



UNIVERSIDAD DE LEÓN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS



**POLIMORFISMOS GENÉTICOS PARA ALFA ACTININA 3 E SUA
RELAÇÃO COM DANO MUSCULAR E CAPACIDADES
FUNCIONAIS EM ATLETAS DE FUTEBOL.**

EDUARDO MENDONÇA PIMENTA
2012

**A(DM)ISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

Agradecimientos

A Deus, por tudo...

PAIS, Eduardo e Marina, pela a minha fundação! Caminhei até aqui por suas mãos e devo-lhes a minha formação humana, afetiva, de caráter e intelectual.

Ao Professor Dr. José Antonio De Paz Fernández pela orientação no doutorado, mas pelo exemplo como Docente, pelo incentivo e apoio que tem me dado nos meus estudos e vida acadêmica.

Ao Professor Dr.Emerson Silami Garcia, através de seu exemplo, acreditei que era possível realizar o Doutorado, algo que jamais havia imaginado. Figura importante na minha formação humana, como pesquisador e profissional do Futebol.

Ao Professor Dr.Christiano Veneroso, meu grande amigo, sem sua ajuda não seria possível realizar este sonho.

Ao Professor Dr.Guilherme Pussieldi, pela sua energia e objetividade no meu trabalho e, principalmente, por acreditar no nosso estudo.

À Professora Dr^a Maria Raquel, que me acolheu em um momento muito difícil e delicado da minha jornada acadêmica, tendo paciência, compreensão e muita sapiência. Uma pessoa fundamental no meu amadurecimento e desenvolvimento nas ciências.

Aos grandes “amigos irmãos” Emersom Avila e Gerson Rocha, que me acompanham desde o meu início como profissional e pesquisador, meus velhos, obrigado pelos bons e maus momentos, mas principalmente pela sinceridade e companheirismo.

Ao Dr Daniel Coelho por sua inquietude na busca pela perfeição acadêmica, pelos conselhos e prontidão nos momentos deste projeto em parceria.

À Drnda. Izinara pela atenção, carinho e dedicação ao estudo.

Aos Atletas que participaram deste estudo.

Ao Cruzeiro Esporte Clube, Ipatinga Futebol Clube, e CaboFriense Futebol Clube.

Ao amigo Elias e sua equipe pelo apoio e prontidão.

À Fundação Helena Antipoff.

Aos amigos..... Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzados nossos caminhos. Algumas percorrem ao nosso lado, vendo muitas luas passarem, mas outras apenas vemos entre um passo e outro, mas são igualmente importantes para nosso crescimento: Rodrigo Morandi, Paulinho Mendonça, Daniel Espanha, Alessandro, Guilherme Bressiani, Simba, Leo, Vini, Daniel Uriuls, Ricardo Drubisk, Chafit Felipe, Luciano Capettine, Tales, Endersom Moreira, Dr Wallace, Dr Paulo, Hering, Nicanor, Diogo Giacomini, Paulo Roberto, Aida, Barroso, Roger, muito obrigado.

Aos meus irmãos, Kit, Xandi e Leo meu porto seguro, minha história, amo vocês.

Aos meus filhos Davi, Gabriel e principalmente à minha amada esposa Ana Paula: este passo foi dado por vocês, mas a caminhada só é possível pelo seu amor, apoio, confiança, respeito e amizade.

***“O descontentamento é o primeiro passo na evolução de um
homem ou de uma nação”***

Oscar Wilde

Parte de los resultados expuestos en la presente memoria han sido incluídos en la siguiente publicación y comunicación a congreso:

Rosse, I.C.¹; Mendonça, E.P. ²; Coelho, D.B. ²; Melo, A.L.O. ¹; Figueredo, D.N.G. ¹; De-Paz, J.A.F³; Silami-Garcia², E.; Carvalho, M.R.S.¹ , Carvalho, M. R. S.¹ **Frequência do polimorfismo do gene ACTN3 em atletas de elite do futebol mineiro. Poster. In CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENETICA. Belo Horizonte 2010.**

Mendonça, E.P. ²; Coelho, D.B. ²; Rosse, I.C.¹; Melo, A.L.O. ¹; De-Paz, J.A.F³; Silami-Garcia², E.; Carvalho, M.R.S.¹ , Carvalho, M. R. S.¹ **Relação entre força e resistência aeróbia com o gene do ACTN3 em jogadores de futebol. Poster. In CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENETICA. Belo Horizonte 2010.**

Pimenta, E.M. Coelho,D.B. Prado,L.S. Silami-Garcia,E. **Novas Perspectivas de Avaliação e Monitoramento do Estado de Treinamento Esportivo no Futebol e em Outros Esportes. In Temas Atuais XIII, Educação Física e Esportes. Emerson Silami Garcia e Katia Lúcia Iemos. Belo Horizonte: Casa da Educação Física, 2010.117-133.**

Pimenta EM, Coelho DB, Cruz IR, Morandi RF, Veneroso CE, de Azambuja Pussieldi G, Carvalho MR, Silami-Garcia E, De Paz Fernández JA. **The ACTN3 genotype in soccer players in response to acute eccentric training.** Eur J Appl Physiol. 2012 Apr;112(4):1495-503.

Pimenta EM, Coelho DB, Cruz IR, Morandi RF, Veneroso CE, de Azambuja Pussieldi G, Carvalho MR, Silami-Garcia E, De Paz Fernández JA. **Effect of gene ACTN3 on strenght and endurance in soccer players.** Journal of Strength & Conditioning Research. Online Submission and Review System. JSCR-08-2150R2

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACTN2= ALFA ACTININA2
ACTN3 557R= ALELO 577R DO GENE ALFA ACTININA3,
ACTN3 577X= ALELO 577X DO GENE ALFA ACTININA3,
ACTN3= ALFA ACTININA3
ADP= ADENOSINA DIFOSFATO
ATP = ADENOSINA TRIFOSFATO
CAE= CICLO DE ALONGAMENTO E ENCURTAMENTO
CBF = CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE FUTEBOL
CK = CREATINA-QUINASE
CK-BB = CK CEREBRAL
CK-MB = CK CARDÍACA
CK-MM = CK MUSCULAR
CON = CONCÊNTRICO(A)
CP= CREATINA FOSFATO
(DM)=DANO MUSCULAR
EXC = EXCÊNTRICO(A)
FC = FREQUÊNCIA CARDÍACA
FCMÁX= FREQUÊNCIA CARDÍACA MÁXIMA
FIFA = FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE ASSOCIAÇÕES DE FUTEBOL
GH = HORMÔNIO DO CRESCIMENTO
IGF = INSULIN GROWTH FACTOR
IL-1B=INTRLEUCINA 1 BETA
IL6= INTERLEUCINA 6
LDH = LACTATO DESIDROGENASE
NK= NATURAL KILLER
NFAT = FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADAS
O/N= OVER NIGHT,
PCR= REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE,
PPD = ESTER FOSFATO DE ADAMANTIL DIOXETANO
TAQ= DNA POLIMERASE TERMOESTÁVEL UTILIZADA NA AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR.
TNF-ALFA= FATOR DE NECROSE TUMORAL
VO2 = VOLUME DE OXIGÊNIO CONSUMIDO
VO2MÁX= CONSUMO MÁXIMO DE OXIGÊNIO
SNPS – SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS

INDICE DE CONTEÚDOS	pag.
RESUMEN.....	14
1.INTRODUÇÃO	46
2.ANTECEDENTES	54
2.1 DNA COMO REGULADOR DO FUNCIONAMENTO DO ORGANISMO	56
2.2 GENÉTICA, FENÓTIPOS MUSCULARES E ATIVIDADE FÍSICA.....	58
2.3 ALFA-ACTINA 3 (ACTN3) E SUAS RELAÇÕES COM OS FENÓTIPOS ESPORTIVOS	58
2.4 CARACTERIZAÇÃO DO FUTEBOL.....	70
2.5 EXERCÍCIO E MICROLESÃO MUSCULAR.....	76
2.5.1 DANO E REPARO MUSCULAR.....	81
2.5.2 AVALIAÇÃO DO DANO MUSCULAR.....	88
2.5.2.1 AVALIAÇÃO DIRETA DO DANO MUSCULAR	88
2.5.2.2 AVALIAÇÕES INDIRETAS DO DANO MUSCULAR.	89
2.5.3 EXTRAVASAMENTO DE PROTEÍNAS INTRAMUSCULARES COMO MARCADOR DE CANO MUSCULAR	90
2.5.3.1 CREATINA QUINASE	92
2.5.4.2 ALFA-ACTINA MUSCULAR ESQUELETICA	100
2.6 INFLAMAÇÃO E EXERCÍCIO	102
2.6.1 CITOCINA IL-6.....	106
2.7 RESPOSTAS HORMONAIS AO TREINAMENTO	110
2.7.1 CORTISOL E EXERCÍCIO.....	111
2.7.2 TESTOSTERONA E EXERCÍCIO.....	114

3.DESENHO DA INVESTIGAÇÃO	116
ESTUDO 1.....	117
1.OBJETIVO.....	119
2.METODOLOGÍA.....	120
2.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	120
3.AMOSTRA.....	123
4. MATERIAL E METÓDOS	126
4.1 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO R577X NO GENE ACTN3.....	126
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	129
6. RESULTADOS	130
7.DISSCUSSÃO	133
ESTUDO 2.....	139
1.OBJETIVO.....	140
2.METODOLOGÍA.....	141
2.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	141
3. AMOSTRA.....	144
4. MATERIAL E METÓDOS	148
4.1 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO R577X NO GENE ACTN3.....	148
4.2 COLETAS SANGUINEAS E AVALIAÇÕES DAS VARIÁVEIS	151
4.3 DOSAGEM DE INTERLEUCINA-6.....	151
4.4 DOSAGEM DE ALFA-ACTINA.....	152
4.5 DOSAGEM DE CREATINA KINASE (CK)	153
4.6 DOSAGEM DE CORTISOL E TESTOSTERONA.....	153
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	154

6. RESULTADOS	155
6.1 POLIMORFISMO DA ACTN3 NAS CONCENTRAÇÕES DE IL-6	156
6.2 EFEITO DO POLIMORFISMO ACTN3 NA MICROLESÃO MUSCULAR ..	156
6.3 EFEITO DO POLIMORFISMO DA ACTN3 SOBRE AS RESPOSTAS HORMONAIAS	158
7. DISCUSSÃO	161
4. CONCLUSÕES	167
5. BIBLIOGRAFIA	169
6. APÊNDICES.....	192

ÍNDICE DE FIGURAS	pág.
Figura 1 Arquitetura do disco Z.....	59
Figura 2 Esquema de um sarcomero sob microscópio eletrônico	61
Figura 3 Freqüências dos três genótipos ACTN3 R577X nos controles e atletas de elite	63
Figura 4 Rompimento do sarcômero seguido de uma contração excêntrica	77
Figura 5 Teoria dos processos fisiológicos de reparo do dano promovidos pelo exercício	83
Figura 6 Estrutura molecular da alfa-actina monomérica	100
Figura 7 Resumo da metodologia usada no estudo	120
Figura 8 A) Esquema da restrição com enzima Ddel	128
B) Gel de poliacrilamida da restrição	128
Figura 09 Valores de testes de, saltos (CMJ, SJ) em relação aos diferentes genótipos do ACTN3.....	131
Figura 10 Valores de testes de velocidade em 10, 20 e em relação aos diferentes genótipos do ACTN3.....	132
Figura 11 Valores de testes de Yoyo Endurance (VO ₂) em relação aos diferentes genótipos do ACTN3.....	132
Figura 12 Resumo da metodologia usada no estudo 2	141
Figura 13 A) Esquema da restrição com enzima Ddel	150
B) Gel de poliacrilamida da restrição	150
Figura 14 Efeito do polimorfismo actn3 nas concentrações de il-6	157
Figura 15 Efeito do polimorfismo actn3 concentrações de CK.....	157
Figura 16 Efeito do polimorfismo actn3 concentrações de alfa-actina	158
Figura 17 Efeito do polimorfismo actn3 concentrações de Testosterona.....	159
Figura 18 Efeito do polimorfismo actn3 concentrações de Cortisol.....	160

ÍNDICE DE TABLA	pág.
Tabela 1 Percentual da predominância das concentrações de CK de cada tecido	94
Tabela 2 Dados referentes as características da amostra utiliza	124
Tabela 3 Frequências genotípicas observadas para o locus ACTN3 em atletas de Futebol Brasileiro.....	124
Tabela 4 Dados referentes às características da amostra	126
Tabela 5 Valores de testes de velocidade em 10, 20 e 30m, saltos (CMJ, SJ) e consumo máximo de oxigênio em relação aos diferentes genótipos do ACTN3 (RR,RX e XX)	131
Tabela 6 Dados referentes às características de ações da sessão de treinamento	143
Tabela 7 Dados referentes às características da amostra Total	146
Tabela 8 Frequências genotípicas observadas para o locus ACTN3 em atletas de futebol Brasileiros.....	146
Tabela 9 Dados referentes às características da amostra	147
Tabela 10 Fenótipos em relação ao polimorfismo do gene ACTN3 (RR, RX, XX)	155

RESUMEN

La excelencia atlética es esencialmente multifactorial y determinada por complejas interacciones entre factores ambientales y genéticos. Al menos 240 genes han sido reconocidos como relacionados con la cualidad cardiorrespiratoria, la resistencia, la fuerza, la potencia muscular (Bray *et al.*, 2009).

El ejercicio físico agudo, provoca un disturbio homeostático que activa, entre otras, enzimas y proteínas relacionadas con las vías de señalización intracelular, que a su vez activan la transcripción de genes específicos que se traducen en una modificación de la cantidad o tipo de proteínas formadas en las células. En este contexto, las adaptaciones inducidas por el entrenamiento físico, traducen en parte, el efecto acumulativo de la activación de estas vías a lo largo de las sesiones de entrenamiento.

En un partido de fútbol, la distancia recorrida por cada jugador de campo ronda los 10km (Bangsbo & Lindquist, 1992; Ekblom, 1986; Rienzi *et al.*, 2000), a una intensidad media del 70-80% del VO₂máx (Bangsbo, 1994) y al 85% de la frecuencia cardíaca máxima (Krustrup *et al.*, 2005; Helgerud *et al.*, 2001; Mortimer *et al.*, 2006).

Este deporte se caracteriza por la gran presencia de saltos, sprints, frenazos, aceleraciones, cambios de dirección que ocurren entre 1200 y 1400 veces durante un partido (Stolen *et al.*, 2005; Greig *et al.*, 2006; Sporis *et al.*, 2010). Estas acciones requieren fuerza, especialmente en régimen de contracción excéntrica (Mougios, 2007). La contracción excéntrica, como es bien conocido, provoca en mayor medida que la concéntrica, daño muscular y la subsecuente respuesta inflamatoria, con producción de radicales libres,

elevación de citoquinas e incrementos de proteínas en el plasma procedentes de las proteínas contráctiles intracelulares (Clarkson & Hubal, 2002; Ispirlidis, 2008; Chatzinikolaou *et al.*, 2010; Ascensão *et al.*, 2008; Andersson *et al.*, 2010).

Con frecuencia se han buscado marcadores fisiológicos que reflejen el daño muscular producido por la práctica deportiva, empleándose con frecuencia la creatinquinasa (CK), la lactato deshidrogenasa (LDH), fragmentos de cadena pesada de miosina (MCH), troponina-I o la mioglobina (Brown 1997). Existen dudas sobre la sensibilidad, la especificidad y la reproductividad sugiriéndose que la alfa-actina puede ser un mejor marcador del daño musculo-esquelético (Martínez-Amat *et al.*, 2005; Martínez-Amat *et al.*, 2007; Vicent *et al.*, 2010).

También se emplean marcadores asociados a la inflamación, como la interleuquina 6 (IL-6) (Febbraio & Pedersen, 2002; Pedersen & Febbraio, 2008), o marcadores de fatiga crónica como cortisol y de testosterona de naturaleza hormonal (Uchida *et al.*, 2004; Cormack; *et al.*, 2008).

Los factores genéticos influyen en los diferentes fenotipos musculares y en la respuesta al entrenamiento (Thomis *et al.*, 1998; Beunen & Thomis, 2004; Thomis *et al.*, 2004; Brutsaert & Parra, 2006, Clarkson *et al.*, 2005a; Delmonico *et al.*, 2007; Norman *et al.*, 2009; Ogura *et al.*, 2009). Entre los genes ligados al rendimiento deportivo, se encuentra el gen que codifica la formación de la alfa-actina-3 (ACTN3). La alfa-Actina constituye una proteína onnipresente con una función en el mantenimiento del aparato muscular contráctil que liga los sarcómeros entre sí (Wang *et al.*, 2005), al ser un componente de la línea Z sarcomérica (MacArthur & North, 2004) que crea uniones cruzadas de enlace

entre las actinas de sarcómeros contiguos. Puede ser considerada también como un importante elemento estructural en la generación y transmisión de la fuerza contráctil del músculo (Ogura *et al.*, 2009; Linneman *et al.*, 2010; Lek *et al.*, 2010; Clarkson *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2010, Seto *et al.*, 2011).

Así, en los deportistas de actividades de predominio de la fuerza se han encontrado más frecuentemente fenotipos de los poliformismos del gen de la ACTN3 que expresan la alfa-actina-3 (el RR y el RX) (Macarthur *et al.*, 2008; Macarthur & North, 2004, 2007; Moran *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2010; Santiago *et al.*, 2008; Mccauley *et al.*, 2009). En los deportistas que tienen el genotipo del gen que no expresa la alfa-actina-3 (el XX) tienen a tener una mejor aptitud para la resistencia aeróbica (Gómez-Gallego *et al.*, 2009, Ahmetov *et al.*, 2008; Saunders *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2008; Lucia *et al.*, 2006).

Este gen se expresa en las fibras musculares tipo II, de contracción rápida (MacArthur *et al.*, 2008; MacArthur & North 2004; 2005; 2007; Lucia *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2010). Se ha postulado que la ACTN3, debido a su papel en el enganche entre la actinas en la línea Z, podría conferir mayor capacidad de absorción y de transmisión de fuerza a las fibras tipo II, promoviendo una protección mayor contra los daños musculares (Mills *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2010; MacArthur & North 2004; Linnemann *et al.*, 2010, Seto *et al.*, 2011).

ALFA-ACTINA 3 (ACTN3) Y SU POLIMORFISMO

Las alfa-actinas (ACTN) son una familia de proteínas relacionadas con la distrofina que se unen a la actina y son importantes para la unión y la fijación de los miofilamentos (North & Beggs, 1996; Mills *et al.*, 2001). Cuatro genes que codifican estas proteínas, ACTN1, ACTN2, ACTN3 y ACTN4, han sido encontrados en humanos. Las ACTN1 y ACTN4 son proteínas no musculares, presentes en los riñones y en tejidos cancerígenos (Honga *et al.*, 1998), mientras que las ACTN2 y la ACTN3 son proteínas miofibrilares localizadas en el disco Z (figura 1).

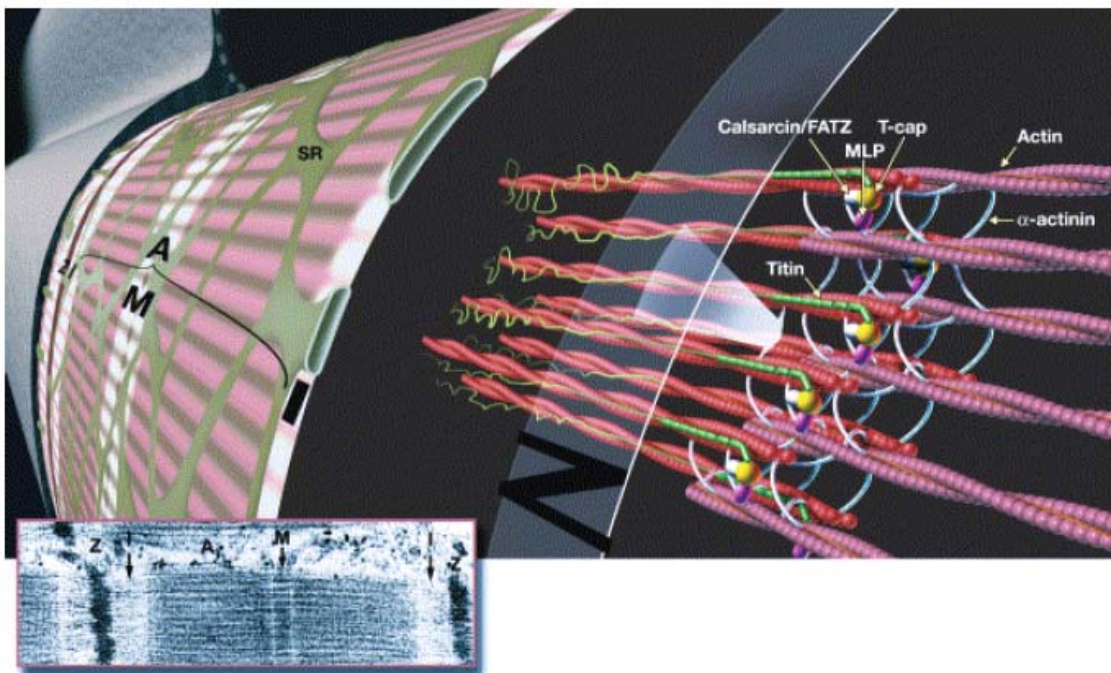


Figura 1. Arquitectura del disco Z. (Z); (M), línea M; (A), banda A, (I), banda I; (SR), retículo sarcoplásmico. Figura de (Epstein y Davis, 2003) Obsérvese la localización específica de la alfa-actinina en el disco Z.

La ACTN3 es una isoforma característica en las fibras rápidas y apenas se expresa en las fibras tipo II (Beggs *et al.*, 1992; North *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2001). Las funciones exactas de la ACTN3 aún no son claramente conocidas, pero se sugiere que tiene una función estructural en el mantenimiento de la integridad mecánica uniendo los filamentos contenidos en la actina y también interviene en la contracción muscular, estabilizando el aparato contráctil (Beggs *et al.*, 1992; Squire, 1997; MacArthur & North, 2004), a la vez que participan en la señalización del metabolismo muscular (Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North, 2004).

El gen de la ACTN3 se localiza en el cromosoma 11q13-q14 y fue clonado por Beggs *et al.*, (1992). North *et al.*, (1999) identificaron en el gen de la ACTN3 un cambio del nucleótido C por el T en la posición 1747 del exón 16. Es decir una mutación resultante de la conversión del aminoácido arginina en un stop-codón prematuro en el residuo 577 (R577X) (Scott *et al.*, 2001). La variante R577X se traduce en dos versiones del gen de la ACTN3 en humanos, un alelo funcional R y un alelo nulo X. Más de mil millones de personas en el mundo son homocigotas para el R577X (alelo nulo) presentando un genotipo XX, no expresando la ACTN3 en su músculo esquelético (MacArthur & North, 2004).

La mutación conduce a la ausencia de la detección de la proteína en individuos homocigotas para el alelo X (North 1999), probablemente porque la proteína troncada es rápidamente degradada en el organismo (MacArthur & North, 2004). A pesar de que la frecuencia de los alelos difiere en las diferentes poblaciones, se estima que aproximadamente del 16 al 21% de la población es

homozigota para el polimorfismo no funcional XX (North *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North, 2007; Moran *et al.*, 2007; Papparini *et al.*, 2007).

El genotipo XX no causa cambios histológicos aparentes lo que sugiere que la presencia de la proteína no es crítica para las funciones musculares ((North & Beggs, 1996), de modo que las variaciones ocurren dentro de los límites de la normalidad (MacArthur *et al.*, 2008). Este hecho puede ser explicado por una posible redundancia funcional entre las proteínas ACTN2 y ACTN3, de modo que la ausencia de la ACTN3 la ACTN2 puede compensar sus efectos (North *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North, 2004, 2007). A pesar de la compensación aparente, se ha de tener en cuenta que el gen ACTN3 ha sido altamente conservado a lo largo de la evolución humana, de manera que la divergencia entre la ACTN2 y las ACTN3 ocurrió hace 300 millones de años (Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North, 2004), lo que sugiere que algunos efectos de la ACTN3 no pueden ser compensados plenamente por la ACTN2 (Seto *et al.*, 2011).

Además es posible que la ausencia del ACTN3 pueda influenciar la actividad de la calcineurina (Yanga *et al.*, 2003), a la que se liga la alfa actina en la línea Z por las calsarcinas (Frey *et al.*, 2000; Frey & Olson, 2002). La calcineurina es un importante señalizador celular, cuya activación contribuye a la hipertrofia muscular y la diferenciación de las fibras (Sakuma & Yamaguchi, 2010).

Por último las alfa-actinas sarcoméricas interactúan con las enzimas metabólicas, incluyendo la fosforilasa de enzimas glucogenolíticas.

GENOTIPO PARA LA ACTN3 Y FUNCIÓN MUSCULAR

Con el fin de observar si el genotipo ACTN3 estaría asociado a variaciones en la función muscular en humanos, han sido numerosos los autores que han estudiado la distribución de los diferentes genotipos en atletas de diversas modalidades. Así por ejemplo Yang *et al.*, (2003) examinaron el genotipo ACTN3 en 429 atletas de elite australianos y de 436 controles. En los hombres hallaron que el genotipo XX fue encontrado en el 16% de los controles no atletas y en apenas el 8% de los atletas de deportes de alta intensidad y corta duración, no habiendo entre los atletas olímpicos ningún portador del genotipo XX. En las mujeres, el 20% de los controles poseían el genotipo XX y ninguna atleta de sprint o deportes de potencia fue identificada como homocigota XX.

Roth *et al.*, (2008) examinaron la frecuencia del genotipo XX en 79 fisiculturistas y atletas de fuerza (blancos y negros), comparándolos con una población general (n= 886). Encontraron que los atletas caucásicos presentaban el 9,7% frente a los 19,9% de los controles. Ningún deportista negro poseía el genotipo XX y frente a tan sólo el 4,8% de los controles negros.

Con el fin de evaluar la susceptibilidad a los microtraumas musculares en relación al genotipo de la ACTN3, no fue encontrada relación con la actividad plasmática de CK y la presencia de mioglobina en plasma, después de una actividad excéntrica entre los diferentes grupos de ACTN3 (XX, RX, RR). Sin embargo Vicente *et al.*, (2010) investigando la influencia del genotipo R577X ACTN3 en la respuesta aguda a una sesión de ejercicio excéntrico, 19 sujetos (9 RR y 10 XX), observaron que en el grupo XX se presentaba una

tendencia a presentar niveles de CK más elevados y de manera significativa más dolor muscular retardado.

EJERCICIO Y DAÑO MUSCULAR

Las formas más comunes de producción de daño muscular (DM) son la lesión por contusión, por electrocución y por ejercicio físico intenso (Brancaccio *et al.*, 2007).

La magnitud del daño muscular producido por el ejercicio, depende de la tensión y del alargamiento impuesto al músculo, considerándose a estos dos factores como la clave para el nivel de DM (Tidus, 2003). Se ha publicado con cierta frecuencia que la acción muscular excéntrica provoca mayor DM que la concéntrica, motivo por el que el ejercicio excéntrico (EXC) es uno de los métodos más utilizados en los estudios que investigan las respuestas fisiopatológicas al DM (Chen *et al.*, 2010), pues la realización de ejercicios EXC poco habituales resultan con mayor frecuencia en lesión muscular que el concéntrico (Clarkson & Hubball, 2002; Peake *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2001) y en cualquier caso está asociado a sensación de discomfort muscular, pérdida de fuerza máxima, aumento de concentraciones plasmáticas de enzimas intramusculares, hinchazón mitocotrial, aumento de la presión intramuscular y disminución en la resíntesis de glucógeno (Chen, 2003). El mecanismo que subyace, se cree que se relaciona con que el número de unidades motoras reclutadas es menor que en las concéntricas (Tee *et al.*, 2007), aumentando el estrés contráctil; y por otra parte con el hecho de que durante la contracción EXC, el número de puentes cruzados disminuye a medida que el estiramiento aumenta, conduciendo a un aumento de la tensión de los puentes actina-

miosina establecidos. Todo esto se traduce en una desorganización de los sarcómeros, lesión de las membranas musculares, una alteración de la permeabilidad de la membrana de la fibra muscular (Armstrong, *et al.*, 1991; Allen, 2005), provocando extravasación hacia el plasma desde el interior de las fibras musculares proteínas intramusculares (Foshini *et al.*, 2007; Brancaccio *et al.*, 2008).

El mecanismo de reparación del daño comprende tres grandes fases: una denegativa, seguida de una regenerativa y una tercera de remodelación. Constituye un cuadro complejo en el que las células inflamatorias promueven tanto el daño como la regeneración, a través de la acción combinada de especies reactivas de O₂, enzimas antioxidantes, factores de crecimiento, hormonas y citoquinas (Smith, 2004).

EVALUACIÓN DEL DAÑO MUSCULAR

Clarkson & Hubal (2002), agrupan los procedimientos de la evaluación del daño muscular en un grupo de directos y otro de indirectos.

Métodos directos:

Los principales métodos directos son:

La biopsia muscular, técnica invasiva cuya principal dificultad en este contexto, reside en que se puede tanto subestimar como sobreestimar el daño muscular producido, pues el daño no es igual en todo el músculo.

Análisis de imagen, principalmente la resonancia magnética, herramienta poderosa pero de un elevado coste (Clarkson & Hubal, 2002).

Métodos indirectos:

Pérdida funcional muscular: evaluada como la merma en el desarrollo de la fuerza máxima, ya sea de la contracción isométrica máxima, como de 1RM, o la saltabilidad (Ispirlidis *et al.*, 2008; Fatouros *et al.*, 2010).

Evaluación del dolor muscular: determinada normalmente mediante el empleo de una escala visual de 10 cm en la que los sujetos marcan de 0 (ningún dolor) al 10 (máximo dolor soportable) el dolor percibido (Thompson *et al.*, 1999).

Determinación plasmática de proteínas intramusculares extravasadas: entre las que podemos destacar la creatinquinasa (CK), y la alfa-actina muscular.

Creatínquinasa (CK):

Es de los marcadores de DM más frecuentemente utilizados. Existen al menos cinco isoformas de la CK, tres citoplasmáticas CK-BB o CK1, CK-MB o CK 2 y la CK-MM o CK3, y dos isoenzimas en la mitocondria (Hortobágyi & Denahan, 1989). Ha sido empleada tanto para monitorizar el daño muscular (Brancacci *et al.*, 2007; Mendham *et al.*, 2011, Mclellan *et al.*, 2010, Ispirlidis *et al.*, 2008) como el sobreentrenamiento (Smith, 2000).

Alfa-Actina Muscular esquelética:

Es una de las dos mayores proteínas del músculo, pudiendo llegar a representar más del 20% del total proteico (Aránega *et al.*, 1992), y constituye del 20 al 25% de las proteínas miofibrilares. Martínez-Amat *et al.*, (2005, 2007) han empleado dicha proteína como marcador de daño muscular evaluando a sujetos sedentarios, deportistas y deportistas lesionados.

REPARACIÓN Y DAÑO MUSCULAR, CITOQUINA IL-6

Cuando el daño muscular se produce, el organismo responde para restaurar la integridad perdida. Esta respuesta es denominada como inflamación (Abbas & Litchman, 2004). Potencialmente todos y cada uno de los elementos que intervienen en la inflamación son susceptibles de ser utilizados para monitorizar el daño muscular, ya sean del componente vascular, leucocitario o de los diferentes mediadores de la inflamación, ya sean sustancias proinflamatorias como antiinflamatorias. Comentaremos algunos de los mediadores por nosotros empleados.

La IL-6 proveniente del músculo puede ser un “factor del ejercicio” (miocina), puede ejercer efectos metabólicos en otros tejidos como el hígado, cerebro o tejido adiposo. La transcripción génica de esta citoquina apenas es activada en el músculo en reposo, pero la contracción muscular produce una liberación, que suele ser inversamente proporcional al mayor o menor nivel del depósito del glucógeno muscular (Pedersen *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2004).

Es un mediador que puede comportarse tanto como sustancia proinflamatoria como antiinflamatoria, además de realizar funciones metabólicas como activación de la lipólisis o de la glucogenólisis hepática.

RESPUESTAS HORMONALES AL ENTRENAMIENTO

Numerosas hormonas circulantes han sido utilizadas para observar las respuestas al entrenamiento deportivo. Hormonas como la testosterona, el cortisol, la hormona del crecimiento o la prolactina son algunos ejemplos. De ellas la testosterona y el cortisol han sido ampliamente monitorizadas debido a

la influencia que tienen en la relación existente entre el anabolismo y el catabolismo (Kraemer *et al.*, 2001, 2005; Crewther, 2006).

Cortisol:

Es una hormona esteroidea esencial para mantener las concentraciones de glucosa en la sangre, lo que es de gran importancia particularmente en situaciones de estrés. La concentración de cortisol aumenta en respuesta al aumento del volumen y la intensidad del ejercicio (McMurray *et al.*, 2000). El aumento del cortisol después del ejercicio puede permanecer elevado durante una hora o más. Este aumento se cree forma parte del mecanismo de recuperación, aumentando la movilización de los ácidos grasos y disminuyendo la respuesta inmune e inflamatoria (Stone *et al.*, 1998).

Handziski *et al.*, (2006) observaron las alteraciones del cortisol en futbolistas a lo largo de una temporada deportiva. Los autores verificaron una caída significativa después de la fase precompetitiva y un aumento importante después de la fase competitiva. Otro relevante estudio fue desarrollado por Ispirlidis *et al.*, (2008), monitorizando el efecto de un partido de fútbol sobre la concentración de cortisol sanguíneo. Los resultados mostraron una elevación cercana al 40% en los valores plasmáticos, que volvían a su nivel basal en unas 24 horas tras el partido.

Testosterona:

Esta es la principal hormona sexual masculina, con una acción anabólica directa al estimular la síntesis proteica y el crecimiento óseo (McMurray *et al.*, 2000). También puede ejercer un efecto anticatabólico a través de la interacción con los receptores de cortisol y posiblemente un aumento de la acción glucogenolítica durante el ejercicio y glucogénica durante la

recuperación (Stone *et al.*, 1998; Hackney, 2006). A conclusiones semejantes llegan estudios como el de Fança *et al.*, 2006; Malm *et al.*, 2004).

ESTUDIO 1

OBJETIVO

El objetivo de este estudio, fue comparar el desempeño futbolistas en pruebas de fuerza, velocidad y de resistencia aeróbica, entre los diferentes grupos genotípicos de la ACTN3 (XX, RX y RR).

DISEÑO Y METODOLOGÍA

Como reflejamos en la figura 7, todos los participantes realizaron cuatro test físicos que fueron el Squat Jump, el Counter Movement Jump, esprint de 30 metros y el test de *endurance* Yo-Yo test, para evaluar sus capacidades de fuerza, velocidad y resistencia.

Los test fueron administrados en dos días diferentes, separados por al menos 3 días. En el primer día, realizaron la prueba de Sprint de 30 metros, registrándose las velocidades del primer, segundo y tercer intervalo de 10 metros. Se emplearon fotocélulas con precisión de 0,001 s (Mutisprint® Software Hidrofit Ltda., Bello Horizonte, Brazil).

10 minutos después, se realizaron los test de saltabilidad de la batería compuesta por el Squat Jump (SJ), Courter Movement-Jump (CMJ), sobre una plataforma de contactos, (0,1 cm de precisión), JumpTest ® Software Hidrofit Ltda., Bello Horizonte, Brazil).

En el segundo día, realizaron un test indirecto de VO_{2max} , evaluado mediante el Yo-Yo Test (nivel 2) de Bangsbo, 1994), que es específico para jugadores de fútbol y de deportes intermitentes (Krustrup *et al.*, 2005).

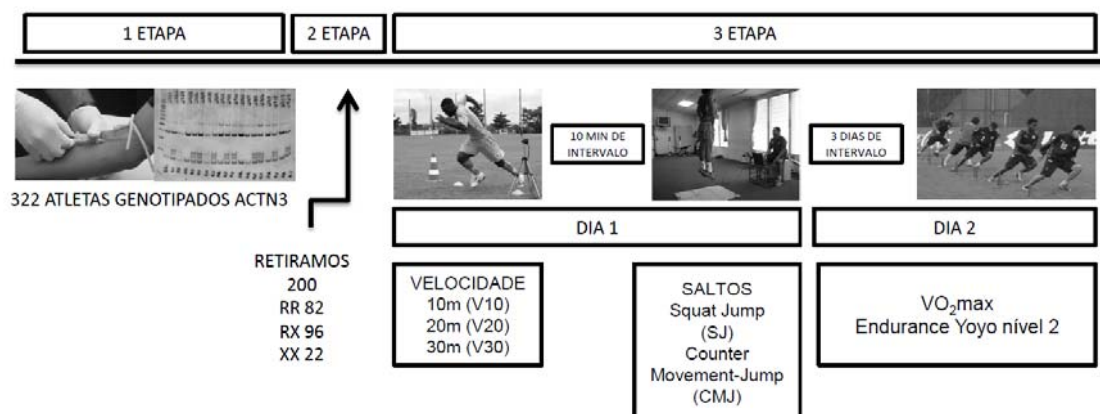


Figura 7: Resumen del diseño y la metodología del estudio 1

GENOTIPADO DEL POLIMORFISMO R577X DEL GEN ACTN3

Todos los individuos fueron genotipados para el polimorfismo de la ACTN3 a través de la técnica de RFLP-PCR (Polimerasa de cadena ramificada y Polimorfismo del fragmento largo de restricción) con la enzima de restricción (DdeI) después de la extracción del DNA. La extracción del DNA genómico de las muestras de sangre periférica fue realizada de acuerdo al protocolo descrito en la literatura con la utilización de proteinasa K, seguida de precipitación salina (Miller *et al.*, 1988).

SUJETOS

Participaron en el estudio 322 jugadores de fútbol, voluntarios, de cuatro categorías (Profesionales, sub-20, sub-17 y sub-15) vinculados a equipos de fútbol inscritos en la Confederación Brasileña de Fútbol (CBF).

En la tabla 4, resumimos los datos de la muestra, referentes a la edad, peso, talla y genotipo de los 200 sujetos utilizados en este estudio. Comentar

que las frecuencias alélicas y genotípicas están en Equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,2582$).

Tabla 4. Datos antropométricos de la muestra

Genótipo ACTN3	Idade	Peso (kg)	Altura (cm)	%G
RR (82) 45%	23,8 ± 0,7	75,0 ± 5,8	181,7 ± 8,5	9,3 ± 2,4
RX (96) 44%	26,2 ± 2,9	73,5 ± 2,7	180,8 ± 8,9	9,2 ± 1,9
XX (22) 11,0%	20,4 ± 2,4	70,4 ± 9,9	179,2 ± 6,8	8,5 ± 1,8
200	24,2 ± 2,0	72,3 ± 7,5	180,5 ± 8,07	9,01 ± 2,0

Dados expressos em média e desvio padrão.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tras verificar la normalidad de la distribución de los datos, con el test de Kolmogorov Smirnov, se ha empleado el ANOVA de una vía, seguido por la prueba post hoc de Tukey, para comparar los diferentes desempeños de los deportistas de los grupos genotípicos. El nivel de significación se estableció para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

En la tabla 5, resumimos los valores medios y las desviaciones estándar de las pruebas realizadas separadas por los diferentes grupos genotípicos.

Se puede observar que los sujetos RR recorren la distancia de 10m en menor tiempo que los XX, en las distancias de 20 y 30m también son más rápidos que los RX y XX. En los test de saltabilidad los RX y los XX muestran mejor desempeño que los RR. Y en la prueba aeróbica, los XX demuestran mayores valores de VO₂max que los RR.

Tabla 5: Valores de las pruebas de velocidad en 10, 20 y 30m, saltos (CMJ, SJ) y consumo máximo de oxígeno en relación a los diferentes genotipos de ACTN3 (RR,RX e XX). (media y desviación típica).

GEN(N)	VO ₂ max(mL/Kg/min)	CMJ (cm)	SJ (cm)	10m (s)	20m (s)	30m (s)
RR(89)	53,36± 4,27*	37,81± 4,37*	34,65± 4,21*	1,78± 0,12*	2,39± 0,13* [#]	4,17± 0,23* [#]
RX(87)	54,29± 3,8	36,76± 4,62*	34,09± 5,35*	1,81± 0,13	2,46± 0,24	4,30± 0,36
XX(24)	56,28± 3,25	34,24± 4,57	30,88± 4,70	1,87± 0,11	2,49± 0,13	4,39± 0,31

Genotipos (GEN) de las diferentes expresiones del gen ACTN3 (RR, RX, XX). *Diferencia en relación al XX, [#] diferencia en relación al RX. (p<0,05).

DISCUSIÓN

Como se puede observar, el grupo XX, presentó un mayor V_{O2}max que el grupo RR, en contrapartida el grupo RR mostró mayor velocidad tanto en los 10, como en los 20 como en los 30m y mejores valores en la saltabilidad que los del grupo XX. Estos datos son más claros que los encontrados también en futbolistas por Al-Hazzaa *et al.*, (2001); Balikian *et al.*,(2000).

Moran *et al.*,(2007) evaluaron a un grupo de 525 hombres y 467 mujeres. Además del genotipo para la ACTN3 evaluaron pruebas de velocidad de 40 m, saltos, agilidad resistencia aeróbica y composición corporal. De

manera similar, estos autores encuentran también que los individuos con ACTN3-RR y los genotipos RX fueron más rápidos en los test de velocidad. No obstante, no hubo una diferencia en los test relacionados con la cualidad aeróbica.

