amigo, sei que tudo foi possível e aconteceu porque tive uma grande ajuda sua.

Tenho que prestar um agradecimento especial ao meu orientador, mestre,

mentor, padrinho, paizão, amigo, professor Dr. Júlio Cesar Bassan, você é e sempre será meu norte. Me espelho em você, se algum dia conseguir ser um terço do que você é, não apenas no conhecimento científico mas também na pessoa que você é, minha missão estará cumprida. Minha total admiração e claro todo o meu respeito, obrigado professor, por ter acreditado em mim e aceitado mais uma vez ter sido meu orientador.

Agradeço ao professor Dr. Fabiano Salgueirosa, por sua importante ajuda no processo, que disponibilizou o seu tempo de final de semana para mostrar como era a extração por kit de DNA, e como realizar a metodologia para genotipar o DNA. Por fim agradeço a todos os meus amigos, porém não gostaria de citar nomes, pois poderia esquecer alguém, pois a lista é longa, amigos que torceram, vibraram, compartilharam, perguntaram, me impulsionaram para que eu pudesse atingir meu objetivo, meu muito obrigado.

RESUMO

RIBAS, Romanovitch Marcelo. **Estudo molecular dos genes candidatos à melhora nos níveis de força e velocidade em atletas de domínio de alto rendimento** (Dissertação) programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2014.

Introdução: A capacidade física humana é influenciada por fatores ambientais e genéticos. Ao associar à genética e o esporte existe a possibilidade de se identificar os indivíduos com a maior capacidade de responder ou adaptar-se ao treinamento com menores chances de sofrerem lesões. **Objetivo:** Avaliar a frequência dos genes, ACTN3 e da ACE I/D, em lutadores de domínio. **Metodologia:** Fizeram parte da presente pesquisa 23 atletas, sendo 11 lutadores de Judô, 4 lutadores de Wrestling e 8 lutadores de Jiu Jitsu, todos do sexo masculino com idade média de $27,3 \pm 6,9$ 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 $p < 0,05$. **Resultados:** As frequências genotípicas e alélicas do ACTN3 (RR=52,2%,RX=26,1% e XX=21,7%; R=65,2% e X=34,8%) e do ACE I/D (DD=50%, ID=25% e II=25%; D=65,2% e I=34,8%) não diferiram significativamente da população controle, porém quando comparado aos atletas de luta foi encontrada uma diferença significativa. **Conclusão:** Em conclusão os dados da presente pesquisa indicam uma associação do gene da ACTN3 e da ACE I/D com lutadores de domínio.

Palavras-chave: Luta de domínio. α actina. Enzima conversora de angiotensina.

ABSTRAT

RIBAS, Romanovitch Marcelo. **Molecular study of candidate genes in a better levels of strength and speed in the field athletes of high performance** (Dissertation) the graduate program in biomedical engineering of the University Federal Technological of Paraná in 2014.

Introduction: The human physical capacity is influenced by environmental and genetic factors. The association to genetics and the sport has the possibility to identify individuals with the greater capacity to respond or adapt to training with lower chances of suffering from lesions. **Objective:** evaluate the frequency of the genes, ACTN3 and the ACE I/D, in fighters of the domain. **Methodology:** Were part of the present research 23 athletes, with 11 fighters of judo, 4 fighters of wrestling and 8 fighters of jiu jitsu, all male with a mean age 27.3 ± 6.9 years. With national and international experience into their respective weight categories and modalities. Genotyping of the polymorphism in the ACTN3 and ACE I/D was performed by reaction polymerase chain (PCR) from DNA genomic. The frequencies genotypic and allelic were compared with control populations and athletes by the tests of chi-square and fisher's exact, for all analyzes was adopted $p < 0.05$. **Results:** the frequencies genotypic and allelic of ACTN3 (RR=52.2%, RX=26.1% e XX=21.7%; R=65.2% e X=34.8%) and the ACE I/D (DD=50%, ID=25% of II=25%; D=65,2% e I=34,8%) did not differ significantly on the population control. However when compared the athletes of struggle was found a meaningful difference. **Conclusion:** In conclusion the data of the present survey indicate an association of the gene of ACTN3 and the ACE I/D with fighter's domain.

Keywords: Fight domain, α Actin, Angiotensin Converting Enzyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da localização da actinina no sarcômero	19
Figura 2 - Representação da localização e estrutura do gene da ACE.....	24
Figura 3 - Tecido alvo e órgãos para o doping genético	29
Figura 4 - Diagrama de vetores virais de replicação deficiente	29
Figura 5 - Padrão esperado de eletroforese para o gene ACTN3	36
Figura 6 - Padrão esperado de eletroforese para o gene da ACE	37
Figura 7 - Padrão de eletroforese para o genótipo DD após reavaliação.....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Indicador utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene ACTN3.....	35
Quadro 2 - Indicador utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene ACE 37	
Quadro 3 - Indicador específico utilizado nas reações PCR para o polimorfismo do gene ACE.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição genotípica do gene ACTN3 dos 23 atletas de domínio.....	41
Tabela 2 - Distribuição alélica do gene ACTN3 dos 23 atletas de domínio	41
Tabela 3 - Distribuição genotípica do gene ACE I/D dos 21 atletas de domínio	42
Tabela 4 - Distribuição alélica do gene ACE I/D dos 21 atletas de domínio.....	43

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
Kbp	pares de base
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
VE	Ventrículo Esquerdo
VEGF	Fator de crescimento epitelial vascular
VEFG	Vascular endotelial growth factor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. PROBLEMA	15
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
4.1 Fisiologia das modalidades esportivas de combate de domínio ...	16
4.2α Actinina.....	17
4.3 Deficiências da ACTN3.....	19
4.4 ACTN3 e desempenho físico.....	19
4.5 Sistema Renina Angiotensina.....	21
4.6 Polimorfismo ID do gene ACE	23
4.7 ACE e desempenho físico	24
4.8 Relação ACE I/D e desempenho esportivo	26
4.9 Doping Genético no Esporte de Alto Rendimento: Tendências e Realidades	27
5. METODOLOGIA.....	31
5.1 Tipo de Estudo	31
5.2 Local	32
5.3 População e Amostra	32
5.3.1 Critérios de Inclusão.....	32
5.3.2 Critérios de Exclusão.....	32
5.4 Delineamento Experimental	33
5.4.1 Procedimentos.....	33
5.4.1.1 Coleta Sanguínea	33
5.4.1.2 Extração do DNA Genômico dos atletas.....	34
5.4.1.4 Genotipagem do polimorfismo I/D do íntron 16 do gene da ACE ..	35
5.4.1.5 Gel de Agarose	38
5.4.1.6 Aconselhamento Genético e acompanhamento Clínico.....	38
5.4.1.7 Análise Estatística.....	39

6. RESULTADOS.....	39
7. DISCUSSÃO	42
8. CONCLUSÃO.....	46
10. REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE A Termo de consentimento Livre e Esclarecido	56
ANEXO A Parecer de aprovação	60
ANEXO B Padrão esperado de eletroforese para o gene ACTN3.....	63
ANEXO C Padrão esperado de eletroforese para o gene da ACE.....	63
ANEXO D Padrão de eletroforese esperado para o genótipo DD após reavaliação.....	63

1 INTRODUÇÃO

A capacidade física humana é influenciada por fatores ambientais e genéticos, contudo, os fenótipos da capacidade física (fisiológicos, psicológicos e biomecânicos) geralmente são altamente poligênicos (GINEVICIENE et al., 2010). No entanto, as maneiras pelas quais polimorfismos relevantes se combinam para influenciar a capacidade física de atletas e das populações em geral não são totalmente conhecidas (WILLIAMS; FOLLAND, 2008). Há evidências que fatores genéticos influenciam em 50% as várias características fenotípicas relacionadas ao desempenho físico e a resposta ao treinamento bem como a aptidão física do atleta de elite (HOPKINS, 2001; EYNON et al., 2011).

A melhora do desempenho físico é adquirida por meio do treinamento, um processo que se destina a induzir engramas motores e melhorar as funções estruturais e metabólicas, além da autoconfiança. Em geral, há duas grandes categorias de atletas de alto nível os geneticamente talentosos e os que treinam laboriosamente (SMITH, 2003).

Sendo assim, ao associar genética e o esporte existe a possibilidade de se identificar os indivíduos com a fisiologia e morfologia ideal, bem como 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).

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 (AHMETOV et al., 2008). Há evidência crescente de fortes influências genéticas sobre o desempenho atlético e para uma mudança evolutiva entre características de desempenho para atividades de velocidade, força e de resistência (YANG et al., 2003).

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 distintas populações, sendo necessário verificar se a

associação é atribuída ao acaso ou é um resultado falso positivo (EYNON et al., 2011; CALÓ e VONA, 2008; ZOOSSMANN-DISKIN, 2008).

De todos os genes candidatos a alta *performance*, dois genes e seus polimorfismos serão objeto de interesse do presente estudo, devido a seus polimorfismos estarem relacionados com o aumento dos níveis de força e velocidade, dentre eles foram investigados: α actina 3 (ACTN3) e a enzima conversora de angiotensina (ECA). Sendo assim, o objetivo desta dissertação foi avaliar o genótipo dos genes, ACTN3, e ECA, em lutadores de domínio.

2 PROBLEMA

Seria a frequência dos polimorfismos nos genes ACTN3 e da ACE em lutadores de domínio de alto rendimento, diferente da população não-atleta e assim um fator sinalizador e determinante para o sucesso dos atletas de esportes de combate de domínio?

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a frequência do genótipo dos genes, ACTN3 e da ACE I/D, em lutadores de domínio de alto rendimento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência do genótipo dos genes ACTN3 e ACE I/D, em lutadores de domínio de alto rendimento;

- Determinar a frequência da distribuição alélica dos genes ACTN3 e ACE I/D, em lutadores de domínio de alto rendimento;

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Fisiologia das modalidades esportivas de combate de domínio

As lutas apresentam-se como sendo uma forma de exercício intermitente, devido à duração dos períodos de exercício e pausa durante os combates, logo a contribuição energética de cada estímulo e sua relação com os diferentes intervalos de recuperação são parâmetros necessários para a correta prescrição do treinamento (DRIGO et al., 1996; MARCHETTI e MELO, 2007).

Devido a este fator, determinar a estrutura temporal, tem sido uma estratégia utilizada para auxiliar na compreensão fisiológica do predomínio de cada sistema energético e suas mudanças ao longo dos estímulos Marchetti e Melo (2007), tornando-se um indicativo importante para o processo de preparação e monitoramento do desempenho esportivo dos atletas Olivio-Jr et al. (2009), devido atenderem às especificidades das ações durante situações reais de competição (DEL VECCHIO et al., 2011).

Assim, se tratando da temporalidade das lutas de domínio (modalidades que são praticadas no chão) como o Judô, *Brazilian Jiu-Jitsu*, luta Greco Romana, estas apresentam características de esforço: pausa de 2:1 ou 3:1 (DEL VECCHIO et al., 2007; MARCON et al., 2010; MIARKA et al., 2010; NILSSON et al., 2002). Observa-se que, tais ações são constituídas por estímulos curtos e intermitentes, sendo o tempo de estímulo superior ao de pausa (OLIVIO-JR et al., 2009).

Tomando por base tais características, atletas de lutas de domínio, tem a necessidade de possuir um efetivo metabolismo glicolítico para produção de energia, e realizar as ações musculares Franchini et al. (1989), além de uma capacidade aeróbia adequada para sustentar o desempenho durante suas lutas (THOMAS et al., 1989). Logo o sucesso no desempenho dos lutadores, está ligado à capacidade de recuperação das vias anaeróbias. Quanto maior essa recuperação, menor será a queda da contribuição das vias anaeróbias e, conseqüentemente, melhor será o

desempenho esportivo (MARCHETTI e MELO, 2007).

