



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

GLAUCIO NEVES WOELLNER

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA
ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA (ACE) E ACTN3 NA
RELAÇÃO POTÊNCIA VERSUS RESISTÊNCIA**

DISSERTAÇÃO - MESTRADO

CURITIBA

2017

GLAUCIO NEVES WOELLNER

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA
ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA (ACE) E ACTN3 NA
RELAÇÃO POTÊNCIA VERSUS RESISTÊNCIA**

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

**ORIENTADOR: PROF. DR.
JÚLIO CESAR BASSAN**

CURITIBA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

WB42a Woellner, Glaucio Neves
2017 Avaliação da associação dos polimorfismos da enzima conversora da angiotensina (ACE) e ACTN3 na relação potência versus resistência / Glaucio Neves Woellner.-- 2017.
60 f.: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web.
Texto em português, com resumo em inglês.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. Área de Concentração: Engenharia Biomédica, Curitiba, 2017.
Bibliografia: f. 42-48.

1. Genes. 2. Enzima conversora da angiotensina. 3. Polimorfismo (Genética). 4. Treinamento (Atletismo) - Aspectos fisiológicos. 5. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos. 6. Desempenho. 7. Aptidão física do atleta. 8. Engenharia biomédica - Dissertações. I. Bassan, Júlio Cesar, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

CDD: Ed. 22 -- 610.28

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ



Campus Curitiba



Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Título da Dissertação Nº 82

“Avaliação da associação dos polimorfismos da enzima conversora da angiotensina (ACE) e ACTN3 na relação potência versus resistência”.

Por

Glaucio Neves Woellner

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Engenharia Biomédica

LINHA DE PESQUISA: Engenharia Clínica e Gestão.

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de **MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA (M.Sc.)** – Área de Concentração: Engenharia Biomédica, pelo **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica (PPGEB)**, – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (**UTFPR**), *Campus Curitiba*, às **10h00min** do dia **22 de fevereiro de 2017**. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos professores:

Julio Cesar Bassan, Dr.
(Presidente – UTFPR)

Prof. Fabiano de Macedo Salgueirosa, Dr.
(UP)

Prof. Antonio Palma Setti, Dr.
(UTFPR)

Visto da coordenação:

Prof^a. Leandra Ulbricht.,Dr^a.
(Coordenadora do PPGEB)

AGRADECIMENTOS

Talvez tão complexo quanto finalizar um projeto como a dissertação seria o de ser justo o suficiente no agradecimento as pessoas e instituições que tanto me ajudaram nesta caminhada. Mas preciso dar o primeiro passo, assim como foi com esta missão.

Primeiramente, gostaria de agradecer, enaltecer, me desculpar, com a minha esposa, Claudia. Foram muitos momentos complicados de dúvidas, incertezas e até mesmo de decepção e tristeza; e você estava lá comigo, me suportando. Mesmo quando não concordava ou se cansava de prestar este suporte, mostrava-me a importância de ficarmos unidos e juntos, afinal, tudo que sempre me importou.

Também gostaria de agradecer e desculpar-me com os meus filhos, que durante muito tempo, tiveram um pai ausente, ainda que fosse com o espírito ausente. Muito obrigado pela paciência, carinho, amor e compreensão.

Aos meus pais, Silvete e Homero, que com todas as dificuldades criaram seus filhos com muita dignidade e proporcionaram não só o sustento, mas foram exemplos de ética, cidadania e honestidade. Estendo aqui meu agradecimento a Ednéia, que também fez parte da minha formação. Meus irmãos Marcela, Luiz Filipe e Ricardo que sempre com uma palavra amiga me colocavam novamente no caminho.

Ao Professor e amigo Zair Cândido de Oliveira Netto, por ser um exemplo de profissional e parceria. Incentivando e apoiando nos estudos sob todos os aspectos tenho a certeza que o trabalho não haveria se consumado sem você. Estendo aqui o agradecimento a outros amigos e colegas de trabalho que de alguma forma contribuíram na pesquisa.

Ao Professor e amigo Fabiano Salgueirosa que esteve ao meu lado durante grande parte da pesquisa, me orientando, me ensinando e que fez com que eu aprendesse muito mais do que a pesquisa me proporcionara.

Ao meu orientador, Professor Julio Bassan, que além de um exemplo, onde superou imensas dificuldades para chegar ao nível acadêmico que

chegou, e que brilhantemente, orienta-nos com sua ética, sabedoria e experiência.

À Professora Leandra, por todo o apoio e conhecimento e principalmente nos momentos delicados da defesa e pela forma como lidou com estas condições.

À minha parceira de pesquisa, que infelizmente não pode chegar junto comigo a este momento, mas tenho certeza que seus sonhos serão realizados. Maria Amélia, mesmo muito mais nova, você é um exemplo de coragem para mim.

Gostaria de agradecer a paciência, carinho e disponibilidade, da minha agora amiga, Jessica Viesser, responsável pelo laboratório de Biotecnologia da Universidade Positivo. Não era sua função, mas também aprendi muito com você.

E finalmente, todas as pessoas aqui não citadas e que tiveram participações importantes como atletas, técnicos, colegas e amigos que contribuía lendo uma parte da pesquisa para dar sua opinião.

RESUMO

WOELLNER, Glaucio Neves. **AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA (ACE) E ACTN3 NA RELAÇÃO POTÊNCIA VERSUS RESISTÊNCIA.** (Dissertação) programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2017.

O Atletismo é uma modalidade esportiva que possui provas com demandas energéticas diferentes: potência (P) para saltadores, velocistas e lançadores e resistência (R) para corredores de longas distâncias e marcha atlética. É possível observar diferenças destas características com as possíveis variações da frequência do genótipo DD (deleção), II (inserção) e heterozigoto ID na ACE, bem como da frequência genotípica RR, RX e XX na ACTN3. O presente artigo tem por objetivo correlacionar à recorrência do polimorfismo ACE (Enzima Conversora da Angiotensina) da ACTN3 nos atletas de Atletismo. Estudos anteriores relacionaram estes polimorfismos à capacidade física demandada em outras modalidades. A amostra foi composta por 50 atletas (39 homens e 11 mulheres), com idade de 13 a 38 anos, participantes de equipes de atletismo, que foram então agrupados em função da característica de suas provas (Potência ou Resistência). O estudo apresentou diferenças significativas entre as amostras e o esperado para esta frequência pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,0067$, para o Polimorfismo da ACE e $p=0,0143$, para o polimorfismo da ACTN3), no que tange a capacidade dominante da prova e também relacionada ao perfil da população brasileira, grupo controle comparado da literatura ($p=0,0223$, para o Polimorfismo da ACE e $p=0,024$, para o polimorfismo da ACTN3). O estudo apresentou uma recorrência de 71,7% somados os genótipos DD e ID, corroborando assim com estudos prévios e 33,3% do genótipo II, conflitando assim com pesquisas anteriores.

Palavras-chave: Gene, ACE, ACTN3, Esportes, Atletismo

ABSTRACT

WOELLNER, Glaucio Neves. **AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA (ACE) E ACTN3 NA RELAÇÃO POTÊNCIA VERSUS RESISTÊNCIA** (Dissertação) programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2017.

The Track and Field's is a sport that has tests with different energy demands: power (P) for jumpers, sprinters and throwers and resistance (R) for runners and race walking long distances. It is possible to observe differences in these characteristics with possible variations of the D allele (deletion) and I (insert). This article recurrence of ACE (Angiotensin Converting Enzyme) in Track and Field's athletes. Previous studies have linked this polymorphism to the defendant physical capacity in other modes. The sample was composed of 25 athletes (16 men and 10 women) from 13 to 38 years old with participants in a track team, which were then grouped according to the characteristic of this evidence (power or strength). The study showed significant differences between the samples and the expected for this frequency by the Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0.0067$, for the ACE polymorphism and $p = 0.0143$ for the ACTN3 polymorphism), regarding the capacity ($P = 0.0223$, for the ACE Polymorphism and $p = 0.024$ for the ACTN3 polymorphism). The study presented a recurrence of 71.7% in addition to the DD and ID genotypes, thus corroborating previous studies and 33.3% of genotype II, thus conflicting with previous research.

Keywords: Gene, ACE, ACTN3, Sports, Track and Field

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição de fibras (vasto lateral) de um indivíduo II e um DD	25
Figura 2- Contração Muscular- teoria dos filamentos deslizantes	26
Figura 3 - Determinação visual de análise em gel de agarose para ACE	34
Figura 4 - Determinação visual de análise em gel de agarose para ACTN3	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência dos oligos para identificação do polimorfismo do gene ACE	32
Quadro 2 - Sequência dos oligos para identificação da classificação antecipada do gene D/D do polimorfismo do gene ACE	33
Quadro 03 - Sequência dos oligos para identificação do polimorfismo do gene ACTN3	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição genotípica do gene ACE I/D dos atletas de Atletismo relacionando o total de todas as provas.	35
Tabela 2 - Distribuição genotípica do gene ACE I/D dos atletas de potência (P)	37
Tabela 3 - Distribuição genotípica do gene ACE I/D dos atletas de resistência (R)	38
Tabela 4 - Distribuição genotípica do gene ACTN3 dos atletas de Atletismo relacionando o total de todas as provas.....	38
Tabela 5 - Distribuição genotípica do gene ACTN3 dos atletas de potência (P)	39
Tabela 6 - Distribuição genotípica do gene ACTN3 dos atletas de resistência (R)	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição genotípica do gene ACE (I/D) nos atletas de Atletismo.....	36
Gráfico 2: Distribuição genotípica do gene ACTN3 nos atletas de Atletismo.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTN3	Alfa actinina
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês desoxyribonucleic acid)
ACE	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
µL	microlitro
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
TBE	solução base de Trisborato-EDTA
VO ₂ M	Volume máximo de oxigênio
SRA	Sistema Renina-Angiotensina

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Parecer Cosubstancial do Cep	49
APÊNDICE 2 - Termo de consentimento Livre e Esclarecido	54
APÊNDICE 3 - Termo de consentimento Livre e Esclarecido Responsáveis por Menores de idade	56
APÊNDICE 4 – Declaração de autorização de uso de espaços físicos para pesquisa e Laboratórios	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. PROBLEMA	20
2.1 Objetivos	21
2.1.1 Objetivo Geral	21
2.2.2 Objetivos específicos	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
Demandas fisiológicas das diferentes provas do Atletismo.....	21
A Genética e o desempenho físico	22
Sistema renina-angiotensina	23
Polimorfismo da ACE: primeiro gene relacionado com desempenho físico	24
A influência do gene ACTN3 no desempenho físico	25
4. METODOLOGIA	29
4.1 Tipo de Estudo	29
4.2 Local	29
4.3 População e Amostra	30
4.4 Critérios de Inclusão	30
4.5 Critérios de Exclusão	30
4.6 Delineamento Experimental	30
4.7 Procedimentos	30
4.7.1 Coleta de Mucosa Jugal	30
4.7.2 Extração do DNA Genômico dos atletas	31
4.7.3 Genotipagem do polimorfismo I/D do íntron 16 do gene da ACE.....	32
4.7.4 Genotipagem do polimorfismo R577X no gene ACTN3	33
4.8 Análise Estatística.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35

6. CONCLUSÃO	40
7. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

A busca implacável para se atingir o sucesso no que se refere ao desempenho humano, nos mais diferentes esportes, tem sido o objetivo almejado pelos diferentes profissionais que fazem parte deste universo (ARTIOLI, 2007). Inúmeras variáveis podem interferir neste sucesso esportivo, como programas avançados de treinamento, nutrição adequada e até mesmo tecnologia dos equipamentos. Estes fatores não justificam os resultados de desempenho devido à similaridade de aplicação sugerindo ao olhar da ciência um novo componente na associação de um fenótipo interferente no desempenho físico e esportivo (DIAS *et al.*, 2007a).