Vincent *et al.*, (2007), evaluaron a 90 sujetos agrupados en las tres formas de expresión del gen ACTN3, evaluando la velocidad en una máquina isocinética, observando que los RR, presentaron mejores resultados en el torque a mayor velocidad angular en comparación a los XX. Estos autores sugieren que esas diferencias pueden ser debidas a la mayor proporción de fibras tipo II en los individuos RR en comparación a los XX. Estos hallazgos son compatibles con los encontrados por nosotros, a pesar de que el patrón de reclutamiento de las fibras musculares en las pruebas isocinéticas es diferente a las pruebas de salto y velocidad realizadas por en nuestro estudio.

E inversamente, los XX presentan una mejor capacidad de resistencia. Es decir que los jugadores deberían tener sus cargas de entrenamiento ajustadas y moduladas por el tipo de predisposición genética que tengan, e incluso la predisposición genética, dado que puede interferir con sus capacidades físicas, podrían hacer que los técnicos puedan usar esta información en ocasiones tácticas especiales que puedan ser importantes en la propuesta del juego.

ESTUDIO 2

OBJETIVO

El objetivo de este estudio, fue comparar las respuestas agudas de la inflamación y del daño muscular y las respuestas hormonales en función de una sesión de entrenamiento excéntrico en atletas profesionales de fútbol con diferentes perfiles genéticos de ACTN3 (XX, RX y RR).

DISEÑO Y METODOLOGÍA

En la figura 12 resumimos el diseño del estudio

Tras advertir a los deportistas que se abstuvieran de tomar bebidas alcohólicas y medicamentos antiinflamatorios, o tratamiento crioterápico dos semanas antes de la prueba.

La intervención se realizó al inicio de la temporada, y era el primer entrenamiento con componente excéntrico significativo.

La recogida de sangre fue antes, inmediatamente después y 2 y 4 horas después de finalizado el entrenamiento.

Tras un periodo de calentamiento, el circuito que realizaron estaba constituido por cinco estaciones, en los que se combinaban saltos, cambios de dirección, aceleraciones y desaceleraciones. En cada estadio permanecían tres minutos, empleando 30 segundos para el cambio de estación. El circuito lo completaron en dos ocasiones. La duración total fue de 45 minutos. Se registró la frecuencia cardiaca, la temperatura y humedad ambiental, la distancia

recorrida y la velocidad con un GPS Garmin Forerunner 305. Se contabilizaron igualmente el número de cambios de dirección, saltos y frenazos ejecutados.

La primera estación consistía en saltar con los pies juntos desde una plataforma de 45 cm de altura y a continuación sobre un obstáculo de 30 cm, tras lo que corría en línea recta a la máxima velocidad 15 metros.

En la segunda estación, recorrían 20 m a la máxima velocidad saltando cuatro obstáculos de 20 cm con los pies juntos, dispuestos en línea recta separados por 1,5 metros.

En la tercera partía desde el alto de un cajón de 45 cm, desde el que saltaba con los pies juntos y se continuaba con un salto lateral sobre un obstáculo de 30 cm, siendo ejecutado una vez con la extremidad inferior derecha y otra con la izquierda, y recorrían a continuación un trayecto de 20 metros con cambio de dirección prefijado por conos, finalizando el trayecto

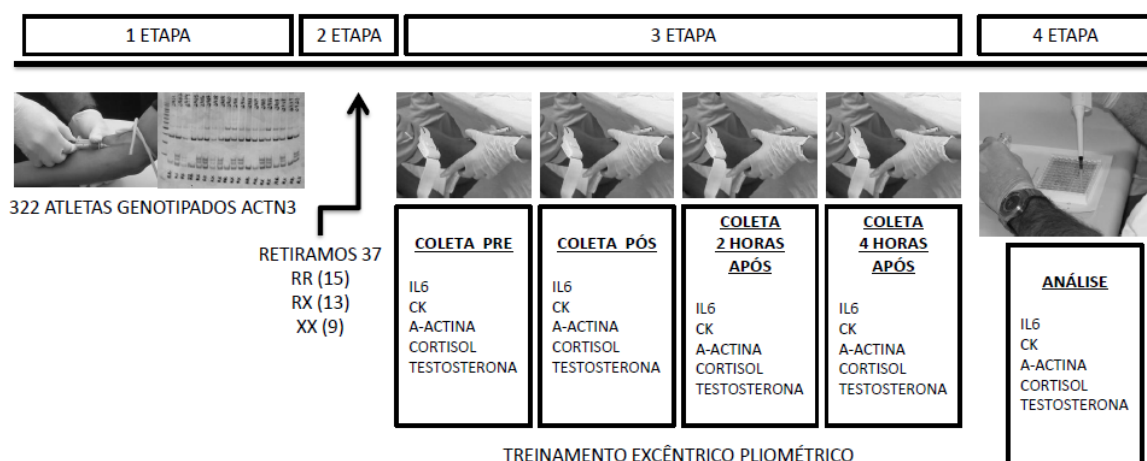


Figura 12: Resumen del diseño experimental y de la metodología usada en el estudio 2

En la tabla 6 resumimos las acciones promedio realizadas en esta sesión de entrenamiento por los sujetos experimentales.

Tabla 6. Acciones en la sesión de entrenamiento
(media \pm desviación estándar).

Acciones	Valores
Saltos	244 \pm 12
Frenzos	202 \pm 25
Cambios de dirección	112 \pm 9
Distancia (Km)	3,98 \pm 0,23
Velocidad (Km/h)	16,8 \pm 2,5
Temperatura (°C)	23°
Humedad Relativa del aire	67%
Frecuencia Cardiaca	124 \pm 18,9

MUESTRA

En la tabla 7 se recoge la muestra de futbolistas genotipados

Tabla 7: Masa corporal, estatura y porcentaje de grasa corporal (%G)

Categoría (n)	Masa corporal (kg)	Estatura (cm)	%G
Sub-15(68)	68,42 \pm 9,42	177,57 \pm 8,52	9,49 \pm 2
Sub-17(44)	73,3 \pm 6,79	181,3 \pm 7,04	9,15 \pm 1,89
Sub-20(115)	73,36 \pm 7,9	180,6 \pm 8,2	9,21 \pm 2,08
Adultos(95)	74,25 \pm 5,79	182,6 \pm 8,55	8,2 \pm 2,34

media \pm desviación típica

En la tabla 8 se muestran las frecuencias de los tres polimorfismos del gen ACTN3 en los futbolistas estudiados.

Tabla 8: Frecuencias genotípicas observadas para el locus ACTN3 en los futbolistas brasileños estudiados.

Categoría (n)	Genotipo		
	RR (%)	RX (%)	XX (%)
Sub-15(68)	25	32	11
Sub-17(44)	18	20	6
Sub-20(115)	50	50	15
Profesionales (95)	42	46	7
Total (322)	135	148	39
	0,419%	0,460%	0,121%

En la tabla 9, mostramos los datos de edad, talla y peso de los futbolistas que participaron en el experimento principal de este estudio 2.

Tabla 9. Datos antropométricos.

Genotipo	Edad	Peso (kg)	Altura (cm)	%G
ACTN3				
RR (15)	24,8 ± 1,7	79,9 ± 3,8	180,2 ± 5,2	9,9 ± 1,0
RX (13)	27,1 ± 2,9	74,5 ± 4,7	174,2 ± 3,7	8,2 ± 1,5
XX (9)	21,3 ± 5,8	72,4 ± 5,9	178,2 ± 7,4	7,1 ± 2,1

media ± desviación típica

METODOLOGÍA

Todos los sujetos fueron genotipados para el polimorfismo de la ACTN3 y divididos en grupos del mismo genotipo RR, RX y XX, a través de la técnica de RFLP-PCR (Polimerasa de cadena ramificada y polimorfismo de longitud de fragmento de restricción) con enzima de restricción (Ddel) después de la extracción del DNA. La extracción del DNA genómico de las muestras de sangre periférica fue realizada según el protocolo descrito en la literatura, con utilización de proteinasas K, seguida de precipitación salina (Miller *et al.*, 1988).

Un fragmento de DAN contenido en el exón 16 del gen ACTN3 fue amplificado a partir del DNA genómico y los iniciadores utilizado fueron : *forward*,5'CTGTTGCCTGTGGTAAGTGGG3';*inverso*,5'CACAGTATGCAGGA3', anclados en las secuencias intrónicas adyacentes (Mills *et al.*, 2001).

Posteriormente los fragmentos digeridos fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida 8%, coloreados con solución de nitrato de plata (Sambrook & Russel, 2001). El alelo ACTN3 577R genera fragmentos de 205 y 86 pares de bases (pb), mientras que el alelo ACTN3 577X genera fragmentos de 108, 97 y 86 pb (Yang *et al.*, 2003), (figuras 13 A y B).

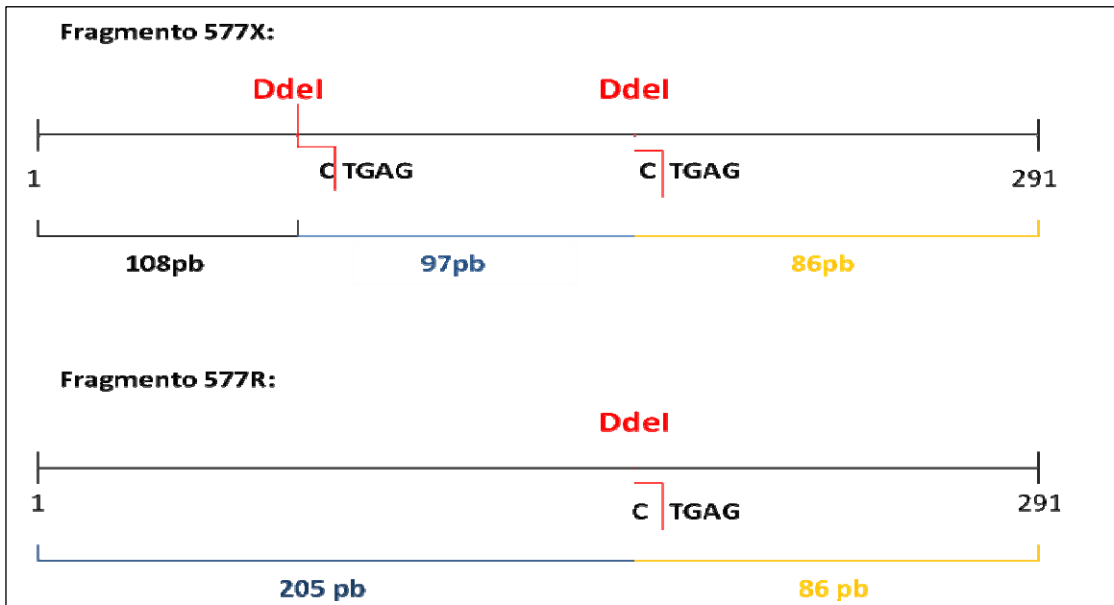
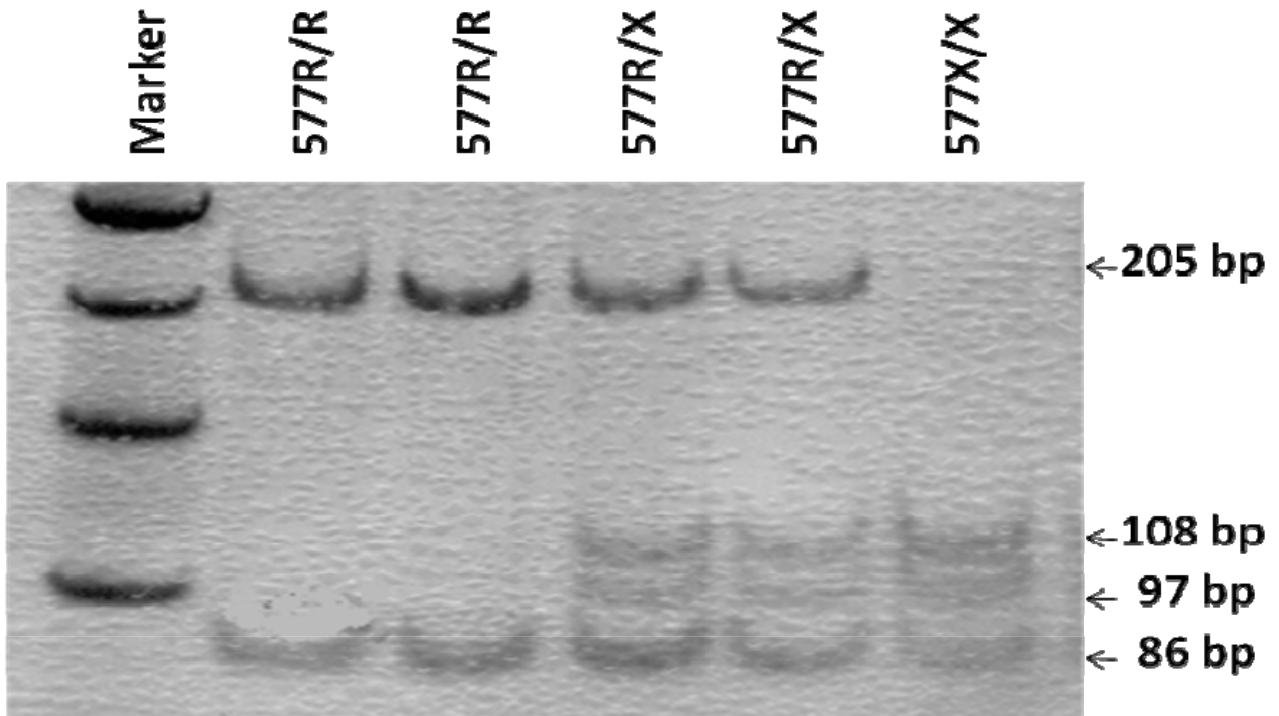


Figura 13 -. A) Esquema de restricción con enzima DdeI. B) Gel de poliacrilamida da restricción. Individuos con genotipo 577R/R presentan fragmentos a la altura de 205 e 86 pb; genotipo 577R/X, 205, 108, 97 e 86 pb; y genotipo 577X/X 108, 97 y 86 pb.

Determinación de Alfa-Actina

Las muestras de plasma fueron diluidas en solución tampón (pH 9,6). Placas con 96 pocillos fueron sensibilizadas con 100 μ L de las muestras diluidas durante 12h a 4°C, Después de este período todo el líquido fue retirado de las placas y fueron lavados suavemente con tampón de lavado. En seguida se realizó un bloqueo de uniones inespecíficas mediante la adición en cada pocillo de 100 μ L de PBS enriquecido con leche desnatada (Molico) a 2% durante 1h a 37°C.

Después de este período la placa fue nuevamente lavada con tampón de lavado y fue añadido el anticuerpo primario monoclonal anti- α -actina (St. Louis, USA, Sigma) diluido en la proporción 1:1000 en PBS-T (PBS + Tween-20 0,05%). Tras incubación durante 1 hora a 37°C, el anticuerpo primario fue retirado, y fue entonces adicionado el anticuerpo secundario policlonal en una dilución de 1:3000 PBS-T + leche al 2%. Tras dos lavados posteriores y adicionado el subtrato de ración (OPD 0,2 mg/ml en tampón citrato 0,2 g/L a pH de 5,0) y paralizado 20 minutos después con 20 μ L de H₂SO₄ 4N, realizándose lectura en lector de microplaca a 492nm.

Determinación de CK

La actividad de la CK fue medida mediante método enzimático colorimétrico, utilizado un Kit CN-NAC activado (Labtest Diagnóstica® AS, Brasil).

Determinación de Cortisol y testosterona

Los niveles de cortisol y testosterona fueron determinados por inmunoensayo quimioluminiscente (ADVIA Centaur® de Siemens, Eschborn, Alemania).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez verificada la normalidad de la distribución de las variables, fue aplicado un ANOVA para comparar las variables estudiadas entre los diferentes grupos genéticos. Para estudiar las diferencias entre los diferentes momentos en cada grupos, usamos el ANOVA de una vía de medidas repetidas con análisis post hoc de Tukey. Se fijó en nivel de significancia para una $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

En la tabla 10 se muestran las diferentes variables hormonales y de daño muscular en los cuatro momentos determinados, y se observa con claridad comportamientos diferentes en respuesta al ejercicio agudo, en función de los diferentes genotipos para el gen ACTN3.

Tabla 10. Marcadores de daño muscular y respuesta hormonal en relación al polimorfismo del gen ACTN3 (RR, RX, XX).

		Pré	Pós	2 horas	4 horas
IL-6 (pg/mL)	RR (15)	2,49 ± 1,17	3,02 ± 2,13	8,28 ± 2,24*#	5,91 ± 2,45*#
	RX (13)	3,48 ± 1,74	4,05 ± 2,63	6,91 ± 2,69 #	5,45 ± 2,21
	XX (9)	3,49 ± 1,38	3,97 ± 1,24	5,87 ± 1,45 #	3,62 ± 1,00
Alfa-actina (U/L)	RR (15)	87,57 ± 15,21	106 ± 31,28*#	105,70 ± 18,88*#	96,60 ± 12,21
	RX (13)	8,00 ± 13,12	112,4 ± 29,39*#	106,0 ± 20,85*#	98,00 ± 20,73
	XX (9)	102 ± 18,11	167,60 ± 31,47 #	158,30 ± 31,38 #	100,1 ± 31,72
Creatina Kinase (U/L)	RR (15)	344,40 ± 227,91	418,41 ± 199,6 #	344,40 ± 227,93	346,54 ± 227,94*
	RX (13)	363,72 ± 177,21	472,12 ± 230,3 #	363,72 ± 177,23 #	386,23 ± 161,25
	XX (9)	327,00 ± 197,35	395,72 ± 232,55 #	337,10 ± 187,37 #	523,76 ± 201,10 #
Cortisol (ug/dL)	RR (15)	10,08 ± 3,01	11,42 ± 2,73*#	10,32 ± 2,43	6,92 ± 3,04 #
	RX (13)	8,37 ± 2,79	12,45 ± 3,70*#	10,86 ± 2,91 #	7,75 ± 2,66
	XX (9)	8,10 ± 1,87	13,68 ± 2,77 #	8,73 ± 1,51	7,55 ± 2,40
Testosterona (ng/dL)	RR (15)	476,82 ± 130,42	433,43 ± 92,17*	350,92 ± 126,00 #	357,00 ± 132,61 #
	RX (13)	490,54 ± 93,29	371,42 ± 92,29	339,82 ± 122,72 #	412,53 ± 98,99
	XX (9)	524,32 ± 52,62	330,45 ± 52,96 #	417,61 ± 104,82 #	422,76 ± 103,56 #

Diferencia post – pre ejercicio (p<0,05). * Diferencia en relación al XX (p<0,05).

DISCUSIÓN:

Los resultados del presente estudio muestran que indicadores de daño muscular (actividad de la CK y la concentración de alfa-actina) son en general más altos en los sujetos XX después del ejercicio excéntrico en concordancia con los datos publicados por Vincent *et al.*, (2010) Y Chan *et al.*, (2008). Las alteraciones determinadas por la ausencia de alfa-actina-3 en las fibras tipo II, considerando que esa proteína además de la función mecánica tiene también una función como sensor metabólico (Lek *et al.*, 2010), dificultarían las respuestas musculares en contracciones excéntricas de alta potencia en los sujetos XX, lo que llevaría a una sobrecarga de estas fibras y consecuentemente a un cuadro catabólico.

La determinación de las respuestas endocrinas en pruebas de desempeño deportivo en pruebas de contacto no son infrecuentes. La testosterona y el cortisol fueron identificados como marcadores de confianza de la respuesta del sistema endocrino (Engelmann *et al.*, 2004; Kraemer *et al.*, 2009; Chatzinikolaou *et al.*, 2010; Ispirlidis *et al.*, 2008). La testosterona se emplea como el principal marcador anabólico para la síntesis proteica y de glucógeno muscular (Spiering *et al.*, 2008). El cortisol es considerado como una hormona de estrés y actúa de manera antagónica en respuesta a la acción de la testosterona mediando la actividad catabólica (Kraemer & Ratamess, 2005).

Pedersen & Hoffman-Goez (2000) afirman que la lesión muscular causada por el ejercicio está relacionada con aumentos de cortisol plasmático y probablemente tiene un papel en el mantenimiento de neutrófilos y linfopenia después del ejercicio intenso. Cunniffe *et al.*, (2010) muestran un aumento del cortisol tras un partido de rugby, resultados semejantes encontrados en

jugadores de fútbol (Ispiridis *et al.*, 2008, Avloniti *et al.*, 2007, Lac *et al.*, 2003), en que se verifica que durante la competición de rugby los niveles de cortisol aumentan respecto a los valores de reposo regresando a los mismos tras 4 horas, en consonancia con nuestros resultados. El grupo XX presentó mayores concentraciones de cortisol después del ejercicio, que los RR y RX.

Las citoquinas participan en el control de la respuesta inmune de la fase aguda, reacciones inflamatorias y en procesos de reparación en los tejidos. Inicialmente la elevación de la IL-6 era considerada una respuesta inflamatoria causada por el daño muscular. No obstante, se ha encontrado que otros factores como la duración, intensidad y tipo de contracción muscular implican un aumento de IL-6 independientemente de la inflamación o de la lesión muscular (Scheele *et al.*, 2009; Pedersen, 1998; Pedersen & Febbraio, 2008; MacIntyre *et al.*, 2001; Willoughby *et al.*, 2003). Ascensão *et al.*, (2008), Ispiridis *et al.*, (2008) e Andersson *et al.*, (2010), encontraron aumentos en las concentraciones de IL-6 después de juegos de fútbol en atletas profesionales. En el presente estudio el aumento de IL-6 fue hallado después del ejercicio presentando mayores concentraciones a las 2 horas continuando hasta 4 horas después del ejercicio. Este comportamiento también es encontrado al estudiar los diferentes polimorfismos del gen, por Chatzinikolaou *et al.*, (2010), Cunniffe *et al.*, (2010) y Dovic *et al.*, (2010), contrariamente a lo que nosotros encontramos en que la expresión de IL-6 en los grupos RR es superior al XX, a pesar de presentar menores niveles de marcadores de daño muscular que el XX. Este comportamiento podría ser explicado por la alta sollicitación neural y glucolítica en función de la habilidad mecánica para generar acciones musculares de alta intensidad en los individuos RR, llevando a una liberación

mayor de IL-6 para suplir la alta demanda metabólica promoviendo el aumento de glucogenolisis hepática y de lipólisis, lo que aumenta la oferta sistémica de glucosa y ácidos grasos libres y glicerol, contribuyendo al mantenimiento energético (Febbraio & Pedersen 2002; Fischer 2006; Febbraio & Pedersen 2005; Edwards *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES:

Primera: los jugadores de fútbol con genotipo ACTN3 RR y ACTN3 RX muestran una mayor aptitud para la fuerza y la velocidad en comparación con los que presentan un genotipo ACTN3 XX, sin embargo estos últimos muestran una mejor aptitud para la resistencia aeróbica.

Segunda: los jugadores de fútbol profesional homocigotos para el gen ACTN3 XX presentan un mayor estado catabólico evidenciado por las respuestas metabólicas, hormonales e inmunes después de un entrenamiento de carácter excéntrico en comparación con los grupos ACTN3 RR y ACTN3 RX.

Tercera: los entrenamientos excéntricos agudos promueven un aumento significativo en las variables hormonales e inmunológicas evidenciado por la alteración de la concentración de testosterona, cortisol y citoquinas IL6 tras el entrenamiento

Cuarta: la realización de entrenamiento excéntrico en las condiciones propuestas promueven una elevación en las actividades de las enzimas marcadores de daño muscular, especialmente la CK y la alfa-actina. Sin embargo la alfa-actina se muestra como un marcador más precoz debido a una liberación más rápida que la de la CK. Creemos que se necesitan más investigaciones sobre el uso como marcador de daño muscular en entrenamientos excéntricos y como posible variable para el control y planificación de las cargas del entrenamiento.

Quinta: nuestros hallazgos, al igual que la literatura científica, muestran que el entrenamiento intenso excéntrico produce daño muscular, lo que refuerza la importancia de la monitorización del entrenamiento deportivo mediante el uso de biomarcadores que permitan ajustar las cargas de entrenamiento de manera individualizada para aumentar los beneficios y disminuir las lesiones, mejorando el desempeño así como la salud y la calidad de vida de los deportistas.

1 INTRODUÇÃO

O recente avanço da biologia molecular, que tem como marco o completo sequenciamento do genoma humano em 2001 (Venter, 2003), aliado aos seus promissores resultados na prevenção, detecção, e tratamento de uma série de doenças, tem viabilizado sua utilização no meio esportivo buscando uma melhora no rendimento. Como será discutido posteriormente, no esporte de alto rendimento a biologia molecular pode ter papel importante na prescrição do treinamento e na recuperação de lesões.

Aletas de elite são reconhecidos como fenômenos esportivos e o potencial para atingir níveis superiores de desempenho no esporte está parcialmente sob o controle de genes. A excelência atlética é essencialmente multifatorial é determinada por complexas interações entre fatores ambientais e genéticos. Existem aproximadamente 10 milhões de variantes genéticas dispersas por todo o genoma humano e uma parcela destas variantes tem demonstrado influenciar a responsividade ao treinamento físico. Seguindo o raciocínio de que possibilidades genéticas podem afetar a responsividade ao treinamento físico, aproximadamente 240 genes específicos já foram identificados e mostraram influenciar os fenótipos de capacidade cardiorrespiratória, resistência, força, potência muscular e intolerância ao exercício físico (Bray *et al.*, 2009).

O exercício físico induz inflamação, evento que ocorre para promover o reparo e remodelamento tecidual após o trauma. A ativação do processo inflamatório é local e sistêmico, valendo-se para isso de diversas células e componentes secretados. O objetivo deste quadro é restabelecer a

homeostasia orgânica após uma única sessão ou após diversas sessões de exercícios. A resposta de fase aguda consiste em ações integradas entre leucócitos, citocinas, proteínas de fase aguda, hormônios e outras moléculas sinalizadoras que controlam a resposta tanto a uma sessão de exercícios como também direcionam as adaptações decorrentes do treinamento.

O estímulo do exercício físico gera um distúrbio da homeostase celular, que ativa proteínas quinases e fosfatases, envolvidas em vias de sinalização intracelulares. Estas, por sua vez, ativam a transcrição de genes específicos e a posterior síntese de proteínas. Nesse contexto, observa-se que o processo adaptativo induzido pelo treinamento físico sistematizado é decorrente de um efeito cumulativo da ativação destas vias, a cada sessão de treino.

Todas as diferentes vias são estimuladas durante o exercício e permanecem ativadas por poucas horas (2-3 horas) após o término da atividade. Já o processo de síntese protéica pode permanecer estimulado por mais de 24 horas, sendo influenciado em grande parte pela disponibilidade de nutrientes. Dessa forma, para que a resposta adaptativa seja positiva, é necessário um tempo de recuperação adequado. O fenótipo adaptativo resultante será determinado de acordo com a configuração do treino, dada pela manipulação de variáveis, como a intensidade, volume e pausas. A manipulação dessas variáveis desencadeará respostas distintas, de acordo com o tipo de fibras recrutadas, magnitude de microtraumas gerados na musculatura, respostas hormonais distintas, magnitude de alterações nas concentrações de metabólitos, e o tempo de duração destas alterações. (Matsakas A & Patel K, 2009)

O futebol é um esporte dinâmico e uma de suas principais características é o contato físico dos atletas, fato que relaciona esse às ocorrências de lesões. Evidências comprovam que a maioria dessas lesões ocorre em ações motoras que não envolvem contato físico e que grande parte destas é resultante de treinamentos direcionados e específicos a uma determinada capacidade física. O futebol sofreu diversas mudanças nos últimos anos, principalmente em relação às exigências físicas, levando os atletas próximos ao máximo de seus limites de exaustão, e predisposição a lesões.

Na copa do mundo *FIFA* 2002 a incidência de lesões durante as partidas foram de 50,7 por 1000 h jogadas, enquanto na copa do mundo *FIFA* de 2006 essa prevalência foi de 45,9/1000 horas. Já na copa do Mundo da África do Sul em 2010 observou-se 40,1/1000 horas (Dvorak J *et al.*, 2010). Esta redução gradativa no número de lesões observada nestes eventos esportivos segundo os autores é resultado de uma maior atenção das comissões técnicas a estratégias voltadas a prevenção das lesões, e a uma atuação mais rigorosa da arbitragem e consequente redução de jogadas desleais.

Assim, diferentes estudos científicos com objetivo de minimizar as perdas técnicas e financeiras decorrentes do afastamento dos atletas de treinamentos e competições têm sido realizados (Arnason A *et al.*, 2007).

Tais prejuízos podem ser ainda maiores em fases decisivas das competições, uma vez que os treinadores podem ter menos opções para escalar suas equipes ou os jogadores considerados fundamentais não se encontram disponíveis para o jogo.

Sua prática induz adaptações fisiológicas em quase todos os sistemas corporais, particularmente no músculo esquelético e cardiorespiratório, influenciadas pela intensidade, volume, intervalo de recuperação e frequência de treinamento. Um dos maiores desafios encontrados por fisiologistas e preparadores físicos se dá quanto à dosagem correta de treinos. A elaboração de programas se faz com um bom controle de variáveis. Estímulos decorrentes de exercícios físicos causam adaptações nas células musculares, denominadas microlesões, contudo uma nova repetição de estresse nesse músculo pode levar a uma contusão muscular, afastando temporariamente o atleta de suas atividades diárias. Ainda seguindo esse raciocínio, o que se verifica é que na maioria dos casos, os atletas são submetidos a cargas de exercícios acima dos limites suportáveis. Outro ponto preocupante se dá em função dos preparadores físicos basearem-se apenas na intuição pessoal, vivências passadas enquanto atletas, e não em conhecimentos científicos, podendo colocar em risco a saúde do atleta, assim como a desconsideração do Efeito Posterior Duradouro do Treinamento (Knifs *et al.*, 2008).

O treinamento no futebol, com suas características, representa uma intensidade de esforço parecida para todos os praticantes, no entanto pode ser que o perfil genético específico dos atletas interfira na demanda imposta a estes praticantes de forma diferente, explicando as grandes variações existentes nas respostas individuais aos programas de treinamentos e jogos. (Wolfarth *et al.*, 2005).

Em um jogo de futebol, a distância percorrida é em média de 10 km (Bangsbo & Lindquist, 1992; Ekblom, 1986; Rienzi *et al.*, 2000), a uma intensidade média de 70-80% do $VO_{2máx}$, (Bangsbo; 1994), 165 bpm ou 85% da

frequência cardíaca máxima (%FC_{máx}) (Krustrup *et al.*, 2005; Helgerud *et al.*, 2001; Mortimer *et al.*, 2006).

O futebol é um esporte coletivo caracterizado por esforços intermitentes e de alta intensidade. Esta modalidade é caracterizada pela grande presença de saltos, disputas de bola, sprints, frenagens, acelerações e mudanças de direção, que ocorrem a cada 2-4s em um total de 1200-1400 vezes durante uma partida (Stolen *et al.*, 2005; Greig *et al.*, 2006; Sporis *et al.*, 2010). Estas ações demandam de força e, em especial, no regime excêntrico (Mougios, 2007). Estas ações em treinamentos, jogos ou testes que simulam as respostas fisiológicas do futebol (Sunderland *et al.*, 2008, Magalhães *et al.*, 2010; Greig *et al.*, 2006; Sari-Sarraf *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2009; Twist & Eston 2005) estão relacionadas com o aumento do dano muscular e resposta inflamatória caracterizada por infiltração de fagócitos no músculo, produção de radicais livres, elevação de citocinas, elevação de proteínas contráteis no sangue além de alterações hormonais (Clarkson & Hubal 2002; Ispirlidis 2008; Chatzinikolaou *et al.*, 2010; Ascensão *et al.*, 2008; Andersson *et al.*, 2010).

Têm-se buscado a identificação de marcadores fisiológicos que representem a demanda fisiológica imposta aos esportistas ao longo dos anos. Destes, pode-se citar fatores indicativos de microtraumas musculares como a creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), fragmentos da cadeia pesada de miosina (MHC), troponina-i e mioglobina (Brown, 1997). No entanto estes marcadores apresentam problemas quanto a sua sensibilidade, reprodutibilidade e/ou especificidade, comprometendo a validade externa das investigações realizadas, sendo sugerida a alfa-actina como um candidato a

esse marcador músculo-específico do dano muscular decorrente da demanda músculo-esquelética (Martínez-Amat *et al.*, 2005; Martínez-Amat *et al.*, 2007, Vicent *et al.*, 2010).

Outros fatores do monitoramento da demanda fisiológica imposta aos praticantes na atualidade são as interleucinas em especial a (IL-6) (Steinacker *et al.*, 2004), associada à magnitude da exigência metabólica da atividade em resposta a inflamação (Febbraio; Pedersen, 2002; Pedersen; Febbraio, 2008) e parâmetros hormonais, como concentrações de cortisol e testosterona (Uchida *et al.*, 2004; Cormack *et al.*, 2008).

Além de influenciar diretamente nos fenótipos musculares, os fatores genéticos também podem interferir na resposta ao treinamento (Thomis *et al.*, 1998; Beunen & Thomis, 2004; Thomis *et al.*, 2004; Brutsaert & Parra, 2006, Clarkson *et al.*, 2005a; Delmonico *et al.*, 2007; Norman *et al.*, 2009; Ogura *et al.*, 2009). O rendimento esportivo em atividades de predominância de força e velocidade tem sido associado ao gene ACTN3 que é responsável pela expressão da alfa-actinina-3 (ACTN3). Os genótipos que expressam a alfa-actinina-3 (ACTN3-RR e RX) têm sido relacionados a atividades com predominância de força e velocidade (Macarthur *et al.*, 2008; Macarthur & North, 2004, 2007; Moran *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2010; Santiago *et al.*, 2008; Mccauley *et al.*, 2009), como no caso do futebol (Santiago *et al.*, 2008). O genótipo que não expressa a alfa-actinina-3 (ACTN3-XX) tem sido associado a atividades de predominância de resistência aeróbia (Gómez-Gallego *et al.*, 2009, Ahmetov *et al.*, 2008; Saunders *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2008; Lucia *et al.*, 2006).

A organização estrutural e a manutenção do aparelho muscular contrátil dependem de complexos protéicos que ligam os sarcômeros entre si. Nesse contexto, a alfa-actinina constitui a proteína onipresente predominante para essa função (Wang *et al.*,2005). Essa proteína é um componente da linha Z sarcomérica (MacArthur & North, 2004) que cria ligações cruzadas de ancoramento entre actina-actina. Por essa razão, pode ser considerada como um importante elemento estrutural na geração e transmissão de força contrátil do músculo, bem como na manutenção das matrizes miofibrilares (Ogura *et al.*,2009; Linneman *et al.*,2010; Lek *et al.*,2010; Clarkson *et al.*,2005; Vincent *et al.*,2007; Vincent *et al.*,2010, Seto *et al.*,2011).

North *et al.*,(1999), identificaram no gene alfa-actínina-3 (ACTN3) a mudança do nucleotídeo C pelo T na posição / 1.747 do éxon 16, isto é, uma mutação resultante na conversão do aminoácido arginina em um stop códon prematuro no resíduo 577 (R577X) (Scott *et al.*,2001). A variante R577X resulta em duas versões do gene ACTN3 em humanos, um funcional alelo R e um nulo alelo X. Mais de um bilhão pessoas no mundo são homozigotos para a R577X alelo nulo apresentando o genótipo XX, não expressando a ACTN3 em seu músculo esquelético. (MacArthur & North 2004).

Sabe-se que a ACTN3 é expressa nas fibras de contração rápida tipo II responsáveis pela geração de força contrátil em alta velocidade (MacArthur *et al.*,2008; MacArthur & North 2004;2005;2007; Lucia *et al.*,2006; Mills *et al.*,2001; Scott *et al.*,2001; Vincent *et al.*,2010). Em função das propriedades mecânicas e metabólicas da ACTN3 no processo de ancoramento dos filamentos de actina na linha Z, tem sido postulado que ela pode conferir maior capacidade de absorção e transmissão da força nas fibras tipo II promovendo

uma proteção maior contra danos musculares (Mills *et al.*,2001; Vicent *et al.*,2010; MacArthur & North 2004; Linnemann *et al.*,2010, Seto *et al.*, 2011). A identificação da pré-disposição genética dos atletas de futebol traz informações importantes para a comissão técnica no planejamento individualizado das cargas de treinamento, em especial sobre o curso de tempo de mudanças na fase aguda inflamatória e de dano muscular tendo em vista que alguns treinamentos, e os jogos, são de caráter coletivo. Tal fato justifica-se porque alguns atletas não pré-dispostos geneticamente podem ser super exigidos nos treinamentos ou apresentando recuperação parcial em comparação aos seus colegas.

Contemplando todo o presuposto apresentado o presente estudo se desenhou com fim de estabelecer os possíveis efeitos do gene ACTN3 em respostas motoras e de dano muscular em atletas de futebol.

2. ANTECEDENTES

2.1 DNA COMO REGULADOR DO FUNCIONAMENTO DO ORGANISMO

Antes de discutirmos efetivamente a relação do esporte de alto rendimento com a biologia molecular, é importante revisar alguns conceitos. O primeiro é o chamado dogma central da biologia molecular, segundo o qual o código da vida está contido no DNA e por meio dele é transmitido às diferentes gerações. Inicialmente ocorre a transcrição, processo no qual o código do DNA é transmitido ao RNA mensageiro. A seguir, pelo fenômeno conhecido como tradução, as moléculas de RNA mensageiro são lidas, fornecendo a informação da ordem na qual os aminoácidos serão integrados para formar as proteínas no citoplasma das células, tendo os ribossomos como organelas fundamentais nesse processo. Finalmente, por meio de fosforilação, nitrosilação e glicosilação, ocorrem ajustes finos nas proteínas, que, além de fazerem parte da estrutura do organismo, participam de uma série de processos cruciais ao ser vivo, como: degradação de substratos metabólicos; geração de energia; síntese protéica; recepção do sinal de hormônios e de neurotransmissores; transporte de substâncias por meio de canais na membrana das células; geração de tensão nas células musculares; e regulação da duplicação e da morte celular programada. Portanto, qualquer alteração nos processos de transcrição e/ou tradução pode alterar a quantidade e/ou a qualidade das proteínas no organismo e, conseqüentemente, alterar seu funcionamento, inclusive quando o organismo é submetido ao esporte de alto rendimento (Alberts *et al.*, 2007.)

No DNA, toda informação é armazenada em apenas quatro nucleotídeos – citosina, guanina, adenina e timina. Cada sequência desses nucleotídeos capaz de, após os processos de transcrição e tradução, dar origem a uma proteína é denominada *gene*. Até o momento foram identificados cerca de 30 mil genes, distribuídos nos 46 cromossomos do DNA do núcleo de cada célula, dos quais 23 são provenientes da mãe e 23 do pai. (Wolfarth *et al.*, 2005).

As moléculas de RNA mensageiro formadas por meio do processo de transcrição têm quatro nucleotídeos (guanina, citosina, uracila e adenina, respectivamente) correspondentes às do DNA, citadas previamente. Durante o processo de tradução, os nucleotídeos do RNA mensageiro são lidos de três em três, e cada tríplice é denominada *códon*. Como há apenas vinte aminoácidos, até quatro códons diferentes podem corresponder a um mesmo aminoácido (Alberts *et al.*, 2007).

Como será discutido posteriormente, alterações na sequência dos nucleotídeos do DNA podem ter como resultado um perfil diferente de expressão protéica, tendo como consequência alterações no funcionamento do organismo.

Apesar de cerca de 99,9% da sequência do DNA ser igual entre quaisquer seres humanos, a variação restante é responsável pela determinação de parte de nossas características físicas, nossas habilidades e até mesmo nossas respostas a tratamentos farmacológicos e à prática de exercícios físicos (Alberts *et al.*, 2007). Qualquer alteração na sequência de nucleotídeos no DNA é denominada *mutação*. Como até quatro códons diferentes podem corresponder a um mesmo aminoácido, a mutação de uma base nitrogenada pode não resultar na alteração do aminoácido codificado. Nesse caso a mutação é chamada de *silenciosa*. Mesmo que haja alteração no aminoácido, isso pode resultar ou não em uma

mudança funcional da proteína. Há três tipos possíveis de mutação de uma base nitrogenada – ela pode ser inserida, deletada ou substituída no DNA. Como na tradução os nucleotídeos são lidos de três em três, a deleção ou inserção de apenas um nucleotídeo alterará todos os códons posteriores ao local da alteração. Outro conceito importante é o de polimorfismo, que pode ser definido como qualquer variação genética presente em mais de 1% da população. O tipo mais comum de polimorfismo é o “single nucleotide polymorphism (SNP)”, que é a troca de apenas um nucleotídeo (Rebbeck *et al.*, 2004).

2.2 GENÉTICA, FENÓTIPOS MUSCULARES E ATIVIDADE FÍSICA

A identificação da estrutura do ácido desoxirribonucléico (DNA), por James Watson e Francis Crick, em 1953, e o rápido avanço das técnicas de biologia molecular tornaram possível a identificação de sequências variantes no DNA de genes específicos, relacionando tal heterogeneidade gênica a diferentes fenótipos (Wolfarth *et al.*, 2005).

O DNA humano contém aproximadamente 3,1 bilhões de pares de bases (A – adenina; G – guanina; C – citosina; T – timina) divididos em 20-25 mil genes. Após transcrita, a sequência de nucleotídeos de cada gene é traduzida em uma sequência polipeptídica, dando origem a uma proteína específica.

O genoma humano contém quase 10 milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*) (Rankinem *et al.*, 2010). O Polimorfismo é descrito como alterações na sequência de DNA que modificam a função ou a expressão de uma proteína, ocorrendo na população com frequência igual ou superior a 1%. No entanto, nem todos os SNPs são

reconhecidos como funcionais, ou seja, nem todos tem potencial em afetar a expressão de um gene ou a função da proteína codificada por um gene mutante. Sendo assim, dentre as quase 10 milhões de variantes genéticas existentes, apenas uma parcela delas poderia influenciar um fenótipo específico (Rebbeck *et al.*, 2004).

