

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional
Programa de Pós Graduação em Ciências do Esporte

Tane Kanope Ferreira Serpa

**VARIAÇÕES GENÉTICAS E SUAS POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM AS
RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS EM JOGADORES DE FUTEBOL**

Belo Horizonte

2022

Tane Kanope Ferreira Serpa

**VARIAÇÕES GENÉTICAS E SUAS POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM AS
RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS EM JOGADORES DE FUTEBOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências do Esporte.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mendonça Pimenta

Belo Horizonte

2022

S486d Serpa, Tane Kanope Ferreira
2022 Variações genéticas e suas possíveis associações com as respostas inflamatórias em jogadores de futebol. [manuscrito] / Tane Kanope Ferreira Serpa – 2022.
124 f.: il.

Orientador: Eduardo Mendonça Pimenta

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional.

Bibliografia: f. 91-99

1. Genética - Teses. 2. Polimorfismo - Teses. 3. Futebol - Teses. 4. Resposta inflamatória – Teses. I. Pimenta, Eduardo Mendonça. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. III. Título.

CDU: 612:796

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Antônio Afonso Pereira Júnior, CRB 6: nº 2637, da Biblioteca da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA, FISIOTERAPIA E TERAPIA OCUPACIONAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO ESPORTE
ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO TANE KANOPE FERREIRA SERPA

Às **08:00 horas** do dia **18 de julho de 2022**, a comissão examinadora de tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte, reuniu-se videoconferência, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “**VARIAÇÕES GENÉTICAS E SUAS POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM AS**

RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS EM JOGADORES DE FUTEBOL”. Abrindo a sessão, o presidente da comissão, Prof. Dr. Eduardo Mendonça Pimenta (UFMG), orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra para o candidato, para apresentação de seu

trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA 96ª TESE DO PPGCE:

Prof. Dr. Eduardo Mendonca Pimenta (orientador) – UFMG Prof. Dr. Samuel Penna Wanner
- UFMG

Prof. Dr. Mauro Heleno Chagas – UFMG

Profa. Dr. Christiano Eduardo Veneroso – UFMA Profa. Dr. Cabeb Guedes Miranda dos Santos – IBEX

Após as indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado foi comunicado publicamente para o candidato pelo presidente da comissão examinadora. Nada mais havendo, a tratar o presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora.

Belo Horizonte, 09 de agosto de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **caleb guedes miranda dos santos, Usuário Externo**, em 09/08/2022, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Christiano Eduardo Veneroso, Usuário Externo**, em 10/08/2022, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Heleno Chagas, Professor do Magistério Superior**, em 12/08/2022, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Mendonca Pimenta, Professor(a)**, em 08/03/2024, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Samuel Penna Wanner, Professor do Magistério Superior**, em 12/03/2024, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1667182** e o código CRC **6636065C**.

Dedico este trabalho a Deus, ao meu pai que é minha maior inspiração na busca por evolução no âmbito acadêmico e a minha família que me deu todo o apoio e suporte para concretizá-lo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e determinação para seguir sempre em frente. Obrigado por ser a minha força, minha rocha e o meu refúgio em todos os momentos. Senhor, que tudo o que eu tenho, tudo o que eu sou e que tudo o que eu vier a ser, seja um reflexo do Teu agir em minha vida.

A minha avó Nice, que partiu muito cedo, mas deixou uma saudade intensa no meu coração. Obrigado por todo o carinho, ternura e por todos os ensinamentos. Meu amor por você vai além desse mundo.

Aos meus pais, Nilo, Sandra e a minha segunda mãe, Silvia pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Sem vocês, nada seria possível. Amo vocês, demasiadamente.

Às minhas irmãs Sati, Rani e Amanda que mesmo com a distância, sempre se fazem presentes na minha vida. Carrego vocês no meu coração por onde eu for. Obrigado pelo companheirismo, apoio e amor incondicional. Amo vocês com todo meu coração.

À irmã que a vida me deu Cláudia, por toda amizade e por segurar minha “onda” nos momentos mais difíceis que passei até aqui.

Ao Prof. Dr. Eduardo Mendonça Pimenta, por tantos ensinamentos e oportunidades proporcionadas. Sempre foi um grande exemplo e inspiração para mim, e hoje, agradeço por sempre ter me incentivado, pela amizade e companheirismo e pelos “puxões de orelha” também. Muito obrigado por tudo!

Ao Prof. Dr. Caleb Guedes, pelo exemplo de pessoa, professor e pesquisador, pelas contribuições acadêmicas fundamentais para a minha formação e pela incrível capacidade de ensinar com clareza e educação. Além de todas as contribuições feitas desde o início desse projeto.

Ao Prof. Dr. Cristiano Veneroso, pelo auxílio e suporte ao longo de todo o período desse doutorado.

Aos professores Dr. Maicon Albuquerque e Dr. Mauro Heleno por toda compreensão às situações adversas ao longo do curso, por serem exemplos de professores e por todas as contribuições na qualificação. Obrigado!

Aos atletas e diretorias dos clubes participantes que com muita dedicação colaboraram com o estudo.

Muito obrigado.

“Os que se encantam com a prática sem ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca direcionam o destino”

Leonardo da Vinci

RESUMO

O futebol é um esporte caracterizado por ações intermitentes de alta intensidade, as quais demandam grande geração de força excêntrica, que por sua vez resultam em aumento e da resposta inflamatória após treinamentos e jogos. Fatores genéticos têm demonstrado grande influência não só sobre componentes do desempenho atlético, mas também na ativação e resolução da inflamação, na regeneração do tecido muscular e outros fenótipos. Dessa forma o objetivo do presente estudo, foi investigar, a associação de fatores genéticos com fenótipos relacionados à inflamação em atletas de futebol após uma sessão de treinamento com predominância de ações excêntricas. A amostra foi composta por 47 atletas de futebol do sexo masculino da categoria sub-20 que fazem parte de clubes da primeira divisão do futebol brasileiro. Foram coletadas amostras de sangue nos momentos Pré, 3, 24 e 48 horas após a sessão de treinamento para avaliar as respostas inflamatórias (análises hematológicas (hemograma), creatinofosfoquinase (CK), proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade (PCR), fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina 6 (IL-6) e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1)). No estudo 1, observou-se que indivíduos com o genótipo XX para o polimorfismo (SNP) da *ACTN3* rs1815739, apresentam maiores respostas inflamatórias (Neutrófilos, Monócitos e TNF α ($p < 0,01$)), possível sinalização tardia de IL-6 e menores concentrações de IGF-1 em comparação com atletas que carregam o alelo R ($p < 0,01$). Os resultados do estudo 2, sugerem que a abordagem de distância genética baseada em 10 polimorfismos (SNPs) e Fst relacionados ao desempenho, em comparação com 1000genomes, foram replicáveis em populações similares, mas independentes, de jogadores de futebol. Em um contexto mais amplo do ponto de vista da genética, no estudo 3, foi verificada a associação de diversos polimorfismos (analisados individualmente e em conjunto) e as respostas inflamatórias dos atletas. Dos 28 SNPs analisados, 9 (*ACTN3* rs1815739, *COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795, *MMP3* rs679620, *SLC30A8* rs13266634, *SOX15* rs4227) foram individualmente associados com biomarcadores e 7 SNPs (*COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *COL5A1* rs1800012, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795 and *MMP3* rs679620) analisados de maneira combinada, explicaram de 16% a 40% da variação das respostas inflamatórias em atletas de futebol. A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que o perfil genotípico pode ser levado em consideração para uma distribuição da carga de treinamento mais individualizada assim como na elaboração de estratégias de recuperação para atletas de alto nível entre sessões de treinamento e jogos de alta demanda física e fisiológica.

Palavras-Chave: Genética. Polimorfismo. ACTN3. Futebol. Resposta Inflamatória.

ABSTRACT

Football is a sport characterized by high-intensity intermittent actions, which demand great eccentric force generation, which in turn, result in increased inflammatory response after training and matches. Genetic factors have been shown to have a great influence not only on components of athletic performance, but also on activation and resolution of inflammation, muscle tissue regeneration, and other phenotypes. Thus, the objective of the present study was to investigate the association of genetic factors with inflammation-related phenotypes in football players after a training session with a predominance of eccentric actions. The sample was composed of 47 male football athletes from the under-20 category who belong to clubs from the first division of Brazilian football. Blood samples were collected in the moments Pre, 3, 24 and 48 hours after the training session to evaluate inflammatory responses (hematological analyses (hemogram), creatine phosphokinase (CK), high sensitivity quantitative C-reactive protein (CRP), tumor necrosis factor (TNF α), interleukin 6 (IL-6) and insulin-like growth factor type 1 (IGF-1)). In study 1, it was observed that individuals with the XX genotype for the *ACTN3* rs1815739 polymorphism (SNP), exhibit greater inflammatory responses (Neutrophils, Monocytes and TNF α ($p < 0.01$)), possible delayed IL-6 signaling, and lower IGF-1 concentrations compared to athletes carrying the R allele ($p < 0.01$). The results of study 2, suggest that the genetic distance approach based on 10 polymorphisms (SNPs) and performance related *Fst* compared to 1000genomes were replicable in similar but independent populations of football players. In a broader context from a genetic point of view, in study 3, the association of several polymorphisms (analyzed individually and together) and the inflammatory responses of athletes was verified. Of the 28 SNPs analyzed, 9 (*ACTN3* rs1815739, *COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795, *MMP3* rs679620, *SLC30A8* rs13266634, *SOX15* rs4227) were individually associated with biomarkers and 7 SNPs (*COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *COL5A1* rs1800012, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795 and *MMP3* rs679620) analyzed in combination explained between 16% and 40% of the variation in inflammatory responses in football players. From the results presented, it can be concluded that the genotype profile can be considered for a more individualized training load distribution as well as in the elaboration of recovery strategies for high level athletes between training sessions and games of high physical and physiological demand.

Keywords: Genetics. Polymorphism. ACTN3. Football. Inflammatory Response.

LISTA DE FIGURAS ESTUDO 1

| | |
|---|----|
| Figura 1- Desenho Experimental..... | 33 |
| Figura 2- Discriminação alélica no software StepOnePlus™ Software v2.3..... | 36 |
| Figura 3- Concentração de Neutrófilos, Linfócitos, contagem de glóbulos brancos (CGB), Monócitos antes, 3, 24 e 48 horas após a sessão de treinamento. | 38 |
| Figura 4- Concentrações de CK antes, 3, 24 e 48 horas após o treinamento. | 39 |
| Figura 5- Concentrações de PCR antes, 3, 24 e 48 horas após a sessão de treinamento..... | 39 |
| Figura 6- Concentrações de TNF α antes, 3, 24 e 48 após a sessão de treinamento. | 40 |
| Figura 7- Concentrações de IL-6 antes, 3, 24 e 48 horas após a sessão de treinamento. | 41 |
| Figura 8- Concentrações de IGF-1 antes, 3, 24 e 48 horas após a sessão de treinamento. | 41 |

LISTA DE TABELAS ESTUDO 1

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Característica da Amostra | 32 |
| Tabela 2 - Demanda Física e Condições Ambientais da Sessão de Treinamento. | 34 |
| Tabela 3 - Associações Entre Biomarcadores e os Genótipos para o SNP ACTN3 rs1815739..... | 42 |

LISTA DE FIGURAS ESTUDO 2

Figure 1 -A: Principal component analysis regarding the distance matrix of molecular variance (F_{st}) values of continental populations from 1000 Genomes in comparison with U20_BFDSC and BFDSC. B: Phylogenetic tree (UPGMA model) regarding the distribution of genetic distance from genotypes of the SNPs selected from U20_BFDSC, BFDSC and continental populations from 1000 Genomes. U20 indicates under 20 years; BFDSC indicates Brazilian first division soccer club; SNPs, single nucleotide polymorphisms. 57

LISTA DE TABELAS ESTUDO 2

Table 1 - Fst Values for Comparisons Among Groups of Populations From 1000 Genomes Database and U20_BFDSC 57

LISTA DE FIGURAS ESTUDO 3

| | |
|--|-----------|
| Fig. 1- Desenho Experimental..... | 64 |
|--|-----------|

LISTA DE TABELAS ESTUDO 3

| | |
|---|----|
| Tabela. 1 - Características da Amostra. | 63 |
| Tabela. 2 - Demanda Física e Condições Ambientais da Sessão de Treinamento. | 65 |
| Tabela. 3 - SNP pré-selecionados e Equilíbrio de Hardy-Weinberg. | 68 |
| Tabela. 4 – SNPs individualmente associados com biomarcadores. | 69 |
| Tabela. 5 – Análise combinada dos SNPs e biomarcadores. | 70 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- A** – Adenina
- ACTN2** - Alfa actina 3
- ACTN3** – Alfa actina 3
- BFDS** - *Brazilian first division soccer club*
- C** – Citosina
- CGB** – Contagem de glóbulos brancos
- CK** - Creatina quinase
- COL** - Colágeno
- DNA** – ácido desoxirribonucleico
- FC** – Frequência cardíaca
- G** – Guanina
- gDNA** – DNA genômico
- GLUT-4** – Transportador de glicose tipo 4
- HGF** - O fator de crescimento dos hepatócitos
- HWE** – Equilíbrio de Hard-Weinberg
- IGF-1** - Fator de crescimento semelhante à insulina 1
- IL-6** - Interleucina 6
- MGF** – Fator de crescimento muscular
- MMP** - Metaloproteinases matriciais
- mRNA** – RNA mensageiro
- PCR** – Proteína C Reativa
- PI3K** - fosfatidilinositol3-cinase
- RNA** – ácido ribonucleico
- rTNF-II** – Receptor específico de fator de necrose tumoral
- SNP** – Polimorfismo
- SNPs** – Polimorfismos
- ST** – Sessão de treinamento
- T** – Timina
- TNF α** - fator de necrose tumoral alfa
- U** – Uracila
- VO₂max** – Consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

| | | |
|-----|--|-----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 1.1 | Sistema Imune & a Prática Esportiva..... | 21 |
| 1.2 | Genética..... | 24 |
| 1.3 | Justificativa..... | 26 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 27 |
| 2.3 | Objetivo geral..... | 27 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 27 |
| 2.3 | Organização do Estudo..... | 28 |
| | Estudo 1 - O genótipo ACTN3 e a sua influência nas respostas inflamatórias em jogadores de futebol..... | 29 |
| | Resumo | 29 |
| | Introdução | 30 |
| | Métodos | 31 |
| | Resultados | 37 |
| | Discussão | 42 |
| | Conclusão | 48 |
| | Aplicações Práticas | 49 |
| | Agradecimentos | 49 |
| | Referências | 49 |
| | Estudo 2 - LETTER TO THE EDITOR: Replicating results using Population-Genetics Approach Based on the 1000 Genomes Database and another Elite Soccer Players..... | 56 |
| | References..... | 57 |
| | Estudo 3 - Perfil poligênico e a magnitude das respostas inflamatórias em jogadores de futebol..... | 59 |
| | Introdução | 60 |
| | Métodos | 62 |
| | Resultados | 68 |
| | Discussão | 70 |
| | Conclusão | 82 |
| | Referências | 83 |
| 3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 93 |
| | REFERÊNCIAS..... | 95 |
| | ANEXOS..... | 104 |
| | Anexo I – Parecer de aprovação do COEP / UFMG..... | 104 |
| | Anexo II – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)..... | 108 |

| | |
|--|-----|
| Anexo III – Protocolo da sessão de treinamento | 112 |
| Anexo IV – Protocolo de extração swab genoma completo..... | 113 |
| Anexo V – Protocolo de sequenciamento do genoma completo (WGS) | 116 |
| Anexo VI – Publicação Estudo 2..... | 132 |

1 INTRODUÇÃO

Durante uma partida oficial de futebol de elite, cada jogador realiza de 1000 a 1400 ações (principalmente ações de curta duração), variando a cada 4-6 segundos (Bangsbo *et al.*, 1991). A distância média percorrida entre os atletas varia entre 10 e 12 km (Bangsbo *et al.*, 1991; Castagna *et al.*, 2017), sendo que de 1 a 11% desta distância é percorrida em sprints (MOHR *et al.*, 2003). Drust *et al.* (2000) encontraram um valor médio de 19 sprints durante uma partida que ocorriam a cada 4-5 minutos, enquanto Strudwick *et al.* (2002) observaram a ocorrência de uma ação em alta intensidade a cada 60 segundos e um esforço máximo a cada 4 minutos. Em um estudo analisando ações intensas de curta duração, Castagna *et al.* (2017) verificaram que jogadores de futebol profissional percorrem em média 635m acelerando e 611m desacelerando em intensidade elevada ($>2\text{m/s}^2$) e 214m acelerando e 209m desacelerando em intensidade muito elevada ($>3\text{m/s}^2$). Dessa forma, nota-se que a prática do futebol envolve a realização de ações de intensidade elevada, as quais demandam grande geração de força excêntrica, que por sua vez está relacionada com alterações morfofuncionais do aparato muscular (Nosaka *et al.*, 2005), resultando em aumento do dano muscular e da resposta inflamatória após treinamentos e jogos.