Características genéticas também podem influir no processo de treinamento dos atletas de rendimento, podendo o perfil genotípico indicar um favorecimento em desempenho esportivo (LUCIA *et al.*, 2010). A possibilidade de interveniência, de um componente genético, na individualidade de respostas do treinamento já é um tema estudado há mais de três décadas, tendo seu início em estudos com gêmeos monozigóticos (BOUCHARD, 2012a). Somente com o sequenciamento completo do genoma, no início do século que esta verificação ganhou maior força.

Pode-se destacar o fator, predisposição genética como um traço de herança que influenciará em um, ou mais campos do desenvolvimento humano, dentre eles o desempenho físico (DIAS *et al.*, 2007b). Com o auxílio da genética, é possível coligar os indivíduos com a fisiologia e morfologia ideal, bem como aqueles atletas com aptidão de responder ou adaptar-se ao treinamento com menor suscetibilidade a lesões (LIPPI, 2010). Nesta linha, as descobertas de novas correlações genéticas têm deslumbrado pesquisadores, médicos, geneticistas, comissões técnicas e atletas (BAIRROS *et al.*, 2011).

Com o avanço da biologia molecular, observa-se que a interferência do perfil genotípico pode ir além, sendo correlacionado a capacidades físicas como força e flexibilidade. A expressão de uma proteína que foi modificada em virtude de uma alteração na sequência das bases do DNA pode influenciar em uma condição de favorecimento a um fenótipo que altere o desempenho físico. Um conceito importante neste aspecto é o do polimorfismo genético, que são

estas sequências de base diferentes em descrições do genoma, sendo alterações nas sequências de bases do DNA que podem influenciar na expressão de determinadas proteínas e, assim, estar envolvida na variação do fenótipo de desempenho físico. Hoje, acredita-se que aproximadamente 300 variações genéticas (genes candidatos) estão relacionadas com fenótipos de desempenho e aptidão física e saúde (DIAS, 2011), dentre os mais estudados estão o gene *ACTN3* e o *ACE*, que interfere no sistema renina-angiotensina, sendo este o primeiro correlacionado com o desempenho físico humano (MONTGOMERY *et al.*, 1998).

Esta possível associação pode ocasionar vantagens tanto em atividades que exijam força e explosão muscular (potência) como em atividades aeróbias e de longa distância (resistência) (PASQUA *et al.*, 2011).

Pesquisas que postulam explicar o status atlético que indique associações de polimorfismos genéticos com fenótipos de desempenho em diferentes grupos de atleta vêm crescendo no decorrer dos anos (JÚNIOR, *et al.* 2010). Assim, é possível intensificar o acompanhamento e aperfeiçoar o investimento em indivíduos com determinadas potencialidades esportivas (OSTRANDER *et al.*, 2009).

A dificuldade de tentar descrever possíveis influências genéticas no desempenho atlético se dá pela natureza multifatorial das modalidades esportivas. O principal desafio é determinar as exigências físicas das modalidades que se demonstram drasticamente diferentes. Portanto, inicialmente os estudos direcionados ao desempenho físico e sua associação deve ser apropriada ao esporte de interesse da pesquisa (GUTH & ROTH, 2013a).

Considerando o número de sistemas do corpo que interagem no desempenho esportivo e morfologias do corpo completamente individuais, torna esta linha de estudos um processo ainda mais desafiador, pois sistemas cardiovascular, respiratório e nervoso, com o agravante da funcionalidade da morfologia corporal vão influenciar nos resultados de desempenho dos atletas nos mais variados esportes.

Dentre os diferentes polimorfismos genéticos candidatos ou genes candidatos, com interferência no desempenho atlético, o polimorfismo da *ACE*,

enzima conversora da angiotensina é uma das mais investigadas. Com fragmentos de 190 e 490 pares de base, respectivamente, localizadas no cromossomo 17, posição q23 pela metodologia dos estudos de FOLLAND *et al.*, 2000, apresenta-se como o polimorfismo genético mais estudado na literatura ao longo dos anos. A ACE é controladora da pressão arterial exercendo uma função fundamental no sistema renina-angiotensina (RAS), sendo um agente vasoconstritor, degradando as cininas (JONES, 2002) e (MYERSON *et al.*, 1999). A primeira evidência de polimorfismos genéticos que influenciam o desempenho físico humano é relatada para o gene ACE. O polimorfismo do gene ACE I/D tem sido correlacionado com melhorias no desempenho e duração do exercício em uma variedade de populações. O alelo I, o que representa uma inserção de 287 bp, está associada melhor desempenho em esportes de resistência. A deleção da variante (alelo D) está associada com e atividade da ECA e um melhor desempenho em esportes que exigem potência. (MA *et al.*, 2013).

A presença do alelo I (inserção) da ACE é relatada pela literatura em atletas de modalidades de resistência (WILLIAMS *et al.*, 2000) enquanto a do alelo D (deleção) em atletas de modalidade de potência como nadadores e velocistas (FATINI *et al.*, 2011), podendo também ser relacionado às atividades de força (BOUCHARD, 2011b).

O segundo polimorfismo do gene mais pesquisado no contexto do desempenho esportivo é ACTN3, a codificação proteína alfa-actinina-3. As alfa-actininas desempenham função importante na organização do citoesqueleto. Na musculatura esquelética apresentam-se duas isoformas alfa-actininas (ACTN2 e ACTN3), que são componentes estruturais importantes na manutenção da matriz miofibrilar ancorando finos filamentos ao disco Z. Contempla além de seu papel mecânico em sua função sarcomérica, mas também interagem na sinalização de vias metabólicas (MILLS *et al.*, 2001). A ACTN2 é expressa em todos os tipos de fibras muscular. Já a ACTN3 é quase que as fibras do restrita as fibras do tipo II (CLARKSON *et al.*, 2005a).

Em 1999, North *et al.* (1999) identificaram um polimorfismo comum na ACTN3 (R577X) que apresentou a ausência de ACTN3 em mais de um bilhão de pessoas no mundo todo. O alelo 577R e o genótipo de 577RR do

polimorfismo do gene ACTN3 estão relacionados ao alto nível de desempenho atlético, incluindo uma ampla variedade de grupos étnicos (YANG *et al.*, 2003). Além disso, há uma associação positiva entre a presença do alelo R e a capacidade de realizar contrações musculares de alta potência (CLARKSON *et al.*, 2005b). Contudo, o genótipo XX, uma deficiência de ACTN3, está relacionado com uma diminuição do desempenho em esportes de força e potência (North *et al.*, 1999b).

Outros componentes do desempenho incluem fatores cognitivos e susceptibilidade a lesões, além do ambiente que também influenciará no termo empregado atualmente que é a treinabilidade (GUTH & ROTH, 2013b). O atletismo é a modalidade esportiva mais antiga da história humana e é considerada um “esporte base” porque contempla atividades básicas, como correr, saltar e lançar (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Observa-se então a modalidade esportiva mais abrangente no que tange a variação de provas e suas características. Estas diferentes características surgem em virtude do grande número de provas que compõe a modalidade. Para as provas de velocidade, lançamentos, arremessos e saltos à capacidade física dominante é a potência. Já nas provas de corridas de fundo, a capacidade física dominante passa ser a resistência.

Em uma classificação inicial, levando em conta diferentes demandas energéticas necessárias para a prática, teremos provas de potência (P) e provas de resistência (R). Entende-se que muitos aspectos interferem na escolha de uma prova no início da especialização do atleta de atletismo, como somatotipo e experiência motora.

Portanto, levantam-se as seguintes questões problema: A ACE e a ACTN3 em suas recorrências poderiam ser associadas ao desempenho dos atletas? A relação entre as diferentes demandas energéticas (potência ou resistência) exigidas nas provas do atletismo podem ser associadas?

2. PROBLEMA

Identificar os polimorfismos da ACE, deleção e inserção e ACNT3, verificando a associação com a participação dos atletas nas provas do Atletismo. Observar a relação entre as diferentes demandas energéticas

(potência ou resistência) exigidas nas provas do atletismo podem ser. Comparar a frequência genotípica e alélica dos genes ACE I/D e ACTN3 em atletas de provas com diferentes demandas energéticas.

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil genotípico de atletas de Atletismo em relação aos genes da ACTN3 e da ACE.

2.1.2. Objetivos Específicos

Mensurar a recorrência alélica no que tange os genes da ACTN3 e ACE, em atletas de Atletismo;

Associar à frequência destes genes às diferentes demandas energéticas das provas de Atletismo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Demandas fisiológicas das diferentes provas do Atletismo.

Em uma classificação inicial, o atletismo é uma modalidade esportiva composta por provas de corridas e marcha atlética, de saltos e de lançamentos, realizados nas pistas e no campo. As corridas são divididas pelas de velocidade, as de meio fundo e fundo, incluindo as com obstáculos. As provas dos saltos são constituídas pelo salto em distância, triplo, altura e salto com vara. Os lançamentos são os do dardo, do disco, do martelo e o do arremesso de peso (CBAAt, 2005). O atletismo apresenta várias provas cujos aspectos físicos são distintos, nas quais o desempenho do atleta pode demandar uma exigência muscular diferente. Algumas exigem uma maior

capacidade aeróbica e cardiorrespiratória para a sua execução e outras uma maior capacidade anaeróbica em uma demanda de explosão muscular intensa.