Claro que para manter uma elevada *performance* durante competições de alto nível técnico, faz-se necessário que o atleta possua elevado nível técnico-tático, bem como força, capacidade aeróbia, flexibilidade, potência e resistência anaeróbia, bem como pequenas alterações nestas variáveis, pode determinar o resultado durante uma luta ou competição (ARTIOLI et al., 2007).

4.2 α Actinina

A actina é uma proteína pertencente ao componente contrátil do músculo esquelético (Figura 1), sua interação com a miosina promove o encurtamento dos sarcômeros (SJOBLOM et al., 2008). Cabe ressaltar que nos mamíferos, existem quatro isoformas para a α actina (ACTN1, 2, 3 e 4) Pasqua et al. (2011), tais proteínas são divididas em duas categorias as musculares (α -actinina-2 e α -actinina-3) e as não-musculares (α -actinina-1 e α -actinina-4) (BLANCHARD et al., 1989).

Enquanto a α -actinina-2 é expressa em todos os tipos de fibra muscular esquelética e cardíaca (MILLES et al., 2001). Já a ACTN3, é uma proteína estrutural denominadas linhas Z (bandas Z discos Z), bem como a isoformas ACTN2, porém apenas a primeira é uma isoforma expressa apenas nas fibras do tipo II, que mantém a estrutura do arranjo miofibrilar e regula a contração da musculatura esquelética, sua presença está relacionada a um melhor desempenho em atividades que exigem velocidade, força muscular e hipertrofia (MILLS et al., 2001; NIEMI e MAJAMAA, 2005; YANG et al., 2003; NORMAN et al., 2009; AHMETOV et al., 2011; GENTIL et al., 2011).

O gene ACTN3 está localizado no cromossomo 11q13-q14 Vincent et al. (2007) e foi clonado por Berggs et al. (1992). O polimorfismo identificado como R577X, definido pela troca entre citosina e timina na posição 1747 do exón 16, resulta na troca de arginina (alelo R) por um stop códon prematuro no (alelo X) no aminoácido 577, levando indivíduos homocigotos a não produzirem a proteína α actina 3 no músculo esquelético, o que resulta na diminuição da massa muscular, devido a redução na região transversa dos músculos compostos predominantemente

de fibras do tipo II (NORTH et al., 1999; MORAN et al., 2007; VINCENT et al., 2007; MACARTHUR et al., 2008; CHAN, et al., 2008; CALÓ e VONA, 2008).

Indivíduos que possuem ambos os alelos mutantes (genótipo XX) apresentam ausência total de ACTN3. Já indivíduos heterozigotos (genótipo RX), ou que possuem um alelo funcional (alelo R) e um alelo polimórfico (alelo X), apresentam uma redução na quantidade de ACTN3 sintetizada no musculoesquelético (PASQUA et al., 2011; MACARTHUR e NORTH, 2011).

Cerca de 45% das proporções de tipos de fibra são determinadas por fatores genéticos. A variante ACTN3 poderia ser um dos genes que contribuem para a herdabilidade de distribuição do tipo de fibra através de sua interação com a calcineurina (VINCENT et al., 2007). Embora a frequência dos alelos tenda a diferir entre populações, existe a possibilidade de 16% a 21% da população ser homozigoto para o alelo mutante, XX (MACARTHUR e NORTH, 2007; MORAN et al., 2007; PAPANINI et al., 2007). Segundo Milles et al. (2001), 18% da população europeia é homozigota para o alelo X, estima-se valores aproximados de 1 bilhão de pessoas pelo mundo.

Isso sugere que um indivíduo pode possuir características inatas que o beneficiarão em modalidades com características específicas, o que pode ser resultado de uma variação genética mantida pela seleção natural, por exemplo, o alelo 577X do gene ACTN3 (PASQUA et al., 2011).

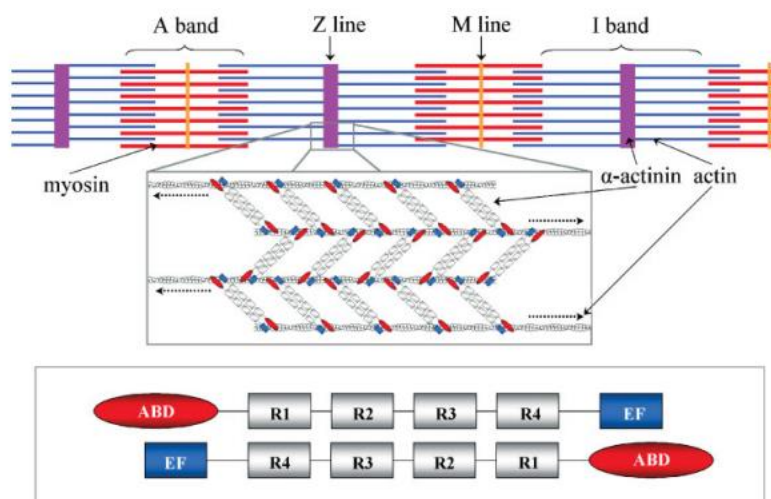


Figura 1 - Representação da localização da actinina no sarcômero. Os sarcômeros de a actinina se encontram na linha Z, representados na cor roxa, ligados aos filamentos finos de actina representados na cor azul. Fonte: MACARTHUR e NORTH (2004).

4.3 Deficiências da ACTN3

Existem fortes evidências da interferência genética sobre o desempenho atlético, para modalidades cujas características necessitam de velocidade e resistência. Como já mencionado anteriormente, 18% da população caucasiana é homocigótica para o alelo 577X do gene ACTN3 e não possuem α actinina 3, sendo esta responsável por gerar força e potência em fibras musculares de contração rápida (YANG et al., 2003). Porém, essa ausência da proteína funcional não resulta em quadro patológico ou qualquer alteração fenotípica evidente, sugerindo que a α -actinina-2 pode suprir em parte a falta da isoforma – 3 no músculo esquelético (PASQUA et al., 2011; CALÓ e VONA, 2008).

4.4 ACTN3 e desempenho físico

Em estudo conduzido por Moran et al. (2007), os pesquisadores constataram que adolescentes gregos com genótipo (R) possuíam uma velocidade maior em corridas de 40 metros quando comparados com homocigoto (X) e a distribuição de genótipos R577X na população pesquisada foi de RR = 34%, RX = 48%, XX = 18%. Segundo Norman et al. (2009), o alelo X é menos frequente em atletas de velocidade do que na população em geral, os autores encontraram uma distribuição em sua pesquisa de RR= 31%, RX = 50%, e XX=19%.

Na pesquisa efetuada por Niemi e Majamaa (2005), com atletas de elite finlandesa identificou-se uma menor incidência do genótipo XX em atletas de força e potência e uma menor ocorrência do genótipo RR para os atletas de resistência, o que sugere que variações nos alelos podem a vir interferir na capacidade do músculo para realizar contrações intensas, em especial em fibras tipo II. Análises de Druzhevskaya et al. (2008) observaram que atletas russos de esportes de potência de nível nacional e internacional apresentaram uma menor proporção do alelo XX em relação à população em geral e concluíram que a ACTN3 e o polimorfismo R577X tiveram associação positiva em atletas de potência.

Ao pesquisar uma população de 90 homens com idade entre 18 e 29 anos,

Vincent et al. (2007), concluíram que o mecanismo pelo qual o polimorfismo da ACTN3 modula a força muscular pode depender da proporção do tipo de fibras musculares. Os autores ao comparar os genótipos XX e RR verificaram que indivíduos possuíam uma proporção de 9% e 14% respectivamente de fibras do tipo IIX, e por consequência o grupo RR era mais forte que o XX.

Realizando experimento com ciclistas de estrada, atletas velocistas e saltadores espanhóis, Fiuza-Luces et al. (2011) encontraram um frequência para os genótipos de RR 28%, RX 46%, XX 26% e RR 47,6%, RX 36,5%, XX 15,9%, demonstrando que o genótipo RR é mais comum entre os atletas de força e velocidade. Com brasileiros, Gentil et al. (2011), investigaram a associação do polimorfismo R577X em 441 homens com idade média de $22 \pm 2,7$ anos que realizaram um treinamento de força muscular, verificando-se um frequência para genótipos RR de 34,4%, RX 47% e XX 18,6%, e uma não associação do polimorfismo do gene ACTN3 com a força muscular em resposta ao treinamento de resistência. Porém, apenas os portadores do alelo R apresentaram aumentos na espessura muscular em resposta ao treinamento realizado.

Quando da genotipagem de 457 atletas de triátlon para a mutação R557X, Saunders et al. (2007), não encontraram associação entre o desempenho e a ultra resistência destes atletas. Tal fato demonstra que a capacidade atlética é multifatorial que envolve numerosos sistemas fisiológicos sendo influenciado por muitos genes e da interação destes genes com o ambiente (RANKINEN et al., 2006).

Comparando a população não-atleta e atletas de força americanos, Roth et al., (2008), encontraram uma frequência do alelo II 16,3% maior quando em comparação com os atletas 6,7%, demonstrando que atletas de força possuem um predomínio dos alelos RR e RX. Comparando padrões fisiológicos e os correlacionando com o genótipo de remadores russos, Ahmetov et al. (2008), observaram que os atletas de elite remadores (n=107), tinham o um genótipo XX duas vezes menores quando foram comparados com o grupo controle compostos por uma população normal.

Em outro estudo Ahmetov et. al. (2011), ao pesquisarem patinadores russos, concluíram que o polimorfismo ACTN3 R577X estava associado com a distância de corrida, e a composição da tipologia da fibra muscular, fibras lentas possuíam uma frequência para o alelo RR de 12,8%, RX de 13,2% e XX de 16,3%, os autores

concluíram que os patinadores que apresentaram maior proporção de fibras lentas, tinham sucesso quando realizavam provas de longas distâncias.

4.5 Sistema Renina Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) corresponde a um complexo sistema endócrino, parácrino e autócrino, que exerce importante papel no controle da manutenção da homeostase tanto cardiovascular como renal (FERREIRA et al., 2005). Percebe-se que o SRA, existe não só como um regulador do sistema endócrino, mas também dentro de tecidos e células locais, onde o mesmo realiza várias funções (PUTHUCHEARY et al., 2011). Porém sua ação primária reside no controle fisiológico do balanço hidroeletrólítico e da pressão arterial (PEACH, 1977; EISENMANN et al., 2009).

O início do sistema se realiza como uma cascata bioquímica, iniciada com a liberação da renina pelas células justaglomerulares renais. No que advoga a renina, esta tem a função de clivar o angiotensinogênio um substrato sintetizado no fígado que irá formar o decapeptídeo angiotensina I. Posteriormente, sob ação da enzima conversora de angiotensina, a angiotensina I é convertida ao octapeptídeo angiotensina II, substância ativa responsável pelos principais efeitos fisiológicos associados ao sistema renina-angiotensina, atuando diretamente nos receptores de angiotensina do tipo AT 1 e AT 2, por meio da ação da ACE (FERREIRA et al., 2005).

A ação agonista de Angiotensina II no receptor de angiotensina de tipo 1 (AT1 R), provoca aumento da pressão arterial por meio da vasoconstrição arterial, pela retenção de sódio e água pelos rins, provocada pela libertação de aldosterona adrenal, no entanto AT 2R está menos bem caracterizada (PUTHUCHEARY et al., 2011).