As diferenças genéticas baseadas em polimorfismos, com potencial em afetar a aptidão e o desempenho físico humano, começaram a ser investigadas nos anos de 1990 (Rankinen *et al.*, 2001). Atualmente existem cerca de 240 genes que estão associados com os fenótipos de boa forma física relacionada à saúde e os fenótipos de desempenho físico humano (Bray *et al.*, 2009). Fatores ambientais, como dieta e exercício, têm um papel importante no desenvolvimento da função e morfologia do músculo esquelético, no entanto, esses fatores sozinhos não conseguem explicar por completo as variações nos fenótipos musculares. Devido à contribuição de estudos das últimas duas décadas, atualmente se tem a comprovação de que uma parte importante das variações destes fenótipos é devida a fatores genéticos (Dias, 2011).

Deste modo o exercício pode ser uma variável a ser controlada nas pesquisas sobre os efeitos genéticos em determinados fenótipos. Outra forma de se analisar a interação entre fatores genéticos e ambientais é comparar a diferença de resposta entre determinados genótipos, pois a resposta ao exercício é altamente variável entre os indivíduos, o que também pode ser mediado por variações genéticas (Bray, 2000). Portanto, além de influenciar diretamente nos fenótipos musculares, se reconhece que os fatores genéticos podem interferir na resposta ao treinamento (Thomis *et al.*, 1998; Beunen & Thomis, 2004; Thomis *et al.*, 2004; Brutsaert & Parra, 2006).

As pesquisas relativas à associação entre genética e exercício normalmente envolvem investigações de genes que afetam medidas reconhecidamente influenciadas pelo exercício, como massa muscular, densidade mineral óssea, força muscular, etc. (Dias, 2007). Para que os resultados das pesquisas sejam mais precisos, as buscas são baseadas nos efeitos biológicos dos genes, de modo a selecionar fatores associados diretamente aos fenótipos estudados. Nesse sentido, um dos fatores genéticos que tem recebido destaque por sua suposta influência nos níveis de força e massa muscular é o gene da ACTN3 (Yang *et al.*, 2003; Clarkson *et al.*, 2005; Niemi & Majamaa, 2005; Rankinen *et al.*, 2010). É importante ressaltar que múltiplos fatores biológicos e ambientais influenciam também o rendimento esportivo e que a análise de um único gene de forma isolada, não necessariamente determina o fenótipo de um atleta (Macarthur & North, 2005,2007). Ainda assim, considerando todos os fatores ambientais na formação do atleta, entre os esportistas de mais alto nível competitivo, pode ser que a expressão genética seja o fator de diferenciação entre eles.

2.3 ALFA-ACTINA 3 (ACTN3) E SUAS RELAÇÕES COM OS FENÓTIPOS ESPORTIVOS.

As alfa-actinas (ACTN) figura1, são uma família de proteínas relacionadas à distrofina que se ligam à actina e são importantes para a ligação e fixação dos miofilamentos (North & Beggs, 1996; Mills *et al.*, 2001). Quatro genes para alfa-actina foram encontrados em humanos: ACTN1, ACTN2, ACTN3 e ACTN4. As ACTN1 e ACTN4 são proteínas não-musculares presentes nos rins e tecidos

cancerígenos (Honda *et al.*, 1998), enquanto as ACTN2 e ACTN3 são proteínas miofibrilares localizadas no disco Z. figura 1.

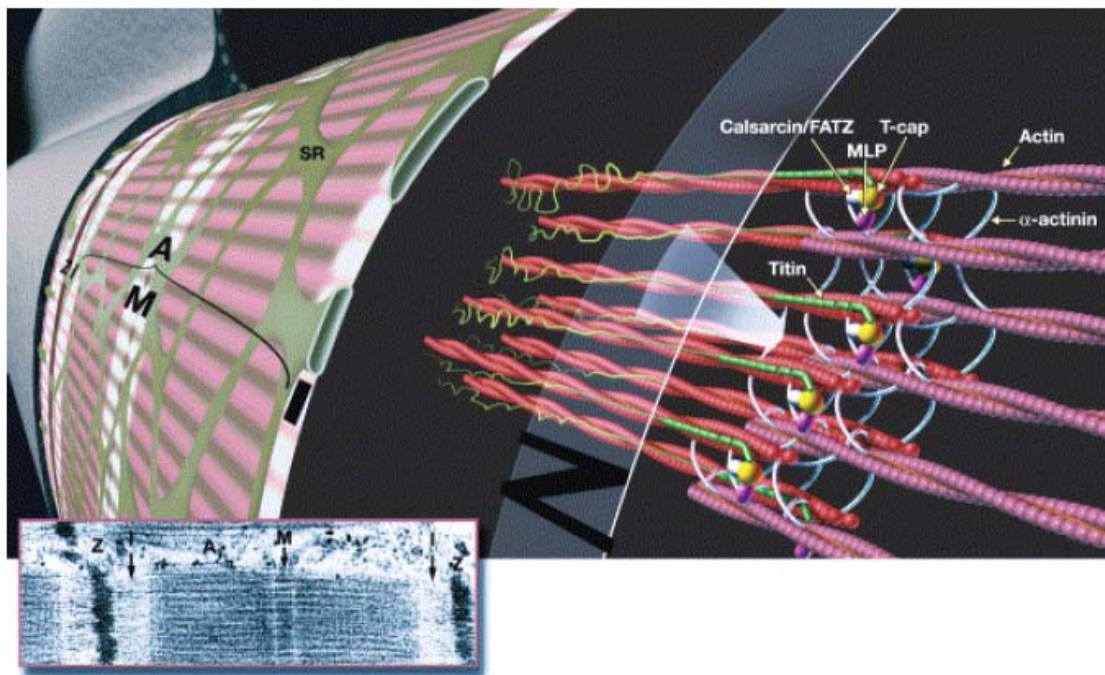


Figura 1. Arquitetura do disco Z. (Z), o disco Z; (M), a linha M; (A), banda A, (I), banda I; (SR), retículo sarcoplasmático. Figura de (Epstein e Davis, 2003) Observe a localização específica de alfa-actinina no disco Z.

A ACTN3 é uma isoforma característica das fibras rápidas, expressa apenas nas fibras tipo II (Beggs *et al.*, 1992; North *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2001), as quais são responsáveis pela geração de contrações rápidas e intensas, como em atividades de sprint e levantamento de peso. As funções exatas da ACTN3 ainda não são conhecidas, mas sugere-se que ela tenha função estrutural na manutenção da integridade mecânica e na contração muscular (Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North, 2007), podendo também influenciar na tipologia das fibras (Vincent *et al.*, 2007). Esta proteína é parte do mecanismo contrátil das fibras rápidas e duas de suas principais funções são unir os filamentos contidos na actina e estabilizar o aparato contrátil do músculo (Beggs *et al.*, 1992; Squire,

1997; MacArthur & North, 2004). Além do papel mecânico, as alfa-actinas também interagem com proteínas envolvidas na sinalização e metabolismo muscular (Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North, 2004). O gene ACTN3 localiza-se no cromossomo 11q13-q14 e foi clonado por Beggs *et al.*, (1992). Posteriormente, um polimorfismo funcional no gene ACTN3 foi identificado em humanos por North *et al.*, (1999). O polimorfismo, definido pela troca entre Citosina e Timina na posição 1747 do éxon 16, resulta na troca de Arginina (alelo R) por um códon de terminação (alelo X) no aminoácido 577, sendo identificado como R577X. A mutação leva à ausência de detecção da proteína em indivíduos homocigotos para o alelo X (North *et al.*, 1999), provavelmente porque a proteína truncada é rapidamente degradada pelo organismo (MacArthur & North, 2004). Apesar da frequência dos alelos diferir entre populações, estima-se que aproximadamente 16% a 21% da população seja homocigotos para o polimorfismo não-funcional XX (North *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North, 2007; Moran *et al.*, 2007; Papparini *et al.*, 2007).

O genótipo XX não causa mudanças histológicas aparentes, o que sugere que a presença da proteína não seja crítica para as funções musculares (North & Beggs, 1996), de modo que as variações ocorram dentro dos limites da normalidade (MacArthur *et al.*, 2008). Tal fato pode ser explicado por uma possível redundância funcional entre as proteínas ACTN2 e ACTN3, de modo que, na ausência de ACTN3, a ACTN2 pode compensar seus efeitos (North *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North, 2004, 2007). Apesar da compensação aparente, deve-se levar em conta que o gene ACTN3 foi altamente conservado ao longo da evolução humana, sendo que a divergência entre ACTN2 e ACTN3 ocorreu há cerca de 300 milhões de anos (Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North,

2004), o que sugere que alguns efeitos do ACTN3 não podem ser compensados pelo ACTN2. (Seto *et al.*, 2011).

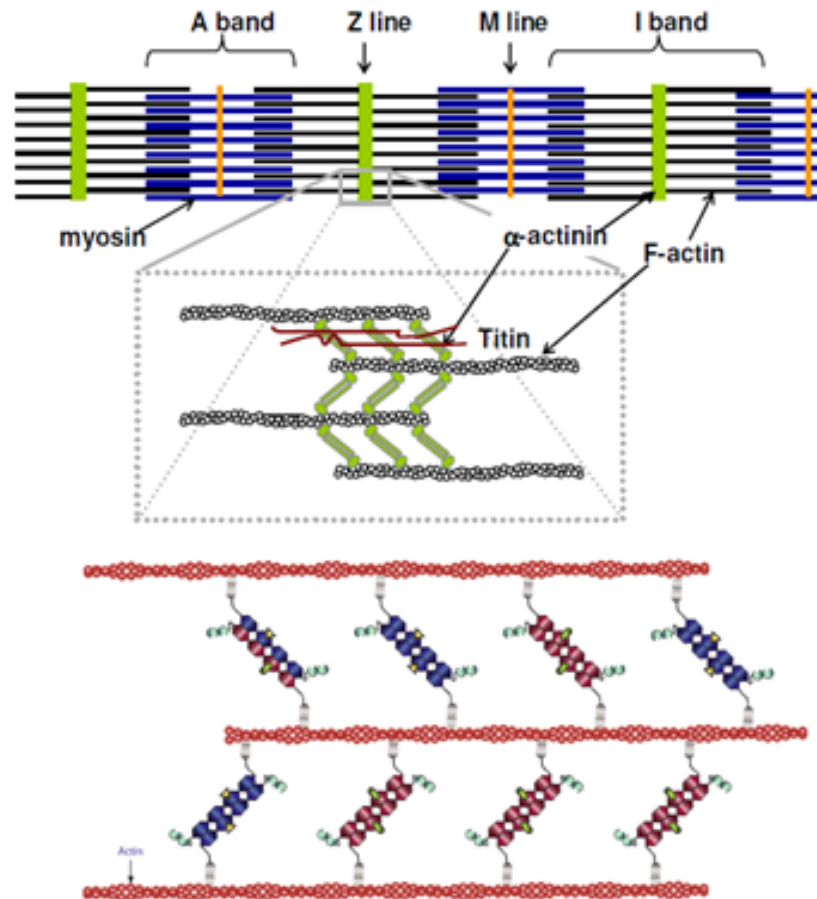


Figura 2. Esquema de um sarcômero sob microscópio eletrônico. A linha M corresponde ao local onde os diferentes filamentos de miosina se sobrepõem. A linha Z em ambas as linhas são as extremidades dos sarcômeros. Proteínas como actinina (ACTN2 azul, ACTN3 vermelho) ou titina são as responsáveis pela fixação de diferentes filamentos de actina. Fonte: (Lek & North 2010)

Além disso, é possível que a ausência de ACTN3 possa influenciar a atividade da calcineurina (Yang *et al.*, 2003), a qual se liga à alfa actina na linha Z pelas calsarcinas (Frey *et al.*, 2000; Frey & Olson, 2002). A calcineurina é um importante sinalizador celular, cuja ativação contribui para a hipertrofia muscular e diferenciação de fibras (Sakuma & Yamaguchi, 2010).

Finalmente, as alfa-actininas sarcoméricas interagem com as enzimas metabólicas, incluindo a fosforilase da enzima glicogenolítica e a frutose das

enzimas 1- 6 bisfosfotases e aldolase. A ligação das enzimas metabólicas para as proteínas citoesqueléticas, são um mecanismo comum da regulação das enzimas, e é possível que o funcionamento destas estas enzimas na linha Z sarcomérica pela la alfa-actinina contribua para a disponibilidade local de metabólitos para areparo tecidual. (MacArthur & North,2004; MacArthur *et al.*, 2007, Lek & North 2010; Chan *et al.*, 2011; Quinlam *et al.*, 2010; Seto *et al.*, 2011).

Dentre os possíveis mecanismos responsáveis pela interação entre o gene ACTN3 e os fenótipos musculares estão: 1) alterações na propriedade contrátil dos sarcômeros das fibras tipo II, 2) efeitos na diferenciação dos tipos de fibra ou hipertrofia por meio da interação indireta entre o ACTN3 e proteínas sinalizadoras como a calcineurina; 3) modificação da habilidade de resistir ou recuperar de lesões induzidas pelo exercício; 4) mudanças no metabolismo muscular por meio de interações com enzimas como a frutose 1,6-bifosfatase e fosforilase (MacArthur & North, 2004). Nenhum desses mecanismos é mutuamente exclusivo e é mais provável que o mecanismo real envolva diversos desses processos. (Berman & North, 2010).

Com a finalidade de testar se o genótipo ACTN3 seria associado a variações na função muscular em humanos, alguns autores estudaram a distribuição dos diferentes genótipos em atletas de diversas modalidades. Yang *et al.*,(2003) examinaram o genótipo ACTN3 em 429 atletas de elite australianos e de 436 controles (figura 3). Em homens, o genótipo XX foi encontrado em 16% dos controles não atletas, mas apenas em 8% dos atletas envolvidos com modalidades que requerem esforços de alta intensidade e curta duração, sendo que entre os atletas de nível olímpico, não havia nenhum portador do genótipo XX. Nas mulheres, 20% dos controles possuíam o genótipo XX e nenhuma atleta

de modalidades de sprint ou potência foi identificada como homozigoto XX. Estes resultados sugerem que a presença da proteína ACTN3 seja associada com o desempenho de atividades que exijam contrações musculares intensas e por períodos de tempo relativamente curtos. Ao contrário do verificado em atletas de sprint ou potência, os resultados revelaram que o alelo X é mais frequente em atletas de endurance nesse grupo, 20% dos homens e 29% das mulheres foram identificados como homozigotos XX, enquanto que em não-atletas os valores foram de 16% e 20%, respectivamente.

Resultados similares aos obtidos por Yang *et al.*, (2003) foram reportados em um estudo com atletas finlandeses, o qual compararam a frequência do polimorfismo ACTN3 em 68 atletas de sprint, 40 de endurance e 120 não-atletas (Niemi & Majamaa, 2005). As análises revelaram uma redução na frequência do genótipo XX em atletas de sprint e aumento (não significativo) em atletas de endurance. É importante ressaltar que, tanto no estudo de Yang *et al.*, (2003) quanto de Niemi & Majamaa (2005), as tendências de diferença na distribuição dos genótipos foram mais evidentes nos competidores de nível mais alto.

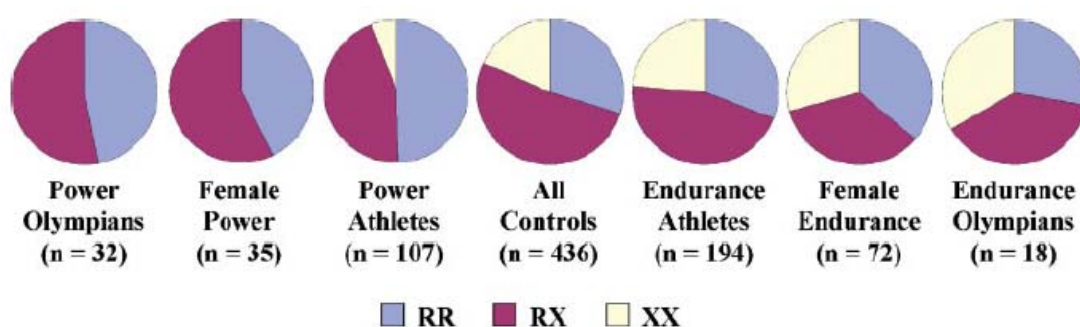


Figura 3. Frequências dos três genótipos ACTN3 R577X nos controles e atletas de elite. Atletas do sexo feminino e atletas que competiram em um nível olímpico são mostrados como grupos separados para potência e resistência. Diferenças significativas de frequências genotípicas nos controles foram observadas para os atletas de potência total ($P < 0,0001$), atletas de força do sexo feminino ($P < 0,05$), atletas olímpicos de potência ($P < 0,01$) e atletas femininas de resistência ($P < 0,05$). Fonte: (Yang, 2003)

Moran *et al.*,(2007) avaliaram a associação do ACTN3 com o desempenho muscular em 525 adolescentes do sexo masculino e 467 do sexo feminino, com idade entre 11 e 18 anos. Os autores reportaram que o desempenho no teste de 40 m foi menor para portadores do genótipo XX do sexo masculino, mas não houve diferenças no sexo feminino. Os resultados não foram significativos para os demais testes, como força de preensão manual, arremesso de bola de basquete e salto vertical.

Também não houve associação dos genótipos com os resultados da avaliação de composição corporal. Rodriguez *et al.*(2010), não encontraram associação entre os resultados dos testes de potência de saltos e velocidade com os genótipos ACTN3 em 281 jovens não atletas. Em um estudo com atletas gregos, Papadimitriou *et al.*,(2008) examinaram as diferenças na distribuição dos polimorfismos R577X entre praticantes de diferentes modalidades (73 de potência e 28 de resistência) e um grupo de 181 não atletas. De acordo com os resultados, os atletas de potência possuíam maior frequência do genótipo RR do que a população em geral (49,94% vs. 25,97%). Os resultados foram ainda mais proeminentes quando se comparou especificamente os velocistas (corredores de provas de 100 a 400m) nos quais o genótipo RR estava presente em 73,53% dos avaliados.

Roth *et al.*,(2008) examinaram a frequência do genótipo XX em fisiculturistas e atletas de força brancos e negros (n = 79) em comparação com a população geral (n = 886). De acordo com os resultados das análises em caucasianos, a frequência do genótipo XX foi menor em atletas (9,7%) em comparação com controles (19,9%). Nenhum atleta negro possuía o genótipo XX,

no entanto, a diferença para o grupo controle não foi significativa devido à baixa frequência do genótipo nesse grupo (4,8%). Druzhevskaya *et al.*,(2008) apresentaram um estudo que envolveu 486 atletas russos de força e potência, comparados com 1.197 controles. A frequência do genótipo XX foi menor nos atletas em comparação com controles (6,4 vs. 14,2%) sendo que a menor frequência foi encontrada no grupo de atletas de alto nível; dentre os 29 atletas de elite, apenas um apresentou o genótipo XX.

A distribuição de genótipos ACTN3 foi avaliada em 155 atletas israelenses e 240 indivíduos sedentários por Eynon *et al.*,(2009). Os autores reportam que a distribuição do genótipo RR foi significativamente maior em velocistas (52%) do que em fundistas (18%) e sedentários (27,3%). Análises adicionais revelaram que em velocistas de alto nível, a frequência do alelo R é maior do que nos atletas de nível nacional. Por outro lado, uma maior proporção do genótipo XX foi encontrada em fundistas (34%) comparados com controles (18%) e velocistas (13%).

Ruiz *et al.*, (2010) genotiparam 66 atletas de elite de voleibol masculinos e femininos e compararam com os resultados dos testes de força e potência (Squat Jump e Counter Moviment Jump). Diferentemente do presente estudo os autores sugerem que as expressões do gene ACTN3 não influem diretamente na manifestação de força e potência em atletas de voleibol. No estudo supracitado, o autor utilizou um teste de salto com o intuito de verificar a potência dos jogadores. Como este é um movimento básico desta modalidade esportiva, acredita-se que, com o treinamento, o potencial genético possa não ter sido diferencial no seu respectivo fenótipo.

Santiago *et al.*,(2009) compararam o polimorfismo R577X ACTN3 com os resultados dos testes de saltos (squat jump e counter moviment jump) e os tempos de sprints de 30 metros em 284 indivíduos não atletas jovens. Os resultados mostraram que a deficiência da alfa-actinina-3 não influenciou negativamente nos resultados do testes de potência. McCauley *et al.*,(2009) não relataram associação entre os genótipos ACTN3 R577X e torque de alta velocidade dos músculos extensores do joelho em homens adultos.

Saunders *et al.*,(2007) avaliaram 457 triatletas de provas de *Ironman* e estes foram divididos de acordo com o seu rendimento na prova como rápidos, médios e lentos e foi feita a comparação do ACTN3-XX com os mesmos e um grupo controle de 143 indivíduos. Não foi encontrada diferença entre os alelos (X ou R) e nem entre os genótipos (XX, RX, RR) entre os grupos concluindo no estudo que não houve relação entre o desempenho em provas de resistência com o alelo X e o genótipo ACTN3-XX.

Quando foram avaliados os corredores jamaicanos e americanos com o objetivo de justificar os resultados positivos das olimpíadas de Pequim, em que todos os finalistas das corridas de velocidade eram destes países, não foram encontradas diferenças entre os atletas e uma amostra de pessoas de mesma nacionalidade, mas foram identificadas baixas frequências de ACTN3-XX na população. Esse perfil genético é pré-disposto para eventos de força e velocidade. Tal fato identifica que a população dessas nações como um todo, possui aptidão para esportes desta característica. (Scott *et al.*, 2010). Santiago *et al.*,(2008) verificaram que os genótipos e a frequência dos alelos de atletas de futebol genotipados para o gene ACTN3 comparados com indivíduos sedentários, e atletas de resistência, foram significativamente diferentes. Foi determinado que

a frequência do genótipo RR foi maior no grupo de jogadores em comparação ao grupo controle e de atletas de resistência e a frequência de RX apresentou o papel inverso. Além desse fator, foi identificado que a proporção de atletas RR nos jogadores da primeira divisão foi maior em comparação com as categorias inferiores e mesmo que somente dois jogadores XX tenham sido determinados entre os jogadores da primeira divisão (11%), isso não foi diferente do grupo controle (~18%). A frequência alélica representou que o alelo R foi maior nos jogadores de futebol em comparação com os outros dois grupos. Estes resultados revelam uma relação direta com a dinâmica e característica do jogo de futebol com as necessidades físicas dos atletas da modalidade.

Assim, embora recordando a importância de outros fatores de aptidão para a prática do futebol (particularmente, táticas de equipe e técnico individual) e outros fenótipos de capacidade de exercício não diretamente relacionado com a habilidade para gerar contrações musculares potentes, os resultados sugerem uma associação entre genótipos de ACTN3 e desempenho de futebol de elite.

Com o objetivo de avaliar a susceptibilidade de microtraumas musculares em decorrência da classificação genética do ACTN3, não foi encontrada relação entre a atividade plasmática de CK e mioglobina após uma atividade excêntrica entre os diferentes grupos do ACTN3 (XX, RX, RR). Ainda assim, diferente do esperado, os autores encontraram menores valores de CK em repouso nos indivíduos XX. Os autores alegam que a diferença étnica entre os participantes pode ter sido um fator determinante por não se ter sido encontrado a hipótese esperada, bem como a massa muscular dos indivíduos, já que esta não foi avaliada nos voluntários e pode interferir diretamente nos valores basais de CK (Clarkson *et al.*, 2005).

Chan *et al.*,(2008) avaliaram o músculo extensor digitorum longus de ratos com deficiência na ACTN3 e verificaram que a ausência da proteína não altera a quantidade de lesões provenientes de ações excêntricas, sugerindo que não há influência na estabilidade mecânica do sarcômero. No entanto, quando comparadas com músculos de animais sem deficiência na produção de proteína, houve maior tempo de relaxamento após o estímulo, melhor recuperação da fadiga e menor área de secção transversa nas fibras de animais sem expressão de ACTN3.

Neste contexto, Vicent *et al.*,(2010) investigaram as possíveis diferenças da ausência da alfa actinina em função do genótipo R577X ACTN3 na resposta aguda a uma sessão de exercício excêntrico. Foi examinado um grupo de 19 indivíduos (RR = 9 e XX = 10). Os resultados deste estudo mostram uma tendência para níveis mais altos de CK ($p = 0,09$) e mais dor muscular ($p = 0,04$) em pessoas com deficiência de alfa-actinina-3 após o exercício excêntrico. Os resultados mostraram que após uma sessão de exercício excêntrico, as concentrações de CK tendem a ser maiores no grupo XX em comparação com RR sugerindo um papel protetor da ACTN3 em treinamentos excêntricos e uma melhor sinalização de reparo tecidual, embora os efeitos sejam pequenos.

Seto *et al.*, (2011) analisaram dois tipos diferentes de ratos, um com deficiência de alfa-actinina-3 (knockout) e outro sem essa deficiência (wild-type), após um protocolo de contrações excêntricas até a fadiga. Foi verificado um maior déficit de força após o protocolo realizado no rato com deficiência de alfa-actinina-3, sugerindo então uma elevada susceptibilidade a dano muscular para esse tipo de rato. Esse aumento de dano muscular, apesar do número total de actininas não ser diferente entre os voluntários, se deve à diferença funcional entre as

mesmas. Foi observado que a alfa-actinina-2 se interage com outras proteínas musculares, como ZASP, titina e vinculina, de forma mais intensa. Portanto, essa diferença de funcionalidade poderia alterar as propriedades viscoelásticas do músculo, repercutindo então em maior dano muscular. Também foi alterada a expressão de genes responsáveis pela reparação tecidual, sugerindo que a ausência de alfa-actinina-3 esta associada com a ativação dos percursos de regeneração muscular.

Estudos com animais modificados geneticamente (KO) mostraram que em nível fisiológico, o KO apresenta força muscular diminuída, maior resistência muscular, maior recuperação a fadiga e redução significativa na massa muscular em relação aos normais (WT) (MacArthur *et al.*,2007; MacArthur *et al.*,2008, Quinlan *et al.*,2010; Chan *et al.*,2008, Seto *et al.*, 2011). Em nível molecular, fibras musculares (KO) mostraram um aumento geral do conteúdo de glicogênio, as fibras rápidas apresentam atividade significativamente diminuída de enzimas anaeróbias e aumento da atividade das enzimas mitocondriais na via oxidativa, além de um retardo na recaptção de íons cálcio Ca^{+2} pelo retículo sarcoplasmático, sem alterar o tipo de fibra (Lek & North 2010; Chan *et al.*,2010; Quinlan *et al.*,2010; Seto *et al.*,2010). Estas alterações determinadas pela ausência da alfa-actinina-3 nas fibras tipo II dificultaria as respostas musculares em contrações excêntricas e de alta velocidade nos indivíduos XX, o que levaria a uma sobrecarga das fibras e conseqüentemente um quadro catabólico maior.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DO FUTEBOL

O futebol é um esporte de característica intermitente e de alta intensidade (Bangsbo, 1994), no qual ocorrem várias ações musculares excêntricas durante uma partida, como saltos e frenagens (Stolen *et al.*, 2005). Esse tipo de ação muscular é uma das principais causas de microlesões ou dano no músculo esquelético (Clarkson & Hubal, 2002) que, dependendo da intensidade e duração da atividade, causam aumento da permeabilidade da membrana plasmática, culminando em extravasamento de enzimas citoplasmáticas para corrente sanguínea (Brancaccio *et al.*, 2008).

As profundas e frequentes modificações na exigência imposta pelo futebol de hoje em diferentes níveis levam-nos, a semelhança do que ocorre nas outras áreas de conhecimento das Ciências do Desporto na especialidade do treino de atletas de alto rendimento, a uma série de modificações, tanto nas suas bases e correntes teóricas, como nos seus procedimentos metodológicos. Ainda assim, apesar dos inúmeros avanços no conhecimento apresentados nos últimos anos, parece existir ainda um hiato entre o conhecimento teórico disponível, altamente condicionado pelo necessário rigor metodológico nas abordagens experimentais, e a sua aplicação prática. Esta modalidade tem sofrido alterações ao nível competitivo, devido ao constante aumento de número de competições e subsequente número de jogos, encontrando-se os atletas submetidos, invariavelmente, a um aumento da carga competitiva, com consequente incremento da exigência física da modalidade.

O futebol é um esporte praticado em todos os continentes e a adesão à modalidade vem aumentando a cada ano entre os gêneros e todas as idades (Reilly, 2000). É um esporte muito antigo e um dos mais populares do mundo,

com mais de 150 países associados à FIFA (Federação Internacional de Associações de Futebol), que foi fundada em 1904. Atualmente existem mais de duzentos milhões de jogadores de futebol em atividade ao redor do mundo (FIFA, 2010).

A maioria das atividades que demandam energia no futebol é de intensidade submáxima com as situações de alta intensidade sendo infrequentes e de curta duração (Rienzi *et al.*, 2000). No entanto, as atividades realizadas em alta intensidade de esforço constituem o componente anaeróbico do futebol, e frequentemente, o desempenho nestas ações, determina o resultado do jogo (Balsom; 1992; Reilly *et al.*, 2000; 1997). Admitindo a distância percorrida pelos jogadores durante um jogo como uma referência da intensidade de esforço, alguns autores demonstraram que os jogadores percorrem, em média, 10 km durante um jogo, podendo existir diferenças significativas entre os jogadores, de acordo com as posições ocupadas pelos mesmos em campo (Sporis *et al.*, 2010; Stolen *et al.*, 2005; Reilly, 1997; Bangsbo; Michalsik, 2002).

A associação entre fadiga e movimentos explosivos é bastante presente no futebol, pois é um esporte de perfil irregular e intermitente. Durante a prática do futebol ocorrem movimentos de aceleração e desaceleração, os quais exigem um grande equilíbrio muscular da coxa e envolvem contrações concêntricas e excêntricas desta musculatura (Small *et al.*, 2009; Delextrat *et al.*, 2010).

Baseado na relação individual entre frequência cardíaca (FC) e o consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) obtida em testes padronizados de laboratório (Shephard, 1992) pode-se estimar que a intensidade relativa de esforço de um jogo de futebol é de aproximadamente 75% do $VO_{2máx}$ (Bangsbo; 1994). Além disso, os jogadores se esforçam a cerca de 85% da $FC_{máx}$, 165 bpm (Helgerud *et*

al., 2001), e apresentam um gasto energético de 1400 kcal durante um jogo ou 11,34 kcal.min⁻¹ (Silami-Garcia *et al.*, 2005).

Os jogadores de futebol, assim como pode ser observado também em outros esportes coletivos, devem ter um bom condicionamento aeróbico, cerca de 60 mL•kg⁻¹•min⁻¹ (Arnason *et al.*, 2004; Strudwick *et al.*, 2002). No entanto, o condicionamento aeróbico destes atletas é menor quando comparado com outros esportes tipicamente de resistência, como por exemplo, os corredores de longa distância (Bangsbo; Michalsik, 2002) ou os esquiadores de “cross-country” (Tumilty, 1993). Mas mesmo assim, jogadores com uma alta capacidade aeróbica são capazes de percorrer maiores distâncias durante um jogo (Strudwick *et al.*, 2002), participar de um número maior de jogadas decisivas, aumentar o número de *sprints* realizados (Helgerud *et al.*, 2001), melhorar a sua recuperação após os *sprints* (Aziz; Chia; Teh, 2000) e de diminuir a queda de rendimento no segundo tempo (Ekblom, 1986), aumentando o rendimento global durante uma partida de futebol (Wisloff *et al.*, 1998), cujo padrão de atividade é intermitente (Nagahama *et al.*, 1992).

Durante uma partida de futebol, tem se observado que somente em torno de 2% da distância total é percorrida com posse da bola, a maioria das atividades é desenvolvida sem bola em manobras posicionais, com grande contribuição aeróbica (Reilly, 1997). Por outro lado as atividades diretamente ligadas ao jogo tais como disputas de bola, saltos e chutes, são, no geral, predominantemente anaeróbicas.

De fato, durante a maior parte do jogo, as ações realizadas são sem bola e em média em regime fundamentalmente aeróbio, sendo contudo as ações individuais com bola acentuadamente com predominância anaeróbia.

Tipicamente, o jogo exige em média a cada jogador um sprint all-out a cada 90 segundos e um esforço de elevada intensidade em cada 30 segundos (Bangsbo, Mohr, & Krusturup, 2006).

Pela alta intensidade e longa duração de um jogo de futebol, os jogadores devem ser capazes de manter um bom nível de esforço durante todo o jogo. No entanto, identifica-se um declínio na distância percorrida, na intensidade de trabalho, na FC, nas concentrações de lactato e de glicose no decorrer do jogo apontando para uma menor permanência dos jogadores em zonas de maior intensidade no decorrer do jogo (Helgerud *et al.*, 2001).

Quanto ao padrão de movimento dos jogadores, identificou-se em valores percentuais médios, que durante um jogo, os jogadores permanecem parados 17,1% do tempo total, andando 40,4% (6 km/h), em corrida de baixa intensidade os jogadores permanecem 35,1% do tempo total de jogo, sendo este valor subdividido em 16,7% de trote (8 km/h), 17,1% de corrida em jogging (12 km/h), e 1,3% de corrida para trás (12 km/h). Já as corridas de alta intensidade perfazem 8,1% do tempo total, consistindo de 5,3% de corrida de velocidade moderada (15 km/h), 2,1% de corrida de alta velocidade (18 km/h) e 0,7% de *sprints* (30km/h) (Bangsbo; Norregaard; Thorso, 1991, Small, McNaughton, Greig, & Lovell, 2009).

Em termos globais, pode-se observar que os jogadores andam ou estão parados durante a maior parte do jogo e que a velocidade média durante uma partida de futebol é de 7,2 km/h (Shephard, 1992).

Em um jogo a distribuição da distância total percorrida se dá em diferentes zonas de velocidades. De acordo com Barros *et al.*,(2007), os jogadores brasileiros de futebol percorrem 5526m em velocidades entre 0 a 10 km/h, 1600m

entre 11 a 13 km/h, 1721m entre 14 e 18 km/h, 691 m entre 19 e 22 km/h e 437m em velocidades acima de 23 km/h. Esses resultados mostram uma predominância da distância percorrida em baixas velocidades, o que caracteriza a demanda aeróbia desse esporte. Entretanto, apesar dessa predominância, são as ações predominantemente anaeróbias que podem definir o resultado de uma partida (Alhazaa *et al.*,2001).

A conversão rápida de energia química em mecânica é um fator importante na velocidade dos deslocamentos e ações de curta duração e altas intensidades realizadas durante os jogos como, saltos, chutes, disputas contra os adversários e *sprints* com mudança de direção. Geralmente, em uma partida de futebol ocorrem por volta de 1000 a 1500 mudanças de direção, muitas dessas são caracterizadas por corridas de costas, corridas em diagonal, corridas laterais e corridas em linha reta.(Stolen *et al.*,2005).

No entanto, a intensidade do jogo quando interpretada somente como valores médios de distância percorrida e velocidade, não reflete a intensidade real da modalidade, pois não considera fatores importantes, tais como cabeceadas, divididas, frenagens e acelerações, que são atividades que também influenciam na demanda energética deste esporte e são inerentes à modalidade (Reilly, 1997; Wisloff *et al.*, 1998; Sporis *et al.*,2010).

Observa-se, portanto, que as exigências físicas têm interferência direta no desempenho durante um jogo, visto que jogadores com grande habilidade técnica e tática só demonstram estas qualidades durante um jogo de 90 minutos se tiverem altas capacidades de força e resistência, as quais têm relação direta com o rendimento da equipe (Wisloff *et al.*, 1998).

A estruturação dos principais tipos de treinamentos no futebol tem como objetivo trabalhar as áreas físicas, técnicas e táticas (Flanagan e Merrick, 2002). Alguns treinamentos para melhora das capacidades físicas tem sido utilizados em forma de circuito (Hof, 2005), campo reduzido (Rampinini *et al.*, 2007), corridas intervaladas (Hof, 2005). Assim com o objetivo de identificar a intensidade de esforço de algumas sessões treinamento de futebol, Castagna (2007) avaliou treinamentos em campo reduzido e treinamentos coletivos, no qual foram observadas intensidades relativas pela frequência cardíaca máxima de 79% e 75% respectivamente. Várias das ações características dos treinamentos e jogos do futebol possuem um elevado componente excêntrico, o que pode resultar em dano no músculo esquelético (Clarkson e Hubal, 2002)

Desta forma, o futebol é caracterizado como uma atividade intermitente de alta intensidade, cujas características variam com sua função em campo (posição), podendo ser influenciado ainda pelo estilo de jogo individual (Daniel *et al.*, 2004; Di Salvo *et al.*, 1998).

2.5 EXERCÍCIO E MICROLESÃO MUSCULAR

As formas mais comuns de ocorrência de dano muscular (DM) são lesão por esmagamento, lesão por eletrocução e exercício físico intenso (Brancaccio, Lippi e Maffulli, 2007). Nesta revisão será abordado apenas o DM causado pelo exercício físico.

A sobrecarga mecânica imposta ao músculo esquelético pode causar pequenas rupturas, principalmente quando esta sobrecarga não é habitual e a predominância da ação muscular é excêntrica (Clarkson y Hubal, 2002; Proske e Allen, 2005). As rupturas causadas no tecido muscular pelo exercício físico são denominadas pela literatura como microlesões musculares ou dano muscular (Tidus, 2008).

O DM é definido por Tidus (2008) como perda da função muscular causada pelo rompimento físico das estruturas envolvidas na produção ou transmissão de força (Figura 4). Essa definição é embasada na hipótese que a perda da função no músculo com microlesões é devido ao rompimento das estruturas musculares. Algumas dessas estruturas que podem sofrer dano são as membranas, linha Z, sarcolema, túbulos T e miofibrilas (Foschini *et al.*, 2007). A queda da força muscular observada no músculo com microlesões é devido a combinação do rompimento físico dos sarcômeros e prejuízo no acoplamento excitação e contração, sendo este último caracterizado pelos eventos que iniciam desde a liberação de acetilcolina na junção neuro muscular até a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. (Chen e nosaka, 2006)

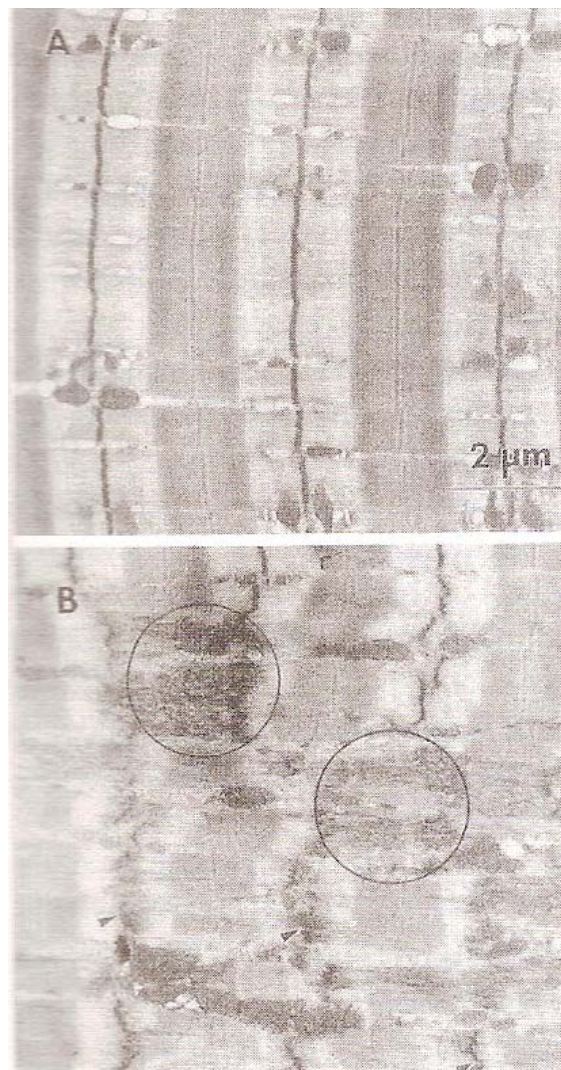


Figura 4. Rompimento do sarcômero seguido de uma contração excêntrica. A – Sarcômeros de um músculo normal demonstrando um bom alinhamento e padrão regular das bandas. B – Sarcômeros de um músculo exposto a contração excêntrica demonstrando com rompimentos na região do disco Z.

(FONTE: TIDUS, 2008: p. 7)

A magnitude do dano muscular depende da tensão e do alongamento imposto ao músculo, sendo esses dois fatores considerados chave para determinar o nível de DM (Tidus, 2003). Assim tem sido reportado que o exercício com elevado componente de ação muscular excêntrica provoca maior DM quando comparado a ação concêntrica e, talvez por isso, a contração muscular excêntrica

(EXC) seja um dos métodos mais utilizados nos estudos que investigam as respostas fisiológicas decorrentes do DM (Chen *et al.*, , 2010)

Em jogadores de futebol há uma grande taxa de lesões na musculatura isquiotibial no momento das contrações EXC durante a realização da corrida e do chute. A prática de exercícios EXC deve ser enfatizada na preparação física com o intuito de prevenção dessas lesões (Brockett; Morgan; Proske, 2004). Comparativamente ao exercício concêntrico CON, as contrações EXC estão associadas à diminuição do consumo de oxigênio, menos ativação de unidades motoras e menor produção de lactato para a mesma intensidade. Adicionalmente, estão bem documentados os efeitos lesivos que se verificam no músculo esquelético após a prática de exercícios com elevada predominância de contrações EXC. (Chen, 2003).