Dentre as provas que exigem uma demanda energética vinculada à resistência aeróbica estão, as corridas de fundo e a marcha atlética, além da maratona. Já as provas dentre as provas que exigem uma capacidade anaeróbica, portanto de potência e explosão muscular estão, os saltos os lançamentos e arremessos, além das corridas de velocidade.

As fibras musculares e sua distribuição no músculo esquelético têm total interferência nestas demandas, pois sua classificação em dois tipos principais de fibra e sua diferenciada contração vai determinar qual tipo deverá ser recrutada e devidamente treinada para as diferentes provas. Nesta distribuição, a literatura mostra uma divisão específica que abrange uma classificação de dois tipos de fibras musculares existentes, as fibras de contração lenta e as de contração rápida, de acordo com sua que determinam sua ação metabólica, gerando sua função contrátil e determinando a especificidade de cada modalidade esportiva (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2008).

A Genética e o desempenho físico e esportivo.

Tendo em vista o descobrimento da estrutura do DNA, os estudos que buscavam relacionar as diferenças percebidas entre os genes com as diferentes possibilidades de fenótipo. Surge então a associação destas diferenças com o desempenho físico em atletas e não atletas, surgindo então o termo, genes candidatos, que foram identificados como intervenientes no desempenho atlético (WOLFARTH *et al.*, 2000). Atualmente, pesquisas comprovam que existem mais de 200 genes candidatos (BRAY *et al.*, 2003b).

Um conceito importante neste aspecto é o do polimorfismo genético, que são sequências de base diferentes em descrições do genoma. Essas sequências nos genes podem interferir na codificação de proteínas e alterar demandas do desempenho esportivo (PASQUA, *et al.* 2011). Esta investigação das correlações iniciou nos anos 90. Um polimorfismo pode ser definido como a mudança na codificação de uma proteína influenciando sua expressão em sua atuação no organismo, alterando a sequência de bases em um gene

específico do DNA (DIAS *et al.*, 2007c). Portanto, a partir destes conceitos, pode-se definir que o fenótipo de um atleta pode ser diferenciado e estabelecer uma possível vantagem. Esta possível interferência pode ocasionar vantagens tanto em atividades que exijam força e explosão muscular (potência) como em atividades aeróbias e de longa distância (resistência).

Apesar da diversidade de perfil genotípico em atletas e seus polimorfismos foram selecionados os genes da ACE e do ACTN3 por se tratarem de polimorfismos com alto número de estudos, porém sem correlações dentro de uma única modalidade com demandas energéticas altamente divergentes (MONTGOMERY *et al.*, 1997).

Sistema renina-angiotensina (SRA)

O SRA é considerado um complexo sistema hormonal, tendo como função principal o controle da pressão arterial e homeostasia hidroelétrica do organismo. Este sistema ele é entendido como um sistema endócrino cuja substância ativa, angiotensina II, é a responsável pela maioria dos efeitos fisiológicos. (MENARD,1993)

No SRA circulante, a renina é uma enzima proteolítica secretada pelos rins quando há redução do volume e sais no plasma, ou ativação simpática. (WOODS *et al.*, 2000). Esta enzima converte angiotensinogênio, sintetizado no fígado, em angiotensina I, que possui ação levemente vasoconstritora. A conversão angiotensina I em angiotensina II se dá em virtude da Enzima Conversora da Angiotensina (PUTHUCHEARY *et al.*, 2011a). Esta é um potente vasoconstritor direto, e que de forma indireta interage com a secreção da secreção aldosterona, aumentando a pressão arterial. (JONES *et al.*,2002) Estas ações são mediadas pelo receptor da angiotensina do tipo I (PUTHUCHEARY *et al.*, 2011b)

Além de aumentar a produção da angiotensina II, a ACE também é responsável pela degradação da bradicinina, uma substância vasodilatadora e natriurética (SANTOS, 2006), esta ação ocorre através da interação da ACE com os receptores da bradicinina tipo I e II . Deste modo, a enzima conversora

da angiotensina gera um potente vasoconstritor (angiotensina II) e inativa um potente vasodilatador (bradicinina). (JONES e WOODS, 2003)

A utilização do conjunto de técnicas modernas de biologia molecular com métodos bioquímicos permitiu evidências da existência de muitos componentes do SRA em tecidos periféricos. A detecção de um ou mais mRNAs desses componentes em vários tecidos como glândulas adrenais, rins, coração, vasos e cérebro dão suporte à existência de SRA local. (GRIENGLING, 1993).

Polimorfismo da ACE: primeiro gene relacionado com desempenho físico

Ao compreendermos a influência do polimorfismo do gene da ACE no desempenho esportivo se faz necessário entender o funcionamento deste em relação aos sistemas metabólicos aeróbicos e anaeróbicos. O primeiro sistema é atuante nas atividades que exigem resistência física e maior duração sendo que o segundo é exigido pelas atividades que demandem potência e força muscular. O gene humano que codifica a enzima conversora da angiotensina (ACE) está localizado no cromossomo 17 (q22-24) e apresenta uma inserção, alelo I, de 287 pares de base no íntron 16 (RIGAT *et al.*, 1990)

Os indivíduos homocigotos DD estão associados à maior atividade da ECA circulante que os heterocigotos ID e homocigotos II. O aumento dos níveis séricos da ECA pode resultar em maior formação da angiotensina II, e ainda, maior degradação da bradicinina. A presença do alelo D está associada à maior resposta hipertrófica, principalmente em situações de estresse cardiovascular como exercício e hipertensão. (MONTGOMERY, 2002)

Montgomery *et al.*, 1998 descreveu o primeiro gene relacionado ao desempenho físico, ou seja, polimorfismo II do gene da ACE. No mesmo ano, Gayagay *et al.* (1998) mostrou que remadores australianos possuíam excesso do alelo I e do genótipo II, quando comparados ao grupo controle.

Em seguida, Williams *et al.*, 2000 mostraram que indivíduos com genótipo II ou ID apresentaram maior desempenho aeróbio ou *endurance*. E

ainda, relataram que a presença do genótipo II leva uma maior eficiência mecânica muscular esquelética em humanos. (JONES, 2003)

A intervenção do genótipo (II) na melhora do sistema metabólico aeróbico se dá em virtude da facilitação da reposição e armazenamento de substratos energéticos na fibra muscular aumentando a densidade mitocondrial nas fibras do tipo I sugerindo uma possível melhora do débito cardíaco (MONTGOMERY, *et al.*, 1998b).

Através do estudo em 2003, por Zhang *et al.*, foi possível associar os diferentes genótipos da ECA com a distribuição percentual de fibras I, IIa e IIb. Na fibra muscular tipo I, caracterizada pelo seu maior recrutamento nas atividades aeróbicas.

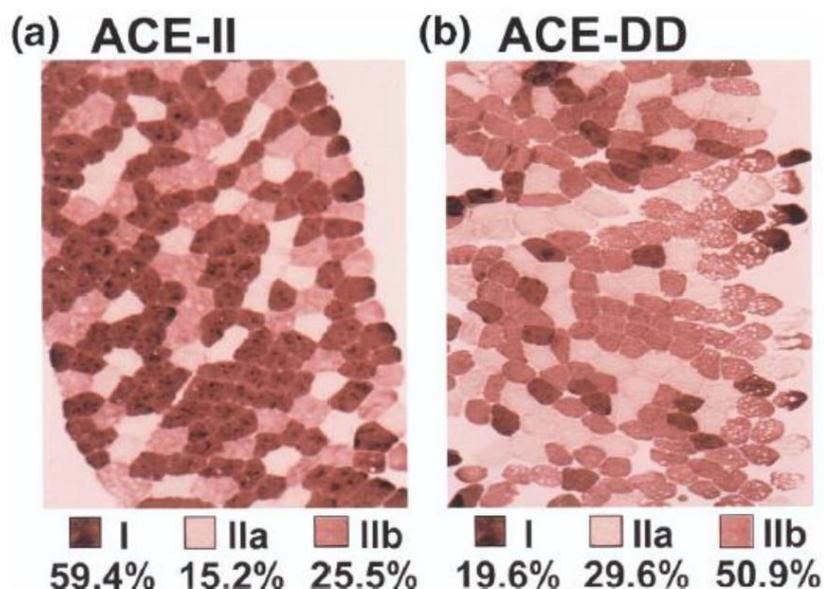


Figura 1- Distribuição de fibras (vasto lateral) de um indivíduo II e um DD (ZHANG *et al.*, 2003)

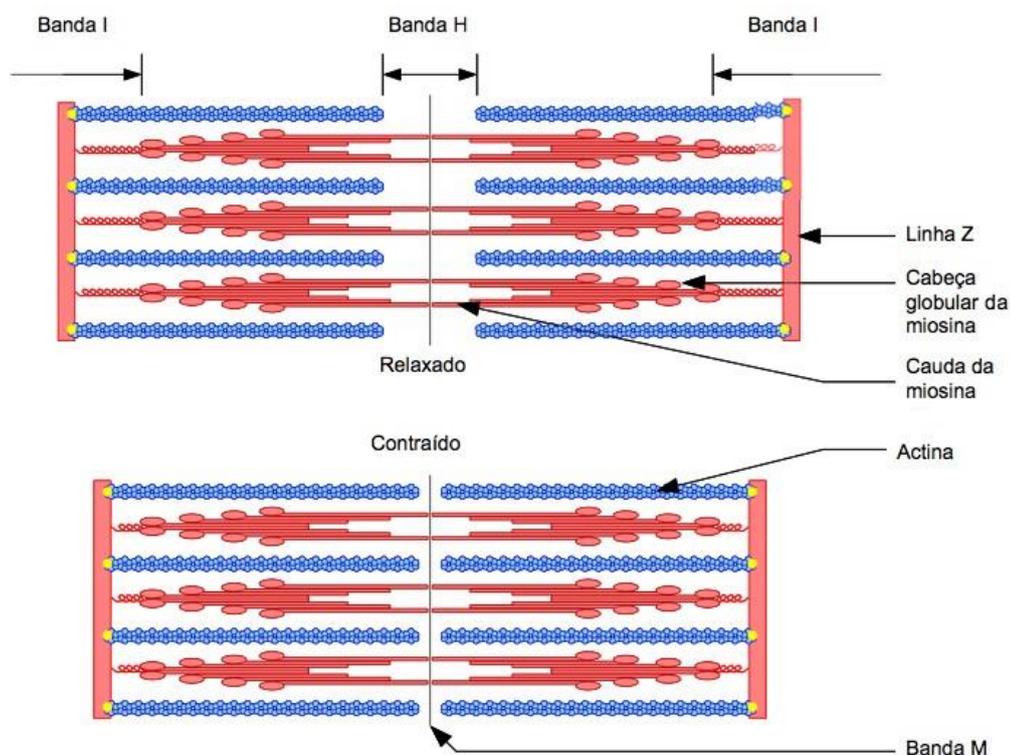
A comparação entre o perfil genotípico de atletas de rendimento em comparação a grupos controle (população em geral) levou a uma relação entre a possível interferência do polimorfismo do ACE com o desempenho físico. Montgomery *et al.* (1998b) já havia demonstrado maior recorrência do genótipo II em atletas de resistência. Um estudo realizado na Suíça revelou melhora na atividade mitocondrial destas fibras tipo I melhorando a modulação capilar

neste tecido muscular. Estes resultados também apresentam forte associação com a incidência do genótipo II em relação aos outros (VAUGHAN *et al.*, 2013).