No entanto a ACE também cliva a bradicinina e atua sobre os dois receptores, a bradicinina tipo receptor-1 (BK 1 R) e os níveis de (BK 2 R). (REGOLI et al., 1998) as bradicininas, por conseguinte, estão inversamente relacionados com a atividade de ACE, devido a possuírem respostas vasodilatadoras (PUTHUCHEARY et al., 2011). Portanto, aumentar a atividade da ACE leva, a respostas hipertensivas

(aumentada em AT1 R ativação) e diminui as respostas de hipotensão (redução da BK 2 R ativação), desempenhando assim um papel crucial na regulação da pressão arterial humana, sal e balanço hídrico (KEM e BROWN, 1990).

A literatura tem documentado a existência de SRA no tecido cardíaco Saber-Ayad et al. (2014), adiposo Engeli et al. (2000), sistema muscular esquelético Dragovic et al. (1996), e a presença de angiotensina II nestes sistemas (AYAD et al., 2014; DRAGOVIC et al.; 1996; ENGELI et al. 2000).

No que se diz respeito ao coração, e a angiotensina II, esta estimula a hipertrofia cardíaca, bem como a produção de matriz extracelular. No entanto, ainda não está claro se a Angiotensina II exerce um efeito direto sobre a hipertrofia cardíaca independente do seu efeito sobre a pressão sanguínea ou o sistema renina-angiotensina circulante (HIGAKI et al., 2000). Adaptações fisiológicas frente ao treinamento físico intensivo prolongado promovem ajustes cardiovasculares que permitem um desempenho excepcional do coração de atletas, devido a uma hipertrofia excêntrica (MITCHELL et al., 2005).

No entanto, foram verificados, em atletas de resistência submetidos a regime de treinamento semelhante, níveis variados de hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE), sugerindo que essa adaptação é mediada geneticamente (DIAS et al., 2007). Para o mesmo autor, a ativação do SRA local pelo exercício físico encontra-se exacerbado em indivíduos homocigotos para o alelo D, resultando em maior degradação da bradicinina. Em se tratando da bradicinina, a mesma tem efeito antiproliferativo e inibidor do crescimento. Portanto, maior degradação da bradicinina pode facilitar a hipertrofia do VE. Entretanto, esses resultados não permitem a conclusão de que polimorfismo I/D da ACE é o único mediador do desenvolvimento do VE (DIAS et al., 2007).

No que alude o SRA local da musculatura esquelética, Zhang et al. (2003), em seu estudo verificaram uma associação entre os genótipos da ECA e a distribuição percentual de fibras I, IIa e IIb. Indivíduos com genótipo II quando comparados com o genótipo DD apresentaram maior média percentual de fibras do tipo I e menor média percentual de fibras do tipo IIb, esses resultados vêm corroborar estudos que mostraram associação do alelo I e alta performance em atletas de resistência.

Percebe-se que o alelo I melhora o desempenho físico em atletas de resistência, enquanto que o alelo D mostrou relação com o fenótipo de força e

explosão muscular, mediado pelo efeito hipertrófico muscular, secundário ao aumento na concentração plasmática e tecidual de Angiotensina II (DIAS et al., 2007).

4.6 Polimorfismo ID do gene ACE

A enzima conversora de angiotensina (ACE, 21 Kbp), está localizada no cromossomo 17q23 sendo composta de 26 éxons (MONTGOMERY et al., 1997; COATES, 2003). Uma variante genética comum no gene da ACE foi descrita e consiste na ausência (deleção ou alelo “D”) ou presença (inserção ou alelo “I”) de 287 pares de base no íntron 16 (MONTGOMERY et al., 1997; RANKINEN et al., 2000), (Figura 2). O alelo D está associado com níveis circulatório e tecidual aumentados de ACE (DANSER et al., 1995).

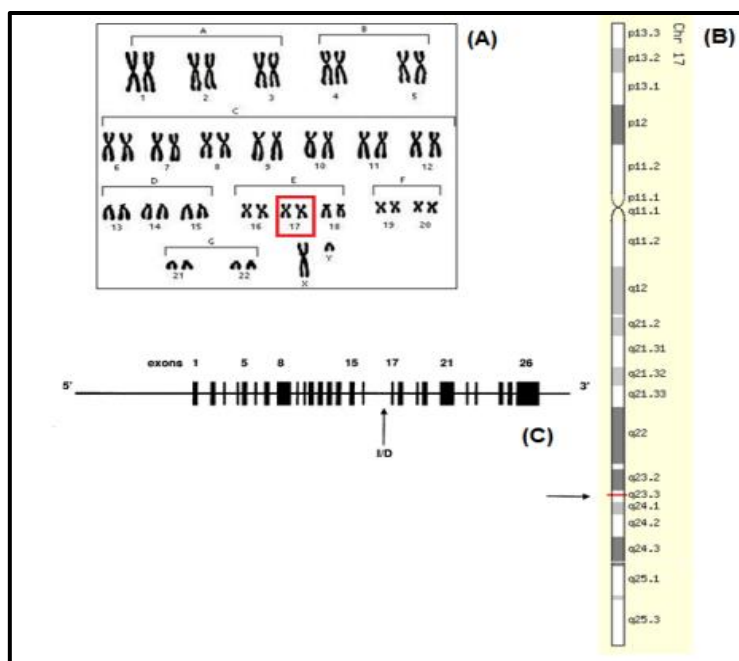


Figura 2 - Representação da localização e estrutura do gene da ACE. Representação esquemática da localização e estrutura do gene da ACE. Em (A) um cariótipo masculino evidenciando os pares de cromossomos homólogos 17; (B) representação do cromossomo 17, evidenciando a localização do gene da ACE no braço longo, especificamente na região 17q23.3 (seta). (C) Localização da região polimórfica presente no íntron 16 (seta). Fonte: Alonso (2012).

O polimorfismo I/D da ACE, foi o primeiro gene específico a ter associação com a *performance* humana Williams et al. (2004), e tem 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 et al., 2002). Em estudo conduzido por Meira-Lima et al. (2000), que avaliaram 323 sujeitos de ambos os sexos com idades entre 18 e 60 anos, os autores reportaram a distribuição para os genótipos do polimorfismo ID da ACE nas seguintes frequências: II = 19,8%; ID = 48%; DD = 32,2%. No entanto, as distribuições das três variantes (II, ID, DD) dentro de uma população caucasiana são cerca de 25%, 50%, e 25%, respectivamente (JONES et al., 2002).

4.7 ECA e Desempenho Físico

Como já mencionado, 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 et al., 2002; AHMETOV et al., 2009). Em uma revisão recente com 336 artigos relacionando seus polimorfismos da ECA com os sistemas metabólicos foi verificado a predominância do alelo DD para a *performance* física em atividades que envolvam força e velocidade e o alelo II para exercícios de resistência (MA et al., 2013). Estudo conduzido por Gineviciene et al. (2009), investigaram a frequência do alelo ACE D, onde a frequência foi de 28%, sendo menor quando comparada a população não atleta 37,4%, os autores constataram que o genótipo DD era 32,3% maior, quando comparada com atletas de velocidade e potência 22,5%.

No entanto, corredores britânicos de nível olímpico ao serem correlacionados, em relação à distância que competiam e o polimorfismo I/D da ECA, Myerson et al. (1999), encontraram uma frequência para o alelo I de 35% para corredores que competiam em provas ≤ 200 m, 53% para corredores de 400 até 3.000 m e 62% para corredores que corriam ≥ 5.000 m, assim os pesquisadores concluíram que estes resultados suportam uma associação positiva do alelo I com o desempenho de atletas de resistência.

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.

Pesquisa realizada com triatletas do exército indiano Shenoy et al. (2010), observaram não haver nenhuma associação com o polimorfismo ACE com a potência e resistência muscular destes atletas. Porém no estudo de Costa et al. (2009a) com nadadores de curta distância foi encontrado associação com o alelo D e melhores níveis de potência. Vinculando genótipos relacionados com fenótipos para aptidão física, 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 potencia muscular o alelo (DD) demonstrou 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). Em outro estudo foi verificado adaptações neurais, através de ativação de unidades motoras e hipertrofia muscular relacionados com a ACE após um período de treinamento (SCHALFEUBERGER et al., 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 da ativação do sistema nervoso simpático (YONEMOCHI et al., 1998).

Em estudo recente com 100 atletas de esporte de força da Polônia, foi observado à predominância do alelo (DD) nos resultados obtidos na amostra com níveis de 77,6% para a presença deste alelo, fortalecendo a hipótese deste

polimorfismo para esportes que exijam aplicação de força (EIDER et al., 2013). Em outro estudo com 58 nadadores e triatletas foi constatado a presença do polimorfismo (DD), em ambos os sexos para provas aquáticas inferior a 200 metros que exigem do metabolismo aeróbio e conseqüentemente o uso da força muscular (COSTA et al., 2009b).

4.8 Relação ACE I/D e desempenho esportivo

Os diferentes genótipos da ACE (II, DD e ID) estão associados com diferentes respostas no organismo e com o desempenho. Têm sido bem reportado que o genótipo II é mais frequente em atletas de modalidades com predominância aeróbia, uma vez que estes indivíduos possuem um percentual maior de fibras do tipo I, sugerindo que estes atletas possuem um maior $Vo_2máx$, no entanto atletas que apresentam um genótipo DD estão relacionados com esportes de força e velocidade, pois estes possuem um predomínio de fibras do tipo IIb (BUENO et al., 2013; ZHANG et al., 2003; ALMEIDA et al., 2012).

O primeiro estudo a correlaciona o genótipo II com esportes de longa duração investigou 64 remadores australianos e foi realizado por Gayagay et al. (1989), os resultados levantados, demonstraram um frequência maior para o alelo I e o genótipo II para estes atletas. Já Williams et al.(2000), mostraram que indivíduos com genótipo II ou ID apresentam maior desempenho aeróbio.

Bem provável, que devido a menor atividade enzimática da ACE associado com o genótipo II pode-se também aumentar as concentrações locais de óxido nítrico, o que por sua vez pode melhorar a eficiência da respiração mitocondrial e, conseqüentemente, a função contrátil em ambos os músculo cardíaco e esquelético (WILLIAMS et al., 2000).

Já para a distribuição percentual de fibras Zhang et al.(2003), investigaram 41 jovens de ambos os sexos não treinados e verificaram que ao correlacionar o predomínio da fibra muscular com o genótipo I/D, os indivíduos que possuíam o genótipo II, apresentaram um percentual maior de fibras do tipo I ($50,1\pm 13,9\%$ contra $30,5\pm 13,3\%$) e um percentual menor de fibras do tipo IIb ($16,2\pm 6,6\%$ contra $32,7,4\%$) quando estes foram comparados aos que possuíam o genótipo DD, tais resultados denotam um mecanismo para a associação entre o genótipo da ACE e desempenho

de endurance.

Os indivíduos homozigotos DD apresentam maior concentração de ACE circulante que os heterozigotos ID e homozigotos II. Aumento nos níveis séricos da ACE pode resultar em maior formação de Angiotensina II ou maior degradação da bradicinina. A presença do alelo D está associada à maior resposta hipertrófica, especialmente em situações de estresse cardiovascular como exercício e hipertensão (OLIVEIRA et al., 2003).

4.9 Doping Genético no Esporte de Alto Rendimento: Tendências e Realidades

O código universal da origem das espécies se encontra no DNA, e a descoberta da sua estrutura de dupla hélice ficou a cargo de Watson e Crick em 1953 (YAMADA et al., 2013). Nos dias atuais, estudam-se os mecanismos da plasticidade muscular, e, procura-se entender como o treinamento de força induz a hipertrofia muscular, graças claro a metodologias modernas em genômica e biologia molecular (PHILP et al., 2011).