No exercício EXC comparado ao CON, encontramos algumas diferenças, enquanto contrações CON iniciam movimentos, contrações EXC retardam ou freiam movimentos. Uma característica única do exercício excêntrico é que indivíduos destreinados tornam-se rígidos e doloridos dias após ter realizado exercícios com componentes EXC devido aos danos às fibras musculares (Proske & Morgan 2001). De fato, a realização de exercícios EXC pouco habituais resulta frequentemente em lesão muscular (Clarkson & Hubbball, 2002; Peake; Nosaka; Suzuki, 2005; Walsh *et al.*, 2001) estando associado à sensação de desconforto muscular, perda de força máxima, aumento da concentração plasmática de enzimas intramusculares, *swelling* mitocondrial e aumento da pressão intramuscular e deficiência na ressíntese de glicogênio muscular (Chen, 2003). Estes fenômenos ocorrem em um número reduzido de fibras musculares e o nível da agressão depende da intensidade e duração do exercício realizado e do nível

de treinamento do sujeito (Clarkson & Hubal, 2002). A presença deste quadro fisiológico se manifesta de forma exacerbada cerca de 24 a 48 horas após a realização do exercício (Clarkson & Hubal, 2002). No que diz respeito à etiologia, este mecanismo de lesão induzido pelo exercício EXC é apontado por diversos autores como estando associado a fatores de origem mecânica e metabólica, provenientes ao uso muscular exaustivo e pouco habitual (Duarte *et al.*, 1999). A hipótese mecânica está associada ao *stress* contrátil e ao estiramento. Durante a realização de contrações EXC, o número de unidades motoras recrutadas é menor comparativamente com as contrações CON (Tee; Bosch; Lambert, 2007). Além disso, também é sugerido que durante este tipo de contrações, o número de pontes cruzadas diminui à medida que o estiramento aumenta levando a um aumento de força realizado por ponte cruzada, predispondo a fibra à lesão.

Com o resultado deste *stress* mecânico verifica-se a desorganização dos sarcômeros, lesão das membranas musculares, perda da permeabilidade seletiva aos íons cálcio e, conseqüentemente a alteração do acoplamento excitação-contracção (Armstrong *et al.*, 1991; Proske & Allen, 2005). Estas mudanças estruturais desorganizam o material miofibrilar e as estruturas elásticas, principalmente na linha Z do sarcômero após contrações EXC, levando a desorganização e/ou desaparecimento da linha Z na banda A subjacente, que permanecem durante alguns dias e talvez até semanas após o exercício EXC, dependendo da intensidade do mesmo. Além disso, alterações no citoesqueleto também são reportadas, levando a menor interação dos filamentos grossos e finos, reduzindo a conexão de pontes cruzadas e alterando o comprimento ótimo de produção de força pelo sarcômero.

Estes danos musculares afetam a membrana celular, causando extravasamento de proteínas da fibra muscular-esquelética. Várias proteínas são encontradas em concentrações elevadas após protocolos lesivos induzidos por exercício, como a proteína citoplasmática creatina-cinase (CK), a proteína miosina de cadeia pesada, a mioglobina e mais recentemente a proteína reguladora do filamento fino, troponina-esquelética. Esses níveis aumentados de proteínas musculares têm sido utilizados como indicadores indiretos de microlesão muscular (Foshini *et al.*, 2007; Brancaccio *et al.*, 2008).

Como consequência final, esses eventos levam à lesão das membranas, incluindo as do retículo sarcoplasmático, túbulos transversais e sarcolema, provocando a entrada descontrolada de cálcio no sarcoplasma e o consequente desenvolvimento de uma sequência de eventos fisiológicos, entre os quais, os fenômenos de proteólise e de reparação celular. Mudanças na capacidade de produção de torque do sistema musculoesquelético estão relacionadas aos processos morfofisiológicos e neurais. Estas alterações na produção de torque após o exercício EXC ocorrem tanto durante a realização de contrações isométricas quanto em contrações concêntricas e excêntricas (Foshini *et al.*, 2007; Brancaccio *et al.*, 2008).

2.5.1 DANO E REPARO MUSCULAR

O princípio da sobrecarga é um dos princípios do treinamento necessários para a melhora do desempenho físico. Pressupõe que devem ser aplicadas sobrecargas progressivas de esforço durante as sessões de treino, a fim de provocar um distúrbio da homeostasia celular e a consequente resposta a esse estresse. As sobrecargas podem ser manipuladas através das seguintes variáveis: carga, duração, pausa entre estímulos, ação muscular, velocidade de execução do movimento, frequência dos exercícios/semana, número de exercícios/sessão, amplitude dos movimentos e combinação dos exercícios na sessão (Toigo & Boutellier, 2006).

A aplicação de sobrecarga provoca microtraumas de graus variados no tecido muscular estriado esquelético, tecido conjuntivo e tecido ósseo. Esses microtraumas são considerados como danos temporários e reparáveis, porque resultam em uma resposta inflamatória aguda, orquestrada, dentre outros, por neutrófilos e macrófagos, cuja função é a limpeza, reparo e desenvolvimento dos tecidos previamente danificados.

Especialmente em relação ao tecido muscular estriado esquelético, os microtraumas são dependentes da intensidade do esforço e incluem ruptura da matriz extracelular, lamina basal e do sarcolema. Podem resultar na liberação para a corrente sanguínea de proteínas intracelulares como a mioglobina, lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase e creatina quinase (CK). Podem, ainda, causar danos ao material contrátil e as proteínas do citoesqueleto, juntamente com uma desorganização na estrutura miofibrilar, rompimento, alargamento ou prolongamento da linha Z com subsequente comprometimento da

ancoragem dos filamentos finos e ligação das fibras adjacentes (Lazarrim *et al.*, 2009). Quando é respeitado o tempo de descanso necessário para a recuperação dos efeitos agudos do esforço físico, ocorre adaptação positiva do tecido muscular estriado esquelético e estruturas adjacentes, no sentido de um remodelamento morfológico e metabólico das miofibrilas. Dessa forma, o processo adaptativo envolve a ativação de vias de sinalização intracelulares e subsequente ativação gênica que pode resultar em alterações na massa muscular, nas propriedades contráteis e nas respostas metabólicas. Essa sinalização protéica é dependente da especificidade dos exercícios empregados e se reflete no aumento de rendimento em capacidades biomotoras diversas (Glesson, 2007).

O mecanismo de reparo do dano é altamente sincronizado e pode ser dividido basicamente em três fases (figura 5): uma fase degenerativa seguida de uma fase regenerativa, e uma terceira fase de remodelamento do tecido danificado constituindo um quadro complexo, no qual as células inflamatórias promovem tanto dano quanto regeneração. Isso é feito através da ação combinada de espécies reativas de O₂, antioxidantes enzimáticos de baixo peso molecular, fatores de crescimento, hormônios e citocinas, que mantêm um equilíbrio entre atividades pró e antioxidantes e pró e anti-inflamatórias. (Smith, 2004).

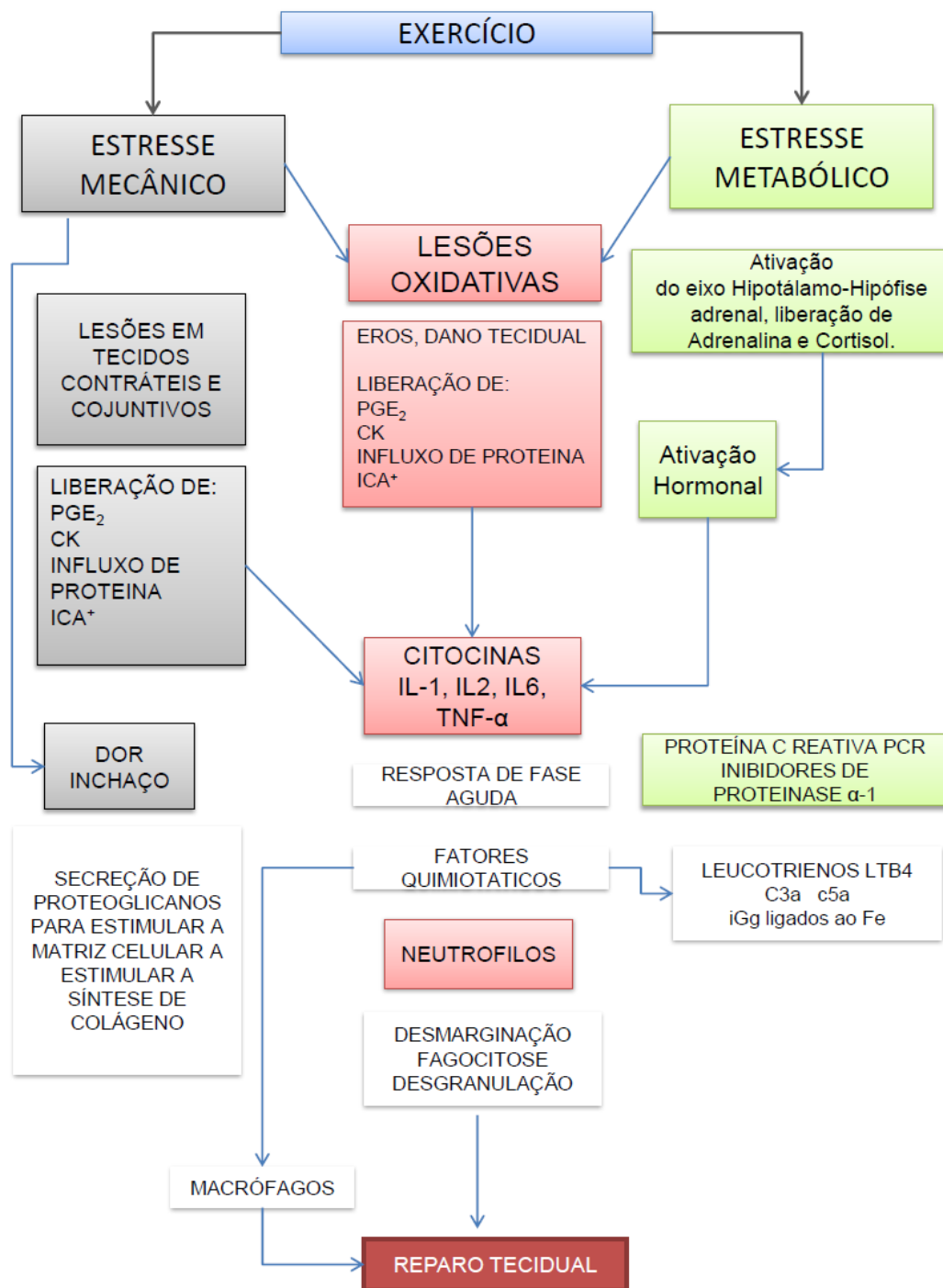


Figura 5. Teoria dos processos fisiológicos promovidos pelo exercício físico. Adaptado de Pyne (1994). Abreviaturas: EROX = Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; PL = Peroxidação lipídica; Ca²⁺ = íons cálcio; CK = Creatina quinase, TNF IL-2 = Interleucina complemento; C5a = Proteína C5a do sistema complemento; Fe = Ferro; LTB4 = Leucotrieno B4. Fonte:(Smith, 2004).

Conjugados, estes fatores viabilizam o influxo de células inflamatórias para o local lesionado, fenômeno denominado de diapedese. Os neutrófilos são a primeira subpopulação de leucócitos a migrar para o tecido e apresentam um pico após 60 minutos do exercício, que pode perdurar por até 5 dias. Simultaneamente, há também um aumento na exportação dos neutrófilos da medula óssea para a corrente sanguínea, mediado pela ação do cortisol e da interleucina-6 (IL-6). A principal função dos neutrófilos é a remoção, por fagocitose, dos elementos indesejáveis relacionados a lesão tecidual. Essa ação é considerada ponto de partida para as respostas subsequentes de reparo e crescimento tecidual (Tidball *et al.*, 2005). Para isso, os neutrófilos ativados liberam proteases lisossomais que degradam as proteínas locais. Formam também EROs como resultado da ação da enzima NADPH oxidase, através de um processo conhecido como *burst* respiratório e também pela ativação da enzima mieloperoxidase. A resposta mediada pelos neutrófilos deve ser aguda e muito bem regulada, a fim de preservar a integridade das células e tecidos ao redor de onde o evento inflamatório está ocorrendo, e evitar a exacerbação do dano através de um aumento na produção de EROs. (Bassel-Duby & Olson, 2006).

Os monócitos formam a segunda sub-população de leucócitos a aparecer no local danificado. Quando essas células saem da circulação e migram para os tecidos passam a ser chamados de macrófagos. Recentemente, surgiram evidências de que a função dos macrófagos que invadem precocemente o local lesionado (entre 24-48h) é diferente daqueles que aparecem mais tardiamente (entre 48-96h). Os últimos teriam um papel mais ativo no reparo muscular enquanto que os primeiros teriam como principal função a remoção do tecido

danificado (Tidball & Wehling-Henricks, 2007). De fato, estudos *in vitro* e *in vivo* confirmaram que os macrófagos exercem uma função importante no reparo e crescimento do tecido lesado, provavelmente, pela secreção de moléculas pró-regenerativas (Bassel-Duby, 2006).

Dentre essas, destacam-se alguns hormônios, como o fator de crescimento semelhante a insulina e algumas citocinas reguladoras do crescimento celular, como o fator de crescimento dos fibroblastos e o TGF- β 10. Essas citocinas atuam no recrutamento e ativação dos fibroblastos que secretam moléculas de colágeno, contribuindo para a regeneração tecidual. Além disso, sinalizam a ativação, proliferação e diferenciação de células-satélite musculares, importantes para a reestruturação tecidual. Os macrófagos secretam, ainda, diversas outras moléculas, como quimiocinas e prostaglandinas, além de EROs. Os linfócitos são, também, importantes no processo de regeneração tecidual pós-exercício, quando respondem de uma forma bifásica. Exibem aumento durante e imediatamente após o esforço, especialmente, das células *Natural Killer (NK)*, seguido de queda, que pode perdurar por várias horas (principalmente dos linfócitos T e das células *NK*), induzindo perda de sua capacidade funcional. Tais alterações podem levar a um quadro de imunossupressão transitória (Gleeson, 2007).

Essa imunossupressão parece estar relacionada a maior susceptibilidade a infecções do trato respiratório superior de atletas, um efeito agudo do exercício exaustivo e prolongado. O cortisol parece coadjuvar nesse ambiente imunossupressor, conhecido na literatura como “janela imunológica” (Smith, 2004). O fenômeno da janela aberta parece relacionado a maior possibilidade de instalação de quadros infecciosos no pós-exercício (Rowbottom & Green, 2000). Um ponto importante a ser considerado em relação ao processo inflamatório é

que a resposta local, descrita acima, normalmente é acompanhada por uma resposta sistêmica, chamada de resposta de fase aguda. O objetivo da resposta de fase aguda é ajustar a homeostasia para o reparo tissular. Dessa forma, dentro de poucas horas, após a ativação da inflamação localizada, o organismo pode apresentar uma variedade de alterações sistêmicas fisiológicas e comportamentais (conhecida também como *Sickness Behavior*), dependentes, principalmente, da intensidade e duração do estímulo estressor (Gruys *et al.*, 2005).

A densidade dos compromissos competitivos ao longo de uma época de futebol é bastante elevada, sendo o tempo de recuperação entre jogos reduzido, conduzindo habitual e progressivamente os jogadores a condições que comprometem os seus níveis de performance (Reilly & Ekblom, 2005). Assim sendo, o desenvolvimento de estratégias que visem recuperar o mais rápido possível tem sido uma preocupação da comunidade desportiva e científica do treino e fisiologia aplicada ao exercício em geral e ao futebol em particular (Reilly, 1997; Reilly & Ekblom, 2005).

De fato, o treino exaustivo e a competição sistemática induzem uma condição genericamente denominada de fadiga muscular esquelética, nervosa e dos sistemas metabólicos. O elevado número de contrações excêntricas associadas a uma forte exigência tensional e contrátil de inúmeras ações durante o jogo, as quais resultam das permanentes frenagens para mudanças de direção e sentido, dos saltos e recepções, carrinhos e desacelerações com alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais que se manifestam durante, imediatamente e no período de recuperação são demonstrativas da elevada

exigência metabólica e funcional do futebol. (Andersson *et al.*, 2008; Ascensão *et al.*, 2008; Ispirlidis *et al.*, 2008).

Este quadro parece ser agravado, em particular no futebol, por este ser praticado em grama e os jogadores utilizarem um calçado bastante abrasivo e de elevada capacidade de tração por ação das travas. Estas alterações caracterizam um fenômeno habitualmente designado por agressão-lesão muscular esquelética, o qual se encontra associado à perda de funcionalidade neuromuscular, à ocorrência de alterações imunológicas, alterações na homeostasia do íon cálcio, perda de integridade de membranas com consequente libertação de proteínas citoplasmáticas, stress oxidativo, inflamação, lesão muscular e sensação retardada de desconforto ou dor musculares (Clarkson, 1992; Clarkson & Hubal, 2002; Proske & Allen, 2005; Proske & Morgan, 2001; Sunderland *et al.*, 2008, Magalhães *et al.*, 2010; Greig *et al.*, 2006; Sari-Sarraf *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2009; Twist & Eston 2005; Ispirlidis *et al.*, 2008).

A sensação de desconforto muscular originada por este tipo de atividades varia muito em função da intensidade e duração, podendo variar entre uma fraqueza muscular que vai desaparecendo com a sequência de treinamentos. (Clarkson, 1992; Clarkson & Hubal, 2002). Algumas manifestações deste fenômeno, embora com uma exuberância menor comparativamente com os exercícios de um só grupo muscular indutores de lesão muscular, têm sido recentemente reportadas durante e após os jogos e treinamentos de futebol (Andersson *et al.*, 2008; Ascensao *et al.*, 2008; Ispirlidis *et al.*, 2008; Magalhaes *et al.*, 2009).

2.5.2 AVALIAÇÃO DO DANO MUSCULAR

Os eventos relacionados à ocorrência do DM possibilitam que o mesmo seja avaliado. Dessa forma, a avaliação do DM tem sido realizada com o objetivo de auxiliar no controle da carga de treinamento no esporte (McLellan *et al.*, 2010.) controle clínico do infarto do miocárdio (AMERICAN COLLEGE, 2000) e avaliação do estado de Rhabdomyolysis caracterizado por ruptura e necrose da fibra do músculo estriado. Assim algumas formas de avaliação do DM são apresentadas pela literatura subdivididas em avaliações diretas e indiretas, ambas possuem vantagens e desvantagens (Clarkson & Hubal, 2002).

2.5.2.1 AVALIAÇÃO DIRETA DO DANO MUSCULAR

1) Análise da biópsia muscular é um método invasivo, no qual uma amostra do músculo é usada para estimar o DM total. Entretanto, esta técnica pode superestimar ou subestimar o dano de um músculo, pois o dano não é similar em todo o músculo (Clarkson & Hubal, 2002).

2) Análise da imagem de ressonância magnética é descrita como uma ferramenta poderosa, porém, apesar de avaliar o DM de forma não invasiva, não deixa claro o que as mudanças na imagem indicam e possui um elevado custo (Clarkson & Hubal, 2002).

De acordo com os problemas supracitados das avaliações diretas de DM, alguns marcadores indiretos têm sido utilizados, como a avaliação da dor muscular, proteínas sanguíneas e contração voluntária máxima. Muitas dessas avaliações podem ser realizadas em até sete dias após o exercício, devido as

alterações decorrentes do DM permanecerem em evidência durante esse período (Clarkson & Hubal, 2002).

2.5.2.2 AVALIAÇÕES INDIRETAS DO DANO MUSCULAR

1) Avaliações neuromusculares: o desempenho de algumas variáveis neuromusculares como a força máxima em 1 repetição máxima e salto vertical têm sido utilizada para avaliar o DM, no qual é esperado que o mesmo reduza o desempenho nessas tarefas (Ispirlidis *et al.*, 2008; Fatouros *et al.*, 2010). Entretanto, essas avaliações dependem da motivação do atleta para a execução da tarefa, o que pode influenciar nos resultados.

2) Avaliação da dor muscular: A escala de dor muscular é uma variável bastante utilizada na literatura para avaliação do DM, sendo descrita também como *delayed onset muscle soreness* (DOMS) (Thompson, Nicholas e Williams, 1999; Ispirlidis *et al.*, 2008; Fatouros *et al.*, 2010). Contudo este tipo de avaliação pode sofrer interferência de fatores cognitivos como a representação subjetiva inadequada do real estado de dor muscular pelo avaliado.

3) Avaliações de proteínas sanguíneas: algumas proteínas são consideradas marcadores de DM por atravessarem a barreira da membrana sarcoplasmática em decorrência do exercício (Foschini *et al.*, 2007; Brancaccio *et al.*, 2008). Essa avaliação permite quantificar o DM, porém, as proteínas sanguíneas apresentam uma alta variabilidade inter e intra individual, o que pode dificultar a interpretação dos resultados (Brancaccio *et al.*, 2008).

2.5.3 EXTRAVASAMENTO DE PROTEÍNAS INTRAMUSCULARES COMO MARCADOR DE CANO MUSCULAR.

Algumas proteínas são consideradas marcadores de DM por atravessarem a barreira da membrana sarcoplasmática em decorrência do exercício. Assim a membrana celular com dano apresenta aumento da sua permeabilidade, o que permite extravasamento dessas proteínas para o sistema linfático até chegar à corrente sanguínea (Clarkson & Hubal, 2002; Foshini, Prestes e Charro, 2007; Brancaccio, Nicomaffulli, Limongelli, 2007; Brancaccio *et al.*, 2008;). Posteriormente, essas proteínas são depuradas, muitas vezes por endocitose nas células de Kupffer do fígado que compõe o sistema retículo-endotelial (Tidus, 2008).

As proteínas mais estudadas são: a mioglobina, lactato desidrogenase (LDH), troponina, fragmentos da cadeia pesada de miosina e creatina quinase (CK) (Foshini, Prestes e Charro, 2007; Brancaccio *et al.*, 2008). Devido às diferentes massas moleculares e concentrações no interior da célula, essas proteínas apresentam diferentes permeabilidades para atravessarem a membrana celular, o que resulta em diferentes concentrações dessas enzimas na corrente sanguínea seguida do mesmo exercício (Brancaccio, Nicomaffulli, Limongelli, 2007; Brancaccio *et al.*, 2008). Além disso, essas enzimas apresentam especificidades distintas de cada tecido (Brancaccio, Nicomaffulli, Limongelli, 2007; Brancaccio *et al.*, 2008).

Marcadores bioquímicos podem ser considerados potentes parâmetros na avaliação da ocorrência do *overtraining*. Esta síndrome é acompanhada por uma

resposta significativa de biomarcadores do estresse oxidativo, os quais são alterados durante períodos de treinamento intenso e retornam aos níveis normais quando a carga diminui, indicando uma relação dose-resposta. Muitos métodos diretos e indiretos tem sido utilizados na análise do dano muscular decorrente do exercício físico. Os métodos indiretos como mioglobina, LDH, fragmentos da cadeia pesada da miosina (MHC) e CK, são mais frequentemente usados. Estas moléculas podem ser utilizadas como marcadores do dano no tecido muscular esquelético devido ao fato de serem citoplasmáticas e assim, impermeáveis na membrana plasmática. Dessa forma, o aumento nos níveis dessas moléculas no líquido extracelular pode indicar uma alteração da permeabilidade da membrana ou o rompimento da mesma (Foschini *et al.*, 2007).

Idealmente, um marcador bioquímico de dano muscular esquelético deve poder determinar-se com uma metodologia simples, que permita sua medida às 24hs do dia e que seja de tão rápida realização como a ressonância magnética ou uma ecografia. O marcador ideal deveria ser músculo-específico, sua concentração intracelular alta, liberar-se com rapidez em caso de lesão, manter sua concentração elevada durante um tempo suficiente no sangue e ser estável. No soro de pessoas saudáveis, este marcador deveria ser indetectável ou encontrar-se em uma concentração muito baixa que se diferencie claramente de sua presença ao produzir-se dano no tecido. Deveria ter uma elevada sensibilidade diagnóstica, especialmente nas primeiras horas da lesão e, finalmente, possuir uma especificidade diagnóstica tão próxima aos 100% (os não lesionados ou traumatizados devem ser reconhecidos confiavelmente) (Martínez-Amat, 2005).

Os métodos utilizados para análise dos danos causados ao músculo induzidos pelo exercício físico podem ser efetuados através de medidas diretas e

indiretas. Os métodos diretos são realizados através das análises de amostras do músculo ou de imagens por técnica de ressonância magnética.

Os métodos indiretos adotados para análise do dano muscular são os mais utilizados nos estudos em função da facilidade de coleta e, sobretudo, pelo baixo custo quando comparado aos métodos diretos. A CK, LDH, MHC, troponina-I e mioglobina são encontradas como marcadores de dano muscular, isso porque essas moléculas são citoplasmáticas e não têm a capacidade de atravessar a barreira da membrana sarcoplasmática (Brown, 1997). Por esse fato, o aumento da concentração sérica dessas moléculas é utilizado como indicativo de dano na membrana muscular e outras estruturas teciduais. Tem sido relatado que esses marcadores não parecem ser os mais adequados enquanto a sua sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade (Martínez-Amat *et al.*, 2005; Martínez-Amat *et al.*, 2007).

2.5.3.1 CREATINA QUINASE

A CK tem sido um dos marcadores de DM mais estudados, além de ser considerada um bom marcador (Brancaccio *et al.*, 2008; Ispirlidis *et al.*, 2008). Após ser liberada, chega à corrente sanguínea com uma elevada concentração comparada as outras proteínas, possui um baixo custo para sua avaliação e o pico de liberação desta enzima pode ocorrer entre 24 e 48h após o exercício físico (Clarkson & Hubal, 2002; Foschini *et al.*, 2007). Além disso, o pico de CK é correlacionado com o pico de outras proteínas séricas, com o pico de alteração da força isométrica máxima e acompanha a alteração na imagem de ressonância magnética (Nosaka & Clarkson, 1996).

A função da CK na célula é regular as concentrações de adenosina difosfato (ADP) e adenosina trifosfato (ATP), pois ela é responsável por catalisar a reação reversível entre a fosfocreatina (CP) e o ADP. A CK é uma proteína dimérica globular composta de duas sub-unidades com massa molecular de 43 kilodaltons (kDa) cada. Existem pelo menos cinco isoformas da CK: três isoenzimas no citoplasma conhecidas como CK-BB ou CK 1, CK-MB ou CK 2 e CK-MM ou CK3, e duas isoenzimas (sarcoméricas e não sarcoméricas) na mitocôndria (Hortobágyi & Denahan, 1989; Brancaccio, Maffulli, Limongelli, 2007). Essas duas isoenzimas são proteínas octoméricas, conhecidas como macro-CK, devido aos seus elevados pesos moleculares (Brancaccio, Maffulli, Limongelli, 2007).

As isoenzimas (CK-BB, CK-MB e CK-MM) compõem a CK-total e cada uma fornece informações específicas do tecido lesionado, assim:

1- A CK-MB é específica do músculo cardíaco e demonstra-se elevada quando há infarto agudo do miocárdio (Katirji & Mohamed, 2001; Brancaccio, Maffulli, Limongelli, 2007)

2- A CK-BB é específica do tecido cerebral e se apresenta elevada em caso de lesão cerebral e durante a vida fetal (Katirji & Mohamed, 2001; Brancaccio, Maffulli, Limongelli, 2007)

3- A CK-MM é encontrada especificamente ligada as miofibrilas localizadas na estrutura da linha-M. Em adultos a maior predominância da CK-total é através da CK-MM oriunda do músculo esquelético e se apresenta elevada no caso de danos no músculo esquelético (Katirji & Mohamed, 2001; Brancaccio, Maffulli, Limongelli, 2007) (Tabela 1)

Tabela 1 – Percentual da predominância das concentrações de CK de cada tecido

(adaptado de Katirji & Mohamed, 2001).

	Isoenzima BB	Isoenzima MB	Isoenzima MM
Sinônimo	CK1	CK2	CK3
Músculo esquelético	-	1-3%	97-99%
Músculo cardíaco		15-20%	75-80%
Cérebro	100%	-	-
CK sérica total	-	-	100%

A resposta da CK ao exercício e os valores de repouso apresentam uma ampla variabilidade inter e intra individual (Brancaccio *et al.*, 2008). Algumas das diferenças relacionadas aos fatores individuais biológicos das concentrações da CK são:

- 1- Gênero: as mulheres apresentam menores concentrações de CK em comparação aos homens. Após o exercício essas diferenças permanecem e são provavelmente derivadas da proteção que o estrogênio pode dar a estabilidade da membrana limitando os danos musculares (Tidus, 2003; Brancaccio, Nicomaffulli, Limongelli, 2007).
- 2- Etnia: sujeitos negros apresentam maiores concentrações que caucasianos, provavelmente pela maior massa muscular apresentada (Brancaccio, Nicomaffulli, Limongelli, 2007)
- 3- Massa muscular: indivíduos com maiores massas musculares apresentam maiores concentrações de CK (Brancaccio, Nicomaffulli, Limongelli, 2007)
- 4- Adaptações ao treinamento: atletas apresentam maiores concentrações em repouso do que sedentários, porém o pico da CK comparado aos sujeitos destreinados é menor. As razões que diferenciam a CK de repouso de

atletas e não atletas podem ter maior massa muscular, catabolismo de proteínas aumentado ou a combinação desses fatores (Brancaccio, Nicomaffulli, Limongelli, 2007).

- 5- Temperatura: atividades realizadas em ambientes frios geram maiores repostas quanto à concentração de CK (Brancaccio, Nicomaffulli, Limongelli, 2007)
- 6- Genética: a resposta da CK ao exercício pode ser influenciada pela carga genética com a expressão da enzima conversora de angiotensina (Heled *et al.*, 2007).
- 7- Idade: Apesar da possibilidade da existência de uma tendência do aumento da CK com o envelhecimento, devido ao processo de atrofia muscular Hortobágyi & Denahan, 1989, esse fato não foi relatado no estudo longitudinal de Mougios (2007) e no estudo transversal de (Horska *et al.*, 2000). Já a maturação sexual que ocorre dos nove aos 17 anos, tem demonstrado maior CK próximo aos 17 anos do que próximo aos nove anos após exercício (Silva *et al.*, 2007).
- 8- Responsividade da CK ao exercício: os sujeitos podem ser classificados como baixo ou alto responsivos de acordo com a elevação de CK após exercício (Totsuka *et al.*, 2002;).
- 9- Ciclo circadiano: parece ser a variável que menos interfere no aumento da CK (Hortobágyi & Denahan, 1989).

Outros fatores que interferem na variabilidade da CK são relacionados a carga de treinamento que o indivíduo é submetido, como o tipo, duração e intensidade do exercício (Hortobágyi & Denahan, 1989; Brancaccio *et al.*, 2008). O tipo de exercício influencia a ocorrência de DM e consequente extravasamento de CK

para a corrente sanguínea. As ações musculares excêntrica, concêntrica e isométrica aumentam a CK no entanto a ação muscular excêntrica provoca mais dano na fibra muscular do que a concêntrica (Mchugh *et al.*, 1999). Outra diferença quanto ao tipo de exercício são as maiores CK observadas em exercício com membro superior durante a flexão de cotovelo do que o exercício de membro inferior durante a extensão do joelho. Esse fato pode ser explicado pela maior usabilidade do membro inferior nas atividades diárias, assim o membro inferior seria mais treinado e teria um efeito protetor maior do que o membro superior, o que resultaria em menor extravasamento de CK para o sangue (Tidus, 2008).

A intensidade do exercício é descrita como determinante no aumento da CK após o exercício do que a duração Hortobágyi & Denahan, 1989. De acordo com Brancaccio, Nicomaffulli, Limongelli, (2007) quando a intensidade do exercício é de leve a moderada o tecido muscular não demonstra mudanças na permeabilidade da membrana, entretanto, quando a intensidade excede esse intervalo, a permeabilidade da membrana é alterada e as enzimas citoplasmáticas são liberadas para o espaço extracelular. Dessa forma, Mendham *et al.*,(2011) observaram em um protocolo de treinamento de força em exercício de alta intensidade uma resposta mais pronunciada da CK do que o protocolo de baixa intensidade e Paschalis *et al.*,(2005) observaram em dois protocolos com mesmo volume e intensidades diferentes que as CK foram maiores 24 h após o protocolo de alta intensidade. Portanto, a intensidade parece exercer uma considerável influência no aumento da [CK].

O exercício de longa duração também exerce influência no aumento da [CK], pois elevadas concentrações de CK são encontradas em provas de longa duração como maratona (Nuviala *et al.*, 1992) ou Triatlon (Denvir *et al.*, 1999).

Em conjunto o tipo, duração e intensidade do exercício influenciam o aumento da CK após exercício. Diante disso, as modalidades esportivas que apresentam tipo, duração e intensidades distintas apresentam diferenças na resposta da CK. Assim, Mougious (2007) avaliou de forma longitudinal a CK em várias modalidades esportivas durante um período de 10 anos. O autor chamou a atenção para as maiores CK aparecerem no futebol e menores na natação. Esse dado foi explicado pela predominância das ações excêntricas e maior contato físico entre os atletas de futebol comparados com os atletas de natação, portanto, essas características favorecem a maior ocorrência de DM no esporte de maior quantidade e intensidade das ações excêntricas.

A CK tem sido utilizada para monitorar o estresse muscular decorrido de jogos de rugby (Mclellan *et al.*, 2010), partidas de futebol (Ispiridis *et al.*, 2008) e dentre outros esportes (Mougious, 2007). O objetivo desse monitoramento têm sido fornecer informações em relação ao estresse muscular desses atletas para que haja o ajuste da carga de treinamento no intuito de evitar lesão e *overtraining* (Smith, 2000).

Algumas sugestões referentes à interpretação dos valores de CK tem sido propostas na literatura. Branccacio *et al.*,(2008) e Totsuka *et al.*,(2002) sugeriram um valor limite de CK, chamado de “Break Point”, entre 300 a 500 U/L que indica quando a carga de treinamento excede um certo limite da capacidade muscular. Martínez-Amat *et al.*,(2005) como critério para seleção de sujeitos com lesão severa usaram uma concentração de CK acima de 500 U/L, o que sugere que valores acima deste pode indicar risco aumentado de lesão.

Durante o monitoramento da CK por quatro meses de treinamento aeróbio, foi proposto que as alterações da CK no mesmo sujeito deveriam alcançar uma

diferença maior do que 119% para indicar um resultado da carga de treinamento e não simplesmente uma consequência da variação biológica e de medida (Nunes, Brenzifer e Macedo, 2010). Já Purge *et al.*,(2006) observaram durante 24 semanas de treinamento com remadores que o aumento da CK ocorreu concomitantemente com os aumentos da carga de treinamento. O que demonstra que a CK pode ser sensível as mudanças da carga de treinamento.

A literatura tem fornecido muitas informações quanto ao monitoramento da carga de treinamento no futebol (Ispirlidis *et al.*, 2008; Wiacek *et al.*, 2011). Dessa forma, alguns estudos têm reportado que a CK aumenta logo após uma partida de futebol e atinge o pico 48 h após (Ascensão *et al.*, 2008; Ispirlidis *et al.*, 2008; Fatouros, 2010) ou 24h após (Magalhães *et al.*, 2010; Coelho *et al.*,2011) e retorna aos seus valores basais 96 h após (Ispirlidis *et al.*, 2008). Além disso, a queda do desempenho em testes neuromusculares e a dor muscular após uma partida é acompanhada pelo aumento da CK (Ispirlidis *et al.*, 2008; Fatouros *et al.*, 2010).

Outros estudos utilizaram simulações das movimentações específicas de uma partida de futebol para avaliar o comportamento da CK (Twist e Eston, 2005; Magalhães *et al.*, 2010). Assim, tem sido observados aumentos logo após e pico de CK 24 h após movimentações simuladas do jogo de futebol com 90 min de duração (Magalhães *et al.*, 2010) e também aumentos logo após exercício pliométrico com pico de CK 48h após (Twist & Eston, 2005).

Alguns estudos se preocuparam em descrever o comportamento da CK no futebol de forma longitudinal (Zoppi *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008; Lazarim *et al.*, 2009; Wiacek *et al.*, 2011). Três desses estudos não demonstram alteração da CK (Zoppi *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008; Wiacek *et al.*, 2011) e um deles

observou redução da CK durante um campeonato brasileiro de futebol da primeira divisão (Lazarim *et al.*, 2009), o que pode ser um indicativo de adaptação muscular (Mchugh, 2003). Dessa forma a informação quanto à redução da CK ao longo de uma temporada competitiva de futebol apresenta-se controversa. O conhecimento sobre a avaliação da adaptação muscular através da CK no futebol pode auxiliar na prevenção de lesões e de um estado de treinamento indesejado (Smith, 2000), pois o excesso de carga de treinamento pode resultar em estiramento muscular que é uma das formas de lesão mais comum no futebol (Fuller *et al.*, 2006).

No intuito de verificar o comportamento da CK ao longo de cinco meses de uma competição de futebol Zoppi *et al.*,(2003) observaram que as CK dos jogadores de futebol permaneciam acima dos valores de referência da população sedentária e mesmo com esses valores, não são impedidos de participar de algum jogo por lesão. Dessa forma, esse autor concluiu que os jogadores de futebol possuem valores de referência para risco de lesão aumentado maior que a população sedentária.

Mougios (2007) observou em jogadores de futebol gregos que a CK era mais elevada que outras modalidades esportivas que tinham menor incidência de contrações excêntricas e menos contato físico. Além disso, foi proposto por esse autor uma concentração de CK de 1492 U/L para risco de lesão aumentado. Nessa mesma linha de pensamento, Lazarim *et al.*, (2009) observaram o comportamento da CK ao longo de um campeonato brasileiro de futebol e determinaram um valor de referência para risco aumentado de lesão de 975 U/L. Desse modo, esses autores observaram, assim como Zoppi *et al.*,(2003), que os

jogadores de futebol permanecem com CK acima da população sedentária. Portanto, os resultados de Lazarim *et al.*,(2009) se aproximaram mais do calendário esportivo brasileiro, o que facilitaria a utilização desses dados para o monitoramento da carga de treinamento de jogadores de futebol em competição.

2.5.3.2 ALFA-ACTINA MUSCULAR ESQUELETICA.

A alfa-actina é uma das duas maiores proteínas do músculo, e pode chegar a representar mais do que 20% do total de proteínas celulares (Aránega *et al.*, 1992). A alfa-actina constitui de 20 a 25% das proteínas miofibrilares. Ela é composta por subunidades globulares de actina G (figura 6), que se polimerizam formando unidades de uma proteína fibrilar (actina F), que se entrelaçam duas a duas em hélice, forma característica do filamento de actina. (Bloom, 1977).

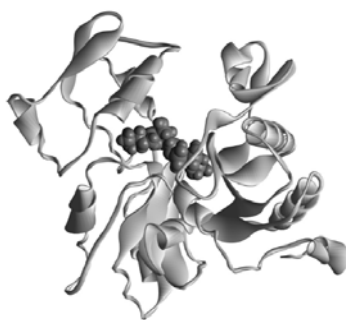


Figura 6: Estrutura molecular da alfa-actina G monomérica (Orban *et al.*, 2008).

A alfa-actina é uma proteína globular (42 kd) que se polimeriza para formar os filamentos finos. A alfa-actina se trata de um marcador muito precoce por sua liberação entre as 0 a 6 horas (Aránega *et al.*, 1993). Esta cinética pode corresponder-se com uma rápida e precoce liberação da actina do compartimento

celular citoplasmático que se acompanharia posteriormente do componente estrutural (Martínez-Amat *et al.*, 2005).

Martínez-Amat *et al.*,(2007) ao avaliar indivíduos sedentários, esportistas e lesionados identificaram que os valores de concentração de alfa-actina nos esportistas lesionados foi maior em comparação com os outros grupos, o que já não foi observado em relação a CK, que teve uma concentração plasmática menor no grupo de atletas lesionados em comparação com os atletas saudáveis. Tal fato identificou que a CK pode sofrer a interferência de outros fatores que não decorrentes da lesão muscular ou sobrecarga de treinamento, por sua presença no sangue sofrer interferência de outros fatores e, além disso, a mensuração total da CK circulante pode estar captando outras isoformas de CK decorrentes de outros tecidos, como a do miocárdio (CK-MB), do cérebro (CK-BB) e do próprio músculo esquelético (CK-MM). No grupo de esportistas não lesionados, tanto os valores de CK quanto os de alfa-actinina foram maiores em comparação com o grupo de sedentários saudáveis, o que representa que a alfa-actina, bem como a CK representaram a sobrecarga de treinamento.

Também com objetivo de se determinar um marcador de dano muscular, Martínez-amat *et al.*,(2005) compararam a mensuração de CK, troponina -T e I com a alfa-actina sanguínea em pessoas lesionadas e não lesionadas. Tendo em vista que a alfa-actina pode ser um marcador de dano muscular cardíaco, foram mensuradas também as troponinas que são específicas do dano muscular e garantiriam que não seria este o caso dos voluntários. Identificando maiores concentrações de alfa-actina plasmática em comparação a CK os autores consideraram a alfa-actina como um bom marcador de dano muscular em comparação com a CK em pessoas lesionadas.

2.6 INFLAMAÇÃO E EXERCÍCIO

Quando ocorre a lesão tecidual, o organismo responde para restaurar a integridade perdida. Essa resposta é denominada de inflamação (Abbas; Litchman, 2004). Uma das primeiras etapas da inflamação é encapsular a área danificada, isolando-a dos demais tecidos. Os espaços teciduais e os vasos linfáticos são bloqueados por coágulos de fibrinogênio, de modo que o líquido pouco consegue fluir por estes locais. Desta forma, o processo de encapsulamento retarda a disseminação de bactérias e possíveis substâncias tóxicas para a regeneração tecidual (Tidball, 2005). Os microtraumas resultam em uma resposta inflamatória moderada, que tem como finalidade o processo de cicatrização, com consequente adaptação muscular ou óssea ou ainda, do tecido conectivo (Reid & Li, 2001, Malm, 2001).