Já em estudos realizados em modalidades que exigem potência muscular, estudos realizados com atletas de origem polonesa, demonstraram forte associação da recorrência do alelo DD, com níveis significativos de 77,6% para a presença deste alelo, fortalecendo a hipótese deste polimorfismo da ACE para esportes que exijam aplicação de força (EIDER *et al.*, 2013).

A influência do gene ACTN3 no desempenho físico

As fibras musculares possuem milhares de miofibrilas em sua composição e cada uma destas é composta por 1500 filamentos de miosina e 3000 de actina. Estes por sua vez formam em sua estrutura ligada a chamada banda Z. Nas estruturas da banda Z encontram as alfa-actininas que juntamente com outras proteínas fazem a sustentação dos filamentos de actina dentro do sarcômero (SQUIRE, 1997).



Fonte: Página da wikiciencias.casadasciencias.org. Elaborada por Catarina Moreira.

Figura 2- Contração Muscular - Teoria dos Filamentos Deslizantes.

As diferenças entre as fibras musculares e sua distribuição na musculatura esquelética, não interferem diretamente na contração muscular depende sistematicamente da interação das proteínas miofibrilares miosina e actina (SCOTT *et al* 2001). As alfa-actininas são uma família de proteínas relacionadas à distrofina que se ligam à actina, e são importantes para a ligação e fixação dos miofilamentos. Há quatro genes para alfa-actinina encontrados em humanos: ACTN1, ACTN2, ACTN3 e ACTN4. As ACTN1 e ACTN4 são proteínas não musculares presentes nos rins e tecidos cancerígenos, enquanto as ACTN2 e ACTN3 são proteínas miofibrilares localizadas no disco Z. (NORTH & BEGGS, 1996; MILLS *et al.*, 2001)

A ACTN2 é encontrada nos seres humanos nos músculos esqueléticos e cardíacos e em todos os tecidos musculares. Já a ACTN3 é encontrada apenas no tecido muscular esquelético (MILLS *et al.*, 2001b) localizada apenas nas fibras de contração rápida do tipo II (NORTH *et al.*, 1999c).

A alfa-actinina-3 é uma das proteínas ligantes da actina, sendo fundamental no ancoramento dos miofilamentos de actina. Ainda é uma isoforma característica das fibras rápidas, expressa apenas nas fibras tipo II, as quais são responsáveis pela geração de contrações rápidas e intensas, como atividades de Sprint e levantamento de peso. (Beggs *et al.*, 1992; NORTH *et al.*, 1999; MILLS *et al.*, 2001)

Estudos sugerem que a não existência deste polimorfismo da ACTN3 na função muscular nas atividades de potência, torna-se deficitária. A expressão desta proteína, ACTN3 é quase exclusivamente restrita a contrações rápidas, glicolíticas, as fibras tipo II, que são responsáveis pelas modalidades de explosão muscular. As fibras com características funcionais de contração rápida possuem uma alta capacidade de gerar energia rapidamente e produzir contrações vigorosas essenciais na prática de esportes de alta intensidade (BOCALINI, *et al.* 2010).

Beggs *et al.*, 1992 clonaram o gene ACTN3 que localiza-se no cromossomo 11q13-q14, posteriormente um polimorfismo funcional no gene ACTN3 foi identificado em humanos por North *et al.* (1999). Existem duas versões da ACTN3, causadas pela mudança na codificação de duas bases nitrogenadas (citosina e timina) que provoca um residual de outra base

nitrogenada, evidenciando estas duas versões funcionais do aminoácido 577 da ACTN3, a versão selvagem (577R) e a versão mutante (577x) (CIESZCZYK *et al.*, 2012).

A genotipagem deste polimorfismo da ACTN3 possui 3 possibilidades nas condições de hereditariedade humana, podendo ser encaminhado pelo lado paterno e materno, RR, RX ou XX, sendo que o genótipo XX determina a não produção de ACTN3 (MACARTHUR, *et al.* 2001). Como 18% da população, (inicialmente mensurado na população europeia) contando-se mais de 1 bilhão de pessoas com a presença deste polimorfismo (MILLS *et al.*, 2001c), tornam-se desafiadores os estudos que já demonstram forte associação da ACTN3 no desempenho físico e esportivo, principalmente para as modalidades que apresentam demanda energética de potência.

A deficiência da ACTN3 não aparenta influenciar em patologias ligadas ao sistema muscular esquelético. A revisão realizada por Dias *et al.* (2007), indicou artigos que sugeriram que indivíduos homocigotos para o alelo 577X não expressam a ACTN3 e não resultam em miopatias ou distrofia muscular, sendo a isoforma ACTN2 o equilibrante em relação a ausência da ACTN3 (MILLS, 2001).

Niemi e Majamaa (2005) encontraram resultados similares ao avaliar atletas de elite de velocidade e de resistência. Foi observada a redução significativa na frequência do genótipo XX nos velocistas e aumento em atletas de resistência.

Para Eynon *et al.*, (2012), em seu estudo realizado com 633 atletas, sendo 278 de resistência e 355 de força e um grupo controle de 808 indivíduos observou-se uma favorável associação para atividades de resistência o genótipo XX. Verificou-se uma frequência significativa menor do genótipo XX com 6%, em análise dos genótipos de atletas de força de nível olímpico quando comparados com um grupo controle de não atletas, quando comparados ao grupo controle de 18% e nenhum atleta apresentou o genótipo XX (YANG *et al.*, 2001).

No estudo de Papadimitrou *et al.*, (2008b), com atletas gregos de potência e resistência, comparados ao grupo controle os velocistas apresentaram menor frequência do genótipo XX e maior frequência do RR.

Estes exemplos de resultados dos estudos comparados demonstram uma associação divergente entre o alelo X e o desempenho em força e potência. Contudo, a relação com o desempenho físico nas modalidades de resistência não apresentam uma associação significativa.

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de Estudo

O estudo visa caracterizar uma determinada população, estabelecendo relações entre variáveis, portanto trata-se de um estudo descritivo transversal envolvendo a utilização de técnicas pré-determinadas (GIL, 1999). O estudo foi aprovado Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos da Faculdade Dom Bosco sob parecer nº 1.424.895.

4.2. Local

O estudo foi delineado no Laboratório Biotechnológico e Densitométrico - LABDEN, nas dependências da Universidade Federal Tecnológica do Paraná – UTFPR e executado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Positivo (UP) no município de Curitiba - PR.

4.3. População e amostra

Fizeram parte da presente pesquisa 50 atletas, entre 11 e 38 anos, sendo 39 do sexo masculino e 11 do sexo feminino com média de idade de 15,58, com experiência nacional e internacional em suas respectivas provas e categorias. Destes 50 atletas foram testados 49 para o gene ACTN3 e 48 atletas foram testados para o gene da ACE. Tal perda amostral para o gene da ACE e ACTN3 se deu pelo fato da não amplificação de uma amostra para o gene ACE e duas amostras, para o gene ACTN3.

4.4. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão utilizados no presente estudo foram: atletas do sexo masculino e feminino com experiência em treinamento acima de 1 (um) ano na modalidade, que treinem com frequência de 5 (cinco) sessões semanais e sejam registrados pelos devidos órgãos federais/regionais que representem as categorias.

4.5. Critérios de exclusão

Para exclusão, os que desejarem por livre e espontânea vontade absterem-se de realizar qualquer procedimento relacionado à coleta dos dados para a pesquisa.

4.6. Delineamento experimental

Foi necessária apenas uma intervenção para a coleta do material genético, não interferindo na rotina de treinos dos atletas, sendo que a coleta do material genético dura em média 3 minutos.

4.7. Procedimentos

Os dados de características de prova e resultados dos atletas foram coletados por intermédio de entrevista com o responsável técnico pela equipe. Os atletas foram encaminhados à coleta do material genético no próprio local treino.

4.7.1 Coleta da Mucosa Jugal

Os atletas foram encaminhados à coleta de mucosa jugal determinando-se um bochecho com solução de glicose 3%. Foram colocadas 5mL dessa solução em tubos de coleta tipo *Falcon* de 15 mL autoclavadas a 127° C por 20 minutos (1,5 Kgf). Após dois minutos do bochecho com esta solução, foi realizada uma raspagem da mucosa jugal com paletas de madeira

autoclavadas. O líquido utilizado no bochecho foi devolvido em um copo plástico, onde esta paleta foi lavada. Este líquido retornou aos tubos *Falcon*, devidamente catalogados, já com a presença das células da mucosa.

4.7.2 Extração do DNA genômico dos atletas

Após o período de 24 horas, os tubos foram centrifugados os a 3000 RPM durante 10 minutos. Posterior a centrifugação o líquido sobrenadante foi descartado.

As células e demais estruturas, chamadas de *Pelet*, armazenaram-se no fundo do frasco. Foi adicionado 1300 μ L de Tampão de Extração (TRIS 10mM, EDTA 5mM, SDS 0,5%). As amostras foram congeladas à -20°C.