Segundo Tidus (2008), o dano muscular é definido como mudanças estruturais no músculo que desencadeiam a perda da função muscular causada pelo rompimento das estruturas envolvidas na produção ou transmissão de força. Clarkson e Hubal (2002) sugerem que danos à fibra muscular após exercício são geralmente atribuídos à desorganização na estrutura das fibras musculares e caracterizam-se pela ruptura, alargamento ou prolongamento da linha Z que é definida como o ponto de contato das proteínas contráteis e o suporte para transmissão de força quando as miofibrilas são encurtadas. O dano muscular também parece ocorrer em outros componentes celulares, como o sarcolema e os túbulos T (Clarkson; Hubal, 2002).

A contração muscular excêntrica gera maior magnitude do dano muscular (Tricoli, 2001). Quando um músculo é alongado, existe a resistência oferecida pelos elementos elásticos os quais constituem a estrutura do músculo esquelético. Esta resistência gera uma tensão passiva, a qual aumenta na medida em que o músculo é alongado. O aumento da tensão às fibras ativas somado ao aumento da tensão passiva do tecido conectivo além de gerar maior produção de força é responsável por maior ocorrência de dano muscular em ações excêntricas

em comparação com as concêntricas e isométricas (Foschini *et al.*, 2007) e talvez por isso, a contração muscular excêntrica seja um dos métodos mais utilizados nos estudos que investigam as respostas fisiológicas decorrentes do dano muscular (Chen *et al.*, 2010).

A resposta inicial após o dano muscular é chamada de fase aguda da inflamação. Os primeiros a chegar ao local lesionado são os neutrófilos que sinalizam uma resposta pró-inflamatória para atrair monócitos. Seguindo de perto os neutrófilos, os macrófagos também participam da fase pró-inflamatória, eles limpam os detritos circulantes por meio de eferocitose. Durante essa fase do processo inflamatório, também predominam fenômenos como a migração de leucócitos, produção de radicais livres e a elevação das concentrações séricas de biomarcadores inflamatórios e de dano muscular como a creatina quinase (CK), proteínas de fase aguda e diversas citocinas que são as principais responsáveis pela coordenação, amplificação e regulação da magnitude e duração dos eventos inflamatórios (Ispirlidis *et al.*, 2008; Da Silva & Macedo, 2011). Dessa forma, tem sido sugerido que as concentrações sanguíneas de biomarcadores associados ao processo inflamatório, podem ser utilizadas para mensurar a magnitude das respostas do organismo ao dano muscular após a prática esportiva (Da Silva & Macedo, 2011; Ispirlidis *et al.*, 2008; Cruzat *et al.*, 2007).

Como já bem documentado na literatura, acredita-se que citocinas pró-inflamatórias interfiram na diferenciação de células satélites, acelerando a degradação da proteína muscular, inibindo a síntese de proteínas musculares, levando a redução de massa muscular e da força (Baumert, *et al.*, 2016), podendo resultar em um reparo tecidual mais lento e redução nas adaptações musculoesqueléticas decorrentes do exercício (Peake, *et al.*, 2010). O reparo da musculatura esquelética é um processo complexo mediado por células satélites no qual diversos fatores são ativados para a regulação do remodelamento muscular (Kurosaka & Machida, 2012). As células satélites são as células tronco mononucleadas do músculo e estão localizadas na superfície externa da fibra muscular, entre a lâmina basal e o sarcolema. Normalmente essas células ficam em repouso e são ativadas após o dano tecidual (Grobler *et al.*, 2004).

No que tange ao processo de reparo tecidual, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os macrófagos exercem papel importante no reparo do tecido lesionado, e isso ocorre provavelmente, pela secreção de moléculas pró-regenerativas (Da Silva & Macedo, 2011). Dentre essas, destacam-se alguns hormônios como o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). Os efeitos anabólicos do IGF-1 envolvem tanto a atuação como um fator de iniciação e progressão do ciclo celular quanto a ativação, proliferação e diferenciação de

células satélite (Matheny et al., 2010). A influência do IGF-1 em mediar alguns aspectos benéficos do exercício particularmente em relação à recuperação pós exercício e mecanismos de remodelamento do tecido muscular esquelético, tem sido uma área de estudo de grande interesse (Nindl & Pierce, 2010; Stewart & Pell, 2009).

Publicações recentes têm mostrado que fatores genéticos têm uma grande influência não só sobre componentes do desempenho atlético, mas também na ativação e resolução da inflamação, na regeneração do tecido muscular e outros fenótipos (Ahmetov & Fedotovska, 2015; Baumert *et al.*, 2016; Larruskain *et al.*, 2018). Dessa forma, a identificação de genes que possam influenciar nos níveis de moléculas envolvidas na cascata inflamatória, pode auxiliar a elucidar os fatores e mecanismos relacionados ao processo inflamatório (Natiza *et al.*, 2012). Alguns estudos têm encontrado associações entre polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) dos genes de proteínas da cascata inflamatória com diversas doenças (Lee *et al.*, 2016; Todendi *et al.*, 2016), no entanto, muito pouco se sabe sobre a potencial associação genética com a resposta inflamatória decorrente da prática esportiva (Baumert *et al.*, 2019; Pickering *et al.*, 2019; Seto *et al.*, 2021).

1.1 Sistema Imune & a Prática Esportiva

A função fisiológica do sistema imune é a defesa contra microrganismos (agentes infecciosos). Entretanto, mesmo substâncias não infecciosas podem estimular respostas imunes. Muitos estressores físicos, como cirurgias, traumas, queimaduras e o exercício físico, induzem um padrão de respostas imunológicas semelhantes. O sistema imune pode ser dividido em duas partes: a imunidade inata (natural ou nativa) e a imunidade adaptativa (adquirida ou específica), que trabalham em conjunto de maneira sinérgica (Abbas *et al.*, 2012; Gleeson *et al.*, 2013).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra agentes estressores e está envolvida nos danos, na reparação e remodelação tecidual. A resposta imune relacionada à imunidade inata, baseia-se em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que estão agindo mesmo antes da ocorrência do estímulo estressor e é programada para respondê-lo de maneira rápida (Abbas *et al.*, 2012). Os principais componentes da imunidade inata são as barreiras físicas e químicas, como o epitélio e agentes antimicrobianos produzidos nas superfícies epiteliais, células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, células dendríticas, células assassinas naturais, conhecidas como células NK (do inglês *Natural Killer*), células

linfóides, além de várias proteínas plasmáticas, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação (Abbas *et al.*, 2012; Gleeson *et al.*, 2013).

Quando ocorre uma falha do sistema inato, a inflamação resultante ativa o sistema imune adaptativo, que responde com um processo de proliferação de células que atacam diretamente o invasor ou produzem proteínas defensivas específicas conhecidas como anticorpos ou imunoglobulinas. Essas proteínas, por sua vez, ajudam a combater o agente estressor de várias formas, como a fagocitose, exposição e neutralização do agente agressor (Gleeson *et al.*, 2013). O sistema imune adaptativo tem a capacidade de reconhecer e reagir a um elevado número de substâncias microbianas e não microbianas. Dentre as características que definem a imunidade adaptativa, destaca-se a habilidade de identificar diferentes substâncias, por isso é também chamada de imunidade específica (Abbas *et al.*, 2012). Outra característica importante na definição da imunidade adaptativa é a habilidade de responder de maneira mais vigorosa a exposições repetidas ao mesmo agente infeccioso, essa habilidade é também conhecida como memória. Os principais componentes da imunidade adaptativa são os linfócitos e seus produtos secretados (anticorpos) (Abbas *et al.*, 2012; Gleeson *et al.*, 2013).

Durante o exercício extenuante, ou seja, o exercício com alta demanda física e metabólica, elevam-se os níveis de hormônios relacionados ao estresse (por exemplo, cortisol e catecolaminas), o que causa depressão temporária de vários aspectos relacionados a função imunológica (por exemplo, estresse oxidativo em neutrófilos e proliferação de linfócitos). Esse efeito pode durar cerca de 3 - 24 horas após o exercício, dependendo da intensidade e duração da sessão de exercícios (Gleeson & Bishop, 1999). Por muito tempo, acreditou-se que a inflamação representava um quadro deletério e prejudicial pelo seu componente catabólico, pela exacerbação inicial do dano muscular ou ainda pela imunossupressão transitória observada após os processos de leucocitose (Tidball, 2011; Turner & Badylak, 2012). Todavia, quando relacionada à prática esportiva regular e sistematizada, a inflamação é considerada um processo necessário com muitos benefícios, uma vez que em conjunto com a ação de hormônios e outras proteínas sinalizadoras é responsável pela regeneração e reparo das estruturas danificadas (Da Silva & Macedo, 2011).

Atletas de futebol de elite após jogos e sessões de treinamento podem sofrer microlesões musculares, as quais geram ruptura das barreiras do sistema imune inato e podem desencadear uma resposta inflamatória como mecanismo de defesa durante as primeiras fases do processo de reparo tecidual (Proske & Allen, 2005; Da Silva & Macedo, 2011; Cheng *et*

al., 2020). Esse processo pode ser dividido em cinco fases: 1) degeneração; 2) inflamação; 3) regeneração; 4) maturação e 5) recuperação funcional (Forcina *et al.*, 2020).

A fase de degeneração é marcada pela necrose miofibrilar e pela expressão de marcadores associados aos padrões moleculares de dano muscular (por exemplo, extravasamento de CK, influxo de cálcio e outras alterações relacionadas as alterações na maquinaria celular) (Forcina *et al.*, 2019; Forcina *et al.*, 2020). Enquanto a fase de inflamação tem como principais características a leucocitose (elevação da expressão e mobilização de neutrófilos e macrófagos, principalmente) e ativação de citocinas pró-inflamatórias (como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α)) (Da Silva & Macedo, 2011; Forcina *et al.*, 2020).

As três fases seguintes, possuem características mais anabólicas. A fase de regeneração é marcada pelo aumento na atividade de células miogênicas, seguida da fase de maturação que é caracterizada pela remodelagem do tecido identificada pelo aumento das fibras musculares, dos vasos sanguíneos e reconstrução da matriz extracelular (Forcina *et al.*, 2019; Forcina *et al.*, 2020). No final desse processo, durante a fase de recuperação funcional, observa-se a reconstituição de conexões neurais e a recuperação de parâmetros de desempenho, como níveis de produção de força (Forcina *et al.*, 2020).

O IGF-1 parece estar relacionado com o reparo tecidual, por seu papel em modular processos como ativação, diferenciação e proliferação de células satélites (Adams, 2002; Forcina *et al.*, 2020). As células satélites são as células tronco mononucleadas do músculo e estão localizadas na superfície externa da fibra muscular, entre a lâmina basal e o sarcolema. Normalmente essas células ficam em repouso e são ativadas após o dano tecidual (Grobler *et al.*, 2004). Estudos realizados a nível celular envolvendo a análise de células satélites, observaram que a ligação de IGF-1 com seu receptor pode iniciar cascatas de sinalização intracelular para respostas mitogênicas e miogênicas (Adams, 2002; Gerlinger-Romero *et al.*, 2013). É possível que citocinas pró-inflamatórias interfiram na diferenciação de células satélites, acelerando a degradação da proteína muscular, inibindo a síntese de proteínas musculares, levando a redução de massa muscular e da força (Baumert *et al.*, 2016). Isso poderia resultar em um reparo tecidual mais lento e redução nas adaptações músculo esqueléticas decorrentes do exercício (Peake, *et al.* 2010).

Juntamente com a resposta local, descrita acima, ocorre uma resposta inflamatória sistêmica, chamada de fase aguda da inflamação (Da Silva & Macedo, 2011). O objetivo da

resposta de fase aguda é ajustar a homeostase para o reparo tecidual. Uma das respostas mais importantes e estudadas da fase aguda envolve o aumento na síntese hepática, com consequente aumento na corrente sanguínea, das chamadas proteínas de fase aguda, das quais, destaca-se a proteína C-reativa (PCR). No cenário esportivo, mais especificamente no cenário do futebol de elite, a PCR tem sido utilizada como forma de compreender e avaliar a magnitude da fase inflamatória que ocorre após a degeneração muscular causada pelo estresse fisiológico imposto em treinos e partidas (Ispirlidis *et al.*, 2008; Ascensão *et al.*, 2011; Bezerra *et al.*, 2016).

1.2 Genética

A identificação da estrutura do ácido desoxirribonucléico (DNA), por James Watson e Francis Crick ocorreu em 1953 e o rápido avanço das técnicas de biologia molecular tornaram possível a identificação de sequências variantes no DNA de genes específicos, relacionando a heterogeneidade gênica a diferentes fenótipos (Waston & Circk 1953; Wolfarth *et al.*, 2005). O DNA é definido como uma molécula extensa composta por diversos nucleotídeos, formados por um fosfato, uma pentose e uma base nitrogenada. As bases nitrogenadas podem ser de dois tipos: 1) purina (adenina (A) e guanina (G)) ou 2) pirimidina (citosina (C) e timina (T)). Os nucleotídeos de uma fita formam pares com os nucleotídeos de outra fita, esses pares são formados através das ligações entre as bases nitrogenadas (Adenina forma par com a Timina e a Guanina forma par com Citosina), e são denominados pares de bases (Cox *et al.*, 2012). O DNA humano possui aproximadamente 3,2 bilhões de pares de bases divididos em cerca de 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 possui aproximadamente 10 milhões de polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*) (Rankinem *et al.*, 2010). O polimorfismo é descrito como alterações ou mutações na sequência de DNA que modificam a função ou a expressão de uma proteína, ocorrendo na população com frequência igual ou superior a 1% e podem auxiliar na evolução e até mesmo no desempenho físico dos indivíduos. Entretanto, 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 primeiras evidências das influências do perfil genético sobre fenótipos relacionados à capacidade física foram derivadas de estudos realizados com gêmeos, entre os anos 70 e 90 (Bouchard *et al.*, 1986). Além disso, muitas publicações baseadas nos resultados de estudos com gêmeos e familiares (*Heritage*), realizados na década de 90, reforçaram a constatação de que uma fração significativa de variação em certas características de desempenho esportivo depende do perfil genético (Bouchard & Malina, 2014). A proporção herdada que explica a variação no desempenho como capacidade de produção de força, VO₂máx e outras características fisiológicas foram estimados em aproximadamente 50% (Ehlert *et al.*, 2013), podendo chegar até 70% dependendo da modalidade esportiva (Ahmetov & Fedotovska, 2015).

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 220 genes que estão associados com fenótipos de desempenho físico humano (Ahmetov *et al.*, 2022). 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 relacionados a performance física e adaptações musculoesqueléticas. Devido à ampla utilização da genotipagem, um elevado número de estudos avaliando variantes gênicas candidatas foram publicados, relatando em grande parte, associações com o status de atleta de elite. Dessa forma, atualmente se tem indicativos que uma parte importante das variações de fenótipos relacionados à performance podem ser explicadas, em parte, por fatores genéticos (Baumert *et al.*, 2019; Ahmetov *et al.*, 2022).