Nesse sentido, os microtraumas são considerados uma reação comum a exercícios, promovendo, conseqüentemente, respostas inflamatórias agudas e locais (Toumi & Best, 2003, Uchiyama *et al.*, 2006). Na maioria dos casos, esta resposta inflamatória local resulta em processos de recuperação, fato que é visto como um processo de adaptação do atleta, com inúmeros efeitos considerados positivos à saúde (Nobrega, 2005, Petersen & Pedersen, 2005). Diversos estudos, porém, relatam que tal recuperação não é alcançada por indivíduos que se submetem a exercícios intensos e prolongados ou a treinos exaustivos, ou ainda, que possuem uma frequência de treinamento muito elevada (Castell, 2002; Rogero *et al.*, 2005). Os elementos passivos, tais como fibras musculares e tecidos ligamentares, são capazes de absorver impactos e lesões de forma

constante. Entretanto, a frequente realização de exercícios extenuantes e o não cumprimento dos tempos necessários para a recuperação comprometem o mecanismo de regeneração tecidual e alteram os processos metabólicos das células.

Tal fato reduz a capacidade dos tecidos em resistir ao estresse ocasionado pelo exercício físico intenso (Radak *et al.*, 2001, Bloomer & Goldfarb, 2004). Algumas repercussões destas ações são a maior frequência de lesões, o que impossibilita o indivíduo de manter um condicionamento físico elevado e a redução do volume de treinamentos, o que conseqüentemente, prejudica o rendimento. Além destes aspectos, a inflamação aguda ou crônica induzida pelo exercício intenso e prolongada, posteriormente, pode evoluir para uma inflamação sistêmica e, principalmente, reduzir a massa muscular (Toumi & Best, 2003).

O exercício vigoroso pode induzir lesão celular com conseqüente inflamação do músculo esquelético tanto em humanos quanto em animais (Tricoli, 2001). A intensidade com que esse quadro se instala depende do tipo, duração e intensidade do esforço, assim como, o tipo de contração muscular (Smith & Miles, 1999). O surgimento desse processo inflamatório representa uma resposta generalizada do organismo a qualquer dano aos tecidos, provocado por uma grande variedade de estímulos químicos e/ou mecânicos (Malm, 2001). Embora a inflamação associada ao exercício físico esteja fortemente ligada à lesão tecidual, tornando a extensão do processo inflamatório dependente da magnitude da lesão muscular, certos aspectos estão intimamente associados às funções vitais de defesa do tecido, sendo que, neste contexto, as evidências experimentais mostraram que em resposta a este fato instala-se um processo inflamatório

agudo, que ao seu final tem a função de promover a regeneração do tecido normal (Malm, 2001).

Os eventos locais da inflamação podem ser divididos em vasculares e celulares, sendo que os mediadores que modificam estes são derivados do sangue e das células (Smith e Miles, 1999). A resposta inflamatória, decorrente do exercício físico, é uma resposta muito bem elaborada e sincronizada, com grande capacidade de amplificação em cada passo visando o movimento de fluídos, proteínas plasmáticas de leucócitos da circulação para o local lesionado (diapedese) e ativação das células do sistema imunitário (Smith & Miles, 1999). Para isso, ocorre vasodilatação periférica e aumento da permeabilidade vascular. A migração de leucócitos (neutrófilos e monócitos ativados) para o local da inflamação induz acúmulo de plasma no espaço intersticial, desencadeando o edema (Fehrenbach & Schneider, 2006). Alguns autores acreditam que quando a causa do processo inflamatório for o exercício aeróbio de longa duração, os mecanismos responsáveis pela sua instalação serão diferentes, por exemplo, de quando a origem for um trauma. Nesta situação o estresse mecânico, a isquemia local e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) na musculatura esquelética, principalmente após o exercício de alta intensidade seriam os responsáveis pelo surgimento do processo inflamatório no pós exercício (Venkatraman *et al.*, 2001).

Segundo Pedersen & Hoffman-Goetz, (2000) o exercício agudo tem um efeito no sistema imunológico tanto durante como depois da atividade. Durante o exercício os músculos produzem e liberam uma elevada concentração de IL-6, e seus níveis plasmáticos podem aumentar de forma significativa. Leucócitos como os neutrófilos, linfócitos (incluídos os T, B e células NK) e os monocitos, assim

como as concentrações plasmáticas de proteína C reativa (PCR) e tanto as citocinas pró como as anti-inflamatórias principalmente TNF-alfa, IL-1, IL-1ra, IL-10 e sTNF-r podem aumentar várias magnitudes durante uma sessão aguda exercício. Ao finalizar o exercício intenso, os neutrófilos e os monocitos podem seguir aumentando no período de recuperação, enquanto que o resto dos leucócitos diminuem seu número e as concentrações plasmáticas das citocinas mencionadas se mantêm elevadas durante algumas horas mais. Exercícios extremos, tais como maratonas, e o sobreentrenamiento se associa com uma depressão da função imune (Gleeson, 2006), que pode aumentar no esportista de elite a suscetibilidade à infecção. Os marcadores proinflamatorios do TNF-alfa e a IL-1B não parecem aumentar em períodos curtos de exercício intenso ou moderado, embora os resultados são contraditórios (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). É evidente, pois, que um exercício agudo exerce diversos efeitos sobre o sistema imunológico mas que são geralmente de natureza transitiva. A inflamação É uma condição que se não for tratada através de um processo que permita a recuperação completa do organismo, pode progredir, tornar-se crônica, indesejável e impedir a melhoria do rendimento físico do atleta. (Smith & Miles, 1999).

2.6.1 CITOCINA IL-6

As citocinas são proteínas biologicamente ativas de baixo peso molecular que possuem diversas funções endócrinas e metabólicas (Pedersen & Febbraio, 2005). A interleucina-6 (IL-6) é uma molécula de sinalização intercelular tradicionalmente associada com o controle e a coordenação de respostas imunes, sendo primeiramente secretada pelos macrófagos e linfócitos em resposta a lesão ou infecção (Pedersen & Tof, 2000).

No músculo esquelético, a elevação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, está associada à incidência de lesão no tecido muscular induzida por atividades de alta intensidade ou ações excêntricas (Keller *et al.*, 2001). No entanto, estudos posteriores estabeleceram que a IL-6 pode aumentar mesmo na ausência de lesão (Bruunsgaard *et al.*, 1997; Croisier *et al.*, 1999; Steensberg *et al.*, 2000; Pedersen *et al.*, 2004;).

A IL-6 plasmática durante o exercício aumenta com a intensidade e duração da atividade (Ostrowski *et al.*, 1998). Foi recentemente demonstrado que a IL-6 pode ser considerada como um “fator do exercício”; esta citocina, que é produzida e liberada no músculo esquelético em resposta ao exercício físico, exerce seus efeitos em outros órgãos do corpo e pode ser chamada de “miocina” (Pedersen *et al.*, 2004; Stich *et al.*, 2000). Quando os períodos de recuperação entre as sessões de exercício são curtos e a intensidade do trabalho, elevada a ponto de comprometer os conteúdos de glicogênio muscular, pode ocorrer uma crise energética no músculo em contração, afetando tanto o metabolismo dos carboidratos como o lipídico (Pedersen *et al.*, 2001), ao passo que, este processo eleva a concentração plasmática e muscular de IL-6 (Stich *et al.*, 2000).

Similarmente o seu papel no sistema imune, a liberação de IL-6 induzida pelo exercício regula componentes da fase de resposta aguda, incluindo fase aguda de síntese protéica pelo fígado e liberação de glicocorticóides via estimulação do eixo hipotalâmico- hipofisário-adrenal (Pedersen & Hoffman, 2000). Concentrações elevadas de IL-6 foram registradas imediatamente após o exercício físico (Steensberg *et al.*,2002).

Em relação a exercícios de características concêntricas e excêntricas, a IL-6 é produzida em maiores quantidades do que qualquer outra citocina (Ronsen *et al.*, 2002). Em consequência de duas sessões prolongadas de ciclismo realizadas por atletas de endurance, pode-se observar que uma segunda sessão de alta intensidade no mesmo dia ocorreu aumentos mais pronunciados de IL-6 e IL-1ra, se comparados com os valores registrados em uma única sessão. No entanto, uma tendência de atenuação na resposta destas citocinas foi observada quando o período de intervalo entre as duas sessões de exercício foi estendido de 3h para 6h e uma refeição adicional foi fornecida (Ronsen *et al.*, 2002). O aumento da IL-6 frente ao exercício pode estar ligado à depleção de glicogênio muscular e aumentada mobilização de substrato por outros tecidos. Suzuki *et al.*,(2003) demonstraram que uma maratona induziu aumentos significativos na liberação sistêmica de IL-6.

No caso de garotas de 14-16 anos de idade, a prática de uma sessão de pólo aquático resultou em aumento na concentração circulante de IL-6 (Nemet *et al.*,2003). Toft *et al.*, (2002), registraram que depois de 60 minutos de exercício em bicicleta ergométrica realizando a seguinte sequência: 0-6 minutos a 50%, 6-12 minutos a 75%, 12-20 minutos a 100%, 20-25 minutos a 130%, 25-40 minutos a 100%, e 40-60 minutos a 75% do VO_{2max} , a IL-6 aumentou progressivamente.

Estudos prévios demonstraram que o exercício concêntrico, como pedalar, resulta em menores aumentos na IL-6, se comparado com o exercício de características excêntricas, como a corrida (Starkie *et al.*, 2001). Contudo, durante a corrida intensa, como a maratona, aumentos de 100 vezes na concentração de IL-6 foram demonstrados (Ostrowski *et al.*, 1999, Starkie *et al.*, 2001; Toft *et al.*, 2000). O aumento de IL-6 no plasma pode ter sido causado pela lesão muscular devido às concentrações marcadamente elevadas de creatina kinase (CK), depois do exercício, em comparação com o período de repouso (Starkie *et al.*, 2001). Em estudo realizado com atletas homens (ciclistas e triatletas) que realizaram uma sessão de ciclismo de carga constante, com duração de 4 horas, na intensidade de 70% do limiar anaeróbio individual, foi observado aumento de 10 vezes na IL-6 em relação aos valores basais (Scharhag *et al.*, 2005). Em atletas que realizaram 75 minutos de exercício em cicloergômetro a 75% VO_{2max} , foram detectados aumentos significativos na concentração de IL-6 (Ronsen *et al.*, 2002). Neste estudo, quando os indivíduos realizaram mais de uma sessão no mesmo dia, as concentrações de IL-6 foram significativamente superiores em relação a uma única sessão (Ronsen *et al.*, 2002). Com o exercício, o pico de IL-1ra foi encontrado 1-2h depois do pico de IL-6, sendo assumido que as concentrações de IL-1ra refletem a produção de IL-6 (Ostrowski *et al.*, 1999). A IL-6 mostrou ter participação no controle de vias metabólicas durante o exercício. A IL-6 é uma substância biologicamente ativa que não é secretada apenas pelas células do sistema imunológico durante condições inflamatórias, mas é também liberada do tecido adiposo (Frubeck *et al.*, 2001) e pela contração muscular na ausência de inflamação. Na perspectiva metabólica, a IL-6 possui efeitos lipolíticos em associação com o exercício físico, sendo que a infusão de IL-6 em ratos

aumentou as concentrações de ácidos graxos e triacilgliceróis de uma forma dose dependente (Nonogaki *et al.*,1995). Assim, esta citocina é uma importante moduladora do metabolismo lipídico, devido ao aumento da oxidação de gorduras e reesterificação de ácidos graxos. No músculo esquelético, a expressão de IL-6 aumenta após o exercício e precede as microrupturas nas miofibrilas induzidas por este tipo de atividade. A produção de citocinas, como IL-6, IL-1 β e TNF-alfa, podem regular o processo de dor muscular tardia decorrente de atividades esportivas (Febbraio, Pedersen, 2005). De fato, a IL-6 induz a proliferação de células satélites, que são células quiescentes precursoras da formação de novos miotubos e auxiliam na regeneração muscular (Jonsdottir *et al.*,2000). A contração muscular induz a expressão do RNAm da IL-6 no músculo, assim como a razão de transcrição do gene de IL-6 é aumentada pelo exercício físico. Esta citocina pode exercer um papel importante na manutenção da homeostasia da glicose durante o exercício prolongado, com ações similares a de um hormônio, otimizando a resposta metabólica durante a atividade muscular. As concentrações plasmáticas de IL-6 aumentam exponencialmente com o aumento da duração e intensidade do exercício, podendo sofrer influência da quantidade de massa muscular recrutada e capacidade aeróbia individual (Pedersen *et al.*,2004; Fischer *et al.*, 2004). Keller *et al.*,(2001) observaram que o exercício prolongado ativa a transcrição do gene de IL-6 no músculo esquelético. Esta resposta foi particularmente aumentada quando o conteúdo de glicogênio muscular era baixo. Os mesmos autores estabeleceram que o tecido muscular é uma fonte de produção de IL-6 durante o exercício prolongado e que a concentração de glicogênio muscular pode ser um determinante crítico, regulando a resposta desta molécula ao exercício. A ingestão de carboidrato atenua as elevações

plasmáticas de IL-6 durante a corrida e o ciclismo. Em resumo a IL-6 proveniente do músculo esquelético pode ser considerada como um “fator do exercício”, esta “miocina” (citocina produzida no músculo esquelético) pode contribuir com a maior parte das elevações plasmáticas observadas durante o exercício e exerce efeitos metabólicos em outros tecidos, como o fígado, tecido adiposo e cérebro. A transcrição gênica da IL-6 não é ativada no músculo em repouso, mas é rapidamente estimulada pela contração muscular. A liberação de IL-6 do músculo esquelético é afetada pelo conteúdo de glicogênio muscular, sendo que, quando os estoques são baixos, a produção é aumentada. Sua função enquanto sensor metabólico inclui: ativação da lipólise no tecido adiposo e glicogenólise hepática, aumentando a liberação de glicose para o sangue. A IL-6 exerce ainda função anti-inflamatória através da inibição da inflamação de baixo grau induzida pela TNF-alfa e pode contribuir para os efeitos da fadiga durante o exercício físico.

2.7 RESPOSTAS HORMONAIAS AO TREINAMENTO

A aferição de diferentes hormônios circulantes tem se mostrado de grande valia no esclarecimento de diversos fenômenos ocorridos durante o treinamento esportivo. Hormônios como a testosterona, cortisol e hormônio do crescimento (GH) são estudados amplamente pela influência que desempenham na relação anabolismo/catabolismo, principalmente em treinamento de força (Kraemer *et al.*, 2001). O treinamento de força promove adaptações hormonais agudas relacionadas ao metabolismo protéico e o crescimento muscular (Crewther, 2006; Kraemer *et al.*, 2005). Entretanto, poucos estudos equalizam os diferentes protocolos para tentar isolar o efeito das diferentes variáveis de treinamento sobre

o sistema endócrino. Estudos relatam que tanto a testosterona quanto o cortisol variam de acordo com os diferentes protocolos de exercício (Gotshalk *et al.*, 1997; Mulligan *et al.*, 1996; Smilios *et al.*, 2003; Crewther *et al.*, 2008; Durand *et al.*, 2003; Kraemer *et al.*, 2006).

2.7.1 CORTISOL E EXERCÍCIO

Os glicocorticóides são secretados pelo córtex da glândula adrenal e também possuem função anti-inflamatória quando em concentrações fisiológicas. Suas ações contrapõem as ações pró-inflamatórias sinalizadas pelas citocinas IL-1b e TNF-alfa. O cortisol está envolvido na regulação da expressão de moléculas de adesão endoteliais, controlando, dessa forma, a migração de fagócitos para o tecido lesado. Isso evita a potencialização do dano muscular em função, por exemplo, de um *burst* respiratório acentuado. O cortisol possui a capacidade de estabilizar as membranas lisossomais, inibindo a liberação de enzimas proteolíticas sinalizadoras da inflamação tecidual, podendo também diminuir a permeabilidade dos capilares, reduzindo o efeito do edema tecidual. Os glicocorticóides induzem, também, aumento na exportação do aminoácido glutamina pela musculatura, através do estímulo na atividade da enzima glutamina sintetase e expressão do RNAm desta enzima, fato este que relaciona a glutamina com a função dos leucócitos. Os glicocorticóides, quando secretados em maior quantidade durante o exercício físico, suprimem a ativação linfocitária, especialmente, os linfócitos T, contribuindo para o quadro de imunossupressão pós-exercício; ao mesmo tempo, suprimem a febre, via redução na secreção de IL-1 β pelas células do sistema imune. Outra ação dos glicocorticóides é induzir

proteólise muscular, a fim de disponibilizar uma grande quantidade de aminoácidos livres para a síntese de proteínas de fase aguda no fígado (Guyton, 2006).

O hormônio cortisol é esteróide e essencial para manter as concentrações de glicose no sangue, o que é de grande importância em situações de estresse. Também tem efeito direto sobre o fígado, onde estimula a gliconeogênese, elevando assim a glicemia. No tecido adiposo, em conjunto com a adrenalina, estimula a lipólise. Tem efeito catabólico na proteína hepática e muscular criando, em alguns casos, um balanço nitrogenado negativo e tem ação depressiva sobre o sistema imunológico (McMurray *et al.*, 2000). A concentração de cortisol no sangue aumenta em resposta ao aumento do volume e intensidade do exercício (McMurray *et al.*, 2000). Alto volume de exercícios de força pode resultar em aumentos significativos na concentração de cortisol, especialmente quando grandes massas musculares são recrutadas (Stone *et al.*, 1998). O aumento do cortisol após o exercício pode ficar acima da linha de base por mais de uma hora. Esse aumento pode ter uma ação envolvida no mecanismo de recuperação, causando o aumento da mobilização de ácidos graxos livres (AGL), inibindo a resposta imune e/ou a inflamação (Stone *et al.*, 1998).

O cortisol é um hormônio catabólico secretado pelo córtex adrenal em resposta ao estresse físico e psicológico. Exercícios acima de 60% do $VO_{2máx}$ são considerados fatores estressantes capazes de causar aumento da concentração de cortisol (Behr *et al.*, 2009; Del Corral *et al.*, 1998; Inder *et al.*, 1998), bem como exercícios com pesos (Nindl *et al.*, 2001) e atividades em intensidade máxima e curta duração (Behr *et al.*, 2009). As concentrações de cortisol aumentam durante exercícios de intensidade alta e moderada e longa duração (Del Corral *et al.*,

1998; Inder *et al.*, 1998) e seus efeitos ocorrem também após o exercício durante a recuperação (Nindl *et al.*, 2001).

Durante o exercício físico, as variações do cortisol são consequência de diversos efeitos, por vezes opostos, tais como o aumento da destruição periférica de cortisol, a diminuição da taxa de metabolização hepática ou do aumento da secreção de hormônios adrenocoticotrópicos (ACTH), derivadas na sua maioria da influência de mecanismos relacionados com o stress. Este quadro configura uma grande variabilidade na resposta do cortisol ao exercício físico. Um aumento da secreção de cortisol é geralmente uma resposta ao stress. Por essa razão, em exercício moderado do qual o stress não é alto, não são detectadas mudanças nos níveis de cortisol, fato confirmado por Ramel *et al.*, (2003) que investigaram os efeitos de um exercício de resistência nos parâmetros hormonais (cortisol e noradrenalina) em 17 participantes com idades médias compreendidas entre os 29 anos. Neste exercício, foram retiradas amostras de sangue antes, durante, imediatamente depois, 30 minutos, 1h, e 2h depois do fim do exercício. A resposta do cortisol ao exercício foi inconstante entre os participantes, porém, a concentração média do cortisol não foi significativamente afetada durante o exercício ou a recuperação, embora tenha sido observado um decréscimo ao longo de todos os momentos estudados. Por outro lado, durante o exercício exaustivo, onde o stress é máximo, espera-se que os níveis de cortisol aumentem (França *et al.*, 2006). Esta tendência foi igualmente verificada por Hoogeveen (1996), ao estudar o comportamento do cortisol, em 10 ciclistas profissionais, antes e depois de um teste sub-máximo, confirmando um aumento nos níveis de cortisol.

Handziski *et al.*, (2006) verificaram as alterações no cortisol em atletas masculinos de futebol, como efeitos de uma temporada competitiva. Os autores verificaram uma queda significativa após a fase pré-competitiva e um aumento importante após a fase competitiva, em relação aos valores coletados no início da fase de preparação. Outro relevante estudo foi realizado por Ispirlidis *et al.*, (2008), o qual foi verificou o efeito de um jogo de futebol sobre a concentração de cortisol sanguíneo. Os resultados obtidos apresentaram que o cortisol elevou-se significativamente em decorrência do jogo de futebol (de aproximadamente 275 para aproximadamente 415 mmol/L). Posteriormente, os valores de cortisol já voltaram aos níveis basais em apenas 24 horas após a realização do jogo.

2.7.2 TESTOSTERONA E EXERCÍCIO

A testosterona é o principal hormônio sexual masculino. Tem ação anabólica, estimula a síntese protéica, o crescimento ósseo, promove ativação enzimática, produção de eritrócitos, androgenia, atua na diferenciação sexual e na função reprodutiva (McMurray *et al.*, 2000). A testosterona pode exercer efeito anti-catabólico através da interação com os receptores de cortisol, por sua influência em fatores neurais e possivelmente um aumento da glicogenólise nas fibras musculares do tipo II, além de promover a ressíntese de glicogênio durante a recuperação pela estimulação da enzima glicogênio sintetase (Stone *et al.*, 1998; Hackney, 2006). Os exercícios devem ser de alta intensidade, usando grandes massas musculares, para que haja o aumento da concentração de testosterona. Porém, treinos com alto volume podem reduzir a concentração de testosterona durante o repouso, diminuindo assim o estímulo de síntese protéica

(Stone *et al.*, 1998; França *et al.*, 2006; Fry *et al.*,1998). Em exercícios que finalizam por esgotamento, a resposta inicial do aumento hormonal segue-se por um marcado decréscimo de testosterona. É possível que durante os exercícios extenuantes, a redistribuição do fluxo sanguíneo afete o fluxo testicular, sendo responsável pela redução dos níveis plasmáticos da testosterona. A redistribuição sanguínea que se faz sentir durante o exercício condiciona um decréscimo no fluxo hepático e, em consequência, uma diminuição do metabolismo hepático de androgênios (França *et al.*, 2006; Fry *et al.*,1998). Ispiridis *et al.*, (2008), verificaram o efeito de um jogo de futebol sobre a concentração de testosterona sanguínea. Os resultados obtidos apresentaram que a testosterona reduziu logo após em decorrência do jogo de futebol, com os valores retornando aos níveis basais em apenas 24 horas. Resultados semelhantes foram encontrados por (Malm *et al.*, 2004) após uma sequência de dois jogos. Assim como outros hormônios, a testosterona é utilizada para o monitoramento do estado de treinamento e da demanda fisiológica de determinadas atividades agudas e crônicas e a sua diminuição após eventos esportivos identifica um estado menos anabólico. (Filaire *et al.*, 2001; Kraemer *et al.*, 2004).

DESENHO DA INVESTIGAÇÃO

A presente Tese se compõe de dois estudos independentes sobre comportamentos fisiológicos em atletas de futebol com diferentes genótipos para o gene da ACTN3.

ESTUDO 1

Neste estudo investigamos o efeito da ACTN3 ou a ausência da ACTN3 no desempenho físico de atletas de futebol. Os autores avaliaram 200 atletas profissionais de futebol em quatro diferentes testes físicos que avaliam tanto a potência/força e resistência. Foram realizados duas variações de um salto (Squat Jump e Counter Movement Jump), um sprint de 30m e um teste de resistência aeróbica (YoYo Endurance Test-nível 2). O tempo de sprint e altura de salto foram medidos através de instrumentação adequada e o teste de resistência foi avaliado usando um teste de VO_{2max} .

ESTUDO 2

Fatores genéticos podem interferir com o desempenho desportivo. A identificação da predisposição genética de jogadores de futebol traz informações importantes para treinadores e técnicos para o ajuste individual das cargas de treinamento. Respostas diferentes para o treinamento excêntrico foram observadas em função do genótipo conhecido como α -actinina-3 (ACTN3) em biomarcadores de lesão muscular, hormônios e respostas inflamatórias. Comparamos a reação inflamatória aguda, lesão muscular e variações hormonais de acordo com o treinamento excêntrico em 37 atletas de futebol profissionais com diferentes perfis genéticos de ACTN3 (XX, RX e RR).



ESTUDO 1

1. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi comparar o desempenho de jogadores de futebol em testes de força, velocidade e de resistência aeróbia entre os diferentes grupos genotípicos da ACTN3 (XX, RX e RR).

2. METODOLOGIA

2.1 DESENHO EXPERIMENTAL

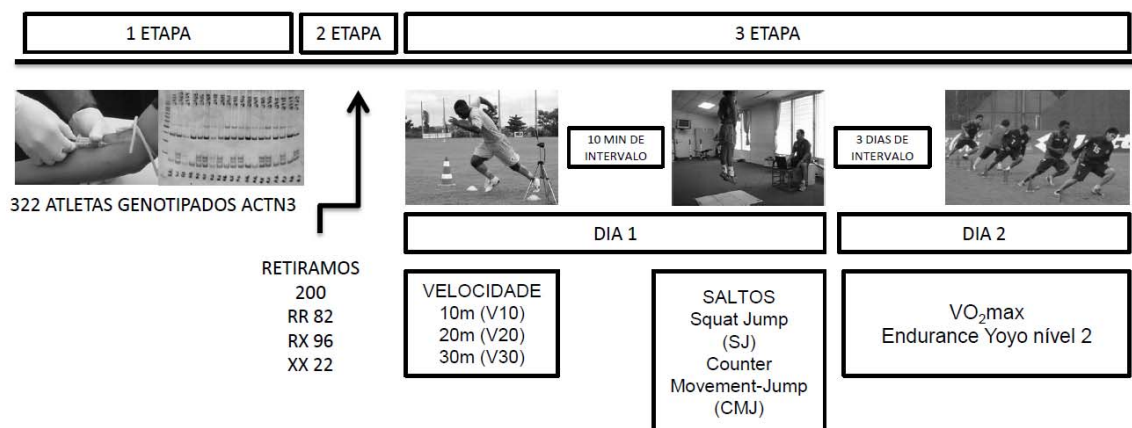


Figura 7: Resumo da metodologia usada no estudo 1.

Os procedimentos de avaliação descritos abaixo ocorreram ao longo de dois dias, em uma semana de testes no início da temporada de treinamento e estão representados na fig 7.

Todos os testes ocorreram de manhã em torno de 09:00. Os indivíduos realizaram quatro testes físicos (Squat Jump, Counter Movement Jump, 30 metros de sprint de teste e Yoyo Endurance Test-nível 2) para a avaliação de suas capacidades de força, velocidade e resistência. Os participantes não estavam tomando qualquer medicação ou suplementos dietéticos com ação anti-inflamatória ou qualquer tipo de tratamento de recuperação, como a crioterapia por duas semanas antes do estudo. Cada jogador foi testado separadamente, instruídos e encorajados verbalmente a dar o esforço máximo em todos os testes. Os voluntários foram instruídos a ser absterm e por não fazer qualquer atividade

física por pelo menos 24 horas antes do exame e não beber bebidas contendo cafeína no dia dos testes. Todos os atletas eram familiarizados com os testes tendo em vista que estes fazem parte da rotina de avaliação dos atletas dos clubes que participaram do estudo.

Os testes foram realizados ao ar livre e em grama artificial. O aquecimento padronizado de 10 - 15 minutos incluiu corrida, saltos, corridas multi-direcionais e exercícios de alongamento dinâmico.

Dia 1

Em um teste de sprint de trinta metros, a velocidade dos jogadores foi avaliada em intervalos de 10m (V10), 20m (V20) e 30m (V30), no campo, com as medições eletrônicas utilizando fotocélulas, com precisão de 0,001 s, localizado a 0m, 10m e 30m do caminho. Todos eles foram conectados a um computador com o software específico (Multisprint software Hidrofit® Ltda; Belo Horizonte, Brazil Multisprint®, Brasil) para análise de velocidade. Cada indivíduo teve três tentativas separadas por cerca de três minutos para garantir a recuperação total. Os atletas iniciaram cada sprint de um pé (estático) posição em que o pé da frente foi colocado 50 centímetros atrás da linha de partida. Todos os voluntários foram instruídos a realizar o sprint o mais rápido possível através da distância. O julgamento com o melhor tempo de sprint de 30m foi escolhida para a análise dos tempos de sprint depois de 10m, 20m e 30m.

Separados por pelo menos 10 minutos do teste anterior, dois testes de desempenho foram incluídos para avaliar a força explosiva dos músculos extensores da perna em uma plataforma, (Jump test, Hidrofit® Ltda; Belo Horizonte, Brazil, precisão de 0.1 cm), conectado e analisado pelo Multisprint

software (Hidrofit® Ltda; Belo Horizonte, Brazil). Este sistema determina a altura do salto usando a seguinte equação: $h = (g (t^2)) / 8$ (onde g = aceleração da gravidade e t = tempo no ar). Os testes utilizados foram Squat Jump (SJ) e Counter Movement-Jump (CMJ). Os indivíduos realizaram o CMJ e SJ com as mãos mantidas em seus quadris durante os saltos. Durante o SJ, com os joelhos a 90° de flexão, os sujeitos foram instruídos para executar um salto vertical máximo e não foram autorizados a usar qualquer movimento para baixo antes do salto vertical máximo. As curvas força foram inspecionadas para verificar nenhum movimento para baixo antes do salto vertical. Durante o CMJ, o deslocamento angular dos joelhos foi padronizado de modo que os indivíduos foram obrigados a dobrar os joelhos diante de aproximadamente 90° para cima e depois de rebote em um salto vertical máximo. Cada indivíduo teve quatro tentativas intercaladas com cerca de um descanso de 1,5 minuto entre cada salto, tanto na SJ e CMJ. O melhor salto de cada sujeito foi utilizado na análise dos dados. O desempenho usando um tapete de cronometragem pode ser influenciado pela posição do corpo durante o voo, por isso os participantes foram instruídos e cuidadosamente observados para manter as pernas retas enquanto estiver no ar. Se os joelhos foram dobrados ou levantados, o salto foi descartado e o participante recebeu uma nova tentativa após um período de descanso.

Dia 2

Três dias após, os jogadores realizaram um teste de VO_{2max} após o aquecimento completo. O VO_{2max} foi avaliado pelo Yoyo Endurance Test-nível 2 (Bangsbo, 1994). Este teste é específico para jogadores de futebol e esportes intermitentes (Krustrup *et al.*, 2005) em que a distância percorrida em caráter

intermitente possui relação direta com a capacidade aeróbia dos atletas (Castagna *et al.*, 2006). Mesmo que os testes de campo não são considerados padrão-ouro para determinar as variáveis fisiológicas, tem sido sugerida a necessidade de utilizar testes de campo pela especificidade e facilidade de aplicação em esportes de equipe. Duas tentativas separadas por quatro horas foram feitas por cada voluntário.

3.AMOSTRA

Este estudo respeita todas as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional da Saúde (Res. 196/96) envolvendo pesquisas com seres humanos. Todos os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE I) após as explicações sobre procedimentos e possíveis riscos. Todos os dados coletados durante a realização deste estudo serão utilizados apenas para fins de pesquisa e somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso às informações. Estas precauções serão adotadas com o intuito de preservar a privacidade, a saúde e o bem-estar dos voluntários. Este projeto foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e foi aprovado para sua realização (ETIC 291/09).

Participaram dos estudos como voluntários 322 jogadores de futebol de campo de quatro categorias (Profissionais, sub-20, sub-17 e sub-15) vinculados a equipes de futebol inscrita na Confederação Brasileira de Futebol (CBF), que mantinha treinamentos regulares e participava de competições reconhecidas por esta mesma confederação durante a realização do estudo. Todos os atletas foram avaliados e genotipados no início da temporada competitiva.

Os sujeitos foram submetidos à avaliação física para a caracterização da amostra, na qual foram mensurados massa corporal, estatura, dobras cutâneas e consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$). A massa corporal (kg) foi medida com os voluntários descalços e nus utilizando-se uma balança digital (Filizola[®]) com precisão de 0,02 kg, calibrada previamente. A estatura (cm) foi medida utilizando-se um estadiômetro com precisão de 0,5 cm acoplado a uma balança (Filizola[®]).

As dobras cutâneas subescapular, tríceps, bíceps, peitoral, subaxilar, suprailíaca, abdominal, coxa e perna foram medidas utilizando-se um plicômetro (Lange[®]), graduado em milímetros, de acordo com o protocolo proposto por (Jackson & Pollock, 1978). Os valores de cada dobra foram utilizados para a obtenção do somatório das dobras (Σ dobras) e cálculo do percentual de gordura. Todos os atletas são submetidos a exames clínicos de rotina e avaliação médica do perfil cardiorespiratório através de ecocardiograma. Todos os procedimentos são de rotina do clube e acontecem de forma sazonal pelo departamento de fisiologia do mesmo. Dados referentes às características da amostra utilizada estão representados na tabela 2.

Tabela 2: Massa corporal, estatura e percentual de gordura.

Categoria (N)	Massa corporal (kg)	Estatura (cm)	%G
Sub-15(68)	68,42 ± 9,42	177,57 ± 8,52	9,49 ± 2
Sub-17(44)	73,3 ± 6,79	181,3 ± 7,04	9,15 ± 1,89
Sub-20(115)	73,36 ± 7,9	180,6 ± 8,2	9,21 ± 2,08
Adultos(95)	74,25 ± 5,79	182,6 ± 8,55	8,2 ± 2,34

Dados expressos em média e desvio padrão.

Todos os atletas foram genotipados para o gene da ACTN3 e divididos por grupos genéticos (tabela 3). As frequências alélicas e genóticas estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,2582$).

Tabela 3: Frequências genóticas observadas para o locus ACTN3 em atletas de futebol brasileiros.

Categoria (N)	Genotipo		
	RR	RX	XX
Sub-15(68)	25	32	11
Sub-17(44)	18	20	6
Sub-20(115)	50	50	15
Profissionais (95)	42	46	7
Totais (322)	135	148	39
	0,419%	0,460%	0,121%

Os dados são apresentados como N em cada uma das categorias e de forma relativa (%).

Foram retirados da amostra total 200 atletas que foram avaliados em todos os testes físicos propostos no início da temporada nos respectivos clubes. Dados referentes às características da amostra utilizada estão representados na tabela 4.

Tabela 4. Dados antropométricos.

Genótipo ACTN3	Idade	Peso (kg)	Altura (cm)	%G
RR (82) 45%	23.8 ± 0.7	75.0 ± 5.8	181.7 ± 8.5	9.3 ± 2.4
RX (96) 44%	26.2 ± 2.9	73.5 ± 2.7	180.8 ± 8.9	9.2 ± 1.9
XX (22) 11,0%	20.4 ± 2.4	70.4 ± 9.9	179.2 ± 6.8	8.5 ± 1.8
200	2.4 ± 2.0	72.3 ± 7.5	180.5 ± 8.07	9.01 ± 2.0

Dados expressos em média e desvio padrão.

4. MATERIAL E METÓDOS

4.1 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO R577X NO GENE ACTN3

Todos os indivíduos foram genotipados para o polimorfismo da ACTN3 e divididos em grupos de mesmo genótipo RR, RX e XX, através da técnica de RFLP-PCR (Polimerase de cadeia ramificada e Poliformismo de Comprimento de Fragmento de Restrição) com enzima de restrição (*Ddel*) após a extração do DNA. A extração de DNA genômico das amostras de sangue periférico foi realizada conforme protocolo descrito na literatura, com utilização de proteinase K seguida de precipitação salina (Miller *et al.*, 1988).

Um fragmento de DNA contendo o éxon 16 do gene ACTN3 foi amplificado a partir do DNA genômico e os iniciadores utilizados foram: forward, 5'-CTGTTGCCTGTGGTAAGTGGG3'; reverse, 5'CACAGTATGCAGGAGGG3', ancorados nas sequências intrônicas adjacentes (Mills *et al.*, 2001). As reações de PCR tiveram um volume final de 25 µL, com 10 mM Tris, pH 8.4, 50 mM KCl, 1,75 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X-100), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 U *Taq* DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 1,0 µM de cada iniciador (SINAPSE BIOTECNOLOGIA®, São Paulo, SP, Brasil), usando aproximadamente 100 ng de DNA genômico como molde. O programa de amplificação foi composto por uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos, compostos por 94°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os alelos R577X (códon CGA e TGA) foram distinguidos pela presença (577X) ou ausência (577R) de um sítio de restrição da enzima *Ddel* (Mills *et al.*, 2001).

Após a amplificação por PCR, 1 µL do produto de PCR foi digerido com 20 U da enzima *Ddel* em um volume final de 15µL. As reações foram incubadas Over night (O/N) a 37°C. Posteriormente, os fragmentos digeridos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corados com solução de nitrato de prata (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). 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) (figuras.8 A e B).

Como pode ser observado, quando os sítios de restrição da enzima *Ddel* (CTNAG) são encontrados na sequência de DNA que foi amplificada através da PCR ocorre a clivagem da sequência gerando fragmentos. De acordo com a existência e posição dos sítios de restrição em cada indivíduo, os fragmentos gerados terão números de pares de bases diferentes que serão identificados através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Sendo possível assim diferenciar o genótipo de cada indivíduo. A separação no gel de eletroforese obedece ao princípio de separação por número de pares de bases em que os fragmentos menores (possuem menor quantidade de pares de bases) conseguem passar mais facilmente pela malha do gel e por isso são identificados mais próximos do pólo positivo da cuba de eletroforese (posição inferior do gel).

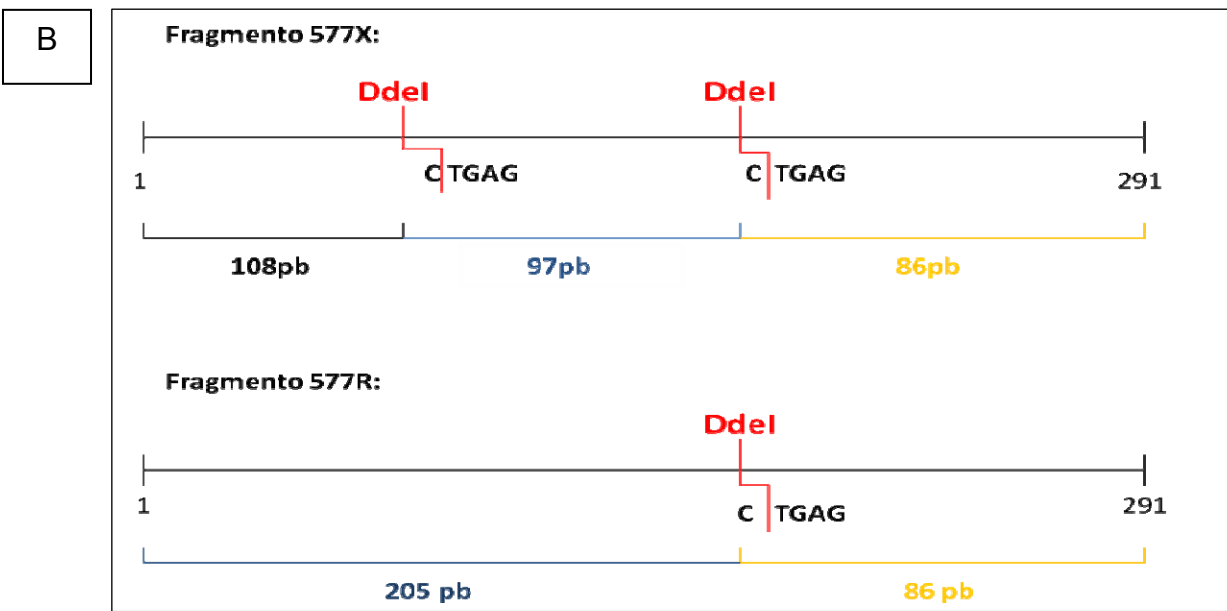
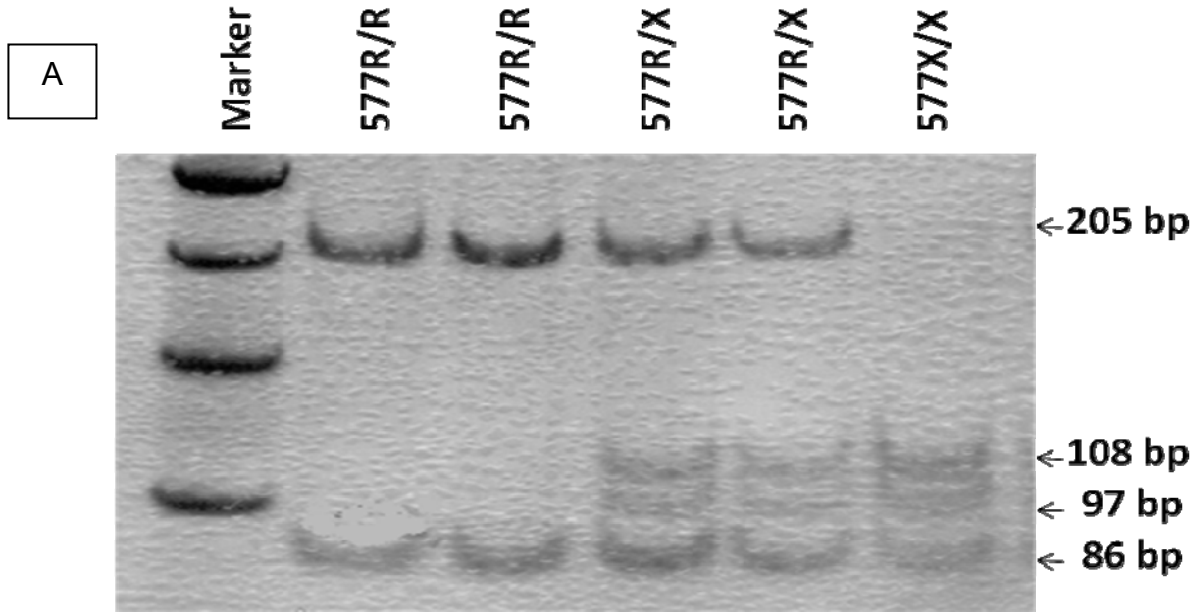


Figura 8 -. A) Esquema da restrição com enzima DdeI. B) Gel de poliacrilamida da restrição. Indivíduos com genótipo 577R/R apresentam fragmentos na altura de 205 e 86 pb; genótipo 577R/X, 205, 108, 97 e 86 pb; e genótipo 577X/X 108, 97 e 86 pares de bases.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após verificar a regularidade dos dados pelo teste de Kolmogorov Smirnov, a ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey post hoc foi utilizada para comparar o desempenho dos atletas em cada prova para os grupos de genótipos diferentes. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$ e os dados são apresentados como média e desvio padrão. O poder estatístico foi de 95%. O desempenho dos testes físicos foi usado para determinar o coeficiente de correlação intraclass (ICC) e o erro padrão de medida (SEM) da amostra.