Para a segunda etapa da extração, as amostras foram descongeladas completamente. Foi pipetado 10 μ L de proteinase K (20mg/mL) em cada tubo de extração, então as amostras foram mantidas em banho-maria 65°C “*overnight*”. Foi vertido o conteúdo em *ependorf* de 2mL. Foi pipetado 500 μ L de acetato de amônio (8M em 1mM EDTA) deixado em temperatura ambiente. Centrifugado novamente por 16 minutos com 13000RPM.

O conteúdo líquido foi dividido em 2 tubos *ependorf* de 1,5mL, sendo 900 μ L em cada tubo. Foi adicionado 540 μ L de isopropanol em cada tubo e mais uma vez centrifugado por 7 minutos com 13000RPM.

Descartou-se o isopropanol e adicionou-se 1mL etanol 70%, tornando a centrifugá-las por 7 minutos com 13000RPM. Descartou-se o etanol 70% e retirou-se o excesso do fundo do tubo. As amostras passaram por um processo de secagem, em temperatura ambiente, por um período próximo a 4 horas.

Depois de secas foi adicionado 50 μ L de TE (TRIS 10mM; EDTA 1 mM; pH 7,76) em cada tubo e deixadas em temperatura ambiente por 24 horas. Foram armazenadas à geladeira por dois dias e somente depois, estocadas à -20° C.

4.7.3 Análise do perfil genotípico dos atletas em relação ao polimorfismo do gene ACE I/D

Os atletas foram divididos em grupos de mesma genotipagem: D/D, I/D e I/I. A análise do perfil genotípico em relação polimorfismo do gene ACE I/D foi realizada através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

O polimorfismo do gene ACE I/D consiste na ausência (deleção ou alelo "D") ou presença (inserção ou alelo "I"). Dessa forma foi amplificada utilizando os seguintes iniciadores:

Quadro 1 - Sequência dos oligos para identificação do polimorfismo do gene ACE.

POLIMORFISMO	PRIMER	SEQUÊNCIA
ACE	DIRETO	5'CTGGAGAGCCACTCCCATCCTTTC T3'
	REVERSO	5'GATGTGGCCATCACATTCGTCAGA T3'

A reação teve um volume total de 25 µL, sendo composto por 22,5 µL de SuperMix para PCR Platinum, 1,7 µL de DNA, 0,4 µL de primer direto e 0,4 µL de primer reverso. O programa de amplificação foi operado em termociclador a seguinte programação: 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 1% e revelados com brometo de etídeo a 5µg/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.

A classificação antecipada de heterozigoto I/D como sendo homozigotos D/D pode ocorrer devido à amplificação preferencial do alelo D e a falta de eficiência da amplificação do alelo I, mudando assim o anelamento. Foi utilizado o método de PCR iniciador para confirmação do genótipo da ACE. A presença de um fragmento com XX pb indica o alelo I. Foi

utilizado a mesma operação em termociclador para o procedimento da PCR apenas com a mudança do primer reverso pelo primer inverso.

Quadro 02 - Seqüência dos oligos para identificação da classificação antecipada do gene D/D do polimorfismo do gene ACE.

POLIMORFISMO	PRIMER	SEQUÊNCIA
ACE	INVERSO	5'TTTGAGACGGAGTCTCGCTC-3'
	DIRETO	5'GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT3'

4.7.4 Análise do perfil genotípico dos atletas em relação ao polimorfismo R577X no gene ACTN3

A genotipagem do polimorfismo 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 polimorfismo foi amplificado utilizando os seguintes iniciadores:

Quadro 03 - Seqüência dos oligos para identificação do polimorfismo do gene ACTN3

POLIMORFISMO	PRIMER	SEQUÊNCIA
ACTN3	DIRETO	5'CTGTTGCCTGTGGTAAGTGGG3'
	REVERSO	5'TGGTCACAGTATGCAGGAGGG 3'

O sistema reacional teve um volume total de 25 µL, sendo composto por 22,5 µL de SuperMix Platinum para PCR, 0,4 µM de cada iniciador e 1,7 µL 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 programação no termociclador 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.*, 2001d). Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% e revelados com brometo de etídeo a 5µg/mL. O alelo ACTN3 577R identifica fragmentos de 205 e 86 pares de bases.

Figura 3 - Determinação visual de análise em gel de agarose para ACE.

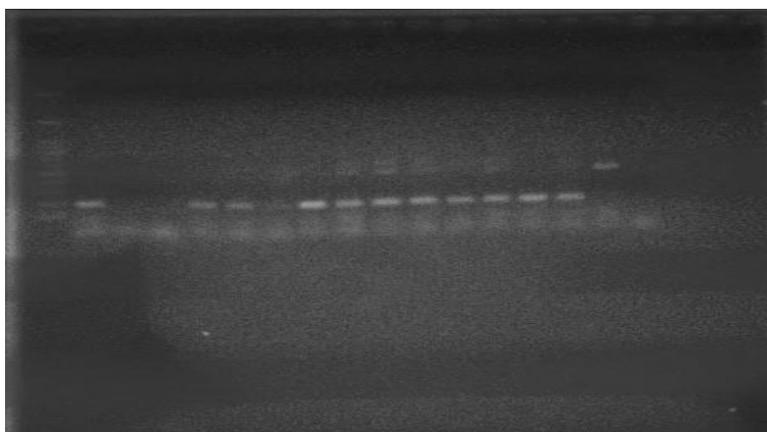


Figura 3 -. Gel para caracterização dos genótipos ACE I/D. Poço 1 – Ladder de 100p; poços - 4, 5, 6, 7,11 e 13 – genótipo DD; poços 8, 9,10,12 e 14 – genótipo ID e poço 15, genótipo II.

Figura 4 - Determinação visual de análise em gel de agarose para ACTN3.

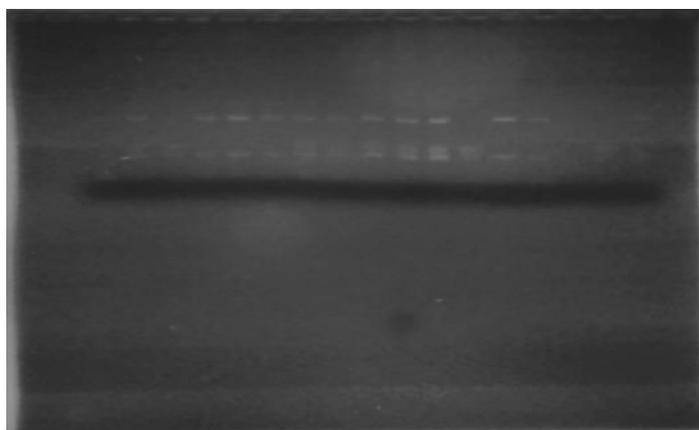


Figura 4 -. Gel para caracterização dos genótipos ACTN3. Poço 1 – Ladder de 100pb; poços - 3, 6, 7, 8, 15 e 16 – genótipo RR; poços- 4, 9,10, 11, 12, 13 e 19 – genótipo RX e poços – 5,14 e 18, genótipo xx.

4.8. Análise estatística

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 BioStat 5.3, sendo considerado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O principal objetivo do estudo foi verificar as frequências genótípicas dos polimorfismos dos genes ACTN3 e ACE I/D em atletas de Atletismo. Para isso as frequências dos polimorfismos foram comparadas com diversos estudos da literatura, tanto com a população em geral (controle) quanto com relação as diferentes demandas energéticas da modalidade (capacidade dominante da prova). A distribuição genotípica do gene ACE I/D não estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $p=0,001$. A frequência genotípica absoluta do gene ACE I/D dos 50 atletas que fizeram parte da presente pesquisa, é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição genotípica do gene ACE I/D dos atletas de Atletismo relacionando o total de todas as provas.

	DD N (%)	ID N (%)	II N (%)	p
Dados da pesquisa com atletas de Atletismo	32 (65,30%)	5 (10,20%)	12 (24,48%)	$p=0,0001^*$
MEIRA- LIMA <i>et al</i>	104 (32,2%)	155 (47,9%)	64 (19,9%)	

No gráfico 1 estão descritos a distribuição genotípica do ACE I/D. Os dados de referência da população brasileira (controle) utilizados para a comparação foram os reportados por Meira-Lima *et al.* (2000), que consistiu de 325 sujeitos, cuja distribuição foi similar a de outros estudos.

Nos estudos realizados por Rankinen *et al.* (2000), com 192 atletas de resistência, resultados semelhantes foram encontrados, mesmo com atletas praticantes de diferentes modalidades esportivas. Já para os estudos Montgomery *et al.* (1998c) que avaliaram atletas de endurance (montanhistas) foram encontrados com maior com maior recorrência o genótipo II em relação ao grupo controle.

Gráfico 1: Distribuição genotípica do gene ACE (I/D) nos atletas de Atletismo.

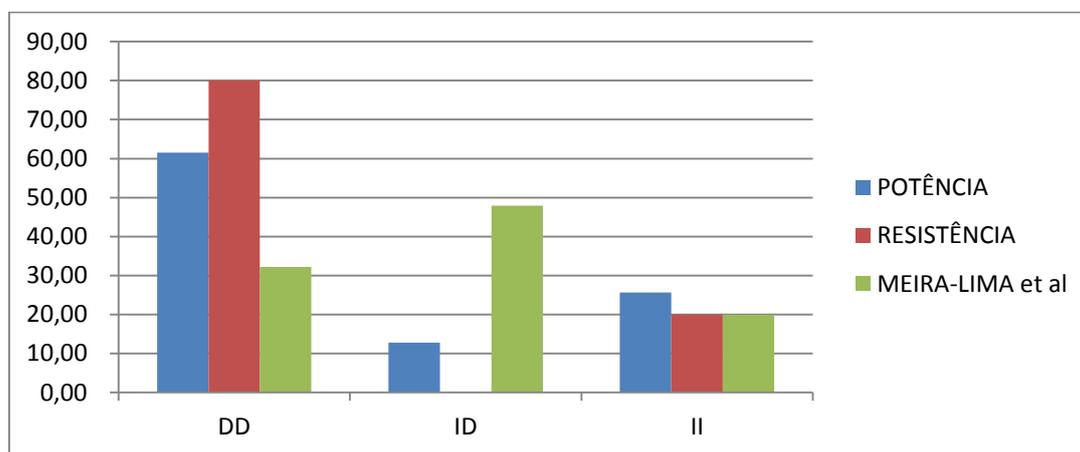


Tabela 2 - Distribuição genotípica do gene ACE I/D dos atletas de potência (P)

	DD N (%)	ID N (%)	II N (%)	p
Dados da pesquisa com atletas de Potência (P)	24 (61,53%)	5 (12,82%)	10 (25,64%)	p=0,0001*
MEIRA- LIMA <i>et al</i>	104 (32,2%)	155 (47,9%)	64 (19,9%)	

Estudos realizados por Costa *et al.* (2009a) corroboram com o presente, onde foram verificados nadadores de velocidade (potência), estes demonstraram uma recorrência do genótipo DD em relação ao genótipo II, em teste de preensão manual. Também foi identificado em estudos de Micheli *et al.*

(2011) valores relevantes nos testes de salto vertical de atletas de futebol, categoria de base, que apresentaram forte associação do genótipo ID em relação aos outros.