Cabe salientar que o sequenciamento do DNA possibilitou o conhecimento de mais de 200 genes envolvidos no desempenho esportivo, fato que em um futuro próximo irá contribuir para realizar a detecção e seleção de talentos de indivíduos predispostos para desenvolver alguma habilidade atlética, e, auxiliará na prescrição individualizado do treinamento físico, no entanto tal conhecimento poderá ser aproveitado ilicitamente por meio da manipulação genética em laboratório para transfecção nos tecidos dos atletas o chamado doping genético (YAMADA et al., 2013).

Entende-se como doping genético, técnica realizada em laboratório, caracterizada pelo uso não terapêutico de células, genes e elementos gênicos, ou a modulação da expressão gênica, que possui a capacidade de aumentar o rendimento esportivo de varias maneiras (Figura 3) (WADA, 2014; OLIVEIRA et al., 2011).

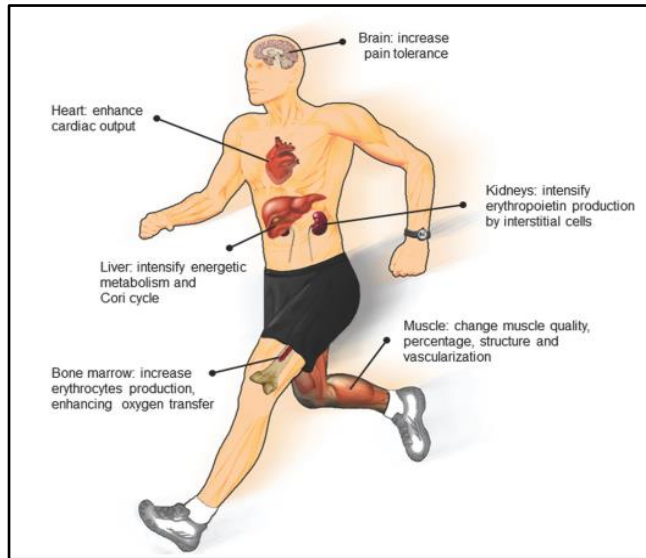


Figura 3 - Tecido alvo e órgãos para o doping genético. Principais objetivos do doping genético para melhorar o desempenho esportivo: melhoria da tolerância à dor (endorfina genes/encefalina), a qualidade muscular e vascularização (gene VEGF e antagonistas miostatina) e número de eritrócitos (gene EPO). Com compreensão mais genômica, outros órgãos serão orientadas no futuro, tais como o coração e os rins, para aumentar o débito cardíaco e a produção de EPO, respectivamente. VEGF = fator de crescimento epitelial vascular; EPO = eritropoietina. Fonte: OLIVEIRA et al. (2011).

O princípio da técnica consiste na transferência vetorial de materiais genéticos para células-alvo, com o objetivo de suprir os produtos de um gene estruturalmente anormal no genoma do paciente (Figura 4) (ARTIOLI et al., 2007b).

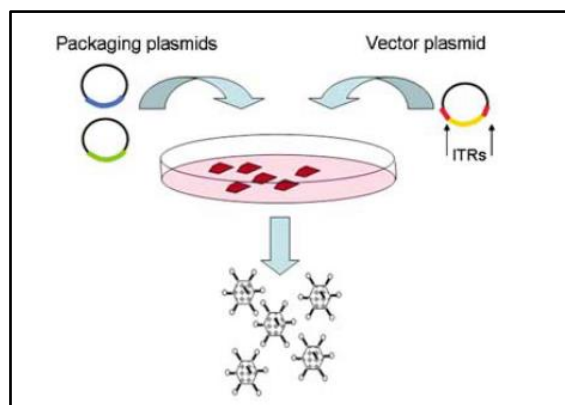


Figura 4 - Diagrama de vetores virais de replicação deficiente. Os genes virais necessários para a replicação e empacotamento são fornecidos em unidades separadas ou como uma transfecção transitente ou pela integração estável para uma linha celular produtora. O plasmídeo vector transporta a construção terapêutica de entre as sequências de repetição terminais invertidas (RTIs), que atuam como sinais para assegurar que o material flanqueado por RTIs é empacotado nas partículas virais. O produto é um vector viral deficiente para a replicação, que transporta o gene terapêutico. Os genes de replicação e de embalagem não são empacotados como eles não têm as sequências de RTIs. Fonte: WELLS (2008).

No esporte de alto rendimento, as modificações genéticas e suas ações, estão direcionados para a melhora muscular, e seus procedimentos são

indetectáveis para os testes atuais, o que concerne para previsões que a prática do doping genético no esporte será comuns é utilizada em larga escala nos próximos anos. Assim, faz-se necessário a melhoria da tecnologia e o desenvolvimento de métodos de detecção, afim de identificar padrões de mudanças em resposta a dopagem em oposição à mostrar agentes específicos (WELLS, 2008).

Sendo o tecido muscular o principal alvo para a prática do doping, uma forma de detectar tal procedimento seria no tocante a acompanhar a concentração da proteína muscular, para tanto seria necessário uma biopsia, para revelar possíveis veículos virais ou alteração de genes, situação esta inviável no cenário atual do esporte (BAOUTINA et al., 2008).

Ainda sobre os agentes específicos, estes são chamados de genes candidatos, onde os mais importantes para o doping genético são a eritropoetina, bloqueadores da miostatina (folistatina), vascular endothelial growth factor (VEFG), insulin-like growth factor (IGF-1), growth hormone (GH), leptina, endorfinas e encefalinas, peroxissome proliferator activated receptor delta (PPAR δ). Uma vez que estes genes exógenos são inseridos no genoma do atleta, os mesmos se expressariam gerando um produto endógeno capaz de melhorar o desempenho atlético (ARTIOLI et al., 2007b; GATZIDOU et al., 2009).

No que diz respeito ao GH, o hormônio do crescimento, o mesmo possui um número considerável de efeitos no corpo associados com o crescimento, podendo destacar seu efeito anabólico sobre as proteínas musculares, sendo um agente anabolizante do tecido conjuntivo no músculo esquelético e tendão humano, e seu recombinante já está sendo utilizado como doping no esporte (WELLS, 2008).

O fator do crescimento semelhante à insulina – 1 (IGF-1) é uma proteína que estimula a proliferação celular de células satélites, seu crescimento e diferenciação somática de muitos tecidos no corpo. Tal proteína é uma chave reguladora do desenvolvimento do músculo esquelético, que contribui para o seu crescimento e reparação durante toda a vida. Tais ações fazem com que o IGF-1, ganhe atenção no meio científico, pois a descoberta de novas funções poderia ter um impacto significativo sobre a massa muscular, força e reparação tecidual (BARTON, 2006).

Sobre a miostatina, é uma proteína que apresenta papel fundamental na regulação do crescimento do músculo esquelético durante a fase de embriogênese, secretada pelas células musculares, sendo ativada pelas mesmas para inibir o crescimento, possivelmente através do bloqueio da proliferação das células satélites

e diferenciação de mioblastos, pertencente à família do TGF- β (transforming growth factor- β), logo agentes farmacológico capazes de bloquear a atividade da miostatina pode ter aplicações para promover crescimento muscular (MATSAKAS e DIEL, 2005; LEE e MCPHERON, 2001).

Outra possibilidade de doping genético seria o Fator de crescimento vasoendotelial (VEGF), tal gene tem a capacidade de produzir novos vasos sanguíneos que significa, aumento do fluxo sanguíneo para o coração, fígado, músculos, pulmões e outros órgãos, de tal maneira que estes retardem o processo de exaustão. Uma nova vasculatura pode influenciar diretamente o VO_2 máx, por aumentar a circulação local, bem como a captação de oxigênio (CARNEVALI JÚNIOR et al., 2009).

No tocante a leptina, hormônio peptídeo produzido no tecido adiposo, tem relação com o controle da fome, redução do consumo alimentar e logo perda peso (ARTIOLI et al., 2007b). Evidências apontam que ao menos em atletas, a leptina pode ter algum efeito benéfico, o que mantém a atenção voltada para o doping genético a partir de tal gene, mas certamente muitos estudos ainda são necessários (CARNEVALI JÚNIOR et al., 2009).

Em que postula a PPAR- δ é uma proteína reguladora-chave do processo de oxidação de lipídeos, ela regula a transcrição de diversas enzimas que participam da β -oxidação, dissipa energia na mitocôndria por meio de proteínas desacopladoras, como resultado, ocorre a diminuição do peso corporal e aumento da termogênese, realizando a preservação do glicogênio o que aumentaria o tempo de tolerância ao esforço (ARTIOLI et al., 2007b). Porém para os mesmos autores, o possível interesse em utilizar a PPAR- δ , como doping genético seria o seu provável papel de converter fibras do tipo II em tipo I, o que passaria a ser o foco de atletas de resistência.

No que alude a Eritropoetina (EPO), uma glicoproteína hormonal, responsável pela produção de glóbulos vermelhos do sangue, o seu aumento pode proporcionar níveis elevados de glóbulos vermelhos no sangue, promovendo maior transporte de oxigênio as células, no caso o tecido muscular, a geração de energia pode ser aumentada por meio 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 et al., 2006). Esse tipo de doping seria, portanto, especialmente ergogênico para atletas de *endurance*, no entanto

prejudicial à saúde desta população devido a super-expressão de EPO representar um sério risco cardiovascular devido ao aumento da viscosidade sanguínea (ARTIOLI et al., 2007b).

Em relação aos genes que codificam endorfina e encefalina, parecem ser candidatos importantes, para oportunizar uma maior resistência a dor, ocasionado pelo esforço físico. As moléculas expressadas são neuropeptídios, que se liga a receptores opióides, que promovem resultados analgésicos e, portanto alívio da dor, porém ainda nenhum dado foi relatado tanto de cunho clínico como no desempenho esportivo (OLIVEIRA et al., 2011).

Fica evidente que os avanços da genômica funcional vêm comprovar que a excelência no esporte de alto rendimento, está sob o controle de genes. Embora o rastreamento dos genes moduladores dos complexos fenótipos de *performance* física esteja em andamento, já é possível compreender como variantes em genes específicos modulam as adaptações ao treinamento físico (DIAS, 2011). Ainda para o mesmo autor, a falta de casos comprovados de atletas geneticamente modificados não exclui a possibilidade de que estes atletas já estejam sendo criados em laboratório, uma vez que a WADA não implementou, até o momento, testes para o antidoping genético.

5 METODOLOGIA

5.1 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).

5.2 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.

5.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Fizeram parte da presente pesquisa 23 atletas, sendo 11 lutadores de Judô, 4 lutadores de Wrestling e 8 lutadores de Jiu Jitsu, todos do sexo masculino com idade média de $27,3 \pm 6,9$ anos, com experiência nacional e internacional em suas respectivas modalidades e categorias de peso. Destes 23 atletas foram testados para o gene ACTN3 e 21 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.

5.3.1 Critérios de inclusão

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

5.3.2 Critérios de exclusão

Lutadores de domínio de alto rendimento que: se recusaram a assinar o TCLE; no decorrer da pesquisa retiraram seu consentimento para continuar participando da mesma; amostras de sangue que por motivos técnicos não foram possíveis extrair o DNA ou amplificá-lo.

5.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Em um primeiro momento, as federações e confederações, foram contatadas a fim de fornecer o ranking dos melhores lutadores em atividade, com resultados nacionais e internacionais. Em uma segunda fase, ocorreu o contato com os atletas, foi informado o objetivo do projeto, entregue o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e agendado dia e horário das coletas sanguíneas, para que o procedimento não interferir na rotina de treinamento e descanso dos lutadores.

5.4.1 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.

5.4.1.1 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.

5.5.1.2 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.