6. RESULTADOS

A tabela 5 apresenta os valores dos testes entre os diferentes genótipos avaliados. Observou-se que os indivíduos RR apresentaram menores tempos para percorrer os percursos em 10m em comparação com os indivíduos XX ($p < 0,05$). Os indivíduos RR também apresentaram menores valores de tempo no percurso de 20 e 30m em comparação com os indivíduos RX e XX ($p < 0,05$). Nos testes de saltos, os indivíduos RR e RX apresentaram valores maiores em comparação com os indivíduos XX ($p < 0,05$). Já em relação ao teste aeróbio, os indivíduos XX apresentaram maiores valores de VO_2 máximo em comparação com o grupo RR ($p < 0,05$). Atletas de futebol que apresentam o genótipo ACTN3/RR são mais rápidos em distâncias curtas e apresentam maior potência de salto. O ICC e SEM dos resultados de cada teste físico foram, respectivamente: V10 (0,98, 2,5%), V20 (0,96, 2,9%), V30 (0,96, 2,8%), SJ (0,94, 3,5%), CMJ (0,95, 3,1%) e Yoyo Endurance Test (0,92, 3,6%)

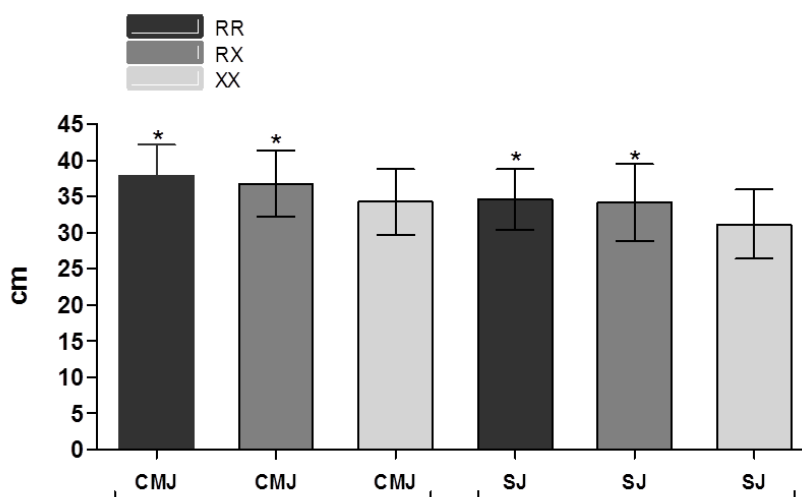
Tabela 5: Valores de testes de velocidade em 10, 20 e 30m, saltos (CMJ, SJ) e consumo máximo de oxigênio em relação aos diferentes genótipos do ACTN3 (RR,RX e XX). Valores apresentados como média e desvio padrão.

GEN(N)	VO ₂ máx(mL/Kg/min)	CMJ (cm)	SJ (cm)	10m (s)	20m (s)	30m (s)
RR(89)	53,36± 4,27*	37,81± 4,37*	34,65± 4,21*	1,78± 0,12*	2,39± 0,13* [#]	4,17± 0,23* [#]
RX(87)	54,29± 3,8	36,76± 4,62*	34,09± 5,35*	1,81± 0,13	2,46± 0,24	4,30± 0,36
XX(24)	56,28± 3,25	34,24± 4,57	30,88± 4,70	1,87± 0,11	2,49± 0,13	4,39± 0,31

Genótipos (GEN) e N das diferentes expressões do ACTN3 (RR, RX, XX). *Diferença em relação ao XX, [#] diferença em relação ao RX. (p<0,05).

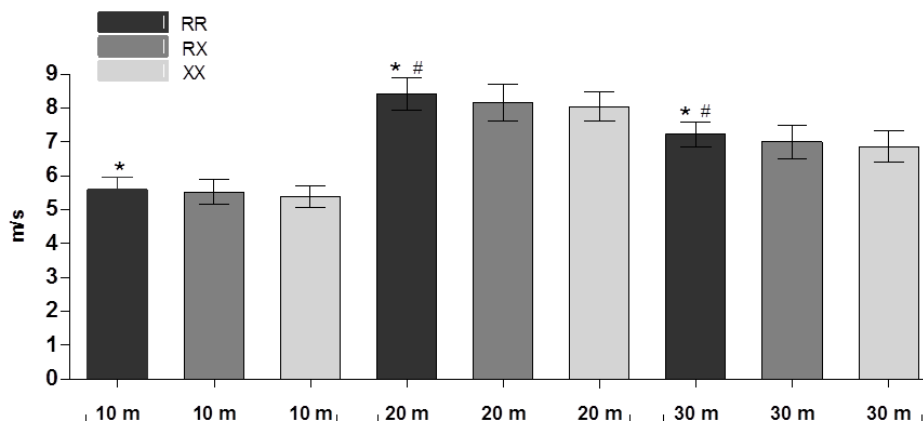
Figuras 09, 10 e 11 apresentam as performances de teste para os diferentes genótipos avaliados.

Figura 09. Valores de testes de saltos (CMJ, SJ) em relação aos diferentes genótipos do ACTN3 (RR, RX e XX).



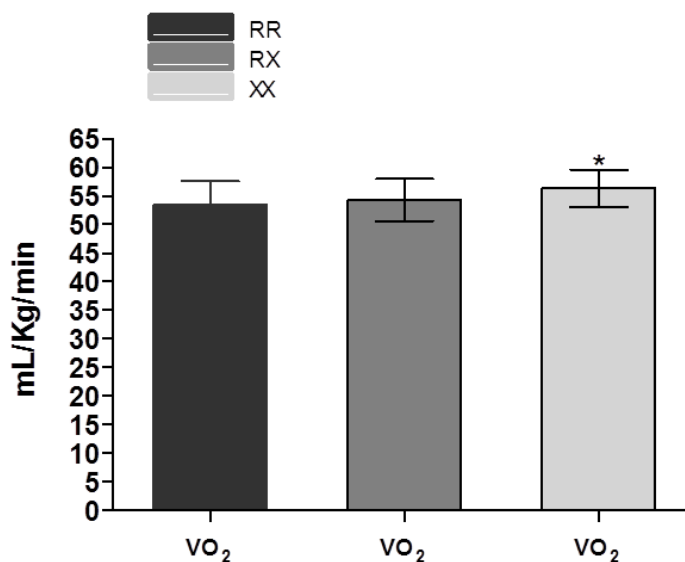
Valores apresentados como média e desvio padrão.

Figura 10. Valores de testes de velocidade em 10, 20 e em relação aos diferentes genótipos da ACTN3 (RR, RX e XX).



Valores apresentados como média e desvio padrão

Figura 11. Valores de testes de Yoyo Enduranve (VO₂) em relação aos diferentes genótipos da ACTN3 (RR, RX e XX).



Valores apresentados como média e desvio padrão

7 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi reconhecer melhor desempenho em testes de velocidade e força para indivíduos com genótipos RR e RX e melhor desempenho para a resistência de genótipos XX, através da comparação dos grupos. Como se pode notar, o grupo XX apresentou maior VO_{2max} comparado ao grupo RR. Inversamente, o RR apresentou menor taxa de tempo para 10, 20 e 30m e maiores resultados nos testes de salto, em comparação com o grupo XX. Estudos que buscaram verificar diferenças de desempenho em testes físicos entre atletas de futebol (Al-Hazzaa *et al.*, 2001; Balikian *et al.*, 2000) isoladamente mostraram uma predisposição a comportamentos mais aeróbios ou anaeróbios, mas nenhum destes estudos associaram estes desempenhos ao perfil genético do atleta.

Com o objetivo de pesquisar o efeito da expressão da ACTN3 sobre a capacidade física, Moran *et al.*,(2007), avaliaram um grupo de 525 homens e 467 mulheres. Velocidade de 40m, saltos, agilidade, resistência e composição corporal foram medidos. De forma semelhante ao presente estudo, os autores verificaram que os indivíduos com ACTN3-RR e genótipos RX foram mais rápidos no teste de velocidade. No entanto, não houve diferença relacionada com genótipos no desempenho em testes de resistência. Além disso, não houve diferença em qualquer outro parâmetro avaliado no estudo. Presumivelmente, os autores não encontraram qualquer outra diferença relacionada com a resistência, porque eles avaliaram uma amostra de indivíduos saudáveis, que não eram atletas.

Também com o objetivo de avaliar o efeito de ACTN3 na força, Vincent *et al.*,(2007), avaliaram 90 indivíduos agrupados em ACTN3 expressão (RR, RX e XX), em testes de velocidade diferentes em uma máquina isocinética. Os autores verificaram que os indivíduos RR apresentaram melhores resultados no torque de maior velocidade angular em comparação com indivíduos XX. Os autores citados sugerem que essas diferenças podem ser devido à maior proporção de fibras do tipo II em indivíduos RR, em comparação com XX. Este resultado corrobora com os achados do presente estudo, apesar da diferença entre o padrão de recrutamento de fibras em testes isocinéticos e os testes de salto e velocidade do presente estudo, que são mais específicos para os atletas em campo.

Por outro lado, Ruiz *et al.*,(2010), recolheram os genótipos de 66 top atletas masculinos e femininos de vôlei e os compararam com os resultados dos testes de força e poder (SJ e CMJ). Contradizendo o estudo, os autores sugerem que a expressão da ACTN3 não afeta diretamente o poder e os valores de força em atletas de voleibol. No estudo acima mencionado, o autor utilizou um teste de salto para verificar o poder dos jogadores. Diferentemente do futebol, a capacidade de saltar no vôlei é fundamental para a performance. Ela está presente no sistema defensivo (bloqueio), no sistema ofensivo e também no serve. Como a maioria dos jogadores de vôlei deve ter essa habilidade bem desenvolvida para ter sucesso, seu treinamento é focado em uma determinada tarefa. Assim, este potencial genético pode não ser o diferencial neste respectivo fenótipo pela avaliação da capacidade de salto no vôlei.

Santiago *et al.*,(2009), compararam os polimorfismos R577X ACTN3 com os resultados dos testes de salto (SJ e CMJ) e os tempos de 30m de sprint de 284 saudáveis não-atletas jovens. Os resultados mostraram que a ausência de ACTN3 não afetou negativamente o desempenho dos testes de potência. Saunders *et al.*,(2007) avaliaram 457 tri-atletas de uma competição de *Ironman* e agrupados de acordo com sua performance em rápido, médio e lento. Houve uma comparação para ACTN3 XX entre os grupos de atletas e um grupo controle de 143 indivíduos. Nenhuma diferença foi encontrada entre os alelos (X ou R) ou genótipos (XX, RX, RR) entre os grupos, sugerindo que não houve relação entre o desempenho em testes de resistência e os X alelo eo genótipo ACTN3 XX. Esta discrepância dos resultados entre os nossos presente investigação e os estudos acima referidos podem ser devido aos diferentes tipos de testes utilizados ea variabilidade das características da amostra.

Ahmetov *et al.*,(2008) avaliaram 230 remadores classificados em diferentes níveis competitivos e relacionaram a classificação dos mesmos, bem como avaliações de parâmetros fisiológicos com a identificação de genes relacionados ao rendimento esportivo. Os autores determinaram que a frequência do gene ACTN3 XX, foi duas vezes menor nos remadores em comparação com o grupo controle. No caso dos remadores, estes foram classificados como atletas especialistas em resistência aeróbia, mas foi admitido que para a prática desta modalidade, a aptidão para a produção de energia anaeróbia é significativa.

Foi identificado no estudo de MacArthur *et al.*,(2008) com ratos knockout que houve redução do diâmetro das fibras rápidas dos indivíduos XX. Não houve redução da proporção de fibras de contração rápida e lenta, mas houve diminuição da massa magra nos animais XX. Determinou-se que a atividade de várias enzimas relacionadas ao metabolismo aeróbio foi aumentada, o que tem influência direta no metabolismo celular dos animais knockout. O tempo de relaxamento das fibras musculares dos animais foi aumentado em comparação com os animais selvagens, bem como a recuperação à fadiga, identificando alterações nessas propriedades de contração. Tais aspectos sugerem uma alteração das propriedades das fibras rápidas parecidas com as funções das fibras lentas. Essas características fenotípicas do ACTN3 XX corroboram com o rendimento em atividades de resistência aeróbia.

Outra questão que merece atenção especial são as implicações de nossas descobertas na rotina de treinamento de atletas de futebol. Como observado por Chan *et al.*,(2011), os músculos ausentes da ACTN3 mostram uma mudança de contração rápida em direção a características mais lentas de contração. Em seu trabalho, a redução da enzima glicogênio fosforilase na ACTN3 em ratos knockout reduziu o fornecimento de energia pelo metabolismo anaeróbico, minimizando a absorção de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático e causando um maior tempo de relaxamento, de menor diâmetro e maior concentração de enzimas oxidativas. Outro estudo já mencionado no presente trabalho encontrou diferentes propriedades mecânicas e funcionais associadas com a deficiência de ACTN3 (Seto *et al.*, 2011). Uma vez que estes fenótipos não são influenciados inteiramente pelo treinamento, especialmente os mais estruturalmente

encontrados no trabalho de Seto, não parece adequado aplicar o mesmo conteúdo de treinamento para todos os indivíduos (RR, RX e XX). Portanto, esses atletas devem ter suas cargas de treinamento ajustadas considerando a sua predisposição genética. RR jogadores e RX deve realizar maior sprint e treinamento de força que o grupo XX. Inversamente, os indivíduos XX deve ter maior carga de treinamento aeróbio.

O presente estudo constatou que o genótipo da ACTN3 pode influenciar a capacidade de jogadores de futebol. Indivíduos RR e RX apresentam uma melhor capacidade de força do que indivíduos XX. Inversamente, este último apresenta melhor capacidade de resistência. Uma vez que este fenótipo não é influenciado inteiramente pelo treinamento, estes jogadores devem ter suas cargas de treinamento ajustadas considerando a sua predisposição genética. Atletas RR e RX responderiam melhor a treinamentos de força e velocidade. Inversamente, os indivíduos XX deveria ter maior treinamento aeróbio. Outra aplicação prática seria no desenvolvimento de esquemas táticos. Predisposição genética poderia interferir em sua capacidade física, treinadores e técnicos podem usar esta informação em ocasiões táticas especiais em que fatores físicos sejam importantes na proposta de jogo.



ESTUDO 2

1 OBJETIVO

O objetivo principal do presente estudo foi comparar as respostas agudas de inflamação, dano muscular e alterações hormonais em função de um treinamento excêntrico em atletas profissionais de futebol com diferentes perfis genéticos do ACTN3 (XX, RX e RR).

Como objetivos secundários, para equacionar a distribuição de carga de treinamentos e conteúdo nas sessões de treinamento de futebol, verificamos o comportamento agudo de marcadores de dano muscular CK e Alfa-Actina, marcador de inflamação (IL6) citocina IL6, e respostas hormonais de Cortisol e Testosterona frente a treinamentos excêntricos específicos de futebol.

2 METODOLOGIA

2.1 DESENHO EXPERIMENTAL

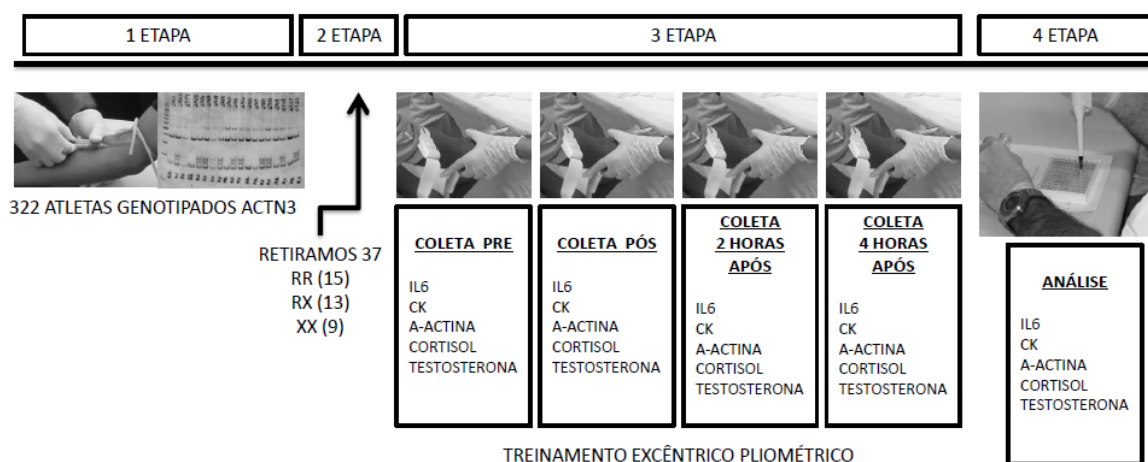


Figura 12: Resumo da metodologia usada no estudo 2.

Os atletas foram orientados em se absterem de bebida alcoólica e não realizarem nenhuma atividade física por no mínimo 24 horas antes ao treinamento. Todos os atletas estavam familiarizados com o treinamento excêntrico proposto. Este foi o primeiro treinamento de regime excêntrico realizado pelos atletas na temporada no período anterior a um mês, apesar dos atletas estarem em regime regular treinamento, mas de caráter aeróbio. Os participantes foram orientados a não usarem nenhum medicamento, suplementos com ação anti-inflamatória ou qualquer tratamento, recuperação, como crioterapia por duas semanas, antes do estudo.

Os momentos das coletas foram: antes do treinamento, logo após, 2 horas depois e 4 horas depois o término do mesmo. Fig 12

Após um aquecimento os atletas foram divididos aleatoriamente e realizaram duas vezes um circuito composto por cinco estações com exercícios intermitentes combinando saltos, mudanças de direção, acelerações e desacelerações. A permanência em cada estação teve duração de três minutos com intervalo de trinta segundos de descanso para as mudanças de estação. Os atletas foram orientados a trocar a perna de execução nos exercícios que apresentavam lateralidade. As atividades foram executadas em velocidade máxima e possuíam incentivo verbal por parte dos treinadores. O tempo total de duração do treinamento foi de 45 minutos. A análise da intensidade da sessão de treinamento foi realizada pelo registro da frequência cardíaca (FC) dos voluntários utilizando-se um conjunto de cardiofrequencímetros (Polar Team System[®], Finlândia). As condições ambientais (temperatura seca e úmida) de todo o treino foram registradas através do Termo-Higrômetro digital (Instrutherm[®] HT-260). A distancia total percorrida e velocidade média foram registradas usando GPS da marca Garmim[®] modelo Forerunner 305. Durante o treino dois pesquisadores registraram a quantidade de mudanças de direção, saltos e frenagens executadas pelos participantes (tabela 6).

Tabela 6. Ações da sessão de treinamento.

Ações	Valores
Saltos	244±12
Frenagens	202±25
Mudanças de Direção	112±9
Distância (Km)	3.98 ± 0.23
Velocidade (Km/h)	16,8± 2,5
Temperatura (°C)	23°
Humidade Rlativa do Ar	67%
Frequencia Cardiaca	124 ± 18.9

A primeira estação consistia em saltar com os pés juntos de uma plataforma com 45 cm de altura e, em sequência, saltar sobre outro obstáculo de 30 cm de altura. Logo após, o avaliado deveria correr em linha reta em velocidade máxima em uma distância de 15 m demarcada com cones.

Na segunda estação, os sujeitos percorreram 20 m em velocidade máxima, saltando quatro obstáculos de 20 cm de altura com os pés juntos, dispostos de forma retilínea, com uma distância de 1,5 m entre eles.

A estação seguinte era iniciada pelo sujeito em cima de uma plataforma de 45 cm de altura, da qual este a descia com os pés juntos e, em seguida, saltava lateralmente um obstáculo de 30 cm de altura, disposto nas laterais da plataforma, sendo executado uma vez com o membro inferior direito e outrora pelo esquerdo. Logo após o salto, o sujeito percorria em velocidade máxima um trajeto de 20 m, com mudança de direção pré-fixada com cones. Ao findar essa distância, os sujeitos deveriam fazer uma parada brusca.

O percurso a ser percorrido na quarta estação foi demarcado com cones. Os participantes correram 10 m em linha reta, viraram a esquerda e percorreram mais 5 m, depois retornaram correndo 10 m em linha reta, convergiram à direita correndo 5 m e, em seguida, percorreram em linha reta mais 10 m, totalizando uma distância de 40 m com mudanças de direção bruscas e rápidas.

A última etapa consistiu em saltar de uma plataforma de 45 cm de altura e saltar três obstáculos perfilados, sendo que o primeiro e o último tinham uma altura de 30 cm e o segundo de 20 cm. Ao terminar os saltos, os sujeitos percorriam 5 m em velocidade máxima até o fim do trajeto.

O circuito, composto por todas as cinco estações, foi realizado duas vezes. A permanência em cada estação teve duração de três minutos com intervalo de 30 segundos de descanso para as mudanças de estação. Os voluntários foram orientados a trocar a perna de execução nos exercícios que apresentavam lateralidade. As atividades foram executadas em velocidade máxima e possuíam incentivo verbal por parte dos treinadores.

3. AMOSTRA

Este estudo respeita todas as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional da Saúde (Res. 196/96) envolvendo pesquisas com seres humanos. Todos os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE I) após as explicações sobre procedimentos e possíveis riscos. Todos os dados coletados durante a realização deste estudo serão utilizados apenas para fins de pesquisa e somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso às informações. Estas precauções serão adotadas com o

intuito de preservar a privacidade, a saúde e o bem-estar dos voluntários. Este projeto foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e foi aprovado para sua realização (ETIC 291/09).

Participaram dos estudos como voluntários 322 jogadores de futebol de campo de quatro categorias (Profissionais, sub-20, sub-17 e sub-15) vinculados a equipes de futebol inscritas na Confederação Brasileira de Futebol (CBF), que mantinha treinamentos regulares e participava de competições reconhecidas por esta mesma confederação durante a realização do estudo. Todos os atletas foram avaliados e genotipados no início da temporada competitiva.

Os sujeitos foram submetidos à avaliação física para a caracterização da amostra, na qual foram mensurados massa corporal, estatura, dobras cutâneas e consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$). A massa corporal (kg) foi medida com os voluntários descalços e nus utilizando-se uma balança digital (Filizola[®]) com precisão de 0,02 kg, calibrada previamente. A estatura (cm) foi medida utilizando-se um estadiômetro com precisão de 0,5 cm acoplado a uma balança (Filizola[®]).

As dobras cutâneas subescapular, tríceps, bíceps, peitoral, subaxilar, suprailíaca, abdominal, coxa e perna foram medidas utilizando-se um plicômetro (Lange[®]), graduado em milímetros, de acordo com o protocolo proposto por (Jackson & Pollock, 1978). Os valores de cada dobra foram utilizados para a obtenção do somatório das dobras (\sum dobras) e cálculo do percentual de gordura. Todos os atletas são submetidos a exames clínicos de rotina e avaliação médica do perfil cardiorespiratório através de ecocardiograma. Todos os procedimentos são de rotina do clube e acontecem de forma sazonal pelo departamento de

fisiologia do mesmo. Dados referentes às características da amostra utilizada estão representados na tabela 7.

Tabela 7: Massa corporal, estatura e percentual de gordura.

Categoria (N)	Massa corporal (kg)	Estatura (cm)	%G
Sub-15(68)	68,42 ± 9,42	177,57 ± 8,52	9,49 ± 2
Sub-17(44)	73,3 ± 6,79	181,3 ± 7,04	9,15 ± 1,89
Sub-20(115)	73,36 ± 7,9	180,6 ± 8,2	9,21 ± 2,08
Adultos(95)	74,25 ± 5,79	182,6 ± 8,55	8,2 ± 2,34

Dados expressos em média e desvio padrão.

Todos os atletas foram genotipados para o gene da ACTN3 e divididos por grupos genéticos (tabela 8). As frequências alélicas e genotípicas estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,2582$).

Tabela 8: Frequências genotípicas observadas para o locus ACTN3 em atletas de futebol brasileiros.

Categoria (N)	Genotipo		
	RR	RX	XX
Sub-15(68)	25	32	11
Sub-17(44)	18	20	6
Sub-20(115)	50	50	15
Profissionais (95)	42	46	7
Totais (322)	135	148	39
	0,419%	0,460%	0,121%

Os dados são apresentados como N em cada uma das categorias e de forma relativa (%).

Retiramos da amostra total 37 atletas profissionais selecionados de dois clubes que iniciavam os treinamentos no mesmo centro de treinamento. A seleção dos voluntários XX foi realizada a partir da genotipagem dos mesmos para a composição de grupos significativos. Em relação ao tamanho da amostra no presente estudo, um fator interveniente para a determinação do mesmo é a disponibilidade de atletas dos clubes esportivo colaboradores. Dados referentes às características da amostra utilizada estão representados na tabela.9.

Tabela 9. Dados antropométricos.

Genotipo				
ACTN3	Idade	Peso (kg)	Altura (cm)	%G
RR (15)	24.8 ± 1.7	79.9 ± 3.8	180.2 ± 5.2	9.9 ± 1.0
RX (13)	27.1 ± 2.9	74.5 ± 4.7	174.2 ± 3.7	8.2 ± 1.5
XX (9)	21.3 ± 5.8	72.4 ± 5.9	178.2 ± 7.4	7.1 ± 2.1

Dados expressos em média e desvio padrão.

4. MATERIAL E METÓDOS

4.1 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO R577X NO GENE ACTN3

Todos os indivíduos foram genotipados para o polimorfismo da ACTN3 e divididos em grupos de mesmo genótipo RR, RX e XX, através da técnica de RFLP-PCR (Polimerase de cadeia ramificada e Poliformismo de Comprimento de Fragmento de Restrição) com enzima de restrição (Ddel) após a extração do DNA. A extração de DNA genômico das amostras de sangue periférico foi realizada conforme protocolo descrito na literatura, com utilização de proteinase K seguida de precipitação salina (Miller *et al.*, 1988).

Um fragmento de DNA contendo o éxon 16 do gene ACTN3 foi amplificado a partir do DNA genômico e os iniciadores utilizados foram: forward, 5'-CTGTTGCCTGTGGTAAGTGGG3'; reverse, 5'-CACAGTATGCAGGAGGG3', ancorados nas sequências intrônicas adjacentes (Mills *et al.*, 2001). As reações de PCR tiveram um volume final de 25 µL, com 10 mM Tris, pH 8.4, 50 mM KCl, 1,75 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X-100), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 U Taq DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 1,0 µM de cada iniciador (SINAPSE BIOTECNOLOGIA, São Paulo, SP, Brasil), usando aproximadamente 100 ng de DNA genômico como molde. O programa de amplificação foi composto por uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos, compostos por 94°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os alelos R577X (códon CGA e TGA) foram distinguidos pela presença (577X)

ou ausência (577R) de um sítio de restrição da enzima *Ddel* (Mills *et al.*, 2001). Após a amplificação por PCR, 1 µL do produto de PCR foi digerido com 20 U da enzima *Ddel* em um volume final de 15µL. As reações foram incubadas Over night (O/N) a 37°C. Posteriormente, os fragmentos digeridos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corados com solução de nitrato de prata (Sambrook; Russel, 2001). 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) (figuras 13 A e B).

Como pode ser observado, quando os sítios de restrição da enzima *Ddel* (CTNAG) são encontrados na sequência de DNA que foi amplificada através da PCR ocorre a clivagem da sequência gerando fragmentos. De acordo com a existência e posição dos sítios de restrição em cada indivíduo, os fragmentos gerados terão números de pares de bases diferentes que serão identificados através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Sendo possível assim diferenciar o genótipo de cada indivíduo. A separação no gel de eletroforese obedece ao princípio de separação por número de pares de bases em que os fragmentos menores (possuem menor quantidade de pares de bases) conseguem passar mais facilmente pela malha do gel e por isso são identificados mais próximos do pólo positivo da cuba de eletroforese (posição inferior do gel).

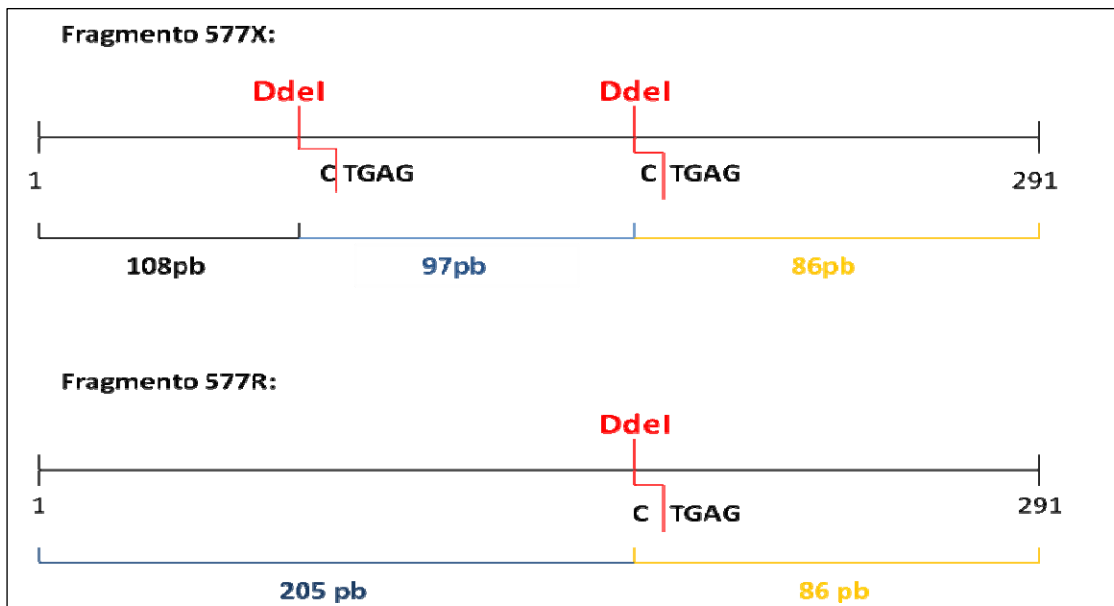
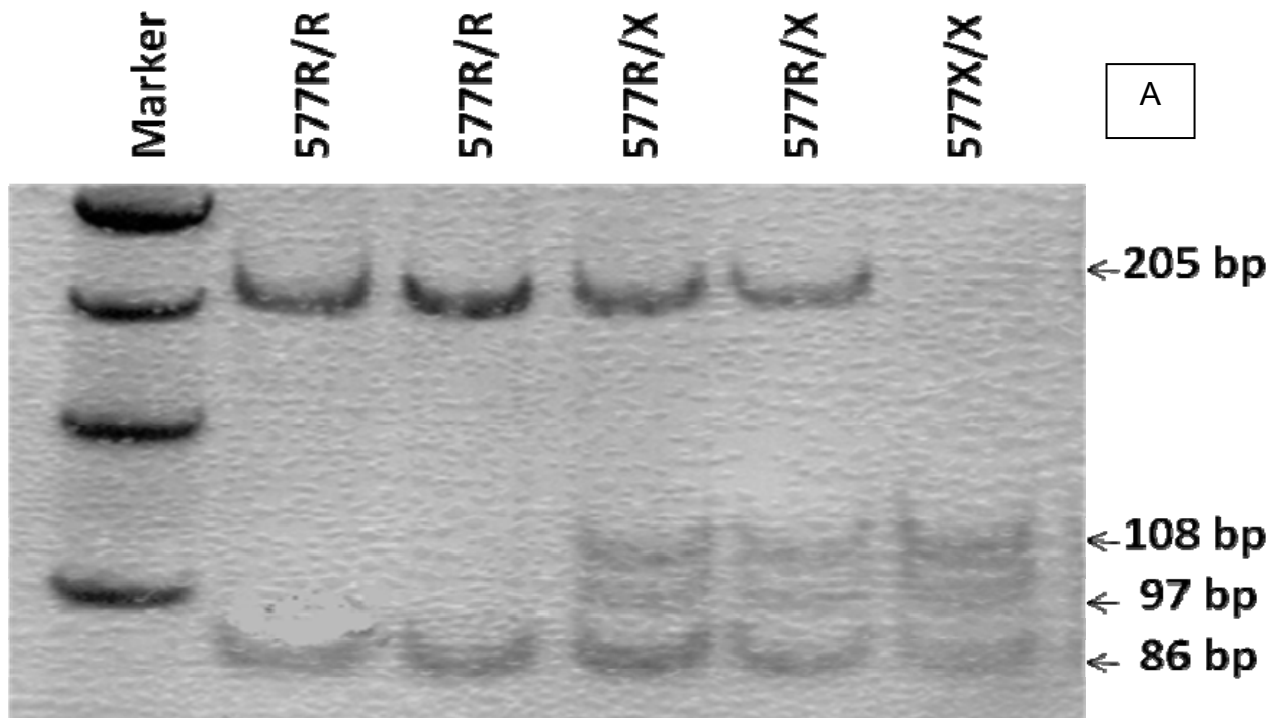


Figura 13 - A) Esquema da restrição com enzima DdeI. B) Gel de poliácridamida da restrição. Indivíduos com genótipo 577R/R apresentam fragmentos na altura de 205 e 86 pb; genótipo 577R/X, 205, 108, 97 e 86 pb; e genótipo 577X/X 108, 97 e 86 pares de bases.

4.2 COLETAS SANGUINEAS E AVALIAÇÕES DAS VARIÁVEIS

As amostras de sangue (~10 mL) foram obtidas pela veia antecubital, durante as manhãs (7h-9h) do experimento após 12 h de jejum, nos seguintes momentos: antes, após, 2 horas após e 4 horas após. Foram utilizados tubos com gel separador (Venoject II, Terumo Europa, Leuven, Bélgica). O soro foi isolado por centrifugação (1.500g minutos, 4°C, por 15 minutos). O soro resultante foi colocado em microtubos Eppendorf separado em alíquotas múltiplas e congelado a -80°C para posteriores análises das concentrações de cortisol, testosterona, IL-6, alfa-actinina e da creatina quinase. Para a realização de genotipagem (ver metodologia a seguir) que acontecerá somente uma vez, foram coletados 2 tubos com EDTA de 4 mL. Essa coleta aconteceu em um momento eletivo de acordo com o programa de treinamento dos atletas para que não interferisse no mesmo.

4.3 DOSAGEM DE INTERLEUCINA-6

A análise das concentrações plasmáticas de IL-6 foram realizadas pelo método ELISA, utilizando o kit de alta sensibilidade (Quantikine[®] HS, R&D Systems). Neste teste, um anticorpo de captura específico para IL-6 deve cobrir previamente as microplacas, interagindo por meio de reação hidrofóbica com a placa (96 poços). Amostras padronizadas foram introduzidas nos poços, e a IL-6, quando presente, foi ligada ao anticorpo imobilizado.

As placas foram lavadas por seis vezes, retirando-se as substâncias não ligadas, e um anticorpo policlonal específico ligado à enzima foi adicionado.

Novamente foi realizada a lavagem dos poços por seis vezes e uma solução de substrato adicionada. As microplacas, em posição horizontal, permaneceram em um vibrador de microplacas em 500 + 50 rpm por um período de incubação de duas horas. Uma solução de amplificação foi adicionada aos poços para que a cor se desenvolva proporcionalmente à concentração de IL-6.

Após incubação por 30 minutos, foi adicionada uma solução paralisadora, e a leitura da intensidade da cor (índices plasmáticos de IL-6) foi feita por um leitor de microplacas ajustado para 490nm, com correção do comprimento de onda a 650nm, dentro de 30 minutos.

4.4 DOSAGEM DE ALFA-ACTINA

As amostras de plasma foram diluídas em tampão apropriado (*coating buffer*, composição em g/L: Na₂CO₃ 1,59; NaHCO₃ 1,93; pH 9,6). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µL das amostras diluídas por um período aproximado de 12h à 4°C. Após este período, todo o líquido foi removido das placas e as mesmas foram lavadas delicadamente com tampão de lavagem (NaCl 0,9% + Tween-20 0,05%). Em seguida, foi realizado um bloqueio de ligações inespecíficas pela adição em cada poço de 100µl de PBS acrescido de leite desnatado (Molico) a 2% por 1h a 37°C.

Após este período a placa foi novamente lavada com tampão de lavagem e foi acrescido o anticorpo primário monoclonal anti- α -actina (St. Louis, USA, Sigma) diluído na proporção 1:1000 em PBS-T (PBS + Tween-20 0,05%). Após incubação por 1h à 37°C, o anticorpo primário foi removido, a placa foi novamente

lavada e foi então acrescido o anticorpo secundário policlonal anti-mouse na diluição 1:3000 PBS-T + leite 2%.

Foram realizadas duas lavagens e adicionado substrato da reação (OPD 0,2 mg/mL em tampão citrato 5,2g/L pH 5,0). Após 20 minutos, a reação foi paralisada com 20 μ l de H₂SO₄ 4N e foi realizada leitura em leitor de microplaca a 492nm. Foram realizados controles negativos (somente coating buffer) e positivos (10; 5; 1; 0,5 μ g de α -actina). A concentração de α -actina sérica foi calculada de acordo com o padrão pré-estabelecido de α -actina.

4.5 DOSAGEM DE CREATINA KINASE (CK)

Atividade da CK foi medida no soro pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o kit CK-NAC ativado (Labtest Diagnóstica ® AS, Brasil).

4.6 DOSAGEM DE CORTISOL E TESTOSTERONA

Os níveis de cortisol e testosterona foram determinados por imunensaio quimioluminescente (ADVIA Centaur ® da Siemens, em Eschborn, Alemanha).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi verificada com o teste de Kolmogorov-Smirnoff. Foi aplicada uma ANOVA para comparar o desempenho dos atletas em cada prova, em relação aos diferentes grupos genéticos. Para investigar as diferenças entre os momentos de cada grupo, usamos a ANOVA one-way de medidas repetidas e análise post hoc de Tukey. Todas as análises dos dados foi realizada usando o pacote SPSS 17.0. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

As variáveis fisiológicas no repouso não apresentaram diferenças significativas entre os grupos genéticos. As variáveis apresentaram comportamentos diferentes em função dos genótipos para o gene da ACTN3 como mostrado na tabela 10.

Tabla 10. Marcadores de daño muscular y respuesta hormonal en relación al polimorfismo del gen ACTN3 (RR, RX, XX).

Diferencia post – pre ejercicio (p<0,05). * Diferencia en relación al XX (p<0,05).

		Pré	Pós	2 horas	4 horas
IL-6 (pg/mL)	RR (15)	2,49 ± 1,17	3,02 ± 2,13	8,28 ± 2,24*#	5,91 ± 2,45*#
	RX (13)	3,48 ± 1,74	4,05 ± 2,63	6,91 ± 2,69 #	5,45 ± 2,21
	XX (9)	3,49 ± 1,38	3,97 ± 1,24	5,87 ± 1,45 #	3,62 ± 1,00
Alfa-actina (U/L)	RR (15)	87,57 ± 15,21	106 ± 31,28*#	105,70 ± 18,88*#	96,60 ± 12,21
	RX (13)	8,00 ± 13,12	112,4 ± 29,39*#	106,0 ± 20,85*#	98,00 ± 20,73
	XX (9)	102 ± 18,11	167,60 ± 31,47 #	158,30 ± 31,38 #	100,1 ± 31,72
Creatina Kinase (U/L)	RR (15)	344,40 ± 227,91	418,41 ± 199,6 #	344,40 ± 227,93	346,54 ± 227,94*
	RX (13)	363,72 ± 177,21	472,12 ± 230,3 #	363,72 ± 177,23 #	386,23 ± 161,25
	XX (9)	327,00 ± 197,35	395,72 ± 232,55 #	337,10 ± 187,37 #	523,76 ± 201,10 #
Cortisol (ug/dL)	RR (15)	10,08 ± 3,01	11,42 ± 2,73*#	10,32 ± 2,43	6,92 ± 3,04 #
	RX (13)	8,37 ± 2,79	12,45 ± 3,70*#	10,86 ± 2,91 #	7,75 ± 2,66
	XX (9)	8,10 ± 1,87	13,68 ± 2,77 #	8,73 ± 1,51	7,55 ± 2,40
Testosterona (ng/dL)	RR (15)	476,82 ± 130,42	433,43 ± 92,17*	350,92 ± 126,00 #	357,00 ± 132,61 #
	RX (13)	490,54 ± 93,29	371,42 ± 92,29	339,82 ± 122,72 #	412,53 ± 98,99
	XX (9)	524,32 ± 52,62	330,45 ± 52,96 #	417,61 ± 104,82 #	422,76 ± 103,56 #

6.1 Efeito do polimorfismo da ACTN3 nas concentrações de IL-6

Tal como indicado na figura 14, a atividade da IL-6 aumentou nos momentos 2 horas após e 4 horas após a todos os grupos ($p < 0,05$), com exceção do grupo XX no último momento, que já haviam retornado aos valores basais. A maior concentração foi observada no grupo RR quando comparado ao grupo XX nos momentos 2 horas após e 4 horas após ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças entre os momentos antes e depois de todos os grupos ($p > 0,05$).