A distribuição genotípica do gene ACE I/D não estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $p=0,001$, em comparação com atletas de potência e $p=0,016$ para os atletas de resistência e representados na Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente.

Tabela 3 - Distribuição genotípica do gene ACE I/D dos atletas de resistência (R)

	DD N (%)	ID N (%)	II N (%)	p
Dados da pesquisa com atletas de Resistência (R)	8 (80,00%)	0 (00,00%)	2 (20,00%)	$p=0,0016^*$
MEIRA- LIMA <i>et al</i>	104 (32,2%)	155 (47,9%)	64 (19,9%)	

De acordo com estudos anteriores, os dados da pesquisa neste aspecto se mostraram divergentes do esperado. A maior parte das informações do possível efeito do polimorfismo do ACE I/D em indicadores de desempenho físico está relacionada à indicadores de resistência. Em estudos realizados com mulheres pós-menopausa foi encontrado forte associação do VO2 máximo (volume máximo de oxigênio) no genótipo II do que no genótipo DD. O VO2 máximo é um indicador internacional de mensuração da capacidade cardiorrespiratória (HAGBERG *et al.*, 1998). Resultados próximos foram encontrados em jovens moderadamente ativos, onde os genótipos II e ID demonstraram forte associação em relação genótipo ao DD (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Entretanto, estudos de Shenoy *et al.* (2010) não fortaleceram esta relação com triatletas mantendo esta relação do VO2 máximo e a frequência genotípica.

A distribuição dos genótipos dos genes ACTN3 estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $p=0,8852$, com a população em geral. Na

Tabela 4 estão descritos a distribuição genotípica com relação ao total de atletas da modalidade independente da demanda energética da prova de especialidade e na tabela 4 e 5 a distribuição genotípica do ACTN3 com relação as demandas energéticas de cada prova identificando dominância de potência (P) ou resistência (R).

No gráfico 2 e Tabela 4 estão descritos a distribuição genotípica do ACTN3. Os dados de referência da população brasileira (controle) utilizados para a comparação foram os reportados por Coelho (2011), que consistiu de 100 sujeitos, cuja distribuição foi similar a de outros estudos.

Gráfico 2: Distribuição genotípica do gene ACTN3 nos atletas de Atletismo.

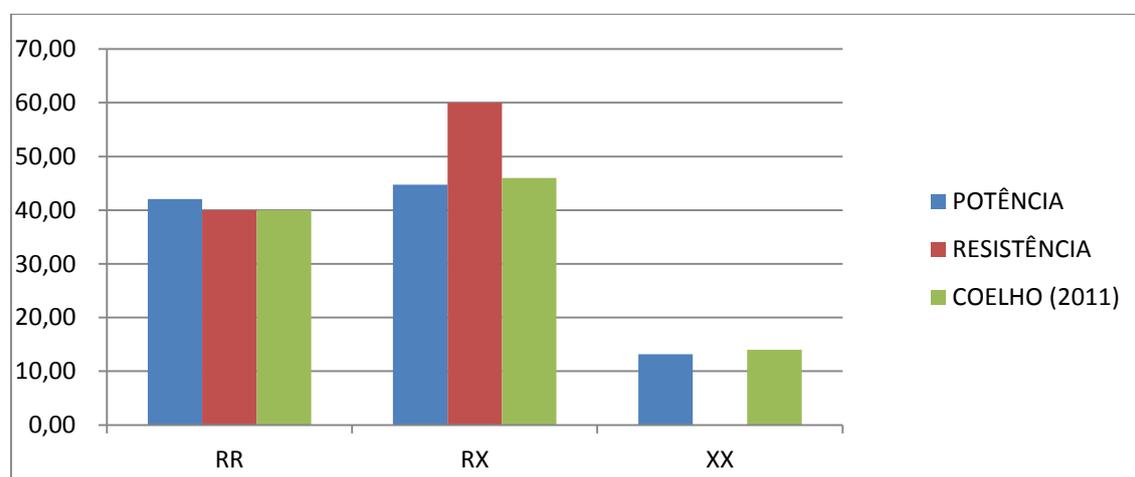


Tabela 4 - Distribuição genotípica do gene ACTN3 dos atletas de Atletismo relacionando o total de todas as provas.

	RR N (%)	RX N (%)	XX N (%)	p
Dados da pesquisa com atletas de Atletismo	20 (41,66%)	23 (47,91%)	5 (10,41%)	p=0,0001*
Coelho (2011) (Controle)	40 (40,00%)	46 (46,00%)	14 (14,00%)	

Em estudos como os de Yang *et al.* (2003) foi relacionado uma frequência genotípica menor do genótipo XX (6%) em atletas de potência

comparados ao grupo controle (18%). Papadimitriou *et al.* (2008c) associaram da mesma forma.

Tabela 5 - Distribuição genotípica do gene ACTN3 dos atletas de potência (P)

	RR N (%)	RX N (%)	XX N (%)	p
Dados da pesquisa com atletas de Potência (P)	16 (42,10%)	17 (44,73%)	5 (13,15%)	p= 0,8852
Coelho (2011) (Controle)	40 (40,00%)	46 (46,00%)	14 (14,00%)	

A associação do polimorfismo do ACTN3 com o desempenho físico relacionado à potência estão associados à interação da ACTN3 com as proteínas da linha Z, tendo assim papel estrutural na integridade do sarcômero durante atividades de alta intensidade (PIMENTA *et al.*, 2013).

Uma possível associação foi percebida no estudo de Vincent *et al.* (2007). A pesquisa observou uma diferença significativa na proporção de fibras tipo II no genótipo RR em relação ao XX.

Tabela 6 - Distribuição genotípica do gene ACTN3 dos atletas de resistência (R)

	RR N (%)	RX N (%)	XX N (%)	p
Dados da pesquisa com atletas de Resistência (R)	4 (40,00%)	6 (60,00%)	0 (00,00%)	p=0,1753*
Coelho (2011) (Controle)	40 (40,00%)	46 (46,00%)	14 (14,00%)	p=

No presente estudo foram avaliados indicadores associados à resistência, os quais não diferiram entre os genótipos. Lucia *et al.* (2006) também não encontrou diferenças relação do VO₂máx, em pesquisa realizada

com ciclistas e corredores. Desta forma, apesar da frequência menor dos genótipos XX do ACTN3 e II do ACE I/D em relação à população controle, que pode indicar uma possível seleção dos atletas, ao comparar indicadores de desempenho, ou seja, fatores como o treinamento podem fazer com que todos se nivelem nestas variáveis.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo é um dos primeiros a descrever de forma combinada a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos do ACTN3 e ACE I/D e a associação com as demandas energéticas diferentes das provas do Atletismo. Os resultados do estudo seguiram trabalhos anteriores, que identificam a recorrência e a associação do gene ACE e da ACTN3 nas características físicas das modalidades esportivas. Estes resultados se tornam desafiadores quando dentro da mesma modalidade, existem valências físicas diferenciadas.

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que as frequências genotípicas do ACTN3 (RR=42,10%, RX=44,73% e XX=13,15%) e do ACE I/D (DD=65,30%, ID=10,20% e II=24,48%) para os atletas da modalidade em geral; (DD=61,53%, ID=12,82% e II=25,64%) para os atletas das provas de Potência, como saltos, lançamentos, arremesso e corridas de velocidade e (DD=80,00%, ID=00,00% e II=20,00%) para os atletas das provas de Resistência, como corridas de longa distância e marcha atlética e não diferiram significativamente quando comparadas à população em geral.

Houve uma forte tendência de associação para a deleção (DD) e heterozigotos (ID) do gene com relação à característica da resistência (R), 80,00%. Contudo, esta associação se mostrou somente possível na característica potência (P), com 61,53% do total das amostras com esta tendência, corroborando com resultados de estudos prévios. Portanto, a associação se deu na comparação.

Apesar da forte associação e de significativa diferença na comparação com o perfil genotípico da população brasileira, o número de amostras de

atletas participantes de provas com demanda energética de Resistência, se mostrou um fator limitante do estudo. O estudo também sugere o aprimoramento do experimento com um N maior de atletas, pois a variedade de provas com demandas energéticas diferenciadas podem demonstrar uma maior interferência em cada modalidade com esta característica.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. A. et al. A influência do genótipo da ECA sobre a aptidão cardiovascular de jovens do sexo masculino moderadamente ativos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n. 4, p. 6, 2012.

ARTIOLI G. et al. Terapia gênica, doping genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Vol. 13, Nº 5 – Set /Out, 2007.

BAIRROS A. et al. Doping genético e possíveis metodologias de detecção. **Revista Brasileira de Ciências do esporte**; Florianópolis, v. 33, n. 4, p.1055-1069, out./dez. 2011.

BOCALINI, D. et al. Efeitos do Treinamento de força específico no desempenho. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 32, p. 217–227, 2010.

BOUCHARD, C. Genomic predictors of trainability. **ExpPhysiol**, v. 97, n. 3, p. 347-52, Mar 2012.

BRAY, M. S. et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 1, p. 35-73, Jan 2009.

CIESZCZYK, P. et al. ACTN3 R577X polymorphism in top-level Polish rowers. **Journal of Exercise Science & Fitness**, v. 10, n. 1, p. 12-15, 2012.

CLARKSON, P. M. et al. ACTN3 genotype is associated with increases in muscle strength in response to resistance training in women. **J ApplPhysiol**, v. 99, n. 1, p. 154-63, Jul 2005a.

COELHO, D. B. et al. Correlação entre o desempenho de jogadores de futebol no teste de sprint de 30m e no teste de salto vertical. **Motriz-Revista De Educacao Fisica**, v. 17, p. 63-70, 2011.