5.4.1.3 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., 2001). 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., 2003) (Figura 5). (Anexo B)

pb	XX	RX	RR
205		■	■
108	■	■	
97	■	■	
86	■	■	■

Figura 5 - Padrão esperado de eletroforese para o gene ACTN3

pb - pares de bases; RR – alelo ACTN3 577R;

RX – alelo ACTN3 577RX; XX – alelo ACTN3 577X.

Fonte: O autor (2014).

5.4.1.4 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 et al., 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 6). (Anexo C).

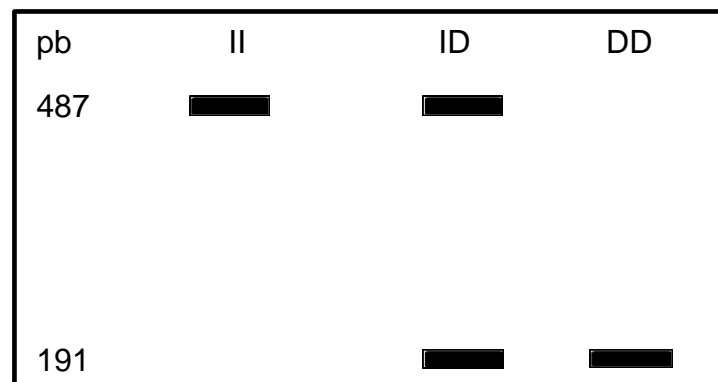


Figura 6 - Padrão esperado de eletroforese para o gene da ACE

pb - pares de bases;

II; ID; DD

Fonte: O autor (2014).

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 et al., 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 et al., 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 (Figura 7). Amostras classificadas como I/D ou I/I na primeira reação foram utilizadas como controle positivo da reação específica para a inserção. (Anexo D).



Figura 7 - Padrão de eletroforese para o genótipo DD após reavaliação

pb - pares de bases;

ID; 191; DD – em branco.

Fonte: O autor (2014).

5.4.1.5 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.

5.4.1.6 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.

5.4.1.7 Análise estatística

Para comparar as frequências dos genótipos com outros estudos publicados foi realizado o teste de Qui-quadrado de Pearson, quando o número de incidência de algum genótipo foi menor que 5 foi usado o teste exato de Fisher. 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 verificar 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 $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

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

A frequência genotípica absoluta e relativa do gene ACTN3 dos 23 atletas de domínio que fizeram parte da presente pesquisa, é apresentada na Tabela 1. Para tanto os resultados foram comparados com estudos da literatura, população geral (controle), quanto com atletas de lutas de domínio de alto nível internacional. A distribuição do genótipo do gene ACTN3 não está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg onde o $p < 0,0001$. Demonstrando, que a frequência genotípica encontrada no presente estudo foi diferente dos valores observados na população geral, confirma o favorecimento genético para a amostra de lutadores de domínio de alto rendimento. Quando da comparação com outros estudo internacionais Kikuchi et al. (2012), lutadores japoneses, Rodriguez-Romo et al. (2013), lutadores espanhóis, ocorreram diferenças significativas entre os estudos quando comparados com o presente estudo, $p = 0,0483$ e $p = 0,0066$ respectivamente.

Tabela 1 - Distribuição genotípica do gene ACTN3 dos 23 atletas de domínio

	RR (%)	n	RX (%)	n	XX n (%)	P
Dados da Pesquisa	12 (52,2%)		6 (26,1%)		5 (21,7%)	
Coelho controle (2011)	40 (40%)		46 (46%)		14 (14%)	0,2086
Kikuchi et al. (2012)	38 (28%)		68 (50%)		29 (22%)	0,0483
Rodriguez-Romo et al. (2013)	23 (22,3%)		60 (54,6%)		25 (23,1%)	0,0066

A Tabela 2 apresenta os dados referentes à distribuição alélica para o gene ACTN3 dos 23 atletas de luta de domínio que fizeram parte da pesquisa. Não foram encontradas diferenças estatísticas nas distribuições alélicas dos dados da presente pesquisa quando comparadas com estudo de Coelho (2011), população geral e no estudo realizado por Kikuchi et al., (2012), com lutadores japoneses. Contudo foi encontrada diferença estatística quando comparada as distribuições com a pesquisa de Rodriguez-Romo et al. (2013), com lutadores de Judô espanhóis.

Tabela 2 - Distribuição alélica do gene ACTN3 dos 23 atletas de domínio

	R n (%)	X n (%)	P
Dados da Pesquisa	30 (65,2%)	16 (34,8%)	
Coelho (2011) controle	126 (63%)	74 (37%)	0,9110
Kikuchi et al. (2012)	144 (53%)	126 (47%)	0,1811
Rodriguez-Romo et al. (2013)	104 (49,6%)	110 (50,4%)	0,0596

A frequência genotípica absoluta e relativa do gene ACE I/D dos 21 atletas que fizeram parte da presente pesquisa, é apresentada na Tabela 3. Para tanto os

resultados foram comparados com estudos da literatura, população geral (controle), quanto com atletas de lutas. A distribuição do genótipo do gene ECA I/D não está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg onde o $p=0,0274$. Quando comparado com o estudo internacional de Cieszczyk et al. (2010), lutadores japoneses, Rodriguez-Romo et al. (2013), lutadores espanhóis, ocorreram diferenças significativas entre os estudos quando comparados com o presente estudo, $p=0,0483$ e $p=0,0066$ respectivamente.

Tabela 3 - Distribuição genotípica do gene ACE I/D dos 21 atletas de domínio

	DD n (%)	ID n (%)	II n (%)	P
Dados da Pesquisa	11 (52%)	5 (25%)	5 (25%)	
Meira-Lima et. al. (2000)	104 (32,2%)	155 (48%)	64 (19,8%)	0,1236
Kikuchi et al. (2012)	68 (50,3%)	39 (28,9%)	28 (20,8%)	0,8774
Cieszczyk et al. (2010)	2 (7,1%)	18 (64,3%)	8 (28,6%)	0,0011

A Tabela 4 apresenta os dados referentes à distribuição alélica para o gene ACE I/D dos 21 atletas de luta de domínio que fizeram parte da pesquisa. Não foram encontradas diferenças estatísticas nas distribuições alélicas dos dados da presente pesquisa quando comparadas com estudo de Coelho (2011), população geral e Kikuchi et al., (2012), com lutadores japoneses. Contudo foi encontrada diferença estatística quando comparada as distribuições com o estudo realizado por Cieszczyk et al., (2013), com lutadores de Judô poloneses e lituanos.

Tabela 4 - Distribuição alélica do gene ACE I/D dos 21 atletas de domínio

	D n (%)	I n (%)	P
Dados da Pesquisa	27 (64,3%)	15 (35,7%)	
Meira-Lima et al., (2000)	363 (63%)	283 (37%)	0,3050
Kikuchi et al. (2012)	175 (53,4%)	95 (46,6%)	0,9468
Cieszczyk et al.(2010)	22 (39,3%)	34 (60,7%)	0,0143

7. DISCUSSÃO

O desempenho esportivo é um fenótipo multifatorial e complexo, determinado por vários fatores, como dieta, treinamento físico, biomecânicos e de características sociais (CIESZCZYK et al., 2010). Em que se refere aos lutadores de nível competitivo de elite e fatores físicos, estes têm a necessidade de possuir tanto valores absolutos como relativos superiores de força máxima e potência muscular, um efetivo metabolismo glicolítico, e uma contribuição relevante do sistema oxidativo (KIKUCHI et al., 2012; RODRIGUEZ-ROMO et al., 2013).

Todavia, considera-se que a variabilidade dos fenótipos em maior gama depende dos diferentes genes e seus polimorfismos existentes no genoma humano, porém a ação destes, ainda não está bem documentada na literatura científica, no tocante a como podem influenciar o desempenho atlético, fato que aguça a curiosidade dos pesquisadores que trabalham com atletas de alto rendimento (Rodríguez-Romo et al., 2013).

O presente estudo é o primeiro a investigar a genotipagem do gene ACTN3 e da ACE em lutadores de domínio brasileiros. Foi observado na Tabela 1, uma maior frequência do genótipo RR 52,2%, seguido de RX 26,1% e XX 21,7%. Quando a amostra foi comparada com a população não atleta, estudo de Coelho (2011), não foi encontrado diferença significativa na distribuição genotípica. Fato que não

ocorreu quanto a amostra foi comparada com Kikuchi et al. (2012), que avaliou lutadores japoneses de Judô e Rodriguez-Romo et al. (2013), que estudaram lutadores de Judô espanhóis.

Como mencionado anteriormente, o genótipo RR e RX estão relacionados a um melhor desempenho em atividades que exigem velocidade, força muscular, hipertrofia e atletas que possuem um predomínio de fibras do tipo IIX (MILLS et al., 2001; NIEMI e MAJAMAA, 2005; YANG et al., 2003; NORMAN et al., 2009; AHMETOV et al., 2011; GENTIL et al., 2011). Em estudo conduzido por Mandroukas et al. (2010), com lutadores de Greco Romana foi constatado que os atletas adultos possuíam um percentual maior de fibras do tipo IIX, quando estes forma comparados com atletas adolescentes. Cabe frisar que, a ACTN3 é uma isoformas específica expressa apenas em fibras de contração rápida nas miofibrilas das fibras do tipo II (NORTH et al., 1999).

No estudo de Kikuchi et al. (2012), ao realizar a genotipagem de 135 lutadores japoneses de Judô, os autores concluíram que os judocas de nível internacional tiveram uma correlação maior com o genótipo RR e RX demonstrando uma pré- disposição genética, fato que corrobora com a presente pesquisa. No entanto Rodriguez-Romo et al. (2013), genotiparam 108 atletas e não encontrou associação positiva com o polimorfismo R577X e o status de ser um atleta de elite no Judô, pelo menos na população espanhola. Para os mesmos autores, pelo menos em relação ao polimorfismo ACTN3 R577X, o genótipo de judocas de elite se assemelha ao tipo misto de atletas e não atletas puramente de força e potência muscular, demonstrando que o desempenho esportivo é poligênico.

Na distribuição alélica do alelo R e alelo X, Tabela 2, o presente estudo encontrou uma distribuição de 65,2% para o alelo R e 34,8% para o alelo X. Varias pesquisas em diferentes modalidades, adolescentes gregos e corrida de 40 metros Moran et al.(2007), atletas finlandeses de força e potência Niemi e Majamaa (2005); atletas russos de potência atletas Druzhevskaya et al.(2008) velocistas e ciclistas de estrada espanhóis Fiuza-Luces et al.(2011), demonstraram uma associação do alelo R com esportes de força e potência, e do alelo X com esportes de resistência.

Porém os dados com lutadores de domínio são um tanto quanto escassos e controversos, Kikuchi et al. (2012) encontrou em judocas japoneses uma distribuição alélica de 53% para o alelo R e de 47% para o alelo X, valores estes que corroboram com a presente pesquisa. No entanto, Rodriguez-Romo et al. (2013), investigando

lutadores espanhóis apresentaram uma distribuição para o R de 49,9% e para o X de 50,4%, descarta uma grande influência do desempenho para este polimorfismo. Tais achados sugerem que um indivíduo pode possuir características inatas que o beneficiarão em modalidades com características específicas, o que pode ser resultado de uma variação genética mantida pela seleção natural, por exemplo, o alelo 577X do gene ACTN3 (PASQUA et al., 2011).

Em que advoga a distribuição genotípica do gene da ACE Tabela 3, foi observado uma maior frequência do genótipo DD 50% seguido de 25% para ID e II. Quando os dados do presente estudo foram comparados com a população normal Meira-Lima et al., (2000) e lutadores japoneses Kikuchi et al. (2012), não foi encontrada diferença estatística significativa, no entanto quando comparado Cieszczyk et al.(2010) com judocas poloneses e lituanos ocorreu diferença significativa entre as distribuições genotípicas.

O polimorfismo I/D da ACE, foi o primeiro gene específico a ter associação com a performance humana (WILLIAMS et al., 2004). 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 (MA et al., 2013). O alelo I também é responsável por um aumento na proporção de fibras musculares do tipo I (ZHANG et al., 2003).

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.

Mais uma vez, poucos são os estudos disponíveis na literatura com relação às lutas de domínio, como em um estudo realizado por Kikuchi et al. (2012) com judocas japoneses de elite os autores reportaram valores de 50,3 %, 28,9% e 20,8% para os genótipos DD, ID e II respectivamente, demonstrando uma associação entre os lutadores deste estudo e o alelo D, fato que vem a fortalecer a presente pesquisa.

No entanto, no estudo de Cieszczyk et al. (2010) com 28 lutadores de elite da Polônia e da Lituânia, os autores encontraram um distribuição genotípica de 7,1%, 64,3% e 28,6% para DD, ID e II respectivamente, valores estes antagônicos a presente pesquisa.

Em que se refere à distribuição alélica do gene ACE I/D, Tabela 4 a presente investigação encontrou valores para o alelo D de 64,3% e para o I de 35,7%. Quando comparado com a distribuição alélica do estudo de Meira-Lima et al. (2000), não foi encontrada diferença estatística significativa, fato também ocorrido com o estudo de Kikuchi et al. (2012). Entretanto, quando comparado com a pesquisa de Cieszczyk et al.(2010) foi reportada diferença significativa. Investigando corredores de resistência Myerson et al. (1999), encontraram uma frequência para o alelo I de 35% para provas ≤ 200 m, 53% para corredores de 400 até 3.000 m e 62% para corredores que corriam ≥ 5.000 m, suportam uma associação positiva do alelo I com o desempenho de atletas de resistência.

Pesquisa realizada por Nazarov et al. (2001), com atletas russos foi encontrado um frequência alélica D 72% para os atletas que participavam de provas cujo o tempo era inferior a 1 min e um alelo I de 63% para provas acima de 1 min até 20 min. Em uma população de lutadores de elite japonesa Kikuchi et al. (2012) encontraram uma distribuição alélica de 63% para o D e 37,7% para o alelo I, valores próximos aos constatados pela presente pesquisa, demonstrando uma pré-disposição genética para a amostra estudada.

Dados conflitantes foram reportados no estudo de Cieszczyk et al.(2010) onde a distribuição do alelo D foi de 39,3% e do alelo I de 60,7%, valores estes opostos ao relatados na presente pesquisa. Para os autores, a maior incidência do genótipo I/II é devido à duração de uma luta que pode chegar a 5 min. Seria interessante conjecturar tal hipótese, porém devido ao pequeno número de estudo existente na literatura com lutadores de domínio.

Uma possível hipótese para o favorecimento da presente amostra para os genes estudados e os seus alelos vinculados à força e velocidade e os demais estudos, poderia residir na sustentação da epigenética, que considera que a prática de exercício físico regular, busca a supercompensação, resposta esta influenciadas por genes e experiências de vida. Logo às mudanças não estáveis, mas transmissíveis, interagem durante uma resposta biológica, sendo que a interação entre genes e estímulos pode alterar em muito os resultados esperados (SOUZA JR e PEREIRA, 2010).

8 CONCLUSÃO

As considerações finais do presente estudo advoga que as frequências genotípicas e alélicas do ACTN3, (RR = 52,2%, RX = 26,1% e XX = 21,7%; R = 65,2% e X = 34,8%) e do ACE I/D (DD = 52%, ID = 25% e II = 25%; D = 64,3% e I = 35,7%), não diferiram significativamente quando comparadas à população geral. Contudo a frequência de genótipos favoráveis para atividades de força e potência forma maiores que na população controle. ACTN3 – RR (52,6% vs 40%) e ACE – DD (52% vs 32,2%) o que pode sugerir uma predisposição genética, para os lutadores de elite brasileira de domínio que fizeram parte da presente pesquisa.

Sendo assim, os resultados obtidos confirmam a importância do gene ACTN3 e ACE com um marcador genético útil na seleção de lutadores de domínio. A presente pesquisa também sugere que os mais predispostos para lutas de domínio, são indivíduos com a distribuição nos alelos dos genes ACTN3 e ACE mais significativos no que diz respeito à força e potência muscular.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.J.; BOULLOSA, A.D.; PARDONO, E.; LIMA, M.R.; MORAIS, K.P.; DENADAI, S.B.; SOUZA, C.V.; NÓBREGA, T.O.; CAMPBELL, G.S.C.; SIMÕES, G.H. A Influência do Genótipo da ECA sobre a Aptidão Cardiorrespiratória de Jovens do Sexo Masculino Moderadamente Ativos. **Arq Bras Cardiol.** v. 98, n. 4, p. 315-320. 2012.
- ALONSO, Kátia C. **Polimorfismo do Gene da Enzima Conversora de Angiotensina em indivíduos do sul do Brasil.** 2012. 118 f. Dissertação (Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa – PR, 2012.
- AHMETOV, I.I.; POPOV, V.D.; ASTRATENKOVA, V.I.; DRUZHEVSKAYA, M.A.; MISSINA, S.S.; VINOGRADOVA, L.O.; ROGOZKIN, V.A. The use of molecular genetic methods for prognosis of aerobic and anaerobic performance in athletes. **Human Physiology.** v. 34, n. 3, p. 338-342, May. 2008.
- AHMETOV, I.I.; WILLIAMS, A.G.; POPOV, D.V.; LYUBAEVA, E.V.; HAKIMULLINA, A.M.; FEDOTOVSKAYA, O.N.; MOZHAYSKAYA, I.A.; VINOGRADOVA, O.L.; ASTRATENKOVA, I.V.; MONTGOMERY, H.E.; ROGOZKIN, V.A. The combined impact of metabolic gene polymorphisms on elite endurance athlete status and related phenotypes. **Hum Genet.** v. 126, n. 6, p. 751–761, Dec. 2009.
- AHMETOV, I.I.; DRUZHEVSKAYA, A.M.; LYUBAEVA, E.V.; POPOV, D.V.; VINOGRADOVA, O.L.; WILLIAMS, A.G. The dependence of preferred competitive racing distance on muscle fibre type composition and ACTN3 genotype. **Exp. Physiol.** v. 96, n. 12, p. 1302-1310, Oct. 2011.
- ARTIOLI, G.G., SCAGLIUSI, F.B., POLACOW, V.O., GUALANO, B., LANCHÁ JUNIOR, A.H. Magnitude e métodos de perda rápida de peso em judocas de elite. **Revista de Nutrição.** v. 20, n. 3, p. 307-315, Maio/Jun, 2007.
- ARTIOLI, G.G.; HIRATA, R.D.C.; LANCHÁ JUNIOR, A.H. Terapia gênica, *doping* genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro. **Rev Bras Med Esporte.** vol.13, n.5, p. 349-354. 2007b.
- BARTON, E.R. The ABCs of IGF-I isoforms: impact on muscle hypertrophy and implications for repair. **Appl Physiol Nutr Metab.** v.31, n.6, p. 791–797.2006.
- BEGGS, A.H.; BYERS, T.J.; KNOLL, J.H.; BOYCE, F.M.; BRUNS, G.A.; KUNKEL, L.M. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. **J. Biol. Chem.** v. 267, n. 23, p. 9281–9288, May. 1992.
- BLANCHARD, A.; OHANIAN, V.; CRITCHLEY, D. The structure and function of alpha-actinin. **J Muscle Res Cell Motil.** v. 10, n. 4, p. 280-289. 1989.
- BAOUTINA, A.; ALEXANDER, I.E.; RASKO, J.E.; EMSLIE, K.R. Developing strategies for detection of gene doping. **J Gene Med.** v.10, n.1, p.3-20, Jan. 2008.

BUENO, S.; PASQUA, A.L.; SANTOS, dos G.V.; SILVA-CAVALCANTE, D.M.; CARVALHO, R.; URSO, P.R.; LIMA-SILVA, E.A.; BERTUZZI, R. Relação entre o polimorfismo da eca e aptidão aeróbia. **Rev. Acta Brasileira do Movimento Humano**. v. 3, n. 2, p. 43-57, Abril/Junho. 2013.

BRAY, M.S.; HAGBERG, J.M.; PÉRUSSE, L.; RANKINEN, T.; ROTH, S.M.; WOLFARTH, B.; BOUCHARD, C. 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, Jun. 2009.

CALÓ, M.C; VONA, G. Gene polymorphisms and elite athletic performance. **J of anthrop. Sciences**. v. 86, p.113-131. 2008.

CARNEVALI JÚNIOR, C.L.; SILVA, P.C.J.; EDER, R.; GONÇALVES, D.; LIMA, P.W.; SEELAENDER, L.C.M. Manipulação de genes e desempenho esportivo: Tendência ou realidade? **Educação Física em Revista**. v.3, n.1, p. 1-12. 2009.

CHAN, S.; SETO, J.T.; MACARTHUR, D.G.; YANG, N.; NORTH, K.N.; HEAD, S.I. 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, p. C897-904, Jul. 2008.

CIESZCZYK, P.; MACIEJEWSKA, A.; SAWCZUK, M.; FICEK, K.; EIDER, J.; JASCANIENE, N. The angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism in elite Polish and Lithuanian judo players. **Biology of Sport**. vol. 27, n.2, p. 119 – 122. 2010.

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**. 2011. 115 f. Doutorado. (Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG. 2011.

COSTA, A.M.; SILVA, A.J.; GARRIDO, N.D.; LOURO, H.; DE OLIVEIRA, R.J.; BREITENFELD, L. Association between ACE D allele and elite short distance swimming. **European journal of applied physiology**. v. 106, n. 6, p. 785-790, May. 2009a.

COSTA, A.M.; SILVA, A.J.; GARRIDO, N.; LOURO, H.; MARINHO, D.A.; CARDOSO MARQUES, M.; BREITENFELD, L. Angiotensin-converting enzyme genotype affects skeletal muscle strength in elite athletes. **J Sports Sci. Med**. v. 8, n.3, p. 410-418, Sep. 2009b.

DRAGOVIC, T.; MINSHALL, R.; JACKMAN, H.L.; WANG, L.X.; ERDOS, E.G. Kininase II-type enzymes. Their putative role in muscle energy metabolism. **Diabetes**. 45(Suppl1): S34-37. 1996.

DRIGO, A.J.; AMORIM, R.A.; MARTINS, J.C.; MOLINA, R. Demanda metabólica em lutas de projeção e de solo no judô: estudo pelo lactato sanguíneo. **Motriz**. v.2, n. 2, p. 80-86, 1996.

DANSER, A.H.; SCHALEKAMP, M.A.; BAX, W.A.; VAN DEN BRINK, A.M.; SAXENA, P.R.; RIEGGER, G.A.; SCHUNKERT, H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. **Circulation**. v. 92, n. 6, p.1387-1388, Sep.1995.

DEL VECCHIO, F.B.; BIANCHI, S.; HIRATA, S.M.; CHACON-MIKAHILI, M.P.T. Análise morfo-funcional de praticantes de brazilian jiu-jitsu e estudo da temporalidade e da quantificação das ações motoras na modalidade. **Movimento e Percepção**. v. 7, p. 263-281. 2007.

DEL VECCHIO, F.B.; HIRATA, S.; FRANCHINI, E. A review of time-motion analysis and combat development in mixed martial arts matches at regional level tournaments. **Perceptual and Motor Skills**. v.112, n. 2, p. 1-10. 2011.

DIAS, G.R. Genética, Performance Física Humana e Doping Genético: o Senso Comum Versus a Realidade Científica. **Rev Bras Med Esporte**. v. 17, n. 1, p.62-70. Jan/Fev. 2011.

DIET, F.; GRAF, C.; MAHNKE, N.; WASSMER, G.; PREDEL, H.G.; PALMA-HOHMANN, I.; ROST, R.; BÖHM, M. ACE and angiotensinogen gene genotypes and left ventricular mass in athletes. **Eur J Clin Invest**. v. 31, n. 10, p. 836-842, Oct. 2001.

DRUZHEVSKAYA, M.A.; AHMETOV, I.I.; ASTRATENKOVA, I.V.; ROGOZKIN, V.A. Association of the ACTN3 R577X polymorphism with power athlete status in Russians. **European Journal of Applied Physiology**. v. 103, n. 6, p. 631-634, May. 2008.

EIDER, J.; ZMIJEWSKI, P.; KLUSIEWICZ, A.; KALISZEWSKI, P.; MALCZEWSKA-LENCZOWSKA, J.; GAJEWSKI, J.; POKRYWKA, A. 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, Dec. 2013.

EISENMANN, J.C.; SARSYNSKI, M.A.; GLEEN, K.; ROTHSCHILD, M.; HEELAN, K.A. ACE I/D genotype, adiposity, and blood pressure in children. **Cardiovasc Diabetol**. v. 8, n.14, p. 1-8. 2009.

ENGELI, S.; NEGREL, R.; SHARMA, M.A. Physiology and Pathophysiology of the Adipose Tissue Renin-Angiotensin System. **Hypertension**. v. 35. p. 1270-1277, 2000.

EYNON, N.; RUIZ, J.R.; OLIVEIRA, J.; DUARTE, J.A.; BIRK, R.; LUCIA, A. Genes and elite athletes: a roadmap for future research. **J Physiol**. v. 589, n. 13, p. 3063–3070, May. 2011.

FERREIRA, B.C.J.; EVANGELISTA, S.F.; BRUM, C.P. Influência dos polimorfismos do sistema renina - angiotensina no desempenho esportivo. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**. v. 15, n. 2, p. 1-9, (supl A). Março/Abril. 2005.

FIUZA-LUCES, C.; RUIZ, J.R.; RODRÍGUEZ-ROMO, G.; SANTIAGO, C.; GÓMEZ-GALLEGO, F.; YVERT, T.; CANO-NIETO, A.; GARATACHEA, N.; MORÁN, M.; LUCIA, A. Are 'Endurance' Alleles 'Survival' Alleles? Insights from the ACTN3 R577X Polymorphism. **PLoS ONE**. v. 6, n. 3, p. e17558, 1-6, Mar. 2011.

FRANCHINI, E.; TAKITO, Y.M.; LIMA, P.R.J.; HADDAD, S.; KISS, D.P.A.M.; REGAZZINI, M.; BOHME, S.T.M. Características fisiológicas em testes laboratoriais e resposta da concentração de lactato sanguíneo em três lutas em judocas das classes juvenil-a, júnior e sênior. **Rev. paul. Educ. Fís.** v.12, n. 1, p. 5-16, Jan/Jun. 1998.

GATZIDOU, E.; GATZIDOU, G.; THEOCHARIS, S. Genetically transformed world records: A reality or in the sphere of fantasy? **Medical Science Monitoring.** v. 15, n. 2, p. RA41-RA47, feb. 2009.

GAYAGAY, G.; YU, B.; HAMBLY, B.; BOSTON, T.; HAHN, A.; CELERMAJER, D.; TRENT, R. Elite endurance athletes and the ACE I allele: the role of genes in athletic performance. **Hum Genet.** v. 103, n. 1, p. 48-50.1998.

GENTIL, P.; PEREIRA, R.W.; LEITE, T.K. M.; BOTTARO, M. ACTN3 R577X polymorphism and neuromuscular response to resistance training. **J of Sports Science and Med.** v. 10, n. 2, p. 393-399, Jun. 2011.

GIL, Antônio Carlos. **Métodos e técnicas de pesquisa social.** 5. ed. São Paulo: Atlas, 1999.

GINEVICIENE, V.; KRUPECKI, K.; MACIEJEWSKA, A.; SAWCZUK, M. The angiotensina converting enzyme gene insertion/ deletion polymorphism in Lithuanian professional athletes. **Acta Medica Lituanica.** v. 16, n.1, p. 9–14, Apr. 2009.

GINEVICIENE, V.; PRANCKEVICIENE, E.; MILASIUS, K.; KUCINSKAS, V. RELATING FITNESS PHENOTYPES TO GENOTYPES IN LITHUANIAN ELITE ATHLETES. **ACTA MEDICA LITUANICA.** v. 17, n. 1-2, p. 1-10, May. 2010.

HIGAKI, J.; AOKI, M.; MORISHITA, R.; KIDA, I.; TANIYAMA, Y.; TOMITA, N.; YAMAMOTO, K.; MORIGUCHI, U.M.; KANEDA, Y.; OGIHARA, T. In vivo evidence of the importance of cardiac angiotensin-converting enzyme in the pathogenesis of cardiac hypertrophy. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 20, n, 2, p 428-34. 2000.

HOPKINS, W.G. Genes and training for athletic performance. **Sportscience.** v. 5, n.1, p. 1-3, Apr. 2001.

JONES, A.; MONTGOMERY, H.E.; AND WOODS, D.R. Human performance: A role for the ACE genotype? **Exerc Sport Sci Rev.** v. 30, n. 4, p. 184 - 190. 2002.

KEM, D. C.; BROWN, R.D. Renin: from beginning to end. **N Engl J Med.** v. 323, n.16, p. 1136-1137, 1990.

KIKUCHI, N.; MIN, S. K.; UEDA, D.; IGAWA, S.; and NAKAZATO, K. Higher frequency of the ACTN3 R allele + ACE DD genotype in Japanese elite wrestlers. **J Strength Cond Res.** v. 26, n.12, p. 3275–3280, 2012.

LEE S.J.; MCPHERON C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v.98 , n.16, p. 9306-9311. 2001.

LIPPI, G.; FRANCHINI, M.; GUIDI, G.C. Blood doping by cobalt. Should we measure cobalt in athletes?. **J. Occup. Med. Toxicol.** vol. 1, n.18, p. 1-3 2006.

LIPPI, G.; LONGO, G.U.; MAFFULLI, N. Genetics and sports. **British Medical Bulletin**. v. 93, n.1, p. 27 – 47, Feb. 2010.

MA, F.; YANG, Y.; LI, X.; ZHOU, F.; GAO, C.; LI, M.; GAO, L. The association of sport performance with *ACE* and *ACTN3* genetic polymorphisms: A systematic review and meta-analysis. **PloS One**. v. 8, n.1, p. 1-9, e 54685, Jan. 2013.

MACARTHUR, D.G.; NORTH, K.N. A gene for speed? The evolution and function of α -actinin-3. **Bioessays**. v. 26, n. 7, p. 786-795. 2004.

MACARTHUR, D.G.; SETO, J.T.; CHAN, S.; QUINLAN, K.G.; RAFTERY, J.M.; TURNER, N.; NICHOLSON, M.D.; KEE, A.J.; HARDEMAN, E.C.; GUNNING, P.W.; COONEY, G.J.; HEAD, S.I.; YANG, N.; NORTH, K.N. An *Actn3* knockout mouse provides mechanistic insights into the association between α -actinin-3 deficiency and human athletic performance. **Hum Mol Genet**. v. 17, n. 8, p. 1076 – 1086, Jan. 2008.

MACARTHUR, D.G.; NORTH, K.N. The *ACTN3* Gene and Human Performance. In:(Ed.). **Genetic and Molecular Aspects of Sport Performance: Wiley-Blackwell**. p. 204-214. 2011.

MANDROUKAS, A.; METAXAS, T.; KESIDIS, N.; CHRISTOULAS, K.; VAMVAKOUDIS, E.; STEFANIDIS, P.; HELLER, J.; EKBLUM, B.; MANDROUKAS, K. Deltoid muscle fiber characteristics in adolescent and adult wrestlers. **J Sports Med Phys Fitness**. v. 50, n.2, p. 113-120. 2010.

MARCHETTI, H.P.; MELO C. de F. Aspectos metabólicos do exercício intermitente. **Rev. Bras. de Ciên. da Saúde**. v. 3, n. 12, p. 42-49, Abr/Jun 2007.

MARCON, G.; FRANCHINI, E.; JARDIM, JR.; BARROS LEITE, TL. Structural analysis of action and time in sports: judo. **J Quant Anal Sports**. v.6, n.4, p.1-13. 2011.

MATSAKAS A.; DIEL P. The growth factor myostatin, a key regulator in skeletal muscle growth and homeostasis. **International Journal of Sports Medicine**. v. 26, n.2, p. 83-89. 2005.

MEIRA-LIMA, I.V. et al. Angiotensinogen and angiotensin converting enzyme gene polymorphisms and the risk of bipolar affective disorder in humans. **Neuroscience Letters**. v. 293, n. 2, p. 103-106. 2000.

MIARKA, B.; PANISSA, G.L.V.; JULIO, F.U.; DEL VECCHIO, B.F.; CALMET, M.; FRANCHINI, E. A comparison of time-motion performance between age groups in judo matches. **J of Sports Sciences**. v. 3, n. 39, p. 1–7, May. 2012.

MITCHELL, J.H.; HASKELL, W.; SNELL, P.; VAN CAMP, P.S. Task Force 8: Classification of sports. **J Am Coll Cardiol**. v. 45, n. 8, p. 1364–1367. 2005.

MILLS, M.; YANG, N.; WEINBERGER, R.; VANDER WOUDE, D.L.; BEGGS, A.H.; EASTEAL, S.; et al. Differential expression of the actin-binding proteins, α -actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. **Hum Mol Genet.** v.1, n.13, p.1335-1346. 2001.

MONTGOMERY, H.E.; CLARKSON, P.; DOLLERY, C.M.; PRASAD, K.; LOSI, M.A.; HEMINGWAY, H.; STATTERS, D.; JUBB, M.; GIRVAIN, M.; VARNAVA, A.; WORLD, M.; DEANFIELD, J.; TALMUD, P.; MCEWAN, J.R.; MCKENNA, W.J.; HUMPHRIES, S. 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, Aug 5.1997.

MORAN, C. N.; YANG, N.; BAILEY, M.E.; TSIOKANOS, A.; JAMURTAS, A.; MACARTHUR, D.G.; NORTH, K.; PITSILADIS, Y.P.; WILSON, R.H. Association analysis of the ACTN3 R577X polymorphism and complex quantitative body composition and performance phenotype in adolescent Greeks. **European Journal of Human Genetics.** v. 15, n.1, p. 88 – 93, Oct. 2007.

MYERSON, S.; HEMINGWAY, H.; BUDGET, R.; MARTIN, J.; HUMPHRIES, S.; MONTGOMERY, H. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. **J. Appl. Physiol.** v. 87, n.4, p. 1313 –1316, Oct. 1999.

NAZAROV, I.B.; WOODS, D.R.; MONTGOMERY, H.E.; SHNEIDER, O.V.; KAZAKOV, V.I.; TOMILIN, N.V.; ROGOZKIN, V.A. **Eur J Hum Genet.** v. 9, n. 10, p. 797– 801, Oct. 2001.

NIEMI, A.K.; MAJAMAA, K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. **European Journal of Human Genetics.** v. 13, n. 8, p. 965 – 969, Aug. 2005.

NILSSON, J.; CSERGÖ, S.; GULLSTRAND, L.; TVEIT, P.; REFSNES, P.E. Work-time profile, blood lactate concentration and rating of perceived exertion in the 1998 Greco-Roman Wrestling World Championship. **Journal of Sports Science.** London, v.20, n.11, p.939-945, 2002.

NORMAN, B.; ESBJÖRNSSON, M.; RUNDQVIST, H.; OSTERLUND, T.; VON WALDEN, F.; TESCH P.A. Strength, power, fiber types, and mRNA expression in trained men and women with different ACTN3 R577X genotypes. **Journal of Applied Physiology.** v.106, n. 3, p. 959 – 965, Mar. 2009.

NORTH, K. N.; YANG, N.; WATTANASIRICHAIGOON, D.; MILLS, M.; EASTEAL, S.; BEGGS, A.H. A common nonsense mutation results in α -actinin-3 deficiency in the general population. **Nature Genetics.** v. 21, n. 4, p. 353-354, Apr. 1999.

OLIVEIRA, E.M.; ALVES, G.B.; BARAUNA, V.G. Sistema renina-angiotensina: interação gene–exercício. **Rev Bras Hipertens.** v.10, n. 2, p. 125-129, abril/junho. 2003.

OLIVEIRA, R.S.; TF COLLARES, T.F.; SMITH, K.R.; COLLARES, T.V.; SEIXAS, F.K. The use of genes for performance enhancement: doping or therapy? **Braz J Med Biol Res.** v. 44, n.12, p.1194-1201, Dec. 2011.

OLIVIO-JR.A.J.; BORIN, P.J.; PASQUALOTO, B.B.; BRAZ, V.T. Modelação Competitiva dos Aspectos Temporais em Lutas de Judô na Classe Juvenil. **Saúde Rev.** v. 11, n. 28/29, p. 17-26, maio-dez. 2009.

PAPARINI, A.; RIPANI, M.; GIORDANO, G.D.; SANTONI, D.; PIGOZZI, F.; ROMANOSPICA, V. ACTN3 genotyping by real-time PCR in the Italian population and athletes. **Med Sci Sports Exerc.** v. 39, p. 810-815. 2007.

PASQUA, A.L.; ARTIOLI, G.G.; PIRES, de O. F.; BERTUZZI, R. ACTN3 e desempenho esportivo: um gene candidato ao sucesso em provas de curta e longa duração. **Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum.** v.13, n. 6, p. 477-483, 2011.

PEACH, M.J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiol Rev.** v. 57 n. 2, p. 313-370, April, 1977.

PHILP, A.; HAMILTON, D.L.; BAAR, K. Signals mediating skeletal muscle remodeling by resistance exercise: PI-3 kinase independent activation of mTORC1. **Journal of Applied Physiology.** v. 110, n. 2, p. 561-568, 2011.

PUTHUCHEARY, Z.; SKIPWORTH, J. R.; RAWAL, J.; LOOSEMORE, M.; VAN SOMEREN, K.; MONTGOMERY, H.E. The ACE gene and human performance: 12 years on. **Sports Med.** v. 41, n. 6, p. 433-448, Jun 1, 2011.

RANKINEN, T.; PÉRUSSE, L.; GAGNON, J.; CHAGNON, Y.C.; LEON, A.S.; SKINNER, J.S.; WILMORE, J.H.; RAO, D.C.; BOUCHARD, C. Angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and fitness phenotype in the Heritage Family Study. **J Appl Physiol.** v. 88, n.3, p.1029 – 1035, Mar. 2000.

RANKINEN, T.; BRAY, M.S.; HAGBERG, J.M.; PÉRUSSE, L.; ROTH, S.M.; WOLFARTH, B.; BOUCHARD, C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 38, n.11, p. 1863–1888, Nov. 2006.

REGOLI, D.; NSA ALLOGHO, S.; RIZZI, A.; GOBEIL, F.J. Bradykinin receptors and their antagonists. **Eur J Pharmacol.** v. 348, n.1, p. 1-10, 1998.

RODRÍGUEZ-ROMO, G.; YVERT, T.; DIEGO, A.; SANTIAGO, C.; DURANA, D.L.D de.; CARRATALÁ, V.; GARATACHEA, N.; and LUCIA A. No Association Between ACTN3 R577X Polymorphism and Elite Judo Athletic Status. I. **J. of Sports Physiology and Performance.** v. 8, p. 579-581, 2013.

ROTH, M.S.; WALSH, S.; LIU, D.; METTER, E.J.; FERRUCCI, L.; HURLEY, B.F. The ACTN3 R577X nonsense allele is underrepresented in elite-level strength athletes. **Eur. J Hum Genet.** v. 16, n.3, p. 391-394, mar. 2008.

SABER – AYAD, M.M.; NASSAR, S.Y.; LATIF, A.I. Angiotensin-converting enzyme I/D gene polymorphism affects early cardiac response to professional training in young footballers. **JRAAS**. v. 15, n. 3, p. 236-242, nov. 2014.

SAUNDERS, C.J.; SEPTEMBER, A.V.; XENOPHONTOS, S.L.; CARILOU, M.A.; ANASTASSIADES, L.C.; NOAKES, T.D.; COLLINS, M. No association of the ACTN3 gene R577X polymorphism with endurance performance in Ironman Triathlons. **Ann. of Hum. Genet.** v. 71, n. 6, p.777–781. Jul. 2007.

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, V.; SELL, K.W.; SAHA, B.K. Mistyping ACE heterozygotes. **PCR Methods Appl.** v. 3, n. 2, p. 120-121, Oct. 1993.

SHENOY, S.; TANDON, S.; BHANWER, S.A. Association of angiotensina converting enzyme gene polymorphism and Indian army triathletes performance. **Asian J of Sports Med.** v. 1, n. 3, p. 143-150, Sep. 2010.

SJOBLOM, B.; SALMAZO, A.; DJINOVIC-CARUGO, K. a-Actinin structure and regulation. **Cell Mol Life Sci.** v. 65, n. 17, p. 2688-2701, 2008.

SMITH, J.D. A Framework for Understanding the Training Process Leading to Elite Performance. **Sports Med.** v.33, n. 15, p. 1103 -1126, Dec. 2003.

SOUZA JR, P.T.; PEREIRA, B. 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.

THOMAS, S.G.; COX, M.H.; LEGAL, Y.M.; VERDE, T.J.; SMITH, H.K. Physiological profiles of the Canadian National Judo Team. **Canadian Journal of Sports Science.** v.14, n.3, p.142-147, 1989.

VINCENT, B.; DE BOCK, K.; RAMAEKERS, M.; VAN DEN EEDE, E.; VAN LEEMPUTTE, M.; HESPEL, P.; THOMIS, M.A. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. **Physiol Genomics.** v.32, n.1, p. 58–63, Sep. 2007.

WELLS, D.J. Gene doping: the hype and the reality. **Br J Pharmacol.** v. 154, n.3, p.623-631, Jun. 2008.

WORLD ANTI DOPING AGENCY. Athlete biological passport. dec. 2009. Disponível em: <http://www.wadaama.org/Documents/Science_Medicine/Athlete_Biological_Passport/WADA_AthletePassport_OperatingGuidelines_FINAL_EN.pdf> Acesso em: 10 de abril 2014.

WILLIAMS, A.G.; RAYSON, M.P.; JUBB, M. The ACE gene and muscle performance. **Nature.** 403:614. 2000.

WILLIAMS, A.G.; DHAMRAIT, S.S.; WOOTTON, P.T.; DAY, S.H.; HAWE, E.; PAYNE, J.R.; MYERSON, S.G.; WORLD, M.; BUDGETT, R.; HUMPHRIES, S.E.; MONTGOMERY, H.E. Bradykinin receptor gene variant and human physical performance. **J Appl Physiol**. v. 96, n. 3, p. 938-942, Nov. 2004.

WILLIAMS, G.A.; FOLLAND, P.J. Similarity of polygenic profiles limits the potential for elite human physical performance. **J Physiol**. v. 586, n.1, p. 113–121, Sep. 2008.

YAMADA, A.K.; BERTUZZI, R.; LEITE, T.C.; PRESTES, J.; Junior, C.R.B. BIOMOTRICITY ROUNDTABLE - Genômica e Fisiologia Molecular do exercício e do esporte. **Brazilian Journal of Biomotricity**. v. 7, n. 4, p. 192-219, 2013.

YANG, N.; MACARTHUR, D.G.; GULBIN, J.P.; HAHN, A.G.; BEGGS, A.H.; EASTEAL, S.; NORTE, K. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. **Am J Hum Genet**. v.73, n.3, p. 627-631. 2003.

YONEMOCHI, H.; YASUNAGA, S.; TESHIMA, Y.; IWAO, T.; AKIYOSHI, K.; NAKAGAWA, M.; SAIKAWA, T.; ITO, M. 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. 23, p. 2268-2273, Jan. 1998.

ZHANG, B.; TANAKA, H.; SHONO, N.; MIURA, S.; KIYONAGA, A.; SHINDO, M.; SAKU, K. 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. **Clin Genet**. v. 63, n. 2, p. 139-44, Feb. 2003.

ZHAO, B.; MOOCHHALA, S.M.; THAM, S.; LU, J.; CHIA, M.; BYRNE, C.; HU, Q.; LEE, H.K.L. Relationship between angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and VO_{2max} of Chinese males. **Life Sciences**. v. 73, n. 20, p. 2625-2630. 2003.

ZOOSMANN-DISKIN, A. The association of the ACE gene and elite athletic performance in Israel may be an artifact. **Exp Physiol**. v. 93, n. 11, p. 1220- 1221, Aug. 2008.

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.

Rubrica

Sujeito

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, ECA, 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

Rubrica
Sujeito

tema por outro instrumento.

Com relação aos pesquisadores envolvido 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

Rubrica

Sujeito

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 sobressair 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 α 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

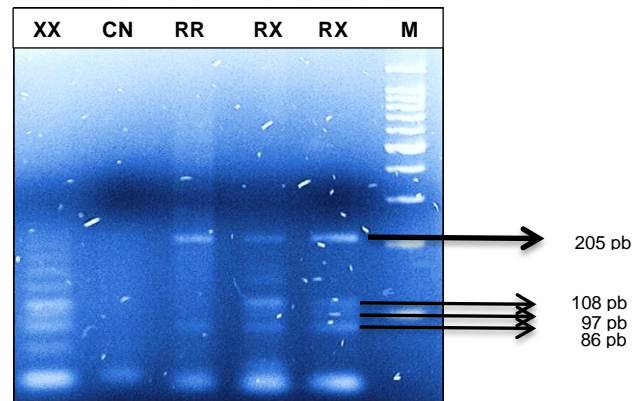
Município: CURITIBA

Telefone: (413)218--5582

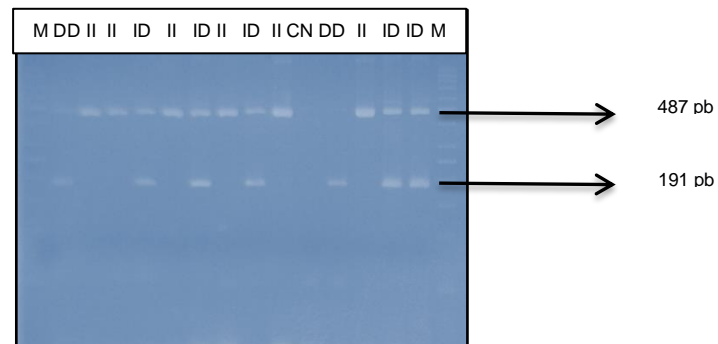
Fax: (413)218--5559

E-mail: cep@dombosco.com.br

ANEXO B - Padrão esperado de eletroforese para o gene ACTN3



ANEXO C – Padrão esperado de eletroforese para o gene da ACE



ANEXO D - Padrão de eletroforese esperado para o genótipo DD após reavaliação