6.2 Efeito do polimorfismo ACTN3 na microlesão muscular

Conforme apresentado na figura 15, a atividade de CK aumentou no momento após, em comparação a antes de todos os grupos ($p < 0,05$) com o grupo RR retornando aos valores basais no momento após ($p > 0,05$). Os grupos RX e XX permaneceram com a atividade de CK mais elevada no momento 2 horas após em relação a antes ($p < 0,05$), com o grupo RX retornando aos valores basais no momento quatro horas depois ($p > 0,05$). No último momento, a atividade da CK do grupo XX continuou elevada em comparação a antes e foi significativamente maior que o grupo RR ($p < 0,05$).

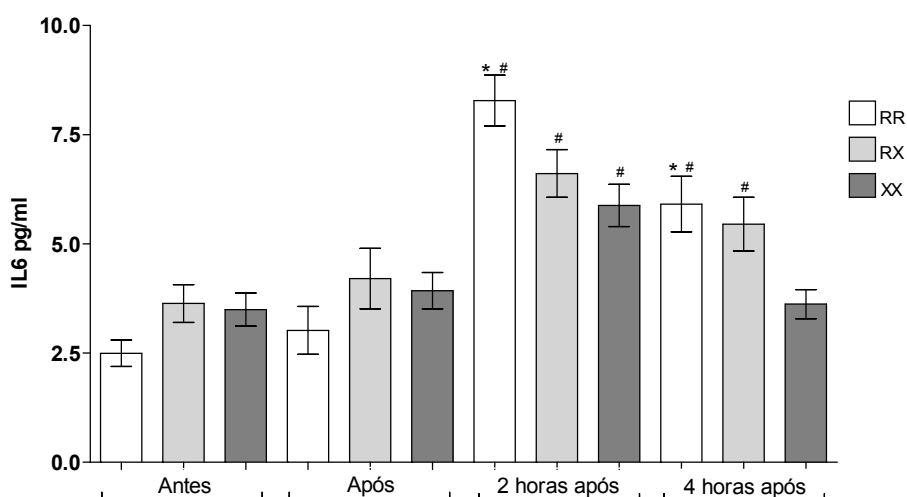


Fig 14 Concentrations of IL-6 before, after, after 2 hours & 4 hours after the eccentric training for the polymorphisms of ACTN3 in professional soccer players. * Difference compared to XX in the moments after 2 hours & 4 hours after. $p < 0.05$. # Difference Compared to Before. $p < 0.05$.

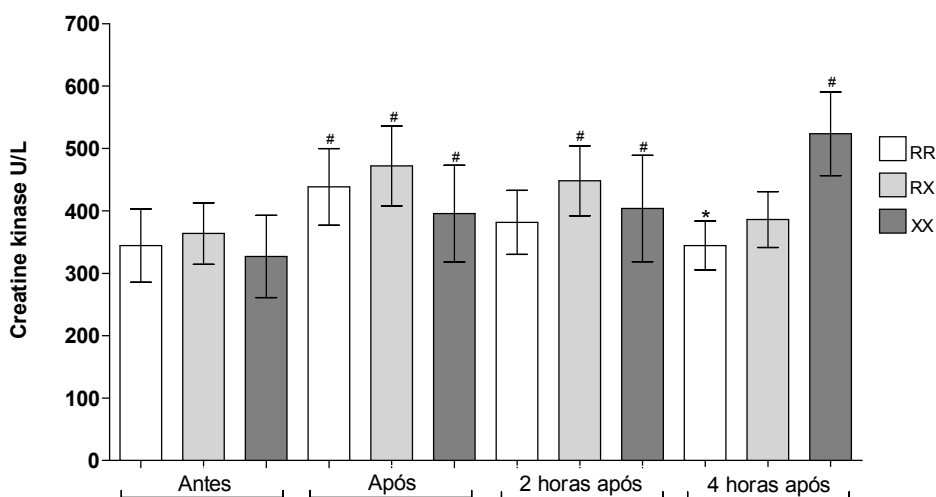


Fig 15 Concentrations of Creatine Kinase before, after, after 2 hours & 4 hours after the eccentric training for the polymorphisms of ACTN3 in professional soccer players. * Difference compared to XX in the moment 4 hours after ($p < 0.05$). # Difference compared to before $p < 0.05$.

Tal como indicado na figura 16, a concentração de alfa-actina foi maior para todos os grupos nos momentos depois e duas horas depois, em relação ao anterior ($p < 0,05$), regressando aos valores basais no momento quatro horas depois ($p > 0,05$). Nos momentos 2 horas após e 4 horas após, a concentração de

alfa-actina foi maior no grupo XX, em comparação com os grupos RX e RR ($p < 0,05$).

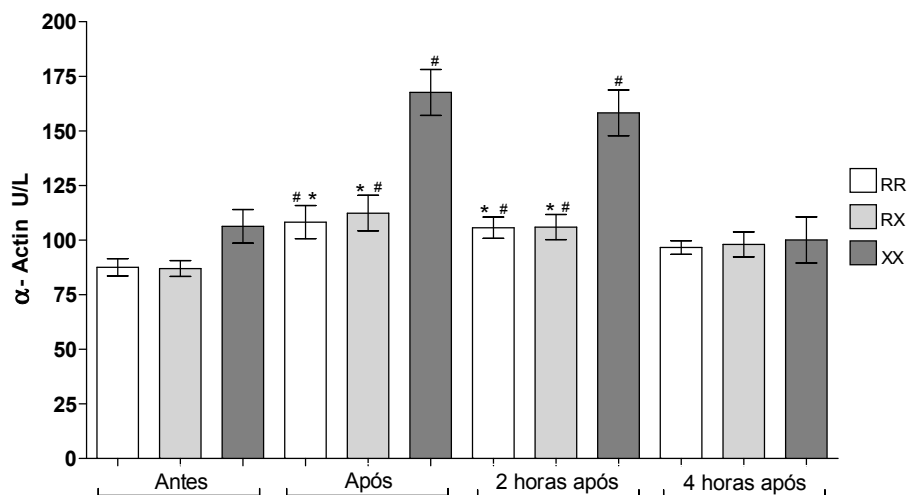


Fig 16 Concentrations of alfa-actin before, after, after 2 hours & 4 hours after the eccentric training for the polymorphisms of ACTN3 in professional soccer players.* Difference compared to XX in the moments After & 2 hours after. ($p < 0,05$). # Difference compared to before $p < 0,05$.

6.3 Efeito do polimorfismo da ACTN3 sobre as respostas hormonais

No presente estudo, um aumento significativo de cortisol e diminuição correspondente nos níveis de testosterona foram observados imediatamente após o treinamento excêntrico. O grupo XX apresentou menor concentração de testosterona em todos os momentos após o treinamento em relação ao anterior ($p < 0,05$). O grupo RX apresentou menor concentração de testosterona apenas no momento 2 horas após em relação a antes ($p < 0,05$). O grupo RR apresentou menor concentração de testosterona nos momentos 2 horas após e 4 horas após, em comparação com antes ($p < 0,05$) e maior que o grupo XX no momento após ($p < 0,05$) (figura 17).

Aumento do cortisol foi verificado imediatamente após o treinamento excêntrico para todos os grupos ($p < 0,05$), com o grupo XX apresentando maior concentração em relação aos grupos RX e RR ($p < 0,05$). No momento duas horas depois, apenas o grupo RX tinha concentração de cortisol maior do que o momento anterior ($p < 0,05$).

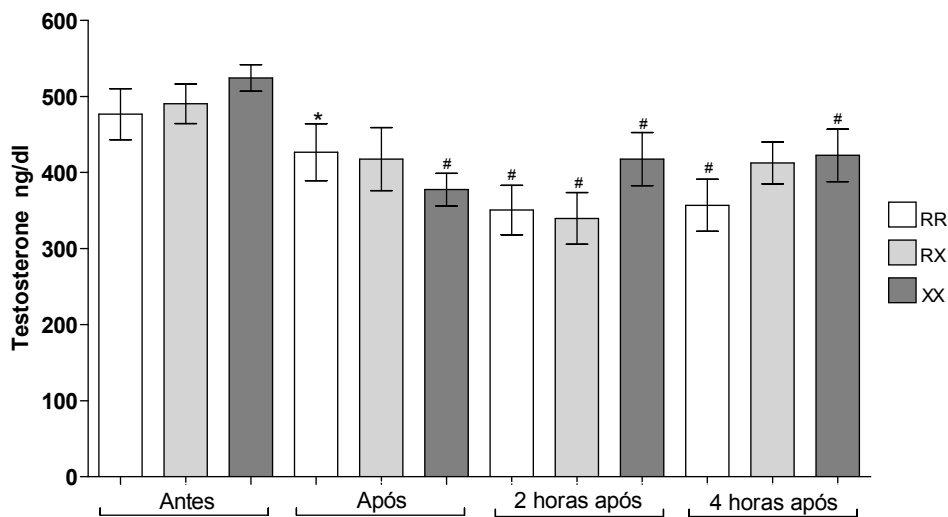


Fig 17 Concentrations of Testosterone before, after, after 2 hours & 4 hours after the eccentric training for the polymorphisms of ACTN3 in professional soccer players.* Difference compared to XX in the moment After. ($p < 0.05$). # Difference compared to before. $p < 0.05$

No momento, quatro horas depois, o grupo RR apresentou menor concentração de cortisol que o momento anterior ($p < 0,05$) (figura 18).

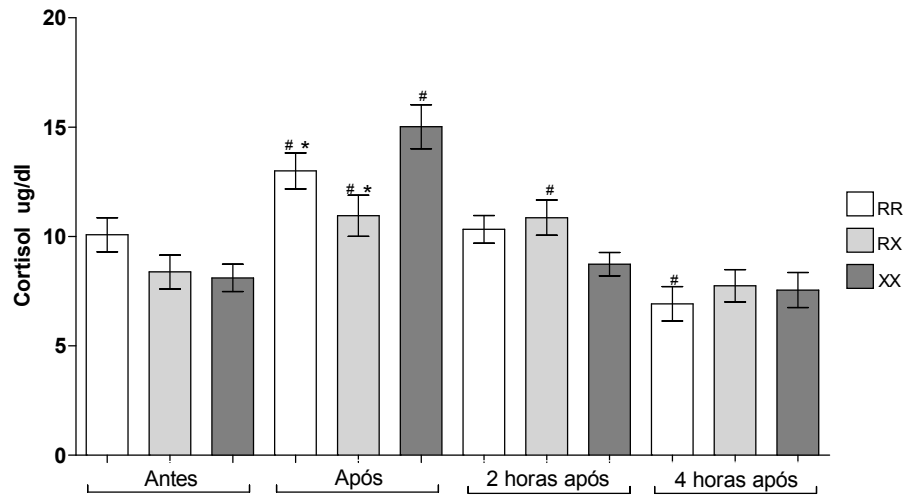


Fig 18 Concentrations of Cortisol before, after, after 2 hours & 4 hours after the eccentric training for the polymorphisms of ACTN3 in professional soccer players.* Difference compared to XX in the moment After. ($p < 0.05$). # Difference compared to before. $p < 0.05$.

7. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que indicadores de dano muscular (atividade CK e concentração de alfa-actina) são em geral mais altos nos indivíduos XX depois do exercício excêntrico em concordância com Vincent *et al.*,(2010) e Seto *et al.*, (2011), contrastando aos resultados de Clarkson *et al.*,(2005) e Chan *et al.*, (2008). As alterações determinadas pela ausência da alfa-actinina-3 nas fibras tipo II, considerando que essa proteína além de desempenhar uma função mecânica também atua como sensor metabólico (Lek & North, 2010), dificultariam as respostas musculares em contrações excêntricas ou de alta potência nos indivíduos XX, o que levaria a uma sobrecarga destas fibras e conseqüentemente um quadro catabólico maior como constatado pelas concentrações de cortisol e testosterona. É bem estabelecido que exercícios com ações musculares excêntricas sejam um dos maiores causadores de dano muscular, principalmente nas fibras tipo II (Cheung *et al.*, 2003; Proske & Morgan, 2001). Para detectar dano muscular, Martínez-Amat *et al.*,2005; Martínez-Amat *et al.*,2007; Vicent *et al.*,2010), sugerem o uso de marcadores específicos de músculo esquelético que tenham rápida liberação e alta sensibilidade, tais como a alfa-actina.

O fenótipo estrutural associado à deficiência da ACTN3 é mais provável devido a diferenças funcionais entre a ACTN2 e ACTN3 que, em parte, são imputáveis as suas interações com proteínas do disco Z como a ZASP, titina, no disco Z que tem como função a manutenção da integridade do aparato contrátil durante o esforço muscular intenso nas fibras tipo II. Isoformas de titina são os principais determinantes da rigidez passiva ou tensão do sarcômero,

principalmente nas fibras tipo II. Variações nessas interações por afinidade da ACTN2, modificam a estabilidade do sarcômero levando a modificação das propriedades elásticas e estruturais, prejudicando uma resposta mais eficiente em contrações de alta intensidade. Essas alterações explicam a redução de rendimento em atividades de força e velocidade que utilizam o componente elástico como o ciclo de alongamento e relaxamento (CAE), levando a uma sobrecarga maior nas fibras tipo II devido a dissipação da energia potencial elástica (Seto *et al.*, 2011). Além disso, o aumento da regulação ACTN2 pode também alterar a estequiometria das proteínas sarcoméricas (Lek & North, 2010) tornando as fibras tipo II do grupo XX com características mais oxidativas (Chan *et al.*, 2011), fato que somado as alterações mecânicas fornecem evidências para o quadro catabólico aumentado do grupo XX e maior dano muscular observado quando comparado aos grupos RR e RX. O perfil oxidativo das fibras tipo II dos indivíduos XX é caracterizado pelo somatório de alterações metabólicas, dentre elas destacamos a redução da enzima glicogênio fosforilase, dificultando o fornecimento de energia de forma anaeróbia, a redução da recaptção do Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático provocando um tempo de relaxamento maior, o menor diâmetro das fibras tipo II e maior concentração de enzimas oxidativas. Todos estes fatores seriam argumentos para explicar a perda da funcionalidade das fibras tipo II nos indivíduos XX devido a alterações das propriedades contráteis e metabólicas, comprometendo sua resposta em atividades repetidas de alta intensidade com caráter excêntrico (Quinlan *et al.*, 2010; MacArthur *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2008; 2011).

A determinação das respostas endócrinas em provas de desempenho esportivo competitivo de contato são comuns prática de esportes profissionais. A

testosterona e o cortisol foram identificados como marcadores de confiança da resposta do sistema endócrino para o desempenho competitivo em esporte intermitentes como o futebol e rugby (Engelmann, Landgraf, Cordoba *et al.*, 2004; Kraemer *et al.*, 2009; Chatzinikolaou *et al.*, 2010; Ispirlidis *et al.*, 2008). A testosterona é o principal marcador anabólico para a síntese protéica e de glicogênio muscular (Spiering *et al.*, 2008). O cortisol é considerado um hormônio do estresse e age de forma antagônica em resposta a ação da testosterona mediando a atividade catabólica (Kraemer & Ratamess, 2005).

Pedersen & Hoffman-Goez (2000) afirmam que a lesão muscular causada pelo exercício está relacionada a aumentos substanciais no nível de cortisol plasmático e provavelmente tem um papel na manutenção da neutrofilia e linfopenia após o exercício intenso. Cunniffe *et al.*, (2010) mostraram um aumento no cortisol logo depois de uma partida em atletas de rugby, resultado semelhante encontrado em jogadores de futebol (Ispirlidis *et al.*, 2008 ; Avloniti *et al.*, 2007). Lac *et al.*, (2003), verificaram que durante a competição de rugby internacional os níveis de cortisol aumentaram, comparados com os valores de repouso e regressaram aos valores basais em 4 horas em concordância com os nossos resultados. O grupo XX apresentou maiores concentrações de cortisol após o treinamento comparado aos RR e RX ($p < 0,05$) regressando aos valores basais posteriormente como nos estudos de Steenberg *et al.*, (2003), Gleeson (2007) e Malm *et al.*, (2004). As concentrações aumentadas no momento pós de cortisol do grupo XX representam um quadro catabólico aumentado, evidenciando que a prova excêntrica apresentou um grande nível de esforço imposto a esse grupo, quando comparado ao demais. Essa hipótese é confirmada pelo concomitante aumento da atividade da concentração de alfa-actina e CK plasmática após a

sessão, provavelmente relacionado a um maior grau de sobrecarga mecânica imposta a estes indivíduos em função das alterações mecânicas no disco Z, decorrentes da ausência da ACTN3. A concentração plasmática de testosterona funciona comumente como um marcador fisiológico do estado anabólico (Uchida *et al.*,2004, Spiering *et al.*, 2008). A testosterona pode exercer efeito anti catabólico através da interação com os receptores de cortisol, por sua influência em fatores neurais e possivelmente um aumento da glicogenólise nas fibras musculares do tipo II, além de promover a ressíntese de glicogênio durante a recuperação pela estimulação da enzima glicogênio sintetase (Hackney, 2006). Diferente do cortisol, as concentrações de testosterona diminuem imediatamente depois de um exercício intenso (Cunniffe *et al.*,2010; Malm *et al.*,2004). O grupo XX mostrou reduções maiores de testosterona quando comparado ao RR no momento pós prova ($p < 0,05$) em resposta análoga ao aumento das concentrações de cortisol no mesmo momento, resultados semelhantes foram observados nos estudos de Elloumi, *et al.*, (2003), Cormack, Newton, McGuigan, (2008), Chatzinikolaou *et al.*,(2010), Ispirlidis *et al.*,(2008) e Cordoba *et al.*, (2004).

As citocinas estão envolvidas no controle da resposta imune de fase aguda, reações inflamatórias e o processo de reparação tecidual. Inicialmente a elevação da IL-6 era considerada uma resposta inflamatória causada pelo dano muscular. No entanto, verificou se que outros fatores como a duração, intensidade e tipo de contração muscular implicam em um aumento de IL-6 independente da inflamação e da lesão muscular (Scheele *et al.*,2009; Pedersen 1998; Pedersen & Febbraio 2008; MacIntyre *et al.*,2001; Willoughby *et al.*,2003). Ascensão *et al.*,(2008), Ispirlidis *et al.*,(2008) e Andersson *et al.*,(2010), encontraram aumentos nos concentrações de IL-6 após jogos de futebol em atletas profissionais. Neste

presente estudo o aumento de IL-6 foi encontrado depois do exercício apresentando maiores concentrações no momento 2 horas após e continuando elevada até as 4 horas depois do exercício em todos grupos como observado por Chatzinikolaou *et al.*,(2010), Cunniffe *et al.*,(2010) e Dovic *et al.*,(2010). Contrariando nossas expectativas a expressão de IL-6 nos grupo RR é superior comparado ao XX mesmo apresentando um dano muscular menor comparado ao grupo XX, diferente ao resultado apresentado por Vicent *et al.*,(2010) que verificou maiores concentrações de RNAm de IL-6 após uma prova excêntrica em indivíduos XX comparados aos RR. Este comportamento poderia ser explicado pela alta solicitação neural e glicolítica em função da habilidade mecânica em gerar ações musculares de alta intensidade nos indivíduos RR, levando a uma liberação maior de IL-6 para suprir a alta demanda metabólica promovendo o aumento da glicogenólise hepática e da lipólise, o que aumenta a oferta sistêmica respectivamente de glicose e de ácidos graxos livres e glicerol, contribuindo com a manutenção energética para os músculos e outros tecidos em atividade (Febbraio & Pedersen 2002; Fischer 2006; Febbraio & Pedersen 2005; Edwards *et al.*,2006).

O principal achado deste estudo foi que os indivíduos XX apresentaram maior concentração na atividade da CK, alfa-actina e níveis mais elevados de cortisol em comparação com os indivíduos RR após uma prova excêntrica, apresentando uma resposta mais catabólica. Já os indivíduos RR apresentam maior concentração de IL-6 e menor dano muscular verificado pelas menores concentrações da CK e alfa-actina. Supostamente os genótipos da ACTN3 podem influenciar nas respostas agudas de dano muscular em atletas de futebol profissionais para contrações excêntricas, com o genótipo ACTN3 XX mostrando

um risco aumentado para o desenvolvimento de dano muscular. Por outro lado, os resultados evidenciam que o genótipo ACTN3 RR pode conferir um efeito protetor contra dano muscular induzido por contrações excêntricas em função das vantagens mecânicas oferecidas pela ACTN3 na linha Z. Pautados na carga genética e atendendo ao princípio da individualidade, ajustes nas condutas de treinamento, recuperação e nutrição poderiam ser feitos com o objetivo de otimizar os efeitos de adaptação ao treinamento, uma vez que no futebol os treinamentos apresentam um caráter coletivo. Indivíduos XX necessitariam de tempos maiores de recuperação entre as sessões de treinos e distribuição diferenciada de conteúdos de treinamentos com o intuito de evitar o supertreinamento e lesões musculares.

8 CONCLUSÕES

PRIMEIRA CONCLUSÃO: Concluímos que jogadores de futebol com genótipo ACTN3 RR e RX apresentam maior aptidão para força e velocidade em comparação com os indivíduos ACTN3 XX. Inversamente os indivíduos XX apresentam maior aptidão para resistência aeróbia, evidenciado pelos resultados em provas motoras.

SEGUNDA CONCLUSÃO: Concluímos que atletas de futebol profissionais homocigotos para o gene ACTN3 XX apresentaram um maior estado catabólico evidenciado pelas respostas metabólicas, hormonais e imunes após um treinamento de caráter excêntrico quando comparados aos grupos ACTN3 RR e ACTN3 RX.

TERCEIRA CONCLUSÃO: Concluímos que treinamentos excêntricos agudos promovem aumento significativo nas variáveis hormonais, e imunológicas evidenciado pela alteração da concentração de testosterona, cortisol e citocina IL6 nos momentos avaliados.

QUARTA CONCLUSÃO: A realização do treinamento excêntrico nas condições propostas promoveu uma elevação na atividade de enzimas marcadoras de dano muscular nos momentos coletados, apresentando diferenças cinéticas de liberação entre a CK e alfa-actina apresentando a alfa actina como um marcador precoce devido a sua rápida cinética de liberação, quando comparado a CK. Os resultados verificados neste estudo em referencia a cinética de liberação da alfa actina, necessitam de mais investigações sobre seu uso como marcador de dano muscular e de intensidade do desgaste muscular durante

treinamentos excêntricos e como controle da carga e distribuição de conteúdos de treinamento.

QUINTA CONCLUSÃO: Os achados deste estudo reforçam as proposições da literatura científica, a qual considera o treinamento intenso excêntrico como causadores de elevações nas concentrações séricas de marcadores de DM. Este fato evidencia a importância do monitoramento do treinamento esportivo, bem como, alerta profissionais da área médica esportiva quanto aos problemas musculoesqueléticos que podem ser encontrados durante eventos esportivos. Dessa forma, a determinação de biomarcadores, permite aos treinadores e atletas ajustarem suas cargas de treinamento tanto para aumentar os benefícios do treinamento quanto para evitar o supertreinamento, melhorando assim o desempenho, a saúde e a qualidade de vida do atleta.

9 BIBLIOGRAFIA

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. *Imunología celular y molecular*. Madrid: 5ed Elsevier 2004: 127-345.

Ahmetov I.I., Popov D.V., Astratenkova I.V., Druzhevskaya A.M., Missina Ss., Vinogradova O.L., Rogozkin V.A. The Use of Molecular Genetic Methods for Prognosis of Aerobic and Anaerobic Performance in Athletes. *Hum. Physiol.* 2008; **34**(3): 338–334.

Alberts , B. et al., *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing, 2007.

Al-Hazzaa, HM, Almuzaini, KS, Al-Rejaee, SA, Sulaiman, MA, Dafterdar, MY, Al-Ghamedi, A, and Al-Khuraiji, KN. Aerobic and anaerobic power characteristics of saudi elite soccer players. *J Sports Med Phys Fitness* 2001;41: 54-61.

Andersson H., Bøhn S.K., Raastad T., Paulsen G., Blomhoff R., Kadi F. Differences in the inflammatory plasma cytokine response following two elite female soccer games separated by a 72-h recovery. *Scand J Med Sci Sports* 2010; **20**:740–747.

Andersson H., Raastad T., Nilsson J., Paulsen G., Garthe I., Kadi F. Neuromuscular fatigue and recovery in elite female soccer: effects of active recovery. *Med Sci Sports Exerc* 2008; **40**: 372-380.

Arnason A, Andersen TE, Holme I, Engebretsen L, Bahr R. Prevention of hamstring strains in elite soccer: an intervention study. *Scand J Med Sci Spor* 2007;18:40-8.

Aránega A.E., Reina A., Muros M.A., Alvarez L., Prados J., Aránega A. Circulating alpha-actin protein in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 1993; **38**(1): 49–55.

Armstrong, R.B. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness:a brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*.1984,16:529-38.

Armstrong, R.B.; Warren, G.L.; Warren, J.A. Mechanisms of exercise induced muscle fiber injury. *Sports Medicine*.1991;12;3:184-207.

Arnason A., Sigurdsson B.S., Gudmundsson A., Holme I., Engebrestsen L., Bahr R. Physical Fitness, injuries, and team performance in soccer. *Med. Scie. Spor. Exer.* 2004; **36**(2), 278-285.

Ascensão A., Rebelo A., Oliveira E., Marques F., Pereira L., Magalhaes J. Biochemical impact of a soccer match analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. *Clin Biochem* 2008; **41**: 841–851.

Avloniti AA, Douda HT, Tokmakidis SP et al., Acute Effects of Soccer Training on White Blood Cell Count in Elite Female Players. *International Journal of Sports Physiology and Performance* 2007; **2**(3):239-249.

Aziz, A.R., Chia M., Teh K.C. A pilot study comparing two field tests with the treadmill run test in soccer players. *Journal of Sports Science and Medicine* 2005; **4**: 105–112.

Aziz, A.R., Chia M., Teh K.C. The relationship between maximal oxygen uptake and repeated sprint performance indices in field hockey and soccer players. *Jour. Spor. Med. Phy. Fitn.* 2000; **40**(3): 195-200.

Bagby G.J., Crouch L.D., Shepherd R.E., Hoffman-Goetz L. Exercise and cytokines: spontaneous and elicited response. *Exerc Immune Function* 1996; 55-78.

Balikian, P, Lourenção, A, Ribeiro, LFP, Festuccia, WTL, and Neiva, CM. Consumo máximo de oxigênio e limiar anaeróbio de jogadores de futebol: comparação entre as diferentes posições. *Rev Bras Med Esporte* 2000; **8**:32-36.

Balsom P.D., Seger J.Y., Ekblom B. Physiological evaluation of high intensity intermittent exercise. *Jour. Spor. Scie.*1992; **10**: 161.

Bangsbo J. The physiology of soccer - with special reference to intense intermittent exercise. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1994; **619**: 1-155. Review.

Bangsbo J., lindquist F. Comparison of various exercise tests with endurance performance during soccer in professional players. *In. Jour. Spor. Med.*1992; **13**(2): 125-132.

Bangsbo J., Michalsik L. Assessment of the physiological capacity of elite soccer players. In: Spinks W, Reilly T, Murphy A, eds. *Science and football IV*. London: E&FN Spon, 1999: 54–62.

Bangsbo J., Mohr M., Krstrup P. Physical and metabolic demands of training and match-play in the elite football player. *J Sports Sci.* 2006; **24**(7): 665-674.

Bangsbo J., Norregaard L., Thorso F. Activity profile of competition soccer. *Can. Jour. Spor. Scie.*1991; **16**(2): 110-116.

Barros r, Misutal m, Menezes r, et al.,Analysis of the distances covered by first division brazilian soccer players obtained with an automatic tracking method. *J sports sci med.* 2007; (6): 233-242.

Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 2006;75:19-37.

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* 1992; **267**: 9281-9288.

Behr M.B., Gerraughty L.E., Ondrak K.S., Battaglini C.L., Hackney A.C. Cortisol responses to supra-maximal exercise. *Braz Jour of Biomot* 2009; **3**(3): 281-286.

Beunen G., Thomis M. Gene powered? Where to go from heritability (h²) in muscle strength and power? *Exercise and Sport Science Reviews* 2004; **32**: 148-154.

Berman Y, North KN. A gene for speed: an emerging role of alpha-actinin-3 in muscle metabolism. *Physiol* 2010;25(4):250-9.

Bloom M., Fawcett D.W. *Tratado de histologia.* Rio de janeiro: 10ed Interamericana 1977: 940.

Bloomer, R.J.; Goldfarb, A.H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Canadian Journal of Applied Physiology* 2004;v.**29**:245-263.

Blotnick S., Peoples G.E., Freeman M.R., Eberlein T.J., Klagsbrun M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2890-2894.

Brancaccio P., Maffulli N., Limongelli F.M. Creatine Kinase monitoring in sport medicine. *British Medical Bulletin Advance.*2007; 1-22.

Brancaccio, P.; Maffulli, N.; Buonauro, R.; Limongelli, F.M. Serum Enzyme monitoring in sports medicine. *Clinics in sports medicine* 2008;**27**:1-18.

Bray M.S. Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. *J Appl Physiol* 2000; **88**: 788-792.

Bray M.S., Hagberg J.M., Perusse 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. *Med Sci Sports Exerc* 2009; **41**, 35-73.

Brockett, C.L.; Morgan, D.L.; Proske. Predicting hamstring strain injury in elite athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise*.2004; 36,3: 379–87.

Brown S.J., Child S.H., Donnelly A.E. Exercise-induced skeletal muscle damage and adaptations following repeated bouts of eccentric muscle contractions. *J Sports Sci* 1997; **15**:215-222.

Brutsaert T.D., Parra E.J. What makes a champion? Explaining variation in human athletic performance. *Respir Physiol Neurobiol* 2006; **151**: 109-123.

Bruunsgaard H., Galbo H., Halkjaer-Kristensen J., Johansen T.L., Maclean D.A., Pedersen B.K. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol* 1997; **499**: 833-841.

Camus G., Poortmans J., Nys M., Deby-Dupont G., Duchateau J., Deby C., Lamy M. Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. *Clin Sci* 1997; **92**:415-422.

Castagna C., Impellizzeri F.M., Chamari K., Carlomagno D., Rampinini E. Aerobic fitness and yo-yo continuous and intermittent tests performances in soccer players: A correlation study. *Jour. Stren. Cond. Res.* 2006; **20**: 320–325.

Castagna, C. et al., Cardiovascular responses during recreational 5-a-side indoor-soccer. *Journal of Science and Medicine in Sport* 2007;**10**:89-95.

Castell, L.M. Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise? *Nutrition* 2002;**18**:371-375.

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. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; **295**:C897–C904.

Chan S, Seto JT, Houweling PJ et al., Properties of extensor digitorum longus muscle and skinned Wbers from adult and aged male and female actn3 knockout mice. *Muscle Nerve*. 2011;doi:10.1002/mus.21778.

Chapman D., Newton M., Sacco P., Nosaka K. Greater muscle damage induced by fast versus slow velocity eccentric exercise. *Int. Jour. Sports Med.* 2006; **27**: 591– 598.

Chatzinikolaou A., Fatouros I.G., Gourgoulis V., Avloniti A., Jamurtas A.Z., Nikolaidis M.G., Douroudos I., Michailidis Y., Beneka A., Malliou P., Tofas T., Georgiadis I., Mandalidis D., Taxildaris K. Time course of changes in performance and inflammatory responses after acute plyometric exercise. *J Strength Cond Res* 2010; **24**(5):1389-98.

Chen, T.C. Effects of a second bout of maximal eccentric exercise on muscle damage and electromyographic activity. *Eur J Appl Physiol* 2003;**89**:115-12.

Chen, T.C.; Lin, K.Y.; Chen, H.L.; Lin, M.J.; Nosaka, K. Comparison in eccentric exercise-induced muscle damage among four limb muscles. *European Journal of Applied Physiology*. 2010;111;2:211-23.

Chen, T.C.; Nosaka, K. Effects of number of eccentric muscle actions on first and second bouts of eccentric exercise of the elbow flexors. *Journal of science and medicine in sport* 2006;**9**:57-66.

Cheung, K.; Hume, P.A.; Maxwell, I. Delayed onset muscle soreness: Treatment strategies and performance factors. *Sports Medicine*.2003;33:145-164.

Clarkson P.M., Devaney J.M., Gordish-Dressman H., Thompson P.D., Hubal M.J., Urso M., Price T.B., Angelopoulos T.J., Gordon P.M., Moyna N.M., Pescatello L.S., Visich P.S., Zoeller R.F., Seip R.L., Hoffman E.P. ACTN3 genotype is associated with increases in muscle strength in response to resistance training in women. *J Appl Physiol* 2005; **99**: 154-163.

Clarkson P.M., Hoffman E.P., Zambraski E., Gordish-Dressman H., Kearns A., Hubal M., Harmon B., Devaney J.M. ACTN3 and MLCK genotype associations with exertional muscle damage. *Jour Appl Physiol* 2005; **99**: 564-569.a

Clarkson P.M., Hubal M.J. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002; **81**(11): S52-S69.

Coelho, D.B.; Morandi, R.F.; Melo, M.A.A.; Silami-Garcia, E. Cinética da creatina quinase em jogadores de futebol profissional em uma temporada competitiva. *Revista brasileira de cineantropometria e desempenho humano* 2011,**13**,3:189-194.

Cordova, A, Martin, JF, Reyes, E, and Alvarez-Mon, M. Protection against muscle damage in competitive sports players: the effect of the immunomodulator AM3. *J Sports Sci*.2004; 22: 827–833.

Cormack, SJ, Newton, RU, and McGuigan,MR. Neuromuscular and endocrine responses of elite players to an Australian rules football match. *Int J Sports Physiol Perform*.2008; 3: 359–374.

Crewther B. Possible stimuli for strength and power adaptation: acute hormonal responses. *Sports Medicine* 2006; **36**(3): 215-38.

Crewther B., Cronin J., Keogh J., Cook C. The salivary testosterone and cortisol response to three loading schemes. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2008; **22**(1): 250-255.

Croisier J.L., Camus G., Venneman I., Deby-Dupont G., Juchmes-Ferir A., Lamy M., Crielaard J.M., Deby C., Duchateau J. Effects of training on exercise-

induced muscle damage and interleukin 6 production. *Muscle Nerve* 1999; **22**: 208-212.

Cunniffe B, Hore AJ, Whitcombe DM et al., Time course of changes in immunoendocrine markers following an international rugby game. *Eur J Appl Physiol* 2010; **108**:113–122.

Daniel J., Pellegrinotti I., Cielo F.B., Neto J.B. Potência anaeróbica de jogadores de futebol juvenis por meio do teste RAST. In: *XXVII Simpósio internacional de ciências do esporte*. São Paulo, 7-9 out., (Resumo n. 610, p.199), 2004.

Del Corral P., Howley E.T., Hartsell M., Ashraf M., Younger M.S. Metabolic effects of low cortisol during exercise in humans. *Jour Appl Physiol* 1998; **84**(3): 939–947.

Delextrat A, Gregory J, Cohen D. The Use of the Functional H:Q Ratio to Assess Fatigue in Soccer. *Int J Sports Med*. 2010; 31(3): 192-197. DOI: 10.1055/s-0029-1243642

Delmonico M.J., Kostek M.C., Doldo N.A., Hand B.D., Walsh S., Conway J.M., Carignan C.R., Roth S.M. Hurley B.F. Alpha-actinin-3 (ACTN3) R577X polymorphism influences knee extensor peak power response to strength training in older men and women. *J Gerontol Biol Sci Med Sci* 2007; **62**: 206-212.

Denvir, M.A.; Galloway, P.J.; Meighan, A.S.; Blyth, M.; Alexander, C.; Fleming, C.; Frame, F. Changes in skeletal and cardiac muscle enzymes during the Scottish Coast to Coast Triathlon. *Scottish Medical Journal* 1999;**44,2**:49–51.

Di Salvo V., Pigozzi F. Physical training of football players based on their positional roles in the team. *Jour. Spor. Med. Phy. Fitn.*1998; **38**: 294-297.

Dias R.G. Genética, performance física humana e doping genético: o senso comum versus a realidade científica. *Rev Bras Med Esporte* 2011; **17**: 62-70.

Dias R.G., Pereira A.C., Negrão C.E., Krieger J.E. Polimorfismos genéticos determinantes da performance física em atletas de elite. *Rev Bras Med Esporte* 2007; **13**: 209-216.

Dovio A, Roveda E, Sciolla C et al., Intense physical exercise increases systemic 11 β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in healthy adult subjects. *Eur J Appl Physiol* 2010;108:681–687.

Dvorak J, Junge A, Derman W, Schwellnus M. Injuries and illnesses of football players during the 2010 FIFA World Cup. *Br J Sports Med* 2011;45:626-30.

Druzhevskaya A.M., Ahmetov I.I., Astratenkova I.V., Rogozkin V.A. Association of the ACTN3 R577X polymorphism with power athlete status in Russians. *Eur J Appl Physiol* 2008; **103**: 631-634.

Duarte, J.A.; Magalhães, J.F.; Monteiro, L.; Almeida-Dias, A.; Soares, J.M.; Appell, H.J. Exercise-induced signs of muscle overuse in children. *International Journal Sports Medicine*. 1999; 20(2): 103-108.

Durand R.J., Castracane V.D., Hollander D.B., Tryniecki J.L., Bamman M.M., O'Neal S., Hebert E.P., Kraemer R.R. Hormonal responses from concentric and eccentric muscle contractions. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2003; 35(6): 937-943.

Edwards KM, Burns VE, Ring C, Carroll D. Individual differences in the interleukin-6 response to maximal and submaximal exercise tasks. *J Sports Sci* 2006; 24(8): 855-862.

Eklom B. Applied physiology of soccer. *Spor. Med.* 1986; 3: 50-60.

Eklom B. *Handbook of Sports Medicine and Science Football (Soccer)*. 1. ed. Blackwell Scientific Publications 1994: 227.

Elloumi, M, Maso, F, Michaux, O, Robert, A, and Lac, G. Behaviour of saliva cortisol [C], testosterone [T] and the T/C ratio during a rugby match and during the post competition recovery days. *Eur J Appl Physiol*. 2003; 90: 23-28.

Engelmann, M, Landgraf, R, and Wotjak, C.T. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Front Neuroendocrinol*. 2004; 25: 132-149.

Epstein, N.D., and J.S. Davis. Sensing stretch is fundamental. *Cell* 2003; 50: 112-147.

Eynon N., Duarte J.A., Oliveira J., Sagiv M., Yamin C., Meckel Y. Goldhammer E. ACTN3 R577X polymorphism and Israeli top-level athletes. *Int J Sports Med* 2009; 30: 695-698.

Farthing J.P.E., Chilibeck P.D. The effects of eccentric and concentric training at different velocities on muscle hypertrophy. *Eur. Jour. appl. Physiol.* 2003; 89(6): 578-586.

Fatouros, I.G.; Athanasios, C.; Ioannis, I.D.; Nikolaidis, M.G.; Kyparos, A.; Margonis, K.; Michailidis, Y.; Vantarakis, A.; Taxildaris, K.; Katrabasas, I.; Mandalidis, D.; Kouretas, D.; Jamurtas, A.Z. Time-course of changes in oxidative stress and antioxidant status responses following a soccer game. *Journal of strength and conditioning research* 2010; 24(12): 3278-3286.

Febbraio M.A., Pedersen B.K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *Faseb J* 2002; 16: 1335-1347.

Fehrenbach E., Schneider M.E. Trauma-induced systemic inflammatory response versus exercise-induced immunomodulatory effects. *Rev. Sports Med.* 2006; 36(5): 373-384.

Filaire E., et al., Preliminary results on mood state, salivary testosterone: cortisol ratio and team performance in a professional soccer team. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2001; **86**: 179-184.

Fischer C.P., Plomgaard P., Hansen A.K., Pilegaard H., Saltin B., Pedersen B.K. Endurance training reduces the contraction-induced interleukin-6 mRNA expression in human skeletal muscle. *Am. Jour. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004; **287**: E1189–E1194.

Flanagan, T.; Merrick, E. Quantifying the work-load of soccer players. In: FOURTH WORLD CONGRESS OF SCIENCE AND FOOTBALL, 4, 1999, Sydney. London: E & FN Spon, 2002, p. 341-349.

Foschini D., Prestes J., Charro M.A. Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano.* 2007; **9**(1): 101-106.

França S.C.A., Neto T.L.B., Agresta M.C., Lotufo R.F.M., Kater C.E. Resposta divergente da testosterona e do cortisol séricos em atletas masculinos após uma corrida de maratona. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2006; **50**(6): 1082-1087.

Freeman M.R., Schneck F.X., Gagnon M.L., Corless C., Soker S., Niknejad K., Peoples G.E., Klagsbrun M. Peripheral blood T lymphocytes and infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 1995; **55**: 4140-4145.

Frey N., Olson E.N. Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J Biol Chem* 2002; **277**: 13998-14004.

Frey N., Richardson J.A., Olson E.N. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 14632-14637.

Friden J., Lieber R.L. Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. *Acta Physiol. Scand.* 2001; **171**: 321-326.

Friden J., Lieber R.L. Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1992; **24**: 521-530.