Confederação Brasileira de Atletismo – **CBAT**. (2005). *Regras Oficiais de Atletismo*. Rio de Janeiro: Sprint.

COSTA, A. M. et al. Angiotensin-converting enzyme genotype affects skeletal muscle strength in elite athletes. **J Sports SciMed**, v. 8, p. 410-8, 2009a.

DIAS, R. G. et al. Polimorfismos genéticos determinantes da performance física em atletas de elite. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 3, p. 8, 2007.

DIAS, R.G. (2011) Genética, performance física humana e doping genético: o senso comum versus a realidade científica. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** 17: 62-70.

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

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

FATINI C. et al. RAS genes influence exercise-induced left ventricular hypertrophy: an elite athletes study. **Medicine Science of Sports Exercise**.v.32, 2011, 1868–1872.

FOLLAND, J. et al. Angiotensin-converting enzyme genotype affects the response of human skeletal muscle to functional overload. **ExpPhysiol**, v. 85, n. 5, p. 575-9, Sep 2000.

GAYAGAY, G. et al. Elite endurance athletes and the ACE I allele—the role of genes in athletic performance. **Hum Genet**, v.103,n.1, p. 48-50, Jul 1998.

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

GRIENDLING KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. **Circulation** 1993; 87:1816-28.

GUTH, L.,ROTH, S. Genetic influence on athletic performance. **Current OpinPediatry**. 25(6): 653–658. December ; 2013.

HAGBERG, J. M. et al. VO2 max is associated with ACE genotype in postmenopausal women. **J ApplPhysiol**, v. 85, n. 5, p. 1842-6, Nov 1998.

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

JONES, A.; MONTGOMERY, H. E.; WOODS, D. R. Human performance: a role for the ACE genotype? **Exerc Sport Sci Rev**, v. 30, n. 4, p. 184-90, Oct 2002.

JÚNIOR C. Et al. Biologia molecular como ferramenta no esporte de alto rendimento. Possibilidades e Perspectivas. **Revista Brasileira de Ciência do Esporte**. 2010; 31(3): 231-249.

LIPPI, G.; LONGO, U. G.; MAFFULLI, N. **GeneticsandsportsBritish Medical Bulletin**, 2010.

LUCIA A. Et al. Elite athletes: Are the genes the champions? **International Journal of Sports Physiology and Performance**2010; 5:98-102.

LUCIA, A. et al. ACTN3 genotype in professional endurance cyclists.**Int J Sports Med**, v. 27, n. 11, p. 880-4, Nov 2006.

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

MACARTHUR, et al. The ACTN3 Gene and Human Performance. In: (Ed.). **Genetic and Molecular Aspects of Sport Performance**: Wiley-Blackwell, 2011. p. 204-214.

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

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

MENARD J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. **J Hypertens suppl** 1993; 11:S3-11.

MICHELI, M. L. et al. Angiotensin-converting enzyme/vitamin D receptor gene polymorphisms and bioelectrical impedance analysis in predicting athletic performances of Italian young soccer players. **J Strength Cond Res**, v. 25, n. 8, p. 2084-91, Aug 2011.

MILLS, M. et al. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 13, p. 1335-46, Jun 15 2001.

MONTGOMERY, H. E. et al. Human gene for physical performance. **Nature**, v. 393, n. 6682, p. 221-2, May 21 1998.

MONTGOMERY, H. E. et al. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. **Circulation**, v. 96, n. 3, p. 741-7, Aug 5 1997.

MOREIRA, C. (2012), WikiCiências, 3(01):0450. Disponível em: <http://wikiciencias.casadasciencias.org/wiki/index.php/Tecido_Muscular>.

MYERSON, S. et al. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. **J Appl Physiol**, v. 87, n. 4, p. 1313-6, Oct 1999.

NIEMI, A. K.; MAJAMAA, K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. **Eur J Hum Genet**, v. 13, n. 8, p. 965-9, Aug 2005.

NORTH, K. N. et al. A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population. **Nat Genet**, v. 21, n. 4, p. 353-4, Apr 1999.

NORTH K.N., Beggs A.H. (1996) Deficiency of a skeletal muscle isoform of alpha-actinin (alpha-actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord** 6:229-235

OLIVEIRA V. et al. A preparação física no atletismo nas provas de corridas de meio fundo na cidade de Curitiba, Paraná. **Revista Digital Bueno Aires**, v.146, 2010.

OSTRANGER E. et al. Genetics of athletic performance. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 10, p. 407–29, jan. 2009.

PAPADIMITRIOU, I. D. et al. The ACTN3 gene in elite Greek track and field athletes. **Int J Sports Med**, v. 29, n. 4, p. 352-5, Apr 2008.

PASQUA L. et al. ACTN3 e desempenho esportivo: um gene candidato ao sucesso em provas de curta e longa duração. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, 2011, 13 (6):477-483.

PIMENTA, E. M. et al. The ACTN3 genotype in soccer players in response to acute eccentric training. **Eur J ApplPhysiol**, Aug 13 2011.

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

RANKINEN, T. et al. No association between the angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and elite endurance athlete status. **J ApplPhysiol**, v. 88, n. 5, p. 1571-5, May 2000.

RIGAT, B. et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **J Clin Invest**, v. 86, n. 4, p. 1343-6, Oct 1990.

SANTOS RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SVB. In: Brandão AA, Amodeo C, Nobre F, Fuchs FD. Hipertensão. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. P. 66-75.

SCOTT W., Stevens J., Binder-Macleod SA. (2001) Human skeletal muscle fiber type classifications. **Phys Ther** 81, 1810-1816.

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

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

SQUIRE, J. M. Architecture and function in the muscle sarcomere. **CurrOpinStructBiol**, v. 7, n. 2, p. 247-57, Apr 1997.

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

VINCENT, B. et al. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. **Physiol Genomics**, v. 32, n. 1, p. 58-63, Dec 19 2007.

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

WOLFARTH, B. et al. A polymorphism in the alpha 2 a-adrenoceptor gene and endurance athlete status. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 32, p. 1709–1712, 2000.

WOODS, D. et al. The ACE I/D polymorphism and human physical performance. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, n. 10, p. 416-20, Dec 2000.

YANG, N. et al. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. **Am J Hum Genet**, v. 73, n. 3, p. 627-31, Sep 2003.

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

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

APÊNDICE 1

FACULDADE DOM BOSCO/ PR


PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: MARCELO ROMANOVITCH RIBAS

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 51717515.5.0000.5223

Instituição Proponente: Faculdades Dom Bosco/ PR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.424.895

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo descritivo transversal, pois visa descrever características sobre uma população determinada, ou ainda estabelecer relações entre variáveis; envolvendo a utilização de técnicas pré-determinadas. Esses estudos ainda atendem objetivos como, por exemplo, detectar talentos (GIL, 1999). O estudo pretende avaliar 300 sendo 150 participantes do sexo masculino e 150 participantes do sexo feminino, que atendam os fatores de inclusão e exclusão da pesquisa. Os indivíduos selecionados serão divididos em 5 grupos (Grupo atletas de corrida de velocidade (CV), grupo de atletas de corrida de resistência (CR), grupo de atletas de Fisiculturismo (AF), grupo de atletas de Ginástica Rítmica (GR) e Grupo Controle (GC)) que serão avaliados em relação aos polimorfismos no gene Alfa actina 3 (R577X); gene CK MM (NcoI); gene ECA (ACE I/D); gene AMPD1 mutação (C34T), e NOS (G894T). A metodologia aplicada para o estudo genético incluiu análise direta de DNA por meio de PCR. A extração de DNA foi adaptada da técnica do Nonidet P-40 (JOHN et al., 1990) modificada por LAHIRI e NURNBERGER Jr. (1991).

Objetivo da Pesquisa:

O presente projeto tem por objetivo, avaliar a frequência do genótipo dos genes, alfa actina 3, da enzima conversora de angiotensina, da enzima creatina quinase M, AMP1 desaminase, oxido

Endereço: Rua Paulo Martins, 332

Bairro: Mercês

CEP: 80.710-010

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3218-5582

Fax: (41)3218-5559

E-mail: cep@dombosco.com.br

Continuação do Parecer: 1.424.895

nítrico, em atletas brasileiros de alto rendimento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por meio da realização deste estudo o participante terá acesso a genotipagem dos genes candidatos que foram estudados para a variável força, potência e resistência e a partir destas informações melhorarem a planificações do treinamento no tocante a melhora do desempenho e prevenção de lesões. Os riscos presentes na realização deste estudo são mínimos, pois a coleta salivar é um método indolor, não invasivo, sem risco de transmissão de doenças, onde cada atleta utilizará um kit estéril e descartável, fato que faz a metodologia ser passível de controle por meio de medidas preventivas. O

presente estudo com relação à determinação dos genes e seus polimorfismos, estes não apresenta aos sujeitos de pesquisa riscos eminentes, em algumas situações poderá ocorrer a não adaptação por parte do atleta, ao novo treinamento proposto, o que em um primeiro momento poderá ocasionar diminuição em sua performance de treino. Os benefícios não foram apresentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa sem pressupostos teóricos, mas com a metodologia detalhada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos de apresentação obrigatória foram apresentados conforme Resolução do CNS 466/12.

Recomendações:

Inclusão de pressupostos teóricos ao projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conforme recomendações deste parecer.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_641202.pdf	08/12/2015 12:12:21		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_641202.pdf	08/12/2015 12:08:33		Aceito
Folha de Rosto	folharosto.docx	08/12/2015 12:06:37	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito

Endereço: Rua Paulo Martins, 332

Bairro: Mercês

CEP: 80.710-010

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3218-5582

Fax: (41)3218-5559

E-mail: cep@dombosco.com.br

FACULDADE DOM BOSCO/ PR



Continuação do Parecer: 1.424.895

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEconsentimentodosatletas.docx	08/12/2015 11:30:05	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEassentimento.docx	08/12/2015 11:29:55	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpais.docx	08/12/2015 11:29:40	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcontrole.docx	08/12/2015 11:29:22	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodoutorado.docx	08/12/2015 11:27:20	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao.docx	08/12/2015 11:26:04	MARCELO ROMANOVITCH RIBAS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 25 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
RENATA WASSMANSDORF
(Coordenador)

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

APÊNDICE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite especial para você participe voluntariamente da pesquisa intitulada: **ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES ACTN3, ACE ID, CK, AMPD1, e NOS NOS DIFERENTES ESPORTES INDIVIDUAIS E COLETIVOS**. Que terá por objetivo avaliar a frequência do genótipo dos genes, alfa actina3, da enzima conversora de angiotensina, da enzima creatina quinase M, AMP1 desaminase, óxido nítrico, em atletas brasileiros de alto rendimento. As informações existentes neste documento são para que você entenda perfeitamente os objetivos da pesquisa, e que a sua participação seja espontânea. Se durante a leitura deste documento ocorrer alguma dúvida você deverá fazer perguntas ao pesquisador envolvido **Prof. Glaucio Neves Woellner, Maria Amélia Gonçalves, Prof. Marcelo Romanovitch Ribas e Prof. Julio Cesar Bassan**, para que possa entender perfeitamente do que se trata a pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar, pedimos, por favor, que assine ao final deste documento e realize sua rubrica em todas as páginas do mesmo. Este documento se apresenta em duas vias onde a primeira via será sua e a segunda via do pesquisador responsável.