SNPs de genes que codificam proteínas específicas na unidade músculo-tendão (como o SNP *ACTN3* R577X), exercem influência na capacidade de recuperação após exercícios extenuantes, influenciando assim o risco de lesão (Baumert *et al.*, 2016; Seto *et al.*, 2021). Isto pode ser particularmente relevante em grupos de atletas de elite, que são conhecidos por terem perfis genéticos diferentes em comparação com a população em geral (Yang *et al.*, 2003). Portanto, 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 relacionados a performance física como capacidade de geração de

força, velocidade, potência e consumo de oxigênio, é reconhecido que fatores genéticos podem interferir nas respostas inflamatórias decorrentes da prática esportiva (Brutsaert & Parra, 2006; Ahmetov *et al.*, 2015; Baumert *et al.*, 2016; Baumert *et al.*, 2019).

Diferenças na atividade gênica específica de alguns SNPs, resultam em diferentes expressões de diversas proteínas envolvidas na cascata inflamatória, o que pode influenciar a suscetibilidade ao dano muscular induzido pelo exercício (Seto *et al.*, 2011; Baumert *et al.*, 2016). Indivíduos que apresentam alta resposta inflamatória induzida pelo exercício podem ter uma maior predisposição a lesões (Kibler *et al.*, 1992; Clansey *et al.*, 2012). Este princípio pode explicar em parte, a razão pela qual atletas pertencentes a um elenco apesar de possuírem rotinas de treinamento semelhantes, respondem com alto índice de lesões musculares induzidas pelo exercício. Entretanto, como a grande maioria dos estudos que investigam as associações do perfil genético com fenótipos relacionados à prática esportiva, visam o desempenho físico, muito pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na associação genética com as respostas inflamatórias após a prática esportiva (Baumert *et al.*, 2019; Ahmetov *et al.*, 2022).

Os resultados documentados na literatura ainda são controversos e inconclusivos em relação às associações de SNPs com fenótipos relacionados ao processo inflamatório, especialmente ao considerarmos a população de atletas de alto rendimento (Dennis *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009; Karimi *et al.*, 2009; Yamin *et al.*, 2009; Cauci *et al.*, 2010; Deuster *et al.*, 2013). Possivelmente, essas divergências ocorrem por diferenças nos protocolos de exercício, além das diferenças culturais e étnicas das amostras dos estudos, juntamente com interações entre fatores genéticos e ambientais. É importante destacar que grande parte dos estudos atuais, têm demonstrado que a avaliação isolada de um SNP, sem considerar sua interação com genótipos de outros mediadores, pode conduzir a interpretações equivocadas, uma vez que a ação combinada de variações genéticas pode resultar em efeitos diferenciados (Baumert *et al.*, 2016; Larruskain *et al.*, 2018; Baumert *et al.*, 2019; Seto *et al.*, 2021). Portanto, os estudos de associações de fatores genéticos com respostas inflamatórias, devem buscar também, avaliações mais amplas no contexto genômico, possibilitando assim, melhores interpretações a respeito dessas associações.

1.3 Justificativa

Fatores genéticos têm recebido destaque por sua suposta influência no metabolismo, na modulação do processo inflamatório e no remodelamento muscular resultando em distintos

níveis de força, potência, resistência aeróbica e fadiga (Baumert *et al.*, 2016; Larruskain *et al.*, 2018). É importante ressaltar que múltiplos fatores ambientais, fisiológicos e psicológicos influenciam na formação do atleta (Kambouris *et al.*, 2014). Porém, entre os esportistas do mais alto nível competitivo (pertencentes as mesmas modalidades), onde o meio que estão inseridos é muito semelhante, pode ser que o perfil genômico característico da variação interindividual seja um fator de diferenciação entre as repostas inflamatórias dos atletas. Além disso, embora a genitipagem nunca seja prognóstica ou preditiva, ela pode ser uma peça importante do modelo de lesão multifatorial, ou seja, a informação genética pode ser utilizada em conjunto com todos os demais fatores de risco para identificar aqueles atletas com alto risco de lesão e individualizar estratégias preventivas, incluindo o controle de carga (Collins *et al.*, 2015; Bahr, 2016). Dessa forma, o estudo e o entendimento da influência de fatores genéticos sobre as respostas inflamatórias de atletas de futebol podem auxiliar na prescrição de carga para eles, maximizando o processo de recuperação, reduzindo assim o risco de lesões.

2 OBJETIVOS

2.3 Objetivo geral

Identificar possíveis associações do perfil genético com a magnitude das respostas inflamatórias após um treinamento com predominância de ações excêntricas em atletas de futebol brasileiros.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as respostas inflamatórias resultantes de um treinamento com predominância de ações excêntricas e sua relação com a expressão do gene *ACTN3* em atletas de futebol.
- Verificar se há diferenças significativas através de variância molecular entre a população estudada e outra coorte de atletas de futebol.
- Verificar a capacidade de replicação de resultados envolvendo SNPs em população semelhante a já publicadas anteriormente.
- Investigar individualmente e de maneira combinada, a associação de polimorfismos previamente associados com a imunologia e fisiologia do exercício com fenótipos imunológicos, bioquímicos e hematológicos em jogadores de futebol.

2.3 Organização do Estudo

Esse trabalho consistiu no desenvolvimento de estudos que serão apresentadas em formatos de artigos, com introdução, método, resultados e discussão na seguinte

ordem:

Estudo 1. O genótipo ACTN3 e a sua influência nas respostas inflamatórias em jogadores de futebol.

*Artigo será submetido no periódico Journal of Strength and Conditioning Research (Qualis A1)

Estudo 2. Replicando resultados usando a abordagem *Population-Genetics* baseada no banco de dados *1000 Genomes* e em outro grupo de jogadores de futebol de elite.

“Replicating results using Population-Genetics Approach Based on the 1000 Genomes Database and another Elite Soccer Players.”

* Carta ao editor foi publicada na revista Genes (Qualis A1)

Estudo 3. Perfil poligênico e a magnitude das respostas inflamatórias em jogadores de futebol. *Artigo será submetido no periódico Biology os Sport (Qualis A2)

Estudo 1 - O genótipo ACTN3 e a sua influência nas respostas inflamatórias em jogadores de futebol.

*Artigo será submetido no periódico Journal of Strength and Conditioning Research (Qualis A1)

<https://journals.lww.com/nsca-jscr/pages/default.aspx>

Resumo

O objetivo deste estudo foi identificar a resposta inflamatória após uma sessão de treinamento específico para futebolistas e sua relação com a expressão gênica da alfa-actina-3 (*ACTN3*), considerando que indivíduos que carregam o alelo R produzem alfa-actina-3 que fornece maior força e potência muscular. A amostra foi composta por 47 atletas de futebol do sexo masculino da categoria sub-20 que foram divididos em dois grupos RR/RX (N=39) e XX (N=8). Foram coletadas amostras de sangue nos momentos Pré, 3, 24 e 48 horas após uma sessão de treinamento com predominância de ações excêntricas para obtenção do DNA e avaliar as respostas inflamatórias (hemograma, CK, PCR, TNF α , IL-6 e do IGF-1). Neutrófilos e monócitos aumentaram significativamente 3 horas após o treinamento em ambos os grupos e foi maior no grupo XX em comparação com o grupo RR/RX (p=0,01). As concentrações de TNF α aumentaram significativamente 3 horas após o treinamento em ambos os grupos e foi maior no grupo XX em comparação com o grupo RR/RX (p=0,01). A IL-6 foi significativamente maior 3 horas após o treinamento somente no grupo RR/RX (p<0,01). As concentrações de IGF-1 no grupo RR/RX foram maiores em relação ao grupo XX nos momentos 24 e 48 horas após o treinamento. Os resultados sugerem que indivíduos XX podem apresentar maior atividade fagocitária indicando um possível prolongamento da fase aguda inflamatória. Concluimos que o perfil genotípico para o SNP *ACTN3* R577X, pode ser levado em conta na distribuição da carga de treinamento e na elaboração de estratégias de recuperação dos atletas.

Palavras-chave: Polimorfismo, *ACTN3*, Futebol, Respostas inflamatórias.

Introdução

O futebol é um esporte caracterizado por ações intermitentes de alta intensidade e curta duração tais como saltos, acelerações, desacelerações e mudanças de direção (65). Essas ações, são intercaladas com breves períodos de recuperação (4,25) e demandam grande geração de força excêntrica, que por sua vez, está relacionada com alterações morfofuncionais do aparato muscular (42), resultando em aumento do dano muscular e das respostas inflamatórias. Tais fenômenos, são caracterizados por alterações hormonais, elevação das concentrações séricas de proteínas contráteis e de diversas citocinas que são as principais responsáveis pela coordenação, amplificação e regulação da magnitude e duração dos eventos inflamatórios (12,15,25). Estudos recentes demonstraram que fatores genéticos têm uma grande influência não só sobre componentes do desempenho atlético, mas também na ativação e resolução da inflamação, na regeneração do tecido muscular e outros fenótipos (1,5,12,15,30,74).

North *et al.* (41), identificaram no gene α -actinina 3 (*ACTN3*), a mudança do nucleotídeo C para T na posição 1,747 do exon 16, ou seja, uma mutação resultante na conversão do aminoácido arginina em um *stop-codon* prematuro no resíduo 577 (R577X) (58). A variante R577X resulta em duas versões do gene *ACTN3* em humanos, um alelo R funcional e um outro nulo X. Os indivíduos homocigotos para o alelo X (genótipo XX) são incapazes de expressar α -actinina-3 nas fibras musculares do tipo II, em oposição aos indivíduos com genótipos RX ou RR (31,34). Curiosamente, os indivíduos com o genótipo *ACTN3* XX compensam a deficiência de α -actinina-3 com uma expressão superior de α -actinina-2 (59).

Embora as isoformas α -actinina-2 e α -actinina-3 sejam quase idênticas em estrutura, diferenças sutis na interação com outras proteínas podem ter um efeito crucial tanto no disco Z como em todo o sarcômero (8,31). Estudos apontam, que a ausência da expressão *ACTN3* resulta em diferenças na função do músculo esquelético, incluindo menor força muscular, sugerindo que a compensação pelo *ACTN2* não é completa em extremos do desempenho físico. Ainda que a deficiência de α -actinina-3 não represente nenhuma doença muscular, evidências atuais sugerem que esse fenômeno pode afetar a fisiologia muscular em atletas, indivíduos saudáveis e em algumas populações clínicas (3,9,48,61). A frequência deste polimorfismo é comum em humanos e globalmente, estima-se que ~16% da população mundial, são do genótipo *ACTN3* 577XX e, portanto, deficiente em α -actinina-3 (3,61).

Através do aumento das concentrações de biomarcadores inflamatórios durante as atividades de força e potência, estudos sugerem que indivíduos que não expressam alfa-actinina-3, sofrem maiores taxas de microlesões, em comparação aos indivíduos que expressam o genótipo *ACTN3*-RR/RX (12,50,51). Entende-se atualmente que em atividades envolvendo força e potência, indivíduos que carregam o alelo R (RX, RR), teriam melhor desempenho, resultando em maiores taxas de atividade muscular após o micro trauma tecidual. Nesse contexto, identificar respostas inflamatórias distintas após um treinamento de alta demanda física e associá-las a diferentes perfis genéticos pode ser útil na determinação de diferentes estratégias de recuperação e na elaboração de métodos de treinamento com a individualização da carga imposta aos atletas (27). Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar as respostas inflamatórias resultantes de um treinamento com predominância de ações excêntricas e sua relação com a expressão do gene *ACTN3* em atletas de futebol.

Métodos

Cuidados éticos

Esse estudo respeitou todas as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde (Resolução 466/12) envolvendo pesquisas com seres humanos e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (69253417.1.0000.5149). Todos os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa foram devidamente repassados aos voluntários anteriormente à sua assinatura do termo de consentimento para a participação no estudo.

Amostra

A amostra foi composta por 47 atletas de futebol do sexo masculino da categoria sub-20 e com pelo menos 6 anos de experiência em treinamentos sistematizados de futebol. Os atletas fazem parte de clubes da primeira divisão do futebol brasileiro e disputam competições organizadas e/ou reconhecidas pela Confederação Brasileira de Futebol (CBF).

Procedimentos

O estudo foi realizado na terceira semana da pré-temporada dos times participantes. Essa escolha foi feita para que os atletas estejam com condicionamento físico equalizado e para que não haja uma possível resposta inflamatória muito discrepante da situação real em caso de atletas em destreinamento em função do período de férias anterior ao estudo.

No primeiro dia do estudo para caracterizar as amostras, os sujeitos foram submetidos a uma avaliação física, na qual a massa corporal, altura e dobras cutâneas foram medidas para calcular o percentual de gordura (26). No mesmo dia foi realizada a primeira coleta sanguínea que foi utilizada para a extração do DNA genômico. Os valores máximos de consumo de oxigênio (VO₂max) foram obtidos através de uma avaliação realizada duas semanas antes do início do estudo utilizando o teste de campo *YoYo Endurance Test* nível 2 (4). Os sujeitos foram genotipados para o gene do ACTN3 e depois divididos em grupos de acordo com seu genótipo (Tabela 1).

Tabela 1- Característica da Amostra

| Variáveis | RR/RX (39) | XX (8) | p |
|--|-------------|-------------|-------|
| Idade (Anos) | 19 ± 1 | 18 ± 1 | 0,985 |
| Peso (kg) | 75,2 ± 7,3 | 72,3 ± 5,9 | 0,174 |
| Estatura (cm) | 177,1 ± 6,6 | 175,7 ± 4,5 | 0,451 |
| Percentual Gord (%) | 10,3 ± 1,1 | 8,2 ± 1,7 | 0,144 |
| VO ₂ máx (mL.kg. ⁻¹ .min ⁻¹) | 56,3 ± 4,1 | 58,7 ± 3,5 | 0,087 |

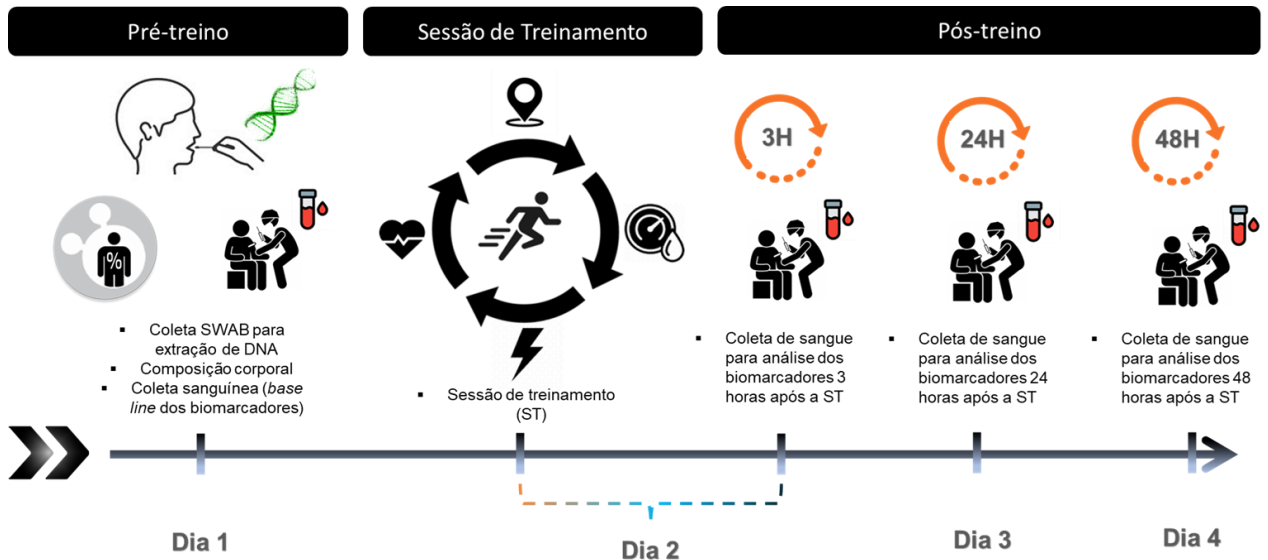
Legenda: Os dados estão apresentados em X ± DP.

Após a caracterização da amostra, no segundo dia do estudo, foi realizada a segunda coleta de sangue para a obtenção do *base line* dos biomarcadores inflamatórios e após uma hora, deu-se início a sessão de treinamento. Ainda no segundo dia do estudo, três horas após o treinamento, foi realizada a terceira coleta sanguínea para análise dos biomarcadores. A quarta coleta de amostras de sangue foi realizada no dia seguinte (dia 3), 24 horas após o término da sessão de treinamento. Finalmente, 48 horas após o treinamento (dia 4), a quarta e última amostra de sangue foi coletada.

Durante o estudo, desde os procedimentos de caracterização da amostra até o momento 48 horas após a sessão de treinamento, os sujeitos foram acomodados nas instalações do clube, onde todas as refeições seguiram a orientação de um nutricionista esportivo. Os participantes não estavam tomando nenhum medicamento ou suplemento dietético com ação anti-inflamatória por pelo menos 2 semanas antes do estudo. Atletas aptos a realizarem o treinamento, mas ainda em processo de recuperação de lesões recentes foram excluídos da amostra, pois esses são constantemente submetidos a tratamentos e protocolos de

recuperação que alteram as respostas inflamatórias. A figura 1 ilustra o desenho experimental do presente estudo.

Figura 1- Desenho Experimental



Fonte: Elaboração própria.

Protocolo de treinamento

Os sujeitos estavam familiarizados com o treinamento proposto (50), mas não realizavam estes tipos de exercícios pelo menos 1 mês antes do estudo, embora estivessem treinando regularmente durante 2 semanas, tendo participado de pelo menos 7 sessões de treinamento por semana, realizando tanto exercícios cardiovasculares quanto de resistência. Após os exercícios de aquecimento, os atletas foram divididos aleatoriamente e fizeram, por duas vezes, um circuito composto por cinco estações com exercícios intermitentes combinando saltos, mudanças de direção, acelerações e desacelerações. A permanência em cada estação tinha a duração de 3 minutos com intervalos de 30 segundos para a mudança da estação. As atividades eram realizadas em velocidade máxima e acompanhadas de incentivos verbais por parte dos treinadores. O tempo total de duração do treinamento foi de 45 minutos. A análise da carga da sessão de treinamento foi realizada pelo registro da frequência cardíaca (FC) e outras variáveis como a distância total percorrida e ações em alta intensidade. Essas variáveis, foram registradas através de dispositivos de GPS integrados com a frequência cardíaca da marca Polar (Polar Team Pro®, Finlândia). As condições ambientais (temperatura e umidade relativa do ar) de todo o treinamento foram registradas através do Termo-

higrômetro digital (Instrutherm® HT-260). Os dados referentes a demanda física da sessão e as condições ambientais do treinamento estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Demanda Física e Condições Ambientais da Sessão de Treinamento.

| Variáveis | RR/RX | XX | p |
|---|---------------|---------------|-------|
| Distância (m) | 3,102 ± 166,2 | 3,233 ± 154,6 | 0,881 |
| Distância em alta intensidade (> 21 km/h) (m) | 160,6 ± 37,3 | 177,6 ± 24,6 | 0,624 |
| Sprints | 20 ± 5 | 18 ± 4 | 0,998 |
| Aceleração em alta intensidade (>3 m/s ²) | 61 ± 7 | 59 ± 8 | 0,098 |
| Desacelerações em alta intensidade (>3 m/s ²) | 54 ± 9 | 56 ± 7 | 0,711 |
| Total de ações em alta intensidade | 137 ± 17 | 135 ± 23 | 0,520 |
| % FC | 79,8 ± 3,4 | 80,3 ± 5,2 | 0,474 |
| Temperatura (°C) | 26° | - | - |
| Umidade relativa do ar (%) | 66% | - | - |

Legenda: Os dados estão apresentados em X ± DP.

Coleta de amostras sanguíneas

As coletas de sangue foram realizadas nos momentos de caracterização da amostra, pré-treino, 3, 24 e 48 horas após o treinamento. Em cada coleta, foram colhidos de cada atleta 4mL de sangue em tubo EDTA (catálogo: 454036 – Greiner®), e 24mL (seis tubos) de soro (catálogo: 454071 – Greiner®). As amostras de EDTA foram refrigeradas a 4°C, e as amostras sorológicas foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos e refrigeradas a 4°C.

Análises hematológicas e bioquímicas

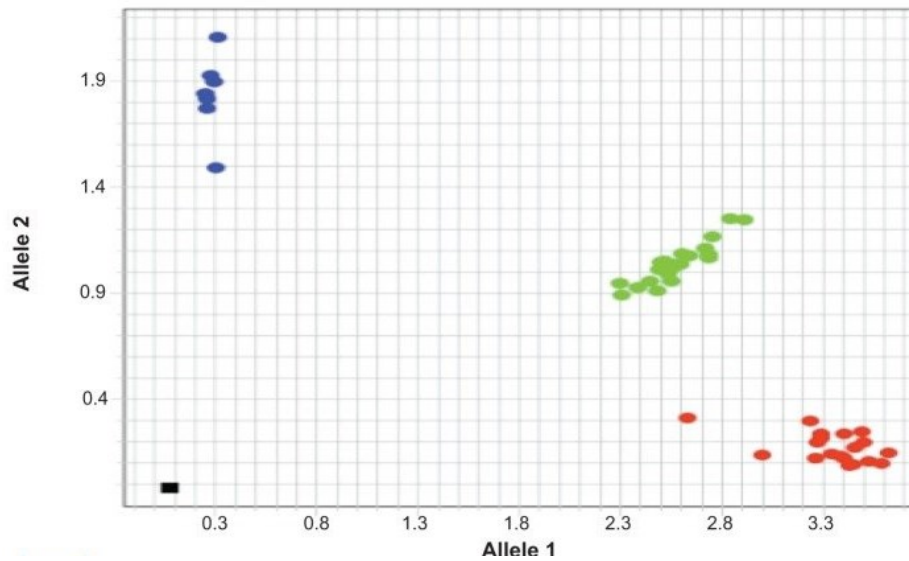
Nas amostras colhidas em tubo EDTA foram realizadas as extrações do DNA genômico e as análises hematológicas (hemograma). Nas amostras de soro foram realizadas as análises dos biomarcadores: creatinofosfoquinase (CK), proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade (PCR), fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina 6 (IL-6) e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1). O hemograma foi obtido por contagem celular automatizada através de citometria de realizada pelo equipamento Série-XN® da marca Roche (Roche Laboratórios, Brasil). A CK foi mensurada através do método cinético

ultravioleta e a PCR por turbidimetria, para ambos os métodos foi utilizado o analisador *Atellica® Solution* (Siemens *Healthineers*, Brasil). As citocinas (TNF α e IL-6) e o IGF-1 foram quantificados pelo analisador *Immulite®* (Siemens *Healthineers*, Brasil) através dos métodos de quimiluminescência e radioimunoensaio, respectivamente.

Genotipagem do SNP rs1815739 ACTN3 R577X

O DNA genômico foi extraído de 500 μ l de sangue total usando um método de *salting out* (MILLER *et al.*, 1988) e a qualidade e integridade da amostra foram testadas por espectrofotometria (*Nanodrop*, *Thermo Fisher Scientific* GE, MA, Estados Unidos). Para a determinação do polimorfismo rs1815739 do gene ACTN3, o local de interesse no exon 16 do gene foi amplificado a partir do DNA genômico utilizando-se os seguintes primers CACGATCAGTTCAAGGCAACA (forward), CCCTGGATGCCCCATGATG (reverse) e sondas moleculares Vic-CTGACCGAGAGCGA e Fam-AGGCTGACTGAGAGC (*Applied Biosystems*, MA, Estados Unidos) para a genotipagem dos alelos C e T respectivamente por fluorescência. A presença do alelo C permite a tradução do resíduo Arginina (R) e nesse trabalho será citado como alelo R. Assim como o alelo T impede a formação do resíduo na mesma posição, truncando a proteína. Neste trabalho será citado como alelo X. A discriminação de alelos foi realizada em um sistema de detecção de sequência genômica (StepOnePlus Real-Time PCR System, *Applied Biosystems*, MA, Estados Unidos) Em cada poço da placa de qPCR foram pipetados 10-15 ng de DNA (1 μ L) além de 12,5 μ L de Master mix para genotipagem (TaqMan Genotyping Master Mix® - 2 \times), 1,3 μ L de primers e sondas específicos (TaqMan genotyping assay mix® - 20 \times) e 11,2 μ L de água livre de DNase e RNase, totalizando para cada amostra, um volume final de 25 μ L. O processo de amplificação iniciou-se com uma desnaturação a 95°C por 10 minutos seguido por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60 segundos a 60°C. Os alelos foram distinguidos por discriminação alélica a partir da relação entre as diferentes fluorescências geradas no software StepOnePlus™ Software v2.3. (Figura. 2).

Figura 2- Discriminação alélica no software StepOnePlus™ Software v2.3.



Legenda: Em azul, observa-se homozigotos XX. Em vermelho homozigotos RR e em verde heterozigotos RX.

Estatística

Os dados descritivos são apresentados como média \pm desvio padrão ($X \pm SD$). A normalidade de distribuição dos dados foi verificada através do teste Kolmogorov-Sminorv. Para as variáveis com distribuição gaussiana, as comparações ao longo do tempo foram realizadas utilizando uma análise de variância de dois fatores (ANOVA *two way*), com medidas repetidas sobre o segundo fator (Grupo x Momento), seguido pelo post-hoc de Tukey quando apropriado. Para as variáveis que não apresentaram distribuição dentro da curva de normalidade foi utilizado a análise de variância para dados não paramétricos (ANOVA *type-statistics*), seguida do post-hoc de Dunn quando necessário (20). Para interpretar o tamanho do efeito para as diferenças estatísticas da ANOVA foi utilizado o eta quadrado classificado como pequeno ($0.01 < \eta^2 \leq 0.06$), médio ($0.06 < \eta^2 \leq 0.14$) e grande ($\eta^2 > 0.14$) (13,29). Todas as análises foram realizadas utilizando o software *Statistical Package for the Social Sciences for Windows*, versão 21. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. Para a análise envolvendo os genótipos, os mesmos foram agrupados na forma de RR + RX em função de XX, de acordo com o modelo genético recessivo, onde o homozigoto mais frequente é agrupado com os heterozigotos e confrontados com o homozigoto menos frequente.

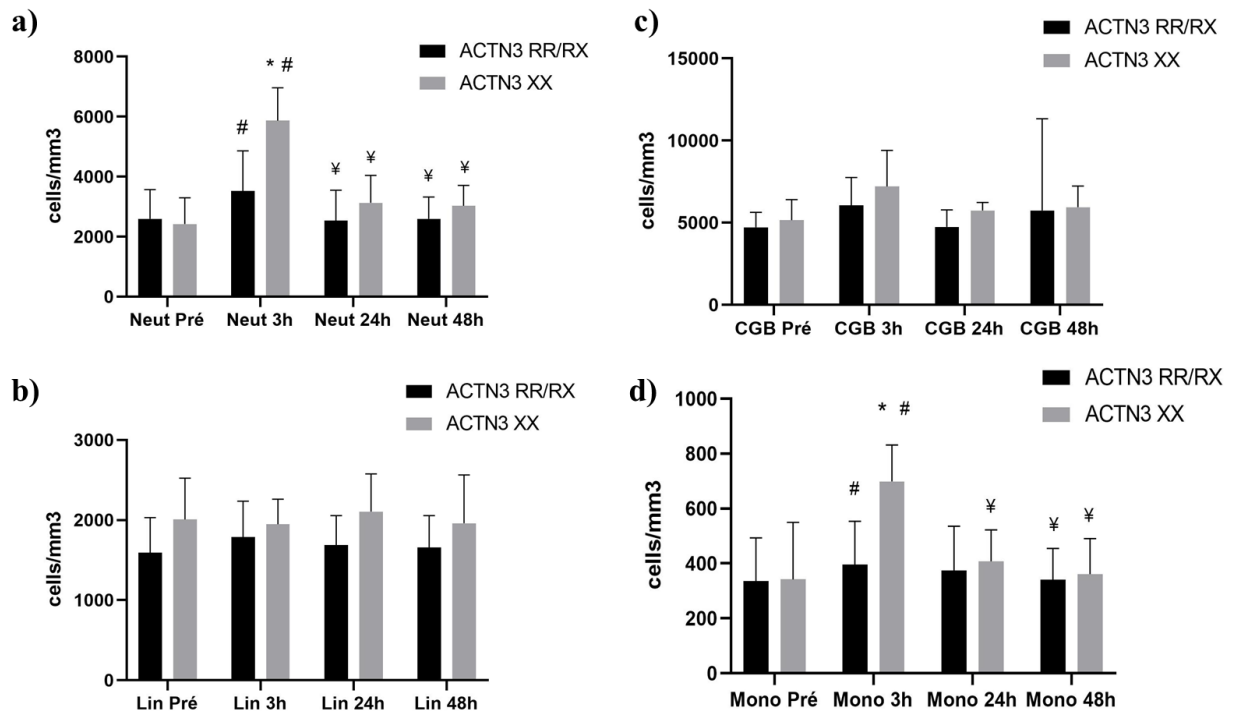
Resultados

As distribuições do genótipo *ACTN3* estavam dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p= 0,1037$), e as frequências dos alelos foram 0,61 e 0,39 para os alelos R e X, respectivamente.

Os marcadores sanguíneos obtidos através do hemograma utilizados no presente estudo estão apresentados na figura 3. Houve interação significativa entre os genótipos e a atividade dos neutrófilos (Figura 3 a) e monócitos (Figura 3 d) ao longo do tempo ($F = 3,87$, $p = 0,01$, $\eta^2 = 0,17$, $F = 4,71$, $p < 0,01$, $\eta^2 = 0,10$, respectivamente). Foi observado efeito significativo do tempo e dos genótipos sobre as concentrações de neutrófilos ($F = 16,45$, $p < 0,01$, $\eta^2 = 0,46$; $F = 6,8$, $p = 0,01$, $\eta^2 = 0,14$, respectivamente). No grupo RR/RX a atividade dos neutrófilos foi maior no momento 3 horas após em relação aos demais momentos ($p < 0,01$) e para os atletas com genótipo XX as concentrações de neutrófilos no momento 3h após o treinamento também foram significativamente maiores em relação aos momentos Pré ($p < 0,01$), 24 ($p < 0,01$) e 48 horas ($p=0,02$) após o treinamento. A atividade dos neutrófilos foi significativamente mais elevada no grupo XX em comparação com grupo RR/RX no momento 3 horas após a sessão de treinamento ($p < 0,01$) (Figura 3 a). Para os monócitos, foi observado efeito elevado do tempo ($F = 8,71$, $p < 0,01$, $\eta^2 = 0,17$) e efeito moderado dos genótipos ($F = 7,78$, $p = 0,01$, $\eta^2 = 0,06$) sobre as suas concentrações.

No grupo RR/RX as concentrações dos monócitos foram maiores no momento 3 horas após em relação aos momentos Pré ($p < 0,01$) e 48 horas ($p = 0,04$) após a sessão de treinamento. Para os atletas do grupo XX as concentrações de monócitos no momento 3h após o treinamento foram significativamente maiores em relação aos momentos Pré ($p = 0,03$), 24 ($p = 0,02$) e 48 horas ($p = 0,03$) após o treinamento. Com um comportamento semelhante aos neutrófilos, a atividade dos monócitos foi significativamente mais elevada no grupo XX em comparação com grupo RR/RX no momento 3 horas após a sessão de treinamento ($p < 0,01$) (Figura 3 d). Os demais marcadores derivados do hemograma, linfócitos e CGB, não apresentaram qualquer diferença significativa entre os momentos ou entre os genótipos (Figura 3 b e c, respectivamente).

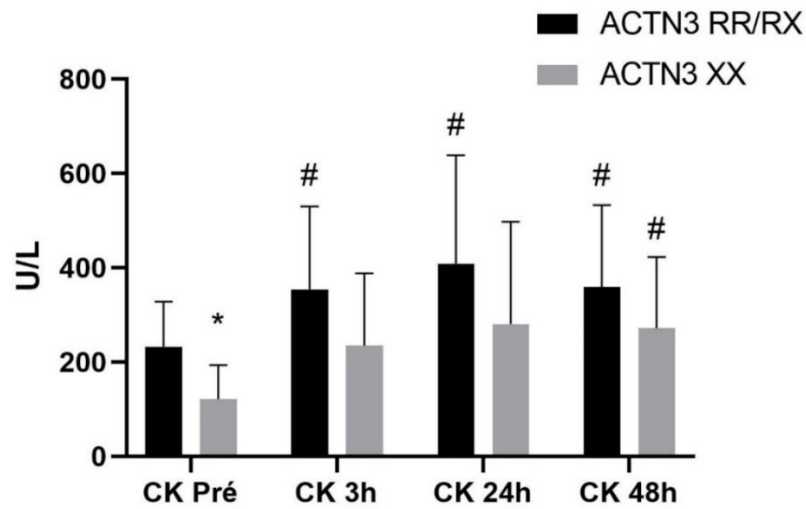
Figura 3- Concentração de Neutrófilos, Linfócitos, contagem de glóbulos brancos (CGB), Monócitos antes, 3, 24 e 48 horas após a sessão de treinamento.



Legenda: *Diferenças entre genótipos no mesmo momento. #Diferenças em relação ao momento Pré. ¥Diferenças em relação ao ao segundo momento. Os dados estão apresentados em $X \pm DP$.

Os valores de CK estão apresentados na figura 4. Não houve interação significativa entre os genótipos e a cinética das concentrações de CK ($F = 0,71$, $p = 0,55$, $\eta^2 = 0,02$). Foi observado efeito significativo do tempo sobre as concentrações sanguíneas de CK ($F = 7,66$, $p < 0,01$, $\eta^2 = 0,20$). Os genótipos apresentaram efeito pequeno sobre os valores de CK ($F = 2,02$, $p = 0,16$, $\eta^2 = 0,02$). No grupo RR/RX as concentrações de CK foram maiores nos momentos 3, 24 e 48 horas após em relação ao momento Pré ($p < 0,01$) e para os atletas com genótipo XX observou-se concentrações de CK significativamente maiores no momento 48 horas após o treinamento em comparação com o momento pré ($p = 0,01$). As concentrações séricas de CK foram significativamente menores no grupo XX no momento Pré ($p = 0,04$) em comparação ao grupo RR/RX, mostrando que os grupos estavam desequilibrados para a CK antes da intervenção.

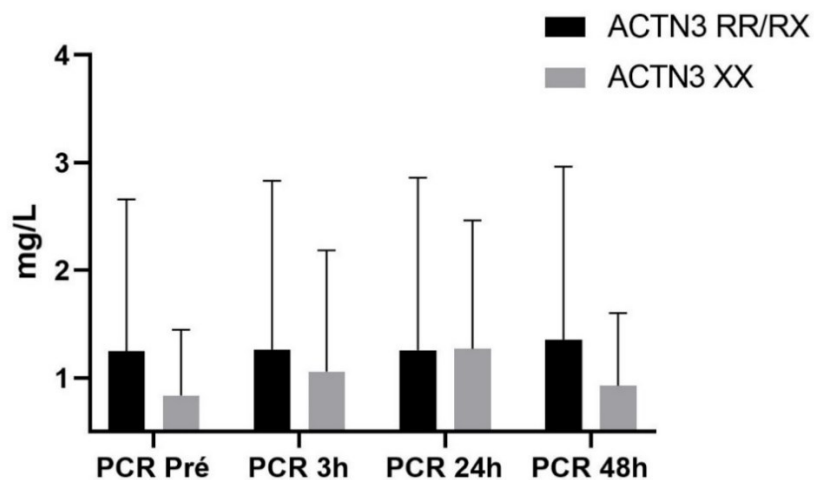
Figura 4- Concentrações de CK antes, 3, 24 e 48 horas após o treinamento.



Legenda: #Diferenças em relação ao primeiro momento. Os dados estão apresentados em $X \pm DP$.

As concentrações de PCR não apresentaram qualquer diferença significativa entre os momentos ($p = 0,56$) ou entre os dois grupos ($p = 0,69$) (Figura 5). Uma variação percentual maior entre os momentos foi identificada no grupo XX, tendo a sua maior variação observada no momento 24 horas após o treinamento (51% de aumento em relação ao momento Pré). Já para o grupo RR/RX a variação percentual entre os momentos foi menor tendo a maior variação observada no momento 48 horas após a sessão de treinamento (9% de aumento em relação ao momento Pré).

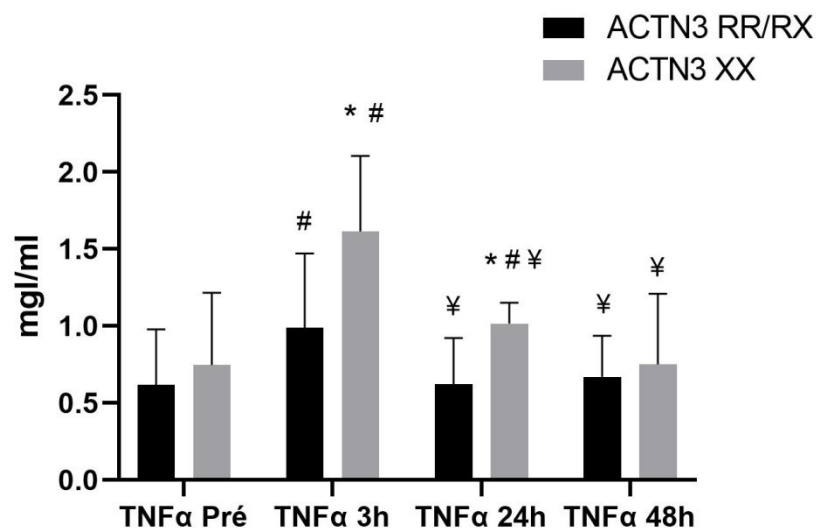
Figura 5- Concentrações de PCR antes, 3, 24 e 48 horas após a sessão de treinamento.



Legenda: Os dados estão apresentados em $X \pm DP$.

Houve interação significativa entre os genótipos e a cinética de $\text{TNF}\alpha$ ($F = 14.74$, $p < 0,01$, $\eta^2 = 0,48$). Houve um grande e significativo efeito do tempo ($F = 7,19$, $p < 0,01$, $\eta^2 = 0,31$) e dos genótipos ($F = 13,21$, $p < 0,01$, $\eta^2 = 0,30$) sobre as concentrações séricas de $\text{TNF}\alpha$. No grupo RR/RX, os valores para o momento 3h após foram significativamente maiores em relação aos momentos Pré, 24h e 48h após ($p < 0,01$). Para o grupo XX, as concentrações de $\text{TNF}\alpha$ foram significativamente maiores no momento 3 h após em relação aos momentos Pré ($p = 0,019$), 24h ($p = 0,039$) e 48h após ($p = 0,046$) e os valores no momento 24h permaneceram significativamente mais elevados em relação ao momento Pré ($p = 0,012$). Na comparação entre os genótipos, os valores de $\text{TNF}\alpha$ foram mais elevados no grupo XX quando comparado ao grupo RR/RX nos momentos 3h ($p < 0,01$) e 24h após ($p < 0,01$) (Figura 6).

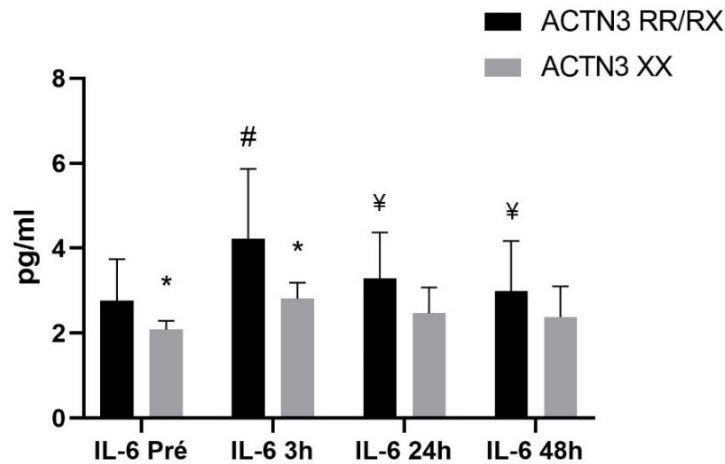
Figura 6- Concentrações de $\text{TNF}\alpha$ antes, 3, 24 e 48 após a sessão de treinamento.



Legenda: *Diferenças entre os genótipos no mesmo momento. #Diferenças em relação ao momento Pré. ¥Diferenças em relação ao momento 3h. Os dados estão apresentados em $X \pm DP$.

Não houve interação significativa entre os genótipos e as concentrações de IL-6 ao longo do tempo ($F = 1,72$, $p = 0,17$, $\eta^2 = 0,05$). Foi observado um efeito moderado do tempo sobre as concentrações de IL-6 ($F = 3,42$, $p = 0,02$, $\eta^2 = 0,10$). Os genótipos apresentaram efeito elevado sobre os valores de IL-6 ($F = 6,13$, $p = 0,02$, $\eta^2 = 0,16$). No grupo RR/RX, os valores para o momento 3 horas após foram significativamente maiores em relação aos momentos Pré, 24 e 48 horas após o treinamento ($p < 0,01$). Os atletas com genótipo XX, não apresentaram diferenças significativas entre os momentos. Entre os genótipos, as concentrações de IL-6 foram significativamente mais elevadas no grupo RR/RX em relação ao grupo XX nos momentos Pré ($p < 0,01$) e 3h após ($p < 0,01$) (Figura 7).

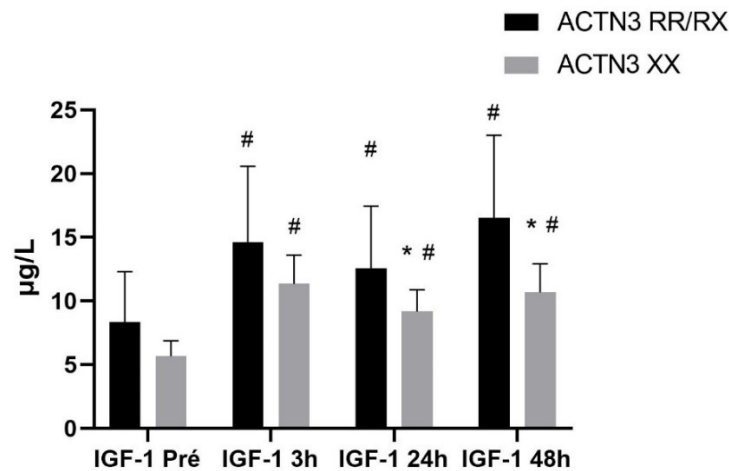
Figura 7- Concentrações de IL-6 antes, 3, 24 e 48 horas após a sessão de treinamento.



Legenda: *Diferenças entre os genótipos no mesmo momento. #Diferenças em relação ao primeiro momento. Os dados estão apresentados em $X \pm DP$.

Em relação as concentrações de IGF-1, não houve interação significativa entre os genótipos e a sua cinética ($F = 0,39$, $p = 0,76$, $\eta^2 = 0,01$). Foi observado efeito elevado do tempo sobre as concentrações de IGF-1 ($F = 5,74$, $p < 0,01$, $\eta^2 = 0,15$). O fator genótipo apresentou efeito moderado sobre os valores de IGF-1 ($F = 5,93$, $p < 0,02$, $\eta^2 = 0,11$). No grupo RR/RX, as concentrações de IGF-1 nos momentos 3, 24 e 48h após foram significativamente maiores em relação ao momento Pré ($p < 0,01$). Os atletas com genótipo XX, também apresentaram valores significativamente maiores nos momentos 3 ($p = 0,02$), 24 ($p = 0,04$) e 48h após ($p = 0,02$) em relação ao momento Pré. Na comparação entre os genótipos, as concentrações de IGF-1 foram significativamente mais elevadas no grupo RR/RX em relação ao grupo XX nos momentos 24 ($p < 0,01$) e 48h após ($p = 0,01$) (Figura 8).

Figura 8- Concentrações de IGF-1 antes, 3, 24 e 48 horas após a sessão de treinamento.



Legenda: *Diferenças entre genótipos no mesmo momento. #Diferenças em relação ao momento Pré. Os dados estão apresentados em média $X \pm DP$.

Um resumo dos resultados aqui apresentados, referentes a todos os biomarcadores analisados nesse estudo e suas respectivas associações com os genótipos para o SNP *ACTN3* rs1815739, está exposto na tabela 3.

Tabela 3- Associações Entre Biomarcadores e os Genótipos para o SNP *ACTN3* rs1815739.

| | Pré | | 3 h | | 24 h | | 48 h | | Interação (genótipo x tempo) | η^2 Tempo | η^2 Genótipo | p (RR/RX x XX) |
|--------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|---------------------------------|----------------|-------------------|-----------------------|
| | RR/RX | XX | RR/RX | XX | RR/RX | XX | RR/RX | XX | | | | |
| Neutrófilos | 2598 | 2423 | 3523 | 5371 | 2540 | 3133 | 2598 | 3032 | < 0,01 | 0,46 | 0,14 | < 0,01 [#] |
| Linfócitos | 1593 | 2010 | 1785 | 1949 | 1690 | 2106 | 1660 | 1961 | 0,54 | 0,02 | 0,01 | >0,05 |
| CGB | 471 | 5157 | 6054 | 7212 | 4743 | 5744 | 5739 | 5938 | 0,82 | 0,03 | 0,02 | >0,05 |
| Monócitos | 335 | 341 | 396 | 698 | 374 | 408 | 340 | 361 | < 0,01 | 0,17 | 0,06 | < 0,01 [#] |
| CK | 233 | 121 | 354 | 235 | 409 | 380 | 358 | 272 | 0,55 | 0,2 | 0,02 | >0,05 |
| PCR | 1,3 | 0,8 | 1,3 | 1,1 | 1,3 | 1,3 | 1,4 | 0,9 | 0,69 | 0,01 | 0,01 | >0,05 |
| TNF α | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 1,6 | 0,6 | 1,1 | 0,7 | 0,8 | < 0,01 | 0,31 | 0,3 | < 0,01 [#] ‡ |
| IL-6 | 2,8 | 2,1 | 4,2 | 2,8 | 3,3 | 2,5 | 3,0 | 2,8 | 0,17 | 0,1 | 0,16 | < 0,01 [#] ‡ |
| IGF-1 | 8,3 | 5,7 | 14,6 | 11,3 | 12,6 | 9,2 | 16,5 | 10,6 | 0,39 | 0,15 | 0,11 | < 0,01 [#] ‡ |

Legenda: CGB = contagem de glóbulos brancos. *Diferenças entre os genótipos no momento Pré. #Diferenças entre os genótipos no momento 3 h. ‡Diferenças entre os genótipos no momento 24 h. †Diferença entre os genótipos no momento 48 h.

Discussão

É bem estabelecido que exercícios com ações musculares predominantemente excêntricas configuram como um dos maiores gatilhos para se desencadear dano muscular e conseqüentemente elevar respostas inflamatórias. Os resultados aqui encontrados, mostraram que tanto a cinética quanto as concentrações sanguíneas de biomarcadores inflamatórios podem variar em função dos genótipos para o gene *ACTN3*. Ou seja, além de seu papel estabelecido na estrutura muscular e no desempenho esportivo, potencialmente o

polimorfismo *ACTN3* R577X também modifica as adaptações ao treinamento e a recuperação após o exercício.

A expressão da proteína α -actinina-3 influencia diretamente a expressão dos principais genes e vias associadas às adaptações musculares e respostas inflamatórias (60). Devido ao papel do *ACTN3* na função do músculo esquelético, particularmente em relação às fibras do tipo 2, indivíduos homozigotos para o alelo X, demonstrariam concentrações sanguíneas de células do sistema imune mais elevadas em resposta ao exercício excêntrico, em comparação com indivíduos que carregam pelo menos um alelo R. A ausência da proteína gera uma maior instabilidade mecânica, metabólica e neural tendo como resposta a maior demanda inflamatória para uma mesma demanda externa (60). Na presente investigação, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de linfócitos e CGB ao longo do tempo e entre os genótipos. Entretanto, indivíduos com o genótipo XX apresentaram maiores concentrações de neutrófilos e monócitos 3 horas após a sessão de treinamento em comparação ao grupo RR/RX ($p < 0,01$). É importante ressaltar, que até o presente momento, esse é o primeiro estudo a verificar a relação de forma global, de células do sistema imune como neutrófilos, linfócitos, CGB e monócitos com os genótipos do polimorfismo rs1815739 no gene *ACTN3*, o que limita a discussão e torna desses resultados.

Os resultados aqui encontrados em relação aos linfócitos, corroboram com os achados de Trecroci *et al.* (69) que não encontraram alterações nas concentrações de linfócitos imediatamente após e 72 horas após uma partida de futebol. Em contrapartida, os achados relacionados a CGB não estão de acordo com os mesmos autores que identificaram alterações significativas na CGB imediatamente após a partida (60). Essas discrepâncias podem estar relacionadas às diferenças nos momentos de coleta dos estudos e na diferença dos estímulos propostos para gerar aumento nas respostas inflamatórias (jogo x treino específico com predominância de ações excêntricas).

Em exercícios de alta intensidade e curta duração, há uma tendência a se desenvolver um quadro de leucocitose (aumento da CGB) proporcional à intensidade do exercício e imediatamente após a atividade, já foi descrito um aumento de 50% a 100% na CGB circulantes na corrente sanguínea (22). Em contrapartida, após 30 minutos de recuperação, foi descrito também uma redução na CGB, que pode variar entre 30% e 50% dos níveis pré-exercício, refletindo uma leucopenia, que permanece por um período de 3 a 6 horas após o exercício (54). Outros estudos apontam que de 4 a 6 horas após o exercício físico, a CGB retorna aos níveis pré-exercício (21,23,40), corroborando com os achados da presente

investigação. Possivelmente, os momentos de coleta aqui propostos, podem não terem sido sensíveis para verificar alterações na CGB.

Nesse estudo, os resultados demonstraram maiores concentrações de neutrófilos para ambos os grupos (RR/RX e XX) 3 horas após o treinamento e retornam aos valores basais nas 24 horas seguintes à sessão de treinamento. Beiter *et al.* (6), observaram aumentos na liberação de neutrófilos em indivíduos sedentários saudáveis e treinados após um protocolo de 60 minutos de exercício de alta intensidade em um ciclo-ergômetro.

Os neutrófilos são um componente importante da resposta imune inata contra vários patógenos. Eles são uma das primeiras e mais abundantes populações celulares a alcançar o local afetado após infecções patogênicas ou outros estímulos inflamatórios (43). Neutrófilos possuem basicamente propriedades duplas na resposta inata, a) atuam como agentes antibacterianos e b) estão envolvidos na magnitude da resposta inflamatória. Além dos patógenos, alguns estudos sugerem que o exercício intenso também pode gerar maior liberação de neutrófilos (6). Uma alta e prolongada ação neutrofílica pode causar danos no processo de cicatrização do músculo ou retardar suas capacidades regenerativas (43). A liberação elevada (ou remoção ineficaz) dos neutrófilos após treinamento, particularmente quando combinada com um período de recuperação insuficiente, pode contribuir para aumentar a suscetibilidade a infecções do trato respiratório superior, inflamação crônica, danos excessivos a músculos/tecidos ou fadiga crônica em atletas (66).

Os resultados obtidos na presente investigação, apontam para um aumento significativo da atividade dos monócitos 3 horas após a sessão de treinamento em ambos os grupos (RR/RX e XX) e os valores parecem retornar próximos aos valores basais 24 horas após o treino. Esses achados estão de acordo com Trecroci *et al.* (69), que em um estudo com 3 momentos de coleta (pré, pós e 72 horas após uma partida de futebol), encontraram maior atividade dos monócitos logo após a partida, os autores também relataram que as concentrações dos monócitos retornavam aos valores basais 72 horas após a intervenção.

O estresse gerado pelo exercício físico parece estimular a atividade dos monócitos (16,45). Estudos apontam que o exercício agudo provoca monocitose transitória, decorrente do aumento na concentração de glicocorticóides, catecolaminas, prolactina, hormônios da tireoide e β -endorfinas (45,46). Os monócitos são fagócitos mononucleares circulantes do sistema imunológico inato e têm várias funções, tais como a fagocitose, reparo tecidual, inativação de vírus, preservação de antígenos e a secreção de citocinas anti e pró-

inflamatórias (36). Após o dano tecidual, os monócitos migram para o tecido lesionado e se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas (73). O efeito do treinamento físico sobre a função do monócito tem sido uma área de estudo relativamente ativa, No entanto os resultados são bastante heterogêneos, devido aos distintos protocolos de exercício proposto e características das amostras.

Nesse estudo, na comparação entre os genótipos, para uma mesma demanda de carga externa observou-se maiores atividades dos neutrófilos e monócitos em indivíduos com o genótipo XX. Com isso, sugere-se possivelmente possibilidade de que atletas com esse genótipo apresentam maiores demandas de células do sistema imune o que pode estar relacionado com uma fase aguda do processo inflamatório mais longa. Dessa forma, esses atletas podem precisar de um controle de carga diferenciado afim de evitar um quadro de acúmulo de fadiga em função de atividade inflamatória por um período prolongado. Considerando que as subpopulações de monócitos se diferenciam em seus estágios maturacionais e nas respostas inflamatórias, um dos fatores limitantes desse estudo, foi a utilização da contagem geral de monócitos o que não nos possibilitou uma análise mais profunda a respeito das subpopulações mais estudadas como aqueles que expressam CD14 ou mesmo CD16 (36,46,73).

Os resultados do presente estudo em relação à CK, estão de acordo com os achados de Coelho *et al.* (12) e Clarkson *et al.* (11) que não encontraram diferença na predisposição em direção ao dano muscular entre diferentes genótipos para o gene *ACTN3*. Por outro lado, este estudo contradiz Vincent *et al.*, (70) e Pimenta *et al.*, (50) que identificaram maiores concentrações de CK após atividades excêntricas em indivíduos homozigotos XX, sugerindo um papel protetor do alelo R do polimorfismo estudado no gene *ACTN3* no treinamento excêntrico, gerando também uma melhor sinalização no processo de reparo tecidual. A variação entre os estudos deve-se provavelmente à heterogeneidade da população genotipada, e diferenças na prescrição do exercício.

No presente estudo, foi observado que indivíduos homozigotos para o alelo X demonstraram atividade de CK em repouso significativamente mais baixa do que os indivíduos que carregam pelo menos um alelo R ($p = 0,04$). É bem estabelecido na literatura que a resposta das concentrações de CK à atividade física é influenciada por vários fatores como sexo, raça, condicionamento físico, volume de massa muscular e temperatura (5,50). Como não avaliamos alguns desses fatores como a massa muscular, é possível que os indivíduos do grupo XX tenham massa muscular baixa, o que poderia explicar a menor

atividade sérica de repouso da CK. A falta de controle desses fatores pode ser considerada uma limitação do estudo.

As concentrações de PCR não diferiram entre os momentos para ambos os grupos (RR/RX e XX) ou entre os genótipos. Esses resultados diferem dos achados de Djarova *et al.* (17), que encontraram relação do alelo R com concentrações mais baixas de PCR em jovens africanos jogadores de cricket. Entretanto, os dados aqui apresentados corroboram com Kostrzewa-Nowak *et al.* (28), que também não identificaram alterações significativas nas concentrações de PCR após uma sessão de corrida com duração de 60 minutos em jogadores de futebol do sexo masculino.

Sessões agudas de exercício provocam um aumento nas concentrações de proteínas de fase aguda como a PCR. Entretanto, o treinamento físico regular a longo prazo pode reduzir as concentrações basais de marcadores inflamatórios. Há estudos que evidenciam que a concentração plasmática de PCR depende do nível de atividade física (55,68). Esses dados sugerem que a circulação do nível sérico de PCR no sangue dos atletas pode estar diminuída pois o condicionamento físico pode conferir efeitos favoráveis sobre o perfil lipídico no sangue, composição corporal, metabolismo de insulina e pressão arterial. Estes dados poderiam explicar em parte, a falta de mudanças nas concentrações sanguíneas de PCR encontradas nesse estudo.

Para indivíduos de ambos os grupos o pico de TNF α foi observado no momento 3 horas após a sessão de treinamento. A cinética aqui apresentada corrobora com os resultados demonstrados por Souglis *et al.* (63), que observaram o pico de TNF α após uma partida de futebol. Em contrapartida, os mesmos autores relataram que 24 horas após o jogo, os valores de TNF α retornaram aos valores basais, o que não foi observado nesse estudo para os indivíduos XX. Na presente investigação, indivíduos com genótipo XX, apresentaram concentrações significativamente maiores em relação ao grupo RR/RX nos momentos 3 e 24 horas após a sessão de treinamento. Tiainen *et al.* (67), mostraram que altos níveis de TNF α no plasma estão associados a desempenho físico reduzido em homens. Os receptores de TNF (principalmente o rTNF-II) podem ainda, desencadear o gatilho para a apoptose. Entretanto, o mecanismo que determinará qual efeito será dominante ainda não está totalmente esclarecido.

Desta forma, o principal efeito fisiológico do TNF- α é promover a resposta imune por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los (53). Foi descrito previamente que o TNF α elevado atenua a fusão e diferenciação dos

mioblastos o que pode prejudicar a regeneração do muscular (64). A expressão local de TNF α dentro do músculo esquelético é significativamente elevada após o exercício (44). A citosina TNF α está associada a vias catabólicas e supressão da síntese de proteínas no músculo esquelético (32). Além disso, a infusão de TNF em ratos levou a uma queda significativa nas concentrações de IGF-I, sugerindo uma influência negativa do TNF α no sistema IGF (33). Com os dados apresentados na presente investigação, sugere-se que indivíduos com o genótipo XX, apresentam maiores concentrações e expressão tardia de TNF α , o que pode influenciar negativamente o processo de reparo tecidual.

A expressão de IL-6 no grupo RR/RX foi maior quando comparada ao grupo XX. Esse achado corrobora com os resultados apresentados por Pimenta *et al.* (50), que após um treinamento físico com atletas de futebol profissional, identificou valores mais elevados de IL-6 em indivíduos portadores do alelo R. Entretanto, esse resultado difere dos dados mostrados por Vincent *et al.*, (70) que observaram maiores concentrações de mRNA em IL-6 após um teste excêntrico em indivíduos XX, quando comparado aos indivíduos homocigóticos RR. Este comportamento poderia ser explicado pela alta demanda neural e glicolítica em função da habilidade mecânica em gerar ações musculares de alta intensidade nos indivíduos RR, o que por sua vez levaria a uma maior liberação de IL-6 para suprir a alta demanda metabólica, promovendo o aumento da glicogenólise hepática e da lipólise, que aumentam a oferta de glicose, ácidos graxos e glicerol, respectivamente, e contribuindo assim com a manutenção energética dos músculos e outros tecidos em atividade (18).

As citocinas estão envolvidas na regulação da resposta imune durante a fase aguda da inflamação em resposta dano tecidual e atuam como mediadores das respostas inflamatórias e no reparo tecidual. Inicialmente, o aumento da IL-6 foi considerado como uma resposta inflamatória decorrente de danos nas células musculares. Entretanto, foi observado que outros fatores como o volume, intensidade e tipo de contração muscular levam a um aumento da IL-6 independente do dano muscular (47,59). Alguns estudos encontraram aumento nas concentrações de IL-6 após partidas de futebol em atletas profissionais (25). Neste estudo, principalmente para o grupo RR/RX, o pico de atividade da IL-6 foi identificado no momento 3 horas pós o exercício com seus valores retornando aos níveis basais no momento 24 horas pós, corroborando com outros achados na literatura (50,63).

O aumento das concentrações de IGF-1, parece estar relacionado com ações excêntricas, de forma que as microlesões nas células musculares possam ser um estímulo para sua ativação (39). Os resultados encontrados nesse estudo, demonstram que indivíduos RR/RX

possuem maiores concentrações de IGF-1 após o exercício. Já indivíduos XX parecem expressar menos IGF-1 após o treinamento. Esses achados corroboram com a teoria anteriormente citada da influência de altas concentrações de TNF α na supressão do eixo IGF (33). Na figura 8 é possível observar através dos valores absolutos de IGF-1 de ambos os grupos, que após um aumento mais expressivo nas 3 horas seguintes ao treinamento as concentrações de IGF-1 sofrem queda no momento 24 horas e voltam subir no momento 48 horas após a sessão de treinamento. Estudos apontam que uma resposta bifásica do IGF-1 pode ser apresentada de forma aguda e ter duração de até 3 dias dependendo do estímulo (35). A teoria bifásica do IGF-1 apoia-se em suas três isoformas: fator de crescimento muscular (MGF), IGF-1Ea e IGF-1Eb (expresso apenas em modelos animais) (35). Os estudos desenvolvidos até o momento, indicam que os mecanismos fisiológicos que agem sobre as ações distintas das isoformas de IGF-1 podem ser a sua funcionalidade, bem como as suas respectivas vias de ativação (10,14,35,62).

Por fim, o MGF, é reconhecido por ser ativado em resposta ao exercício, no próprio tecido muscular e age de forma autócrina e parácrina (10). Enquanto o IGF-1Ea é a isoforma sintetizada no fígado e sua ação principal é parácrina (62). A teoria bifásica aguda do IGF-1, sugere que a resposta do MGF é diferente da resposta do IGF-1Ea (35). Inicialmente, logo após o exercício o IGF-1 se apresenta pela isoforma de MGF e nos dias seguintes, essa apresentação é feita pelo IGF-1Ea (35). A principal função do MGF é mitogênica (ativação e proliferação para o momento de regeneração muscular, reabastecimento do pool de células satélites), enquanto o IGF-1Ea é responsável pela ação miogênica (diferenciação das células satélites proliferadas) (35,62). Além de diferentes funções, diferentes vias de sinalização estão associadas às respostas dessas isoformas. Nesse contexto, a proliferação celular é mediada principalmente pela via quinase RAS/RAF-1/MAPK quinase, enquanto a via de diferenciação é estimulada pela PI3 quinase/p70-S6 quinase (14). Os mecanismos exatos que geram a inversão da expressão entre as isoformas de IGF-1 ainda não estão claros. Mas sugere-se que o próprio MGF se opõe a diferenciação das células precursoras (35). Dessa forma, os níveis de MGF diminuem, enquanto os níveis de IGF-1Ea aumentam.

Conclusão

Aparentemente, indivíduos com o genótipo XX apresentam respostas inflamatórias mais elevadas e IGF-1 mais baixo do que os indivíduos portadores do alelo R (RR e RX). A possível atividade fagocitária aumentada decorrente de maiores níveis séricos das células estudadas em indivíduos XX sugere fase aguda inflamatória prolongada e um relativo atraso

no reparo tecidual dos atletas XX em comparação com os indivíduos RR/RX. Com base na hereditariedade e considerando o princípio da individualidade biológica, ajustes na distribuição da carga de treinamento, diferentes estratégias de recuperação podem ser elaboradas com o objetivo de otimizar as adaptações ao treinamento. Entretanto, novos estudos com amostra maior e talvez com mais momentos de coleta, se fazem necessários para confirmar as associações aqui encontradas e possibilitar melhor compreensão a respeito das cinéticas dos biomarcadores sanguíneos e dos mecanismos fisiológicos envolvidos nessas associações.

Aplicações Práticas

Os resultados desta pesquisa, podem auxiliar na gestão da carga de treinamento e elaboração de estratégias de recuperação.

Possivelmente, para sessões com grande demanda física e predominância de ações excêntricas, indivíduos XX precisariam de um tempo de recuperação maior entre as sessões de treinamento e a distribuição do conteúdo de treinamento por via diferenciada com o objetivo de evitar o sobre-treinamento e o surgimento de lesões.

A carga de treinamento imposta aos atletas assim como os protocolos de recuperação aplicados podem levar em consideração o genótipo para o *ACTN3*, pois, como observado, existem diferenças nas respostas inflamatórias e de reparo tecidual entre indivíduos que possuem o alelo R e homocigóticos XX.

Agradecimentos

Aos atletas voluntários e clubes participantes da pesquisa. Os autores declaram não possuir conflito de interesse em relação ao presente estudo.

Referências

1. AHMETOV, I.I.; FEDOTOVSKA, O.N. Current progress in sports genomics. **Advances in Clinical Chemistry**, v.70, p.247-314, 2015.
2. ALFRED, T.; BEN-SHLOMO, Y.; COOPER R. *et al.* ACTN3 genotype, athletic status, and life course physical capability: meta-analysis of the published literature and findings from nine studies. **Human Mutation**. v. 32, n. 9, p. 1008-1018, 2011.
3. AMORIM.; C.E.G.; ACUÑA-ALONZO, V.; SALZANO, F.M.; BORTOLINI, M.C.; HÜNEMEIER, T. differing evolutionary histories of the ACTN3*R577X polymorphism among the major human geographic groups. **PLoS ONE**. v. 10, n. 2, e0115449, 2015.

4. BANGSBO, J. The physiology of soccer – with special reference to intense intermittent exercise. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.151, n.619, p.1-155, 1994.
5. BAUMERT, P.; LAKE, M.J.; STEWART, C.E.; DRUST, B.; ERSKINE, R.M. Genetic variation and exercise-induced muscle damage: implications for athletic performance, injury and ageing. **European Journal of Applied Physiology**, v.116, p.1595-1625, 2016.
6. BEITER, T.; FRAGASSO, A.; HUDEMANN, J.; SCHILD, M.; STEINACKER, J.; MOOREN, F.C.; NIESS, A.M. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. **Journal of Applied Physiology**. v. 117, p. 325–333, 2014.
8. BERMAN Y.; NORTH K.N. A gene for speed: the emerging role of alpha-actinin-3 in muscle metabolism. **Physiology (Bethesda)**. v. 25, n.4, p. 250-259, 2010.
9. BROOS, S.; VAN LEEMPUTTE, M.; DELDICQUE, L. et al. History-dependent force, angular velocity and muscular endurance in ACTN3 genotypes. **European Journal of Applied Physiology**. v. 115, p. 1637–1643, 2015.
10. CHEEMA, U.; BROWN, R.; MUDERA, V.; YANG, S.Y.; MCGROUTHER, G.; GOLDSPIK, G. Mechanical signals and IGF-I gene splicing in vitro in relation to development of skeletal muscle. **Journal of Cellular Physiology**, v. 202, n. 1, p. 67–75, 2005.
11. CLARKSON, P. M., HOFFMAN, E. P., ZAMBRASKI, et al. ACTN3 and MLCK genotype associations with exertional muscle damage. **Journal of Applied Physiology**. v. 99, p.64–569, 2005.
12. COELHO, D.B.; PIMENTA, E.M.; ROSSE, I.C. et al. Alpha-actinin-3 R577X polymorphism influences muscle damage and hormonal responses after a soccer game. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 33, n. 10, p. 2655-2664, 2019.
13. COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. New York, NY: Routledge Academic, 1988.
14. COOLICAN, S.A.; SAMUEL, D.S.; EWTON, D.Z.; MCWADE, F.J.; FLORINI, J.R. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 10, p. 6653–6662, 1997.
15. DA SILVA, F.O.C.; MACEDO, D.V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v.13, n.5, p. 320-328, 2011.
16. DEL GIACCO, S.R.; SCORCU, M.; ARGIOLOS, F.; FIRINU, D.; DEL GIACCO, G.S. Exercise training, lymphocyte subsets and their cytokines production: Experience of an Italian professional football team and their impact on allergy. **BioMed Research International**, v.2014 ID 429248 6 pages, 2014.
17. DJAROVA, T.; WATSON, G.; BASSON, A.; GRACE, J.; CLOETE, J.; RAMAKOABA, A. ACTN3 and TNF gene polymorphism association with C-reactive protein, uric acid, lactate, and physical characteristics in young African cricket player. **African Journal of Biochemistry Research**. v.5, p. 22-27, 2011.

18. EDWARDS, K.M.; BURNS, V.E.; RING, C.; CARROLL, D. Individual differences in the interleukin-6 response to maximal and submaximal exercise tasks. **Journal of Sports Science**, v. 24, n. 8, p. 855–862, 2006.
19. EYNON, N.; RUIZ, J.R.; FEMIA P. et al. The ACTN3 R577X polymorphism across three groups of elite male European athletes. **PLoS One**. v. 7, n. 8, e 43132, 2012.
20. FIELD, A. **Descobriendo a estatística usando o SPSS**. 2 ed. 2009.
21. GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. **Journal of Applied Physiology**. v.103, n.2, p.693-699, 2007
22. GREEN, K.J.; CROAKER, S.J.; ROWBOTTOM, D.G. Carbohydrate supplementation and exercise-induced changes in T-lymphocyte function. **Journal of Applied Physiology**. v.95, n.3, p. 1216-1223, 2003.
23. GREEN, K.J.; ROWBOTTOM, D.G.; MACKINNON, L.T. Exercise and T-lymphocyte function: a comparison of proliferation in PBMC and NK cell-depleted PBMC culture. **Journal of Applied Physiology**. v.92, n.6, p.2390-5, 2002.
24. HALL, E, BAUMERT, P, LARRUSKAIN, J, *et al*. The genetic association with injury risk in male academy soccer players depends on maturity status. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**. v. 00, p. 1–13, 2021.
25. ISPIRLIDIS I.; FATOUROS, I.G.; JAMURTAS, A.Z.; et al. Time-course of changes in inflammatory and performance responses following a soccer game. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 18, n. 5, p. 423-431, 2008.
26. JACKSON, A.S.; POLLOCK, M.L. Generalized equations for predicting body density of men. **British Journal of Nutrition**, v.40, n.3, p.497-504, 1978.
27. JONES, N.; KIELY, J.; SURACI, B.; SURACI, B.; COLLINS, D.; LORENZO, D.; GRIMALDI, KA. A genetic-based algorithm for personalized resistance training. **Biology of Sports**, v. 33, p. 117–126, 2016.
28. KOSTRZEWA-NOWAK, D.; NOWAK, R.; CHAMERA, T.; BURYTA, R.; MOSKA, W.; CIĘSZCZYK, P. Post-effort changes in c-reactive protein level among soccer players at the end of the training season. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.29, n. 5, 1399–1405, 2015.
29. LAKENS, D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. **Frontiers in Psychology**. v.4, p. 1-12, 2013.
30. LARRUSKAIN, J.; CELORRIO, D.; BARRIO, I.; ODRIUZOLA, A.; GIL, S.M.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.R.; NOZAL, R.; ORTUZAR, I.; LEKUE, J.A.; AZNAR, J.M. Genetic Variants and Hamstring Injury in Soccer: An Association and Validation Study. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 50, n. 2, p. 361-368, 2018.
31. LEE, F.X.Z.; HOUWELING, P.J.; NORTH, K.N.; QUINLAN, K.G.R. How does α -actinin-3 deficiency alter muscle function? Mechanistic insights into ACTN3, the ‘gene for speed’. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**. v. 1863, n. 4, p. 686-693, 2016.

32. LING, P.R.; SCHWARTZ, J.H.; BISTRAN, B.R. Mechanisms of host wasting induced by administration of cytokines in rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism** v.272, n.3, p.333-339, 1997.
33. LLOVERA, M.; GARCIA-MARTINEZ, C.; LOPEZ-SORIANO, J.; CARBO, N.; AGELL, N.; LOPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILES, J.M. Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.142, n.1-2, p.183-189, 1998.
34. MACARTHUR, D.G.; NORTH, K.N.; A gene for speed? The evolution and function of alpha-actinin-3. **Bioessays**. v. 26, p. 786-795, 2004.
35. MATHENY, R.W.; NINDL, B.C.; ADAMO, M.L. Minireview: Mechano-growth factor: A putative product of IGF-I gene expression involved in tissue repair and regeneration. **Endocrinology**, v.151, n.3, p.865-875, 2010.
36. MEDVEDEV, A.E.; SABROE, I.; HASDAY, J.D.; VOGEL, S.N. Tolerance to microbial tlr ligands: Molecular mechanisms and relevance to disease. **Journal of Endotoxin Research**, v.12, n.3, p.133-150, 2006.
37. MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**. v. 16 n. 3, p. 1215, 1988.
38. 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. **Human Molecular Genetics**. v. 10, p. 1335-1346, 2001.
39. MOREIRA, O.C.; TEODORO, B.G.; DE OLIVEIRA, C.E.P.; de Moura, B.P. Influência da prática de exercícios físicos no eixo gh/igf. **Arquivo de Ciências da Saúde UNIPAR**, v. 114, n. 3, p. 277-283, 2010.
40. NIEMAN, D.C. Marathon training and immune function. **Sports Medicine**. v.37, n.4-5, p.412-415, 2007.
41. NORTH, K.N.; YANG, N.; WATTANASIRICHAIGOON, D.; MILLS, M.; EASTEAL, S.; BEGGS, A.H. A common nonsense mutation results in alphaactinin-3 deficiency in the general population. **Nature Genetics**. v. 21, p. 353-354, 1999.
42. NOSAKA, K.; NEWTON, M.J.; SACCO, P. Attenuation of Protective Effect Against Eccentric Exercise-Induced Muscle Damage, **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.30, n.5, p.529-542, 2005.
43. ORYSIAK, J.; TRIPATHI, J.K.; BRODACZEWSKA, K.; SHARMA, A.; WITEK, K.; SITKOWSKI, D.; MALCZEWSKA-LENCZOWSKA, J. The impact of physical training on neutrophil extracellular traps in young male athletes - a pilot study. **Biology of Sport**. v.38, n.3, p. 459-464, 2020.
44. PEAKE J.M.; DELLA GATTA, P.A.; SUZUKI, K.; NIEMAN, D. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. **Exercise Immunology Review**, v.21, p.8-25, 2015.

45. PEAKE, J.M.; NEUBAUER, O.; DELLA GATTA, P.A.; NOSAKA, K. Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. **Journal of Applied Physiology**. v. 122, p. 559–570, 2017.
46. PENCE, B.D. & YARBRO, J.R. Aging impairs mitochondrial respiratory capacity in classical monocytes. **Experimental gerontology**, v. 108, p. 112–117, 2018.
47. PEDERSEN, B.K.; FEBBRAIO, M. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiology Review**, v. 88, p. 1379-1406, 2008.
48. PICKERING, C.; KIELY J. ACTN3: More than just a gene for speed. **Frontiers in Physiology**. v. 8, a. 1080, 2017.
49. PICKERING, C.; SURACI, B.; SEMENOVA, E.A. et al. A Genome-Wide Association study of sprint performance in elite youth football players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.33, n.9, p.2344-2351, 2019.
50. PIMENTA, E.M.; COELHO, D.B.; CRUZ, I.R. *et al.* The ACTN3 genotype in soccer players in response to acute eccentric training. **European Journal of Applied Physiology**. v. 112, p. 1495–1503, 2012.
51. PIMENTA, E.M.; COELHO, D.B.; VENEROSO, C.E. et al. Effect of ACTN3 gene on strength and endurance in soccer players. **Journal of Strength and Conditioning Research**. v. 27, n. 12, p.3286-3292, 2013.
52. PRUNA, R.; ARTELLS, R.; LUNDBALD, M.; MAFFULLI, N. Genetic biomarkers in non-contact muscle injuries in elite soccer players. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**. V. 25, p. 3311–3318, 2016.
53. PHUMEETHAN, S.; CHAT-UTHAI, N.; MANAVATHONGCHAI, M.; VIMPRAKASIT, V. Genetic association study of tumor necrosis factor- α with sepsis and septic shock in Thai pediatric patients. **The Journal of Pediatrics**, v.88, p.417-422, 2012.
54. RONSEN, O.; KJELDSEN-KRAGH, J.; HAUG, E.; BAHR, R. Recovery time affects immunoendocrine responses to a second bout of endurance exercise. **American Journal of Cell Physiology**. v.283, n.6, p.1612-1620, 2002.
55. ROSETY-RODRIGUEZ, M.; DIAZ, A.J.; ROSETY, I.; ROSETY, M.A.; CAMACHO, A.; FORNIELES, G.; ROSETY, M.; ORDONEZ, F.J. Exercise reduced inflammation: But for how long after training? **Journal of Intellectual Disability Research**, v.58, p.874–879, 2014
56. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory**, 2001.
57. SANTIAGO, C.; RODRÍGUEZ-ROMO, G.; GÓMEZ-GALLEGO, F. et al. Is there an association between ACTN3 R577X polymorphism and muscle power phenotypes in young, non-athletic adults? **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**. v. 20, n. 5, p. 771-778, 2010.
58. SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLEOD, S.A. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Physical Therapy**. v. 81, p. 1810–1816, 2001.

59. SCHEELE, C.; NIELSEN, S.; PEDERSEN, B. ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 95-99.
59. SETO, J.T.; LEK, M.; QUINLAN, K.G. et al. Deficiency of α -actinin-3 is associated with increased susceptibility to contraction-induced damage and skeletal muscle remodeling. **Human Molecular Genetics**. v. 20: p. 2914–2927, 2011.
60. SETO, J.N.; ROESZLER, K.N.; MEEHAN, L.R. et al. ACTN3 genotype influences skeletal muscle mass regulation and response to dexamethasone. **Science Advances**. v.7, n.27, p. eabg0088, 2021.
61. SOMERS, D.J.; FREY, T.A.; LEHMAN, H.L. The science behind the ACTN3 polymorphism. **CourseSource**. v. 6, p. 1-4, 2019.
62. SONG, Y.H.; SONG, J.L.; DELAFONTAINE, P.; GODARD, M.P. The therapeutic potential of IGF-I in skeletal muscle repair. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.24, n.6, p.310–319, 2013.
63. SOUGLIS, A.G.; PAPAPANAGIOTOU, A.; BOGDANIS, G.C.; TRAVLOS, A.K.; APOSTOLIDIS, N.G.; GELADAS, N.D. Comparison of inflammatory responses to a soccer match between elite male and female players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.29, n.5, p.1227–1233, 2015.
64. STEWART, C.E.; NEWCOMB, P.V.; HOLLY, J.M.P. Multifaceted roles of TNF- α in myoblast destruction: a multitude of signal transduction pathways. **Journal of Cellular Physiology**, v.198, n.2, p.237–247, 2004.
65. STØLEN, T.; CHAMARI, K.; CASTAGNA, C.; WISLØFF, U. Physiology of soccer. **Sports medicine**, v.35, n.6, p.501–536, 2005.
66. SYU, G.D.; CHEN, H.I.; JEN, C.J. Acute severe exercise facilitates neutrophil extracellular trap formation in sedentary but not active subjects. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 45, p. 238–244, 2013.
67. TIAINEN, K.; THINGGAARD, M.; JYLHÄ, M.; BLADBJERG, E.; CHRISTENSEN, K.; CHRISTIANSEN, L. Associations between inflammatory markers, candidate polymorphisms and physical performance in older Danish twins. **Experimental Gerontology**, v.47, n.1, p.109–115, 2012.
68. TOMASZEWSKI, M.; CHARCHAR, F.J.; PRZYBYCIN, M.; et al. Strikingly low circulating CRP concentrations in ultramarathon runners independent of markers of adiposity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.23, p.1640–1644, 2003.
69. TRECROCI, A.; PERRI, E.; LOMBARDI, G.; BANFI, G.; DEL VESCOVO, R.; ROSA, E.M.; ALBERTI, G.; IAIA, F.M. Perceptual and Biochemical Responses in Relation to Different Match-Day +2 Training Interventions in Soccer Players. **Frontiers in physiology**, v. 12, 685804, 2021.
70. VINCENT, B.; WINDELINCKX, A.; NIELENS, H. *et al.* Protective role of α -actinin-3 in the response to an acute eccentric exercise bout. **Journal of Applied Physiology**. v. 109, p. 564–573, 2010.

71. WANG, J SHANER, N, MITTAL, B, *et al.* Dynamics of Z-band based proteins in developing skeletal muscle cells. **Cell Motility and the Cytoskeleton**. v. 61, p. 34–48, 2005.
72. 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. **American Journal of Human Genetics**. v. 73, p. 627–631, 2003.
73. YANG, J.; ZHANG, L.; YU, C.; YANG, X.F.; WANG H. Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v. 2, n.1, p.1, 2014.
74. ZOUHAL, H.; COSO, JD.; JAYAVEL, A. *et al.* Association between ACTN3 R577X genotype and risk of non-contact injury in trained athletes: A systematic review. **Journal of Sport and Health Science**. v. 17, p. 2095-2

Estudo 2 - LETTER TO THE EDITOR: Replicating results using Population-Genetics Approach Based on the 1000 Genomes Database and another Elite Soccer Players.

* Carta ao editor publicada no periódico Genes (Qualis A1)

<https://www.mdpi.com/2073-4425/14/7/1446>

Replication, validation, and confirmation are important aspects for the quality and applicability of results from genetic association studies(1). The replication of positive findings favors the validity of genotype-phenotype associations, avoiding biases. For this, it is essential to observe aspects such as: the same analysis method, same genetic variants, same definition of the phenotype, same ethnic/admixed group and the use of independent but similar data sets (2,3).

Thus, we have performed the same analysis to the one previously published in IJSP(4), in fourty-four Under-20 years professional athletes from another Brazilian first division soccer club (U20_BFDSC) compared to genomes from 1000genomes database. A “genetic distance approach” of SNP panel based on wright’s statistics was applied alternatively to traditional analyzes from genetic association studies that use SNPs individually.

Close results were observed. U20_BFDSC were more like the European and American populations as well as BFDSC (Figure 1A), but clustered far from African and east Asian populations. No statistically significant Genetic Molecular Variances (Fst) ($p=0.5$) were obtained between U20_BFDSC and BFDSC and they remained closed in phylogenetic tree (Figure 1B). Larger Fst rates were observed respectively when distance matrices based on U20_BFDSC genotypes were compared to East Asian and African populations (Table 1). The study was approved by the Local Ethical Committee for Human Experiments (76189817.0.0000.5235 and 69253417.1.0000.5149) according to the Declaration of Helsinki.

Our results suggest that genetic distance approach based on 10 performance related SNPs panel and Fst, compared to 1000genomes were replicable in similar but independent populations of soccer players. This is particularly difficult to achieve in admixed populations due to their heterogeneity(5,6). Thus, our replicating results indicate one more time a possible selective pressure on performance related genes of elite soccer players, possibly related simultaneously to physical performance, environmental, cognitive, and sociocultural aspects.

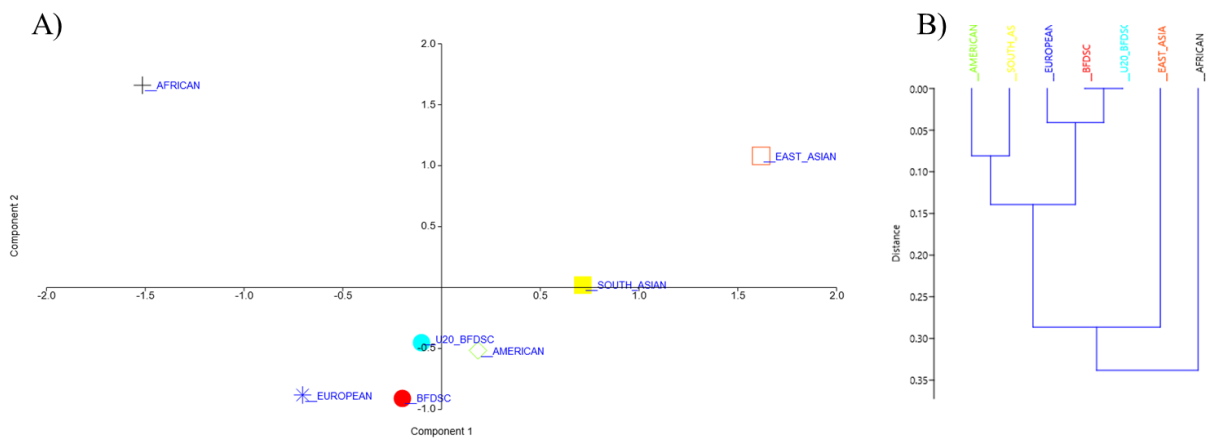


Figure 1 -A: Principal component analysis regarding the distance matrix of molecular variance (F_{st}) values of continental populations from 1000 Genomes in comparison with U20_BFDSC and BFDSC. B: Phylogenetic tree (UPGMA model) regarding the distribution of genetic distance from genotypes of the SNPs selected from U20_BFDSC, BFDSC and continental populations from 1000 Genomes. U20 indicates under 20 years; BFDSC indicates Brazilian first division soccer club; SNPs, single nucleotide polymorphisms.

Table 1 - F_{st} Values for Comparisons Among Groups of Populations From 1000 Genomes Database and U20_BFDSC.

| | U20 | BFDSC | <i>P</i> |
|-------------|---------|-------|----------|
| U20_BFDSC | | * | |
| BFDSC | <0.001 | | 0.5 |
| AFRICAN | 0.10125 | | <0.00001 |
| AMERICAN | 0.03097 | | <0.00001 |
| EAST_ASIAN | 0.13803 | | <0.00001 |
| EUROPEAN | 0.01534 | | <0.00001 |
| SOUTH_ASIAN | 0.07152 | | <0.00001 |

References

1. König IR. Validation in genetic association studies. *Brief Bioinform.* 2011;12(3):253–8.
2. Gruber PJ. Genetic association studies: Is non-replication failure or progress? *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2019 Jun;157(6):e399–400. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2019.02.025>
3. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS, de Vries J, Okada Y, Martin AR, et al. Genome-wide association studies. *Nat Rev Methods Prim* [Internet]. 2021 Dec 26;1(1):59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s43586-021-00056-9>
4. Monnerat G, Maior AS, Tannure M, Back LKFC, Santos CGM. Single-Nucleotide-Polymorphism-Panel Population-Genetics Approach Based on the 1000 Genomes Database and Elite Soccer Players. *Int J Sports Physiol Perform* [Internet]. 2019 Jul

1;14(6):711–7. Available from:
<https://journals.humankinetics.com/view/journals/ijsp/14/6/article-p711.xml>

5. Hellwege JN, Keaton JM, Giri A, Gao X, Velez Edwards DR, Edwards TL. Population Stratification in Genetic Association Studies. *Curr Protoc Hum Genet.* 2017;95(1):1.22.1-1.22.23.
6. Ioannidis JPA, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* [Internet]. 2001 Nov 15;29(3):306–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng749z>

Estudo 3 - Perfil poligênico e a magnitude das respostas inflamatórias em jogadores de futebol.

*Artigo será submetido no periódico *Biology of Sport* (Qualis A2)

https://www.termedia.pl/Journal/Biology_of_Sport-78

Resumo

A prática do futebol envolve a realização de ações de intensidade elevada, as quais demandam grande geração de força excêntrica, que por sua vez resultam em aumento da resposta inflamatória após treinamentos e jogos. O objetivo do estudo, foi investigar, individualmente e de maneira combinada, a associação de 28 polimorfismos com as respostas inflamatórias de atletas de futebol. A amostra foi composta por 47 atletas de futebol do sexo masculino da categoria sub-20 que fazem parte de clubes da primeira divisão do futebol brasileiro. Foram coletadas amostras de sangue nos momentos Pré, 3, 24 e 48 horas após a sessão de treinamento para avaliar as respostas inflamatórias (análises hematológicas (hemograma), creatinofosfoquinase (CK), proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade (PCR), fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina 6 (IL-6) e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1)). O DNA foi obtido através de raspado de células bucais, onde um swab estéril foi friccionado na lateral interna da boca de cada participante por 6 vezes. As bibliotecas foram construídas utilizando-se o kit TruSeq DNA PCRFree (Illumina®) e o equipamento Covaris para cisalhamento do DNA genômico (gDNA) por ultrassom. Dos SNPs analisados, 9 (*ACTN3* rs1815739, *COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795, *MMP3* rs679620, *SLC30A8* rs13266634, *SOX15* rs4227) foram individualmente associados com biomarcadores e 7 SNPs (*COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *COL5A1* rs1800012, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795 e *MMP3* rs679620) analisados de maneira combinada, explicaram de 16% a 40% da variação das respostas inflamatórias em atletas de futebol. Os resultados sugerem que o perfil genotípico pode ser levado em consideração para uma distribuição da carga de treinamento mais individualizada assim como na elaboração de estratégias de recuperação para atletas de alto nível entre sessões de treinamento e jogos de alta demanda física e fisiológica.

Palavras-chave: Polimorfismo, Genótipo, Futebol, Inflamação

Introdução

O futebol é um esporte caracterizado por ações intermitentes de alta intensidade e curta duração, intercaladas com períodos curtos de recuperação [1,2]. Tem sido sugerido que aproximadamente 80-90% das ações em um jogo de futebol ocorrem em intensidade baixa ou moderada enquanto os 10-20% restantes são ações em alta intensidade [1,3,4]. Embora as ações intensas representem um baixo percentual em relação ao total de ações em uma partida de futebol, geralmente elas estão associadas aos momentos mais determinantes e contribuem diretamente para resultado do jogo [5,6]. Drust *et al.* [7], encontraram um valor médio de 19 sprints durante uma partida os quais ocorriam a cada 4-5 minutos. Em um estudo analisando ações intensas de curta duração, Castagna *et al.* [8], verificaram que jogadores de futebol profissional percorrem em média 635m acelerando e 611m desacelerando em alta intensidade ($>2\text{m/s}^2$) e 214m acelerando e 209m desacelerando em intensidade muito elevada ($>3\text{m/s}^2$). Dessa forma, nota-se que a prática do futebol envolve a realização de ações de intensidade elevada, as quais demandam grande geração de força excêntrica, que por sua vez está relacionada com alterações morfofuncionais do aparato muscular [9], resultando em aumento do dano muscular e da resposta inflamatória após treinamentos e jogos.

Várias investigações revelaram que estas ações que demandam contrações excêntricas não habituais, durante as quais o músculo é alongado enquanto está ativo, podem provocar grande perda de força, níveis de dor mais elevados e aumento das concentrações sanguíneas de biomarcadores inflamatórios em comparação com as contrações concêntricas ou isométricas [10-14]. Estas contrações estão fortemente associadas a danos na musculatura esquelética que consistem em ruptura estrutural dos sarcômeros, distúrbios no acoplamento excitação-contração e sinalização de cálcio, levando a uma resposta inflamatória mais elevada e a ativação de vias de degradação da proteína muscular [2,15].

Publicações recentes têm mostrado que fatores genéticos têm uma grande influência não só sobre componentes do desempenho atlético, mas também na ativação e resolução da inflamação, na regeneração do tecido muscular e outros fenótipos [15-18]. Diferenças na atividade gênica específica de alguns polimorfismos genéticos de nucleotídeo único (SNP), resultam em diferentes expressões de diversas proteínas envolvidas na cascata inflamatória, o que pode influenciar a suscetibilidade ao dano muscular induzido pelo exercício [15,19]. Indivíduos que apresentam alta resposta inflamatória induzida pelo exercício podem ter uma maior predisposição a lesões [20,21]. Este princípio pode explicar em parte, a razão pela qual

atletas pertencentes a um elenco apesar de possuírem rotinas de treinamento semelhantes, respondem com alto índice de lesões musculares induzidas pelo exercício. Dessa forma, considerando que múltiplos fatores ambientais, fisiológicos e psicológicos influenciam na formação do atleta [21], entre os esportistas do mais alto nível competitivo, onde o meio que estão inseridos é muito semelhante, pode ser que o perfil genômico característico da variação interindividual seja um fator de diferenciação entre atletas [22].

A pré-disposição a lesões musculares e outros fenótipos como o status de força/potência de atletas são aceitos como sendo de natureza poligênica - isto é, múltiplos fatores genéticos influenciam o fenótipo observado [17,23,24]. Por exemplo, Larruskain *et al.* [17], através de um modelo de fragilidade multivariado de Cox, demonstraram que um perfil poligênico (composto por variações nos genes MMP3, TNC, IL6, NOS3 e HIF1A) foi significativamente associado ao risco de lesão aumentado na musculatura posterior da coxa. Uma revisão recente forneceu evidências de que pelo menos 69 fenótipos genéticos estão ligados ao status de atleta de elite [25]. Destes, 11 polimorfismos (*AGT* rs699, *ACTN3* rs1815739, *CKM* rs8111989, *CNTFR* rs41274853, *GBF1* rs2273555, *HIF1A* rs11549465, *MLN* rs12055409, *MTHFR* rs1801131, *PPARG* rs1801282, *PPARGCIA* rs8192678 e *ZNF608* rs4626333) demonstraram estar associados à capacidade de produção de força em atletas [26-33].

Os perfis genéticos para lesões musculares e ligamentares foram analisados obtendo-se informações sobre a incidência de lesões musculares, grau e tempo estimado de recuperação [17,34-35]. Alguns estudos [36,37] têm encontrado associações entre SNP dos genes de proteínas da cascata inflamatória com diversas doenças, no entanto, muito pouco se sabe sobre a potencial associação genética com a resposta inflamatória decorrente da prática esportiva [15]. Dessa forma, a identificação de genes que possam influenciar nos níveis de moléculas pró e anti-inflamatórias e pró-regenerativas pode auxiliar a elucidar os fatores e mecanismos relacionados ao processo inflamatório [38]. Além disso, a genotipagem pode ser uma peça importante do modelo de lesão multifatorial, ou seja, a informação genética pode ser utilizada em conjunto com todos os demais fatores de risco para identificar aqueles atletas com alto risco de lesão e individualizar estratégias preventivas, incluindo o controle de carga [39,40].

Vale ressaltar, que a avaliação isolada de um SNP, sem considerar sua interação com genótipos de outros mediadores, pode conduzir a interpretações equivocadas, uma vez que a ação combinada dos mesmos pode resultar em efeitos diferenciados [15,17]. Portanto, os

estudos de associações de fatores genéticos com respostas inflamatórias, devem buscar avaliações mais amplas no contexto genômico, possibilitando assim, melhores interpretações a respeito dessas associações. Entretanto, até o momento, nenhum estudo tentou quantificar o impacto de variantes genéticas combinadas nas respostas inflamatórias em atletas de alto rendimento. O objetivo do presente estudo, portanto, foi investigar, individualmente e de maneira combinada, a associação de 28 polimorfismos previamente identificados com fenótipos relacionados à inflamação decorrentes da prática esportiva com as respostas inflamatórias de atletas de futebol.

Métodos

Cuidados éticos

Esse estudo respeitou todas as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde (Resolução 466/12) envolvendo pesquisas com seres humanos e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (69253417.1.0000.5149). Todos os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa foram devidamente repassados aos voluntários anteriormente à sua assinatura do termo de consentimento para a participação no estudo.

Amostra

A amostra foi composta por 44 atletas de futebol do sexo masculino da categoria sub-20 e com pelo menos 6 anos de experiência em treinamentos sistematizados de futebol. Os atletas fazem parte de clubes da primeira divisão do futebol brasileiro e disputam competições organizadas e/ou reconhecidas pela Confederação Brasileira de Futebol (CBF).

Procedimentos

O estudo foi realizado na terceira semana da pré-temporada dos times participantes. Essa escolha foi feita para que os atletas estejam com condicionamento físico equalizado e para que não haja uma possível resposta inflamatória muito discrepante da situação real em caso de atletas em destreinamento em função do período de férias anterior ao estudo.

No primeiro dia do estudo para caracterizar as amostras, os sujeitos foram submetidos a uma avaliação física, na qual a massa corporal, altura e dobras cutâneas