Frubeck G., Gómez-Ambrose J., Muruzábal F.J., Burell M.A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol* 2001; **280**: E827-E847.

Fry A.C., Kraemer W.J., Ramsey L.T. Pituitary-adrenal gonadal responses to high-intensity resistance exercise overtraining. *European Journal of Applied Physiology* 1998; **85**(6): 2352-2359.

Fuller, C.W.; Ekstrand, J.; Junge, A.; Andersen, T.E.; Bahr, R.; Dvorak, J., Hagglund, M.; Mccrory, P. Consensus statement on injury definitions and data

collection procedures in studies of football (soccer) injuries. *British Sports Medicine* 200 ;**40,3**:193-201.

Gleeson M. Immune system adaptation in elite athletes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; **9**: 659-665.

Gleeson M. Interleukins and exercise (perspectives). *J Physiol* 2000; **529**: 1.

Gleeson, M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol*. 2007;103:693-9.

Gómez-Gallego F., Santiago C., González-Freire M., Muniesa C.A., Fernández M., Pérez M., Foster C., Lucia A. Endurance performance: genes or gene combinations? *Int. Jour. Spor. Med.* 2009; **30**: 66–72.

Gotshalk L.A., Loebel C.C., Nindl B.C., Putukian M., Sebastianelli W.J., Newton R.U., Häkkinen K., Kraemer W.J. Hormonal responses of multiset versus single-set heavy-resistance exercise protocols. *Canadian Journal of Applied Physiology* 1997; **22**(3): 244-255.

Greig M.P., Mcnaughton L.R., Lovell R.J. Physiological and mechanical response to soccer-specific intermittent activity and steady-state activity. *Res Sports Med* 2006; **14**: 29–52.

Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005;6:1045-56.

Hackney A. Exercise as a stressor to the human neuroendocrine system. *Medicina (Kaunas)* 2006; **42**(10); 788-97.

Hall G., Steensberg A., Sacchetti M., Fischer C., Keller C., Schjerling P., Hiscock N., Møller K., Saltin B., Febbraio M.A., Pedersen B.K. Interleukin-6 Stimulates Lipolysis and Fat Oxidation in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**(7): 3005-3010.

Handziski Z. The changes of ACTH, cortisol, testosterone and testosterone/cortisol ratio in professional soccer players during a competition halfseason. *Bratislava Medical Journal* 2006; **107**: 259-263.

Helgerud J., Engen L.C., Wisloff U., Hoff J. Aerobic endurance training improves soccer performance. *Med. Scie. Spor. Exer.* 2001; **33**(11): 1925-1931.

Hoff, J. Training and testing physical capacities for elite soccer players. *Journal of Sports Sciences* 2005;**23**:573-582.

Honda K., Yamada T., Endo R., Ino Y., Gotoh M., Tsuda H., Yamada Y., Chiba H., Hirohashi S. Actinin-4, a novel actinbundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* 1998; **140**:1383–93.

Horn F., Henze C., Heidrich K. Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. *Immunobiol* 2000; **202**:151-167.

Hortobágyi T, Denahan T. Variability in creatine kinase: methodological, exercise, and clinically related factors. *Int J Sports Med.* 1989;**10(2)**:69-80.

Inder W.J., Hellemans J., Swanney M.P., Prickett T.C.R., Donald R.A. Prolonged exercise increases peripheral plasma ACTH, CRH, and AVP in male athletes. *Jour. Appl. Physiol.*1998; **85(3)**: 835–841.

Ispiridis I., Fatouros I.G., Jamurtas A.Z., Nikolaidis M.G., Michailidis I., Douroudos I., Margonis K., Chatzinikolaou A., Kalistratos E., Katrabasas I., Alexiou V., Taxildaris K. Time-course of changes in inflammatory and performance responses following a soccer game. *Clin J Sport Med* 2008; **18(5)**:423-31.

Jackson, A. S.; Pollock, M. L. Generalized equations for predicting body density of men. *Brit. Jour. of Nutrit* 1978; **40**;3:497-504.

Jonsdottir I.H., Schjerling P., Ostrowski K. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat muscle. *J Physiol* 2000; **528**:157-163.

Katirji, B. M. D. & M. A. M. D, Mohamed. Creatine Kinase Revisited. Review. *J. Clin. Neuromusc* 2001;**2**:158-163.

Keller C., Steensberg A., Pilegaard H., Osada T., Saltin B., Pedersen B.K., et al., Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *Faseb J* 2001; **15**: 2748-2750.

Klavora P. Vertical jump: a critical review. *Strength and Conditioning Journal* 2000; **22(5)**: 70-75.

Knifs, F. W; Santos, I. C.; Corrêa, C. A.; Carielo, A.; Filho, J. F.; Dantas, E. A. M.; Características antropométricas e sua relação com microlesões induzidas pelo exercício. *Brazilian Journal of Biomotricity* 2008; 2:122 – 132.

Kraemer R.R., Hollander D.B., Reeves G.V., Francois M., Ramadan Z.G., Meeker B., Tryniecki J.L., Hebert E.P., Castracane V.D. Similar hormonal responses to concentric and eccentric muscle actions using relative loading. *European Journal of Applied Physiology* 2006; **96**:551-557.

Kraemer W.J., Dudley G.A., Tesch P.A., Gordon S.E., Hather B.M., Volek J.S., Ratamess N.A. The influence of muscle action on the acute growth hormone response to resistance exercise and short-term detraining. *Growth Hormone IGF Research* 2001; **11(2)**: 75-83.

Kraemer W.J., Gordon S.E., Fleck S.J., Marchitelli L.J., Mello R., Dziados J.E., Friedl K., Harman E., Maresh C., Fry A.C. Endogenous anabolic hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise in males and females. *International Journal of Sports Medicine* 1991; **12(2)**: 228-235.

Kraemer W.J., Ratamess N.A. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2004; **36**(4): 674-688.

Kraemer W.J., Ratamess N.A. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Medicine* 2005; **35**(4): 339-361..

Kraemer, WJ, Spiering, BA, Volek, JS, Martin, GJ, Howard, RL, Ratamess, NA, Hatfield, DL, Vingren, JL, Ho, JY, Fragala, MS, Thomas, GA, French, DN, Anderson, JM, Hakkinen, K, and Maresh, CM. Recovery from a national collegiate athletic association division 1 football game: muscle damage and hormonal status. *J Strength Cond Res.*2009; **23**: 2–10.

Krustrup P., Mohr M., Amstrup T., Rysgaard T., Johansen J., Steensberg A., Pedersen P.K., Bangsbo J. The yo-yo intermittent recovery test: physiological response, reliability and validity. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2003; **35**: 697–705.

Krustrup P., Mohr M., Ellingsgaard H., Bangsbo J. Physical demands during an elite female soccer game: importance of training status. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2005; **37**(7): 1242-1248.

Lac., G., Elloumi M, Maso F, Michaux O, Robert A. Behaviour of saliva cortisol [C], testosterone [T] and the T/C ratio during a rugby match and during the post-competition recovery days. *Eur J Appl Physiol* 2003; **90**:23–28.

Lavender, A.P.; Nosaka, K. A light load eccentric exercise confers protection against a subsequent bout of more demanding eccentric exercise. *Journal of science and medicine in in sport* 2008;**11**: 291-298.

Lazarim F., Antunes-Neto J., Silva F., Nunes, L., Cameron A., Cameron L., Alves A., Brenzikofer R., Macedo D. The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. *Journal of Science and Medicine in Sport* 2009; **12**(1): 85-90.

Lek M., North K.N. Are biological sensors modulated by their structural scaffolds? The role of the structural muscle proteins α -actinin-2 and α -actinin-3 as modulators of biological sensors. *FEBS Letters* 2010; **584**: 2974–2980.

Lieber R.L., Shah S., Fridén J. Cytoskeletal disruption after eccentric contraction-induced muscle injury. *Clin. Orthop.*2002; **403**: S90-S99.

Linnemann A., van der Vena P.F., Vakeel P., Albinus B. et al.,The sarcomeric Z-disc component myopodin is a multiadapter protein that interacts with filamin and α -actinin. *European Journal of Cell Biology* 2010; **89**: 681–692.

Lucia A., Gómez-Gallego F., Santiago C. et al.,ACTN3 genotype in professional endurance cyclists. *In. Jour. Spor. Med.* 2006; **27**: 880-884.

MacArthur D.G. et al., An Actn3 knockout mouse provides mechanistic insights into the association between alpha-actinin-3 deficiency and human athletic performance. *Hum. Mol. Genet.* 2008; **17**: 1076–1086.

MacArthur D.G., North K.N. A gene for speed? The evolution and function of α -actinin-3. *BioEssays* 2004; **26**: 786–795.

MacArthur D.G., North K.N. ACTN3: A genetic influence on muscle function and athletic performance. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2007; **35**(1): 30-34.

MacArthur D.G., North K.N. Genes and human elite athletic performance. *HumGenet* 2005; **116**: 331-339.

MacIntyre DL, Sorichter S, Mair J, Berg A, McKenzie DC. Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2001; **84**:180-186.

MacIntyre DL, Sorichter S, Mair J, Berg A, McKenzie DC. Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2001; **84**:180-186.

Magalhães J., Rebelo A., Oliveira E., Silva J.R., Marques F., Ascensão A. Impact of Loughborough Intermittent Shuttle Test versus soccer match on physiological, biochemical and neuromuscular parameters. *Eur J Appl Physiol* 2010; **108**(1): 39–48.

Malm C, Ekblom O, Ekblom B. Immune system alteration in response to two consecutive soccer games. *Acta Physiol Scand* 2004; **180**:143–155.

Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction? *Acta Physiol Scand.* 2001; **171**(3): 233-239.

Martínez Amat A., Marchal Corrales J.A., Rodríguez Serrano F., Boulaiz H., Prados Salazar J.C., Hita Contreras F., Caba Perez O., Carrillo Delgado E., Martín I., Aranega Jimenez A. Role of alpha-actin in muscle damage of injured athletes in comparison with traditional markers. *Br J Sports Med* 2007; **41**: 442–446.

Martínez-Amat A., Boulaiz H., Prados J., Marchal J.A., Padial Puche P., Caba O., Rodríguez-Serrano F., Aránega A. Release of alpha-actin into serum after skeletal muscle damage. *Br J Sport Med* 2005; **39**: 830–834.

Matsakas A, Patel K; Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. *Histol Histopathol.* 2009; **24**(2):209-22.

Mccauley T., Mastana S.S., Hossack J., Macdonald M., Folland J.P. Human angiotensin-converting enzyme i/d and alpha-actinin 3 r577x genotypes and muscle functional and contractile properties. *Exp Physiol* 2009; **94**: 81–89.

Mchugh, M.P. Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scandinavian Journal Of Medicine & Science In Sports* 2003;**13**,2:88-97.

McLellan, C.P.; Lovell, D.I.; Gass, G.C. Creatine kinase and endocrine responses of elite players pre, during and post rugby league match play. *Journal of strength and conditioning research* 2010;**24**:11;2908-2919.

McMurray R.G., Hackney A.C. Endocrine responses to exercise and training. In W.G. Garrett & D.T. Kirkendall (eds) *Sports_Medicine* Vol 1, Baltimore: Williams & Wilkins, 2000, 135-162.

Miles A., Maclaren D., Reilly T., Yamanaka K. An analysis of physiological strain in four-a-side women's soccer. *Jour. Spor. Scie.* 1992; **10**: 142-143.

Miller A.S., Dykes D.D., Poleski H.F. A simple salting out procedure for extracting dna from human cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 1215.

Mills M., Yang N., Weinberger R., Vander Woude D.L., Beggs A.H., Easteal S. North K. 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* 2001; **10**: 1335-1346.

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 phenotypes in adolescent Greeks. *Eur J Hum Genet* 2007; **15**: 88-93.

Moreira A., Arsati F., de Oliveira Lima Arsati Y.B., da Silva D.A., de Araújo V.C. Salivary cortisol in top-level professional soccer players. *Eur J Appl Physiol* 2009; **106**(1): 25–30.

Mortimer L., Condessa L., Rodrigues V., Coelho D., Soares D., Silami-Garcia E. Comparison between the effort intensity of young soccer players in the first and second halves of the soccer game. *Rev. Port. Cien. Desp.* 2006; **6**: 154-159.

Mougios V. Reference intervals for serum creatine Kinase in athletes. *British Journal of Sports Medicine* 2007; **41**: 674-678.

Mulligan S.E., Fleck S.J., Gordon S.E., Koziris L.P., Triplett-McBride N.T. Influence of resistance exercise volume on serum growth hormone and cortisol concentrations in women. *Journal of Strength Conditioning Research.* 1996; **10**(4): 256-262.

Nagahama H., Isokawa M., Suzuki S., Ohashi J. The physical fitness of soccer players after maximal intermittent exercise. *Jour. Spor. Scie.* 1992; **10**: 153.

Nemet D., Rose-Gottron C.M., Mills P.J., Cooper D.M. Effect of Water Polo Practice on Cytokines, Growth Mediators, and Leukocytes in Girls. *Med Sci Sports Exerc* 2003; **35**: 356-363

Nieman D.C., Johanssen L.M., Lee J.W., Arabatzis K. Infections episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J Sports Med Phys Fitness* 1990; **30**: 321-328.

Niemi A.K., Majamaa K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *Eur J Hum Genet* 2005; **13**: 965-969.

Nindl B.C., Kraemer W.J., Deaver D.R., Peters J.L., Marx J.O., Heckman J.T., Loomis G.A. LH secretion and testosterone concentrations are blunted after resistance exercise in men. *Jour. Appl. Physiol.* 2001; **91**: 1251–1258.

Nobrega, A.C.L. The sub-acute effects of exercise: concept, characteristics, and clinical implications. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 2005; **33**: 84-87.

Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C, Feingold K.R. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinol* 1995; **136**: 2143-2149.

Norman B., Esbjornsson 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. *J Appl Physiol* 2009; **106**: 959-965.

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

North K.N., Yang N., Wattanasirichaigoon D., Mills M., Easteal S., Beggs A.H. A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population. *Nat Genet* 1999; **21**: 353-354.

Nuviala, R.J.; Roda, L.; Lapieza, M.G.; Boned, B.; Giner A. Serum enzymes activities at rest and after a marathon race. *Journal of Sports Medicine Physical Fitness* 1992; **32**, **2**: 180–186.

Nybo L., Nielsen B., Pedersen B.K., Moller K., Secher N.H. Interleukin-6 release from the human brain during prolonged exercise. *J Physiol* 2002; **542**: 991–995.

Ogura Y., Naito H., Kakigi R., Akema T., Sugiura T., Katamoto S., Aoki J. Different adaptations of alpha-actinin isoforms to exercise training in rat skeletal muscles. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; **196**(3): 341-349.

Orban J., Lorinczy D., Nyitrai M., Hild G. Nucleotide dependent differences between the alpha-skeletal and alpha-cardiac actin isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; **368**: 696–702.

Ostrowski K., Hermann C., Bangash A., Schjerling P., Nielsen J.N., Pedersen B.K. A trauma-like elevation in plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J Physiol* 1998; **508**: 949-953.

Ostrowski K., Rohde T., Asp S., Schjerling P., Pedersen B.K. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* 1999; **515**: 287-291.

Ostrowski K., Rohde T., Zacho M., Asp S., Pedersen B.K. Evidence that IL-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol* 1998; **508**: 949-953.

Papadimitriou I.D., Papadopoulos C., Kouvatsi A., Triantaphyllidis C. The ACTN3 gene in elite Greek track and field athletes. *Int J Sports Med* 2008; **29**: 352-355.

Paparini A., Ripani M., Giordano G.D., Santoni D., Pigozzi F., Romano-Spica V. ACTN3 genotyping by real-time PCR in the Italian population and athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2007; **39**: 810-815.

Peake, J.; Nosaca, K.; Suzuki, K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exercise Immunology Review*.2005;11: 64-85.

Pedersen B.K., Febbraio M. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 2008; **88**: 1379-1406.

Pedersen B.K., Febbraio M. Muscle-derived interleukin-6-A possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver, and brain. *Brain Behav Immunity* 2005; **19**: 371-376.

Pedersen B.K., Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol Rev* 2000; **80**: 1055-1081.

Pedersen B.K., Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports* 2006; **16**: 63.

Pedersen B.K., Steensberg A., Fischer C., Keller C., Keller P., Plomgaard P., Wolsk-Petersen E., Febbraio M. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc* 2004; **63**: 263-267.

Pedersen B.K., Steensberg A., Fischer C., Keller C., Keller P., Plomgaard P., Febbraio M., Saltin B. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil* 2003; **24**:113-119.

Pedersen B.K., Steensberg A., Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol* 2001; **536**: 329-337.

Pedersen B.K., Toft A.D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med* 2000; **34**: 246-251.

Pedersen B.K., Woods J.A., Nieman D.C. Exercise-induced immune changes-an influence on metabolism? *Trends Immunol* 2001; **22**: 473-475.

Pedersen M., Bruunsgaard H., Weis N., Hendel H.W., Andreassen B.U., Eldrup E., Dela F., Pedersen B.K. Circulating levels of TNF- α and IL-6-relation to

truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with Type-2 diabetes. *Mech Ageing Dev* 2003; **124**: 495-502.

Petersen, A.M.W.; Pedersen, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology* 2005;98:1154-1162.

Pimenta EM, Coelho DB, Cruz IR, Morandi RF, Veneroso CE, de Azambuja Pussieldi G, Carvalho MR, Silami-Garcia E, De Paz Fernández JA. The ACTN3 genotype in soccer players in response to acute eccentric training. *Eur J Appl Physiol*. 2011 Aug 13. [Epub ahead of print]

Prestes J., Palanch A.C., Frollini A.B., Ferreira C.K., Cavaglieri C.R., Dias R., Donatto F., Guerreschi M.G., Urtado C.B., Leite G.S. Efeito do exercício físico realizado até exaustão, nas intensidades leve e moderada, sobre a concentração sérica de interleucina-6. *IV Workshop em Fisiologia do Exercício da UFSCAR* 2005; 43.

Proske U., Allen T.J. Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 2005; **33**(2): 98-104.

Proske U., Morgan D.L. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol* 2001; **537**(Pt 2): 333-345.

Proske, U.; Allen, T.J. Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. *Exercise and Sport Sciences Reviews*.2005;33; 2:94-104.

Purge, P.; Jurimae, J.; Jurimae, T.; Hormonal and psychological adaptation in elite male rowers during prolonged training. *Journal Of Sports Science* 2006;**24,10**:1075-1082.

Quinlan K.G., Seto J.T., Turner N., Vandebrouck A., Floetenmeyer M., Macarthur D.G., Raftery J.M., Lek M., Yang N., Parton R.G., Cooney G.J., North K.N. Alpha-actinin-3 deficiency results in reduced glycogen phosphorylase activity and altered calcium handling in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 2010; **19**(7): 1335-1346.

Radak, Z.; Taylor, A.W.; Ohno, H.; Goto, S. Adaptation to exercise induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exercise Immunology Review* 2001;**7**:90-107.

Ramel A., Wagner K.H., Elmadfa I. Acute impact of submaximal resistance exercise on immunological and hormonal parameters in young men. *J Sports Sci*. 2003; **21**(12): 1001-1008.

Rampinini, E. et al., Factors influencing physiological responses to small-sided soccer games. *Journal of Sports Sciences* 2007;**25**:6:659-6.

Rankinen T., Perusse L., Rauramaa R., Rivera M.A., Wolfarth B., Bouchard C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes. *Med Sci Sports Exerc* 2001; **33**: 855-867.

Rankinen T., Roth S.M., Bray M.S., Loos R., Perusse L., Wolfarth B., Hagberg J.M., Bouchard C. Advances in exercise, fitness, and performance genomics. *Med Sci Sports Exerc* 2010; **42**: 835-846.

Reardon K.A., Davis J., Kapsa R.M., Choong P., Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* 2001; **24**: 893-899.

Rebeck T.R., Spitz M., Wu X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nat Rev Genet* 2004; **5**: 589-597.

Reid, M.B.; Li, Y.P. Cytokines and oxidative signaling in skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 2001;171:225-232.

Reilly T., Bangsbo J., Franks A. Anthropometrics and physiological predispositions for elite soccer. *Jour. Spor. Scie.* 2000; **18**: 669-683.

Reilly T., Ekblom, B. The use of recovery methods post-exercise. *J Sports Sci* 2005; **23**(6); 619-627.

Reilly, T. Energetic of high intensity exercise (soccer), with particular reference to fatigue. *Jour. Spor. Scie.* 1997;15: 257-263.

Rienzi E., Drust B., Reilly T., Carter J.E.L., Martin A. Investigation of anthropometrics and work-rate profiles of elite south American international soccer player. *Jour. Spor. Med. Phy. Fitn.* 2000; **40**; 162-9, 2000.

Rodriguez-Romo G., Ruiz J.R., Santiago C., Fiuza-Luces C., Gonzalez-Freire M., Gomez-Gallego F., Moran M., Lucia A. Does the ACE I/D polymorphism, alone or in combination with the ACTN3 R577X polymorphism, influence muscle power phenotypes in young, non-athletic adults? *Eur J Appl Physiol* 2010; **110**(6); 1099-1106.

Rogero, M.M.; Mendes, R.R.; Tirapegui, J.O. Aspectos neuroendócrinos e nutricionais em atletas com overtraining. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 2005;**49**:359-368.

Ronsen O., Lea T., Bahr R., Pedersen B.K. Enhanced plasma IL-6 and IL-1ra responses to repeated vs. single bouts of prolonged cycling in elite athletes. *J Appl Physiol* 2002; **92**: 2547-2553.

Roth SM, Walsh S, Liu D, Metter EJ, Ferrucci L & Hurley BF. The ACTN3 R577X nonsense allele is under-represented in elite-level strength athletes. *Eur J Hum Genet* 2008;**16**, 391-394.

Rowbottom DG, Green KJ. Acute exercise effects on the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:S396-S405.

Ruiz J.R., Fernández Del Valle M., Verde Z., Díez-Vega I., Santiago C., Yvert T., Rodríguez-Romo G., Gómez-Gallego F., Molina J.J., Lucia A. ACTN3 r577x polymorphism does not influence explosive leg muscle power in elite volleyball players. *Scand J Med Sci Sports* 2010; JUN 18. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2010.01134.x.

Sakuma K., Yamaguchi A. The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010; April 1. DOI: 10.1155/2010/721219.

Santiago C., Rodríguez-Romo G., Gómez-Gallego F., González-Freire M., Yvert T., Verde Z., Naclerio F., Altmäe S., Esteve-Lanao J., Ruiz J.R., Lucia A. Is there an association between ACTN3 r577x polymorphism and muscle power phenotypes in young, non-athletic adults? *Scand J Med Sci Sports* 2010; 20(5): 771-778.

Santiago, C.; González-Freire, M.; Serratos, L.; Morate, F. J.; Meyer, T.; Gómez-Gallego, F.; Lucia, A. ACTN3 genotype in professional soccer players. *Br J Sports Med* 2008; 42(1): 71-73.

Sari-Sarraf V., Reilly T., Doran D.A., Atkinson G. The effects of single and repeated bouts of soccer-specific exercise on salivary IgA. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 526–532.

Saunders C.J., September A.V., Xenophontos S.L., Cariolou M.A., Anastassiades L.C., Noakes T.D., Collins M. Association of the ACTN3 gene R577X polymorphism with endurance performance in ironman triathlons. *Ann. Hum. Gene.* 2007; 71: 777–781.

Scharhag J., Meyer T., Gabriel H.H.W., Schlick B., Faude O., Kindermann W. Does prolonged cycling of moderate intensity affect immune cell function. *Br J Sports Med* 2005; 39: 171-177.

Scheele C, Nielsen S, Pedersen B. ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. *Trends Endocrinology Metabolism* 2009; 20(3):95-99

Schobitz B., De Kloet E.R., Sutanto W., Holsboer F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci* 1993; 5: 1426–1435.

Scott R.A., Irving R., Irwin L., Morrison E., Charlton V., Austin K., Tladi D., Deason M., Headley S.A., Kolkhorst F.W., Yang N., North K., Pitsiladis Y.P. ACTN3 and ACE genotypes in Elite Jamaican and US sprinters. *Med. Sci. Spor. Exerc.* 2010; 42(1): 107-112.

Scott W., Stevens J., Binder-Macleod S.A. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther* 2001; 81: 1810-6

Seto JT, Lek M, Quinlan KG, Houweling PJ, Zheng XF, Garton F, Macarthur DG, Raftery JM, Garvey SM, Hauser MA, Yang N, Head SI, North KN. Deficiency of Alpha-actinin-3 is associated with increased susceptibility to contraction-induced damage and skeletal muscle remodeling. *Hum Mol Genet.* 2011; 20(15):2914-2927.

Shephard R.J. The energy needs of the soccer player. *Clin. Jour. Spor. Med.* 1992; 2(1): 62-70.

Silami-Garcia E., Espirito Santo L.C., Garcia A.M.C., Nunes V.N.G. Energy expenditure of professional soccer players during official games. *Med. Scie. Spor. Exer.* 2005; 37(5): S87.

Silva, A.S.R.; Santhiago, V.; Papoti, M.; Gobatto, C.A. Psychological, biochemical and physiological responses of Brazilian soccer players during a training program. *Science And Sports* 2008;23,2: 66-72.

Silva, C.C.; Goldberg, T.B.L.; Capela, R.C.; Kurokawa, C.S.; Teixeira, A.S.; Dalmas, J.C.; Cyrino, E.S. Respostas agudas pós-exercício dos níveis de lactato sanguíneo e creatinofosfoquinase de atletas adolescentes. *Revista Brasileira de medicina do esporte* 2007;13:381-386.

Small K., McNaughton L., Greig M., Lovell R. Effect of timing of eccentric hamstring strengthening exercises during soccer training: implications for muscle fatigability. *J StrengthCond Res* 2009; 23(4): 1077-1083.

Smilios I., Pilianidis T., Karamouzis M., Tokmakidis S.P. Hormonal responses after various resistance exercise protocols. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2003; 35(4): 644-54.

Smith LL, Miles MP. Exercise-Induce muscle injury and inflammation. Chapter 27. In: *Exercise and Sports Science*. Garrett WE, Kirkendall DT. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 1999:401-412.

Smith LL. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? *J Strength Cond Res*;2004;18:185-193.

Smith, L.L. Cytokine Hypothesis OF Overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Medicine And Science In Sport And Exercise* 2000;32,2: 317-331.

Spiering, BA, Kraemer, WJ, Anderson, JM, Armstrong, LE, Nindl, BC, Volek, JS, Ho, JY, and Maresh, CM. Resistance exercise biology: manipulation of resistance exercise programme variables determines the responses of cellular and molecular signaling pathways. *Sports Med.* 2008; 38: 527–540.

Sporis G., Jukic I., Milanovic L., Vucetic V. Reliability and factorial validity of agility tests for soccer players. *J Strength Cond Res* 2010; 24(3):679–686.

Squire J.M. Architecture and function in the muscle sarcomere. *Curr Opin Struct Biol* 1997; 7: 247-257.

Starkie R.L., Rolland J., Angus D.J., Anderson M.J., Febbraio M.A. Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol* 2001; **280**: C769-C774.

Starkie R.L., Rolland J., Febbraio M.A. Effect of adrenergic blockade on lymphocyte cytokine production at rest and during exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **281**: C1233-C1240.

Stauber, W.T. Eccentric action of muscles: physiology, injury, and adaptation. *Exercise and Sport Sciences Reviews*.1989;17:157-85.

Steensberg A., Keller C., Starkie R.L., Osada T., Febbraio M.A., Pedersen B.K. IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; **283**: E1272-E1278.

Steensberg A., Toft S.P., Schjerling A.D., Halkjaer-Kristensen J., Pedersen B.K. Plasma interleukin-6 during strenuous exercise: role of adrenaline. *Am J Physiol* 2001; **281**:1001-1004.

Steensberg A., Van Hall G., Osada T., Sacchetti M., Saltin B., Pedersen B.K. Production of IL-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma IL-6. *J Physiol* 2000; **529**: 237-242.

Steinacker J.M., Lormes W., Reissnecker S., Liu Y. New aspects of the hormone and cytokine response to training. *Eur. Jour. Appl. Physiol.* 2004; **91**: 382–391.

Stich V., De Glisezinski I., Berlan M., Bulow J., Galitzky J., Harant I., Suljkovicova H., Lafontan M., Rivière D., Crampes F. Adipose tissue lipolysis is increased during a repeated bout of aerobic exercise. *J Appl Physiol* 2000; **88**: 1277-1283.

Stolen T., Chamari K., Castagna C., Wisloff U. Physiology of soccer: *an update*. *Spor. Med.* 2005; **35**: 501-536.

Stone M.H., Fry A.C. Increase training volume in strength/power athletes. In: *Overtraining in sport*. Human Kinetics 1998; Champaign: 87-106.

Strudwick A., Reilly T., Doran D. Anthropometrics and fitness profiles of elite players in two football codes. *Jour. Spor. Med. Phy. Fitn.*2002; **42**: 239–242.

Sunderland C., Morris J.G., Nevill M. A heat acclimation protocol for team sports. *Br J Sports Med* 2008; **42**: 327–333.

Suzuki K., Nakaji S., Yamada M., Liu Q., Kurakake S., Okamura N., Kumae T., Umeda T., Sugawara K. Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Med Sci Sports Exerc* 2003; **35**(2): 348-355.

Tee, J.C.; Bosch, A.N.; Lambert, M.I. Metabolic consequences of exercise induced signs of muscle damage. *Sports Medicine*.2007;.37;10:827-36.

Thomis M., Beunen G., Maes H., Blimkie C., Van Leemputte M., Claessens A., Marchal G., Willems E., Vlietinck R. Strength training: importance of genetic factors. *Med Sci Sports Exerc* 1998; **30**: 724-731.

Thomis M., Huygens W., Heuninckx S., Chagnon M., Maes H., Claessens A., Vlietinck R., Bouchard C., Beunen G. Exploration of myostatin polymorphisms and the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion genotype in responses of human muscle to strength training. *Eur J Appl Physiol* 2004; **92**: 267-274.

Thompson, D.; Nicholas, C.W.; Williams, C. Muscular soreness following prolonged intermittent high intensity shuttle running. *Journal of sports sciences* 1999;**17**:387-395.

Tidball JG, Wehling-Henricks M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J. Physiol* 2007;**578**:327-36.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;**288**:R345-R353.

Tidus, P. Skeletal Muscle Damage and Repair, *ed: Human Kinetics*. 2008.

Tidus, P.M. Influence of estrogen on skeletal muscle damage, inflammation, and repair. *Exercise and Sport Science Review*.2003;**31**;1: 40-4.

Toft A.D., Jensen L.B., Bruunsgaard H., Ibfelt T., Halkejaer-Kristenses J., Febbraio M., Pedersen B.K. Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **283**: C289-C295.

Toft A.D., Thorn M., Ostrowski K., Asp S., Moller K., Iversen S., Hermann C., Sondergaard S.R., Pedersen B.K. N-3 polyunsaturated fatty acids do not affect cytokines response to strenuous exercise. *J Appl Physiol* 2000; **89**: 2401-2406.

Toigo M, Boutellier U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. *Eur J Appl Physiol* 2006;**97**:643-63.

Tomiya A., Aizawa T., Nagatomi R., Sensui H., Kokubun S. Myofibers express il-6 after eccentric exercise. *Am J Sports Med* 2004; **32**: 503-508.

Totsuka, M. et al., Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise. *Journal of Applied Physiology* 2002;**93**:1280-1286.

Totsuka, M.; Nakaji, S.; Suzuki, K.; Sugawara, K.; Sato, K. Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise. *Journal of applied physiology* 2002;**93**:1280-1286.

Toumi, H.; Best, T.M. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Journal of Sports Medicine* 2003;**37**:284-286.

Tricoli V. Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular tardia. *Rev. Bras. Cien. Mov.* 2001; **9**: 39-44.

Tumilty D. Physiological characteristics of elite soccer players. *Spor. Med.*1993; **16**: 80–96.

Twist C., Eston R. The effects of exercise-induced muscle damage on maximal intensity intermittent exercise performance. *Eur J Appl Physiol* 2005; **94**: 652–658.

Uchida M., Bacurau R., Navarro F. Pontes Júnior F.L., Tessuti V.D., Moreau R.L., Costa Rosa L.F.B.P., Aoki M.S. Alteração da relação testosterona: cortisol induzida pelo treinamento de força em mulheres. *Rev Bras Med Esp* 2004; **10**(3): 165-168.

Uchiyama, S.; Tsukamoto, H.; Yoshimura, S.; Tamaki, T. Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. *European Journal of Applied Physiology* 2006;**452**:109-116.

Van Wagoner N.J., Benveniste E.N. Interleukin 6 expression and regulation in astrocytes. *J. Neuroimmunol* 1999; **100**:124–139.

Venkatraman J.T., Feng X., Pendergast D. Effects of dietary fat and endurance exercise on plasma cortisol, prostaglandin e interferon-2 and lipid peroxides in runners. *J Am College Nutr.* 2001; **20**(5): 529-36.

Venter, J. C. A part of the human genome sequence. *Science* 2003; 299: 1183-1184.

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 Geno* 2007; **32**: 58–63.

Vincent B., Windelinckx A., Nielens H., Ramaekers M., Van Leemputte M., Hespel P., Thomis M.A. Protective role of alpha-actinin-3 in the response to an acute eccentric exercise bout. *J Appl Physiol* 2010; **109**(2): 564-573.

Wallenius V., Wallenius K., Ahrén B., Rudling M., Carlsten H., Dickson S.L., Ohlsson C., Jansson J.O. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 2002; **8**: 75-79.

Walsh S., Liu D., Metter E.J., Ferrucci L., Roth S.M. ACTN3 genotype is associated with muscle phenotypes in women across the adult age span. *Jour. Appl. Physiol.* 2008; **105**: 1486–1491.

Walsh, B.; Tonkonogi, M.; Malm, C.; Ekblom, B.; Sahlin, K. Effect of eccentric exercise on muscle oxidative metabolism in humans. *Medicine & Science in Sports & Exercise.*2001;**33**;3:436-41.

Wang J., Shaner N., Mittal B., Zhou Q., Chen J., Sanger J.M., Sanger J.W. Dynamics of z-band based proteins in developing skeletal muscle cells. *Cel Moti Cyt* 2005; **61**(1): 34-48.

Wiacek, M.; Andrzejewski, M.; Chmura, J.; Zubrzycki, L.Z. the changes of the specific physiological parameters in response to 12-week Individualized training of young soccer players. *Journal of strength condition and research* 2011;25,6:1514-21.

Willoughby DS, McFarlin B, Bois C. Interleukin-6 expression after repeated bouts of eccentric exercise. *International Journal of Sports Medicine* 2003;24(1):15-21.

Wisloff U., Helgerud J., Hoff J. Strength and endurance of elite soccer players. *Med. Scie. Spor. Exer.* 1998; **30**(3): 462-467.

Wolfarth B., Bray M.S., Hagberg J.M., Perusse L., Rauramaa R., Rivera M.A., Roth S.M., Rankinen T., Bouchard C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2004 update. *Med Sci Sports Exerc* 2005; **37**: 881-903.

Yang N., MacArthur D.G., Gulbin J.P., Hahn A.G., Beggs A.H., Easteal S., North K. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet* 2003; **73**: 627-631.

Zoppi C., Antunes-Neto J., Catanho F.O., Goulart L.F., Motta E., Moura N., Macedo D.V. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev. Paul. Educ. Fís.* 2003; **17**(2): 119-130.

10 APÊNDICES

Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (DE ACORDO COM O ITEM IV DA RESOLUÇÃO 196/96 DO CNS)

PROCEDIMENTOS

Antes de algum dos treinamentos serão coletadas uma amostra sanguínea por punção venosa por um pesquisador, previamente treinado em técnicas de punctura de veias periféricas, escolherá a veia mais proeminente da fossa antecubital dos voluntários para tal. Para cada colheita de sangue, 3 amostras de 10 mL de sangue serão coletadas nos períodos antes do jogo, logo após, duas e quatro horas após o treino.

CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS

Todos os seus dados são confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso a estas informações que serão utilizadas para fins de pesquisa.

BENEFÍCIOS

Obter informações sobre a demanda fisiológica imposta ao seu organismo em decorrência do futebol.

RISCOS

Você poderá apresentar um certo desconforto pelas punções sanguíneas ou Hematomas também podem aparecer no local da colheita de sangue, regredindo no máximo após uma semana, dores musculares, tardias ou não, e sensação de cansaço, em decorrência da prática do futebol que devem desaparecer entre 2 e 5 dias. Riscos gerais que envolvem a prática de atividades físicas devem ser considerados, como lesões músculo-esqueléticas e traumatismo em geral. Entretanto, você realizará uma atividade física em condições conhecidas, com toda assistência necessária se for o caso.

EVENTUAIS DESPESAS MÉDICAS

Não está prevista qualquer forma de remuneração ou pagamento de eventuais despesas médicas para os voluntários. Todas as despesas especificamente relacionadas com o estudo são de responsabilidade do Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFISE) da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da UFMG.

Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. Você também deve compreender que os pesquisadores podem decidir sobre a sua exclusão do estudo por razões científicas, sobre as quais você será devidamente informado.

CONSENTIMENTO

Concordo com tudo o que foi exposto acima e, voluntariamente, aceito participar deste estudo, que será realizado no Laboratório de Fisiologia do Exercício da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais. Os resultados desta pesquisa serão utilizados na elaboração de uma tese de doutorado.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário: _____

Assinatura da testemunha: _____

Declaro que expliquei os objetivos deste estudo para o voluntário, dentro dos limites dos meus conhecimentos científicos.

Eduardo Mendonça Pimenta _____
Doutorando / Pesquisador

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DIRECIONADO AOS PAIS OU RESPONSÁVEIS.

(DE ACORDO COM O ITEM IV DA RESOLUÇÃO 196/96 DO CNS)

O projeto de pesquisa denominado “Análise da demanda fisiológica do futebol e a sua relação com a expressão genética do ACTN3.” tem por objetivo analisar a demanda fisiológica de treinamentos de uma temporada competitiva de futebol tendo em vista a genotipagem dos atletas para o ACTN3.

Antes de algum dos treinamentos de uma competição será coletada do seu filho ou menor pelo qual se responsabiliza uma amostra sanguínea por punção venosa por um pesquisador, previamente treinado em técnicas de punctura de veias periféricas, escolherá a veia mais proeminente da fossa antecubital dos voluntários para tal. Para cada colheita de sangue, 1 amostra de 10 mL de sangue será coletada nos períodos antes do jogo, logo após, duas e quatro horas após o jogo.

Parte dessa amostra sanguínea será utilizada para a determinação da genotipagem, tipo genético, referente ao gene ACTN3, que tem relação com a expressão de determinada proteína muscular dos voluntários.

Todos os dados dos voluntários (seu filho ou menor pelo qual você é responsável) são confidenciais, a identidade dele não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso a estas informações que serão utilizadas para fins de pesquisa.

Este estudo pode como benefício para o voluntário, a obtenção de informações sobre a demanda fisiológica imposta ao seu organismo em decorrência do futebol. Com esses dados o planejamento das cargas de treinamento, aplicação das mesmas e recuperação entre elas poderá ser melhor elaborado. Além disso, no caso de atletas recessivos para o gene ACTN3 poderão ter seu treinamento adequado às suas realidades de relação carga/recuperação, que tendem a serem diferentes dos demais.

Como possíveis riscos referentes aos procedimentos do projeto, o voluntário poderá apresentar um certo desconforto pelas punções sanguíneas ou Hematomas também podem aparecer no local da colheita de sangue, regredindo no máximo após uma semana, dores musculares, tardias ou não, e sensação de cansaço, em decorrência da prática do futebol que devem desaparecer entre 2 e 5 dias. Riscos gerais que envolvem a prática de atividades físicas devem ser considerados, como lesões músculo-esqueléticas e traumatismo em geral, mas que não é parte do estudo e sim parte do seu dia-a-dia como atleta.

Não está prevista qualquer forma de remuneração ou pagamento de eventuais despesas médicas para o voluntário. Todas as despesas especificamente relacionadas com o estudo são de responsabilidade do Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFISE) da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da UFMG.

O voluntário, bem como seus pais e responsável, dispõe de total liberdade para esclarecer questões que possam surgir durante o andamento da pesquisa.

Você, pai ou responsável poderá recusar que o seu filho participe deste estudo caso seja de sua vontade ou mesmo do voluntário, bem como o mesmo poderá abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. Também deve ser compreendido pelas partes que os pesquisadores podem decidir sobre a exclusão dos voluntários do estudo por razões científicas, as quais serão devidamente informadas ao voluntário e aos pais ou responsáveis.

CONSENTIMENTO

Concordo com tudo o que foi exposto acima e, voluntariamente, aceito que meu filho ou menor pelo qual sou responsável participe deste estudo, que será realizado pelo Laboratório de Fisiologia do Exercício da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais. Os resultados desta pesquisa serão utilizados na elaboração de uma tese de doutorado.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20____

Nome do Voluntário: _____

Assinatura do pai ou responsável pelo voluntário:

Grau de parentesco ou relação de responsabilidade que responsável possui sobre o voluntário: _____

Assinatura da testemunha:

Declaro que expliquei os objetivos deste estudo para o voluntário, dentro dos limites dos meus conhecimentos científicos.

Eduardo Mendonça Pimenta
Doutorando / Pesquisador

Prof. Dr. Emerson Silami Garcia

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais e pelo Colegiado de Pós-Graduação em Ciências do Esporte M/D da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. Qualquer consideração ou reclamação entre em contato com o COEP/ UFMG: Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade A(DM)inistrativa II, 2º andar, sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte – MG CEP 31270-901. Tel: 34094592. E-mail: coep@prpq.ufmg.br.