Antes de continuar a leitura deste documento, verifique, por favor, se você enquadra-se dentro dos critérios de inclusão e exclusão: Fatores de Inclusão: atletas de esportes individuais e coletivos que possuam entre 18 até 35 anos. Fatores de exclusão: a) não estejam competindo em suas respectivas modalidades; b) não apresentaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) manifestem seu desejo de retirar o seu consentimento em participar da pesquisa, durante a realização da pesquisa.

A pesquisa justifica-se pelo fato de poucos estudos não conclusivos no campo da genética do esporte, ter sido realizado com atletas de rendimento brasileiros. Para tanto, a sua participação na pesquisa será no sentido de fornecer uma amostra de saliva, para que seja coletado material genético, para

a determinação da genotipagem dos genes que serão objeto do presente estudo.

Como método alternativo para a metodologia proposta, poderíamos realizar uma coleta sanguínea de 10 ml de sangue, para posterior extração do DNA. Em relação à pesquisa que será realizada, você poderá ter acesso a genotipagem dos genes candidatos que foram estudados para a variável força, potência e resistência e a partir destas informações melhorarem a planificações do treinamento, no tocante a melhora do desempenho e prevenção de lesões. Os riscos presentes na realização deste estudo são mínimos, pois a coleta salivar é um método indolor, não invasivo, sem risco de transmissão de doenças, onde cada atleta utilizará um kit estéril e descartável, fato que faz a metodologia ser passível de controle por meio de medidas preventivas.

O presente estudo com relação à determinação dos genes e seus polimorfismos, estes não apresenta aos sujeitos de pesquisa riscos eminentes, em algumas situações poderá ocorrer a não adaptação por parte do atleta, ao novo treinamento proposto, o que em um primeiro momento poderá ocasionar diminuição em sua performance de treino.

Cabe salientar que a sua privacidade será respeitada, ou seja, o nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o identificar, será mantido em sigilo, a fim de evitar tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva. Caso não concorde com o que foi exposto até o presente momento, você poderá recusar que seu filho(a) participe do estudo, ou retirar o consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e ele não sofrerá qualquer prejuízo. Com relação ao pesquisador envolvido com o referido projeto, o Prof. Glaucio Neves Woellner tel: 96987728, o Professor Marcelo Romanovitch Ribas tel: 92099267 e o Professor Julio Cesar Bassan tel: 99644220 lhe assegurará a assistência durante toda pesquisa, bem como garantirá a você livre acesso a todas as informações em se tratando de esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que você e seu filho(a) queiram saber antes, durante e depois da participação, ou se você optar estas informações não lhe será repassadas. Caso queira entrar em contato com o comitê de ética, responsável pela aprovação desta pesquisa, poderá contatar o Comitê de Ética

e pesquisa da Faculdade Dom Bosco pelo telefone (041) 3218 – 5582. 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 466/12, II.4).

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de tudo aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo da já referida pesquisa, pedimos o seu livre consentimento para participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela sua participação. No entanto, qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento em dinheiro. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da participação no estudo, será devidamente indenizado, em forma de tratamento conforme previsto em lei.

Data

Nome, CPF e assinatura dos pais ou responsáveis legais.

Nome e (assinatura) do pesquisador responsável

Prof. Glaucio Neves Woellner(CPF–022856929-00)glauciw@hotmail.com

Nome e (assinatura) do pesquisador responsável

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

Nome e (assinatura) do orientador metodológico da pesquisa

Prof. Julio Cesar Bassan (CPF: 504.595.549-72)jcbassan@utfpr.edu.br

OBS: este documento deve conter duas vias iguais, sendo uma pertencente ao pesquisador e outra ao sujeito de pesquisa, onde todas as vias deverão estar rubricadas pelo avaliado e pelo pesquisador.

APÊNDICE 3

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite especial para que seu filho participe voluntariamente da pesquisa intitulada: **ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES ACTN3, ACE ID, CK, AMPD1, e NOS NOS DIFERENTES ESPORTES INDIVIDUAIS E COLETIVOS**. Que terá por objetivo avaliar a frequência do genótipo dos genes, alfa actina3, da enzima conversora de angiotensina, da enzima creatina quinase M, AMP1 desaminase, óxido nítrico, em atletas brasileiros de alto rendimento. [As informações existentes neste documento são para que você entenda perfeitamente os objetivos da pesquisa, e que a participação de seu filho é espontânea. Se durante a leitura deste documento ocorrer alguma dúvida você deverá fazer perguntas ao pesquisador envolvido **Prof. Glaucio Neves Woellner, Maria Amélia Gonçalves, Prof. Marcelo Romanovitch Ribas e Prof. Julio Cesar Bassan**, para que possa entender perfeitamente do que se trata a pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar, pedimos, por favor, que assine ao final deste documento e realize sua rubrica em todas as páginas do mesmo. Este documento se apresenta em duas vias onde a primeira via será sua e a segunda via do pesquisador responsável.

Antes de continuar a leitura deste documento, verifique, por favor, se seu filho(a) enquadra-se dentro dos critérios de inclusão e exclusão: Fatores de Inclusão: atletas adolescentes de esportes individuais e coletivos que possuam entre 11 até 17 anos. Fatores de exclusão: a) não estejam competindo em suas respectivas modalidades; b) não apresentaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) manifestem seu desejo de retirar o seu consentimento em participar da pesquisa, durante a realização da pesquisa.

A pesquisa justifica-se pelo fato de poucos estudos não conclusivos no campo da genética do esporte, ter sido realizado com atletas de rendimento brasileiros. Para tanto, a participação de seu filho(a) na pesquisa será no sentido de fornecer uma **amostra de saliva**, para que seja coletados material

genético, para a determinação da genotipagem dos genes que serão objeto do presente estudo.

Como método alternativo para a metodologia proposta, poderíamos realizar uma coleta sanguínea de 10 ml de sangue, para posterior extração do DNA. Em relação à pesquisa que será realizada, você e seu filho poderão ter acesso a genotipagem dos genes candidatos que foram estudados para a variável força, potência e resistência e a partir destas informações melhorarem as planificações do treinamento, no tocante a melhora do desempenho e prevenção de lesões. Os riscos presentes na realização deste estudo são mínimos, pois a coleta salivar é um método indolor, não invasivo, sem risco de transmissão de doenças, onde cada atleta utilizará um kit estéril e descartável, fato que faz a metodologia ser passível de controle por meio de medidas preventivas.

O presente estudo com relação à determinação dos genes e seus polimorfismos, estes não apresenta aos sujeitos de pesquisa riscos eminentes, em algumas situações poderá ocorrer a não adaptação por parte do atleta, ao novo treinamento proposto, o que em um primeiro momento poderá ocasionar diminuição em sua *performance* de treino.

Cabe salientar que a privacidade de seu filho(a) será respeitada, ou seja, o nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o identificar, será mantido em sigilo, a fim de evitar tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva. Caso não concorde com o que foi exposto até o presente momento, você poderá recusar que seu filho(a) participe do estudo, ou retirar o consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e ele não sofrerá qualquer prejuízo. Com relação ao pesquisador envolvido com o referido projeto, o Prof. Glaucio Neves Woellner tel: 96987728, o Professor Marcelo Romanovitch Ribas tel: 92099267 e o Professor Julio Cesar Bassan tel: 99644220 lhe assegurará a assistência durante toda pesquisa, bem como garantirá a você livre acesso a todas as informações em se tratando de esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que você e seu filho(a) queiram saber antes, durante e depois da participação, ou se você optar estas informações não lhe será repassadas. Caso queira entrar em contato com o comitê de ética,

responsável pela aprovação desta pesquisa, poderá contatar o Comitê de Ética e pesquisa da Faculdade Dom Bosco pelo telefone (041) 3218 – 5582. 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 466/12, II.4).

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de tudo aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo da já referida pesquisa, pedimos o seu livre consentimento para seu filho(a) participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela sua participação. No entanto, qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento em dinheiro. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da participação no estudo, será devidamente indenizado, em forma de tratamento conforme previsto em lei.

Data

Nome, CPF e assinatura dos pais ou responsáveis legais.

Nome e (assinatura) do pesquisador responsável

Prof. Glaucio Neves Woellner(CPF–022856929-00) glaucio@hotmail.com

Nome e (assinatura) do pesquisador responsável

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

Nome e (assinatura) do orientador metodológico da pesquisa

Prof. Julio Cesar Bassan (CPF: 504.595.549-72)jcbassan@utfpr.edu.br

OBS: este documento deve conter duas vias iguais, sendo uma pertencente ao pesquisador e outra ao sujeito de pesquisa, onde todas as vias deverão estar rubricadas pelo avaliado e pelo pesquisador.

APÊNDICE 4



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Universidade Positivo autoriza o uso de seus laboratórios de biologia molecular para a pesquisa em Análise de Polimorfismos Genéticos em Atletas de esportes coletivo e individuais, com os pesquisadores Julio Cesar Bassan, Zair Candido de Oliveira Netto, Glaucio Neves Woellner, Maria Amélia Gonçalves, Marcelo Romanovitch Ribas e Fabiano Salgueirosa.

Por ser verdade, assino o presente.

Curitiba, agosto de 2015.

Universidade Positivo
Prof. Zair Candido de Oliveira Netto
Coord. do Curso de Educação Física

Zair Candido de Oliveira Netto

Coordenador do Curso de Educação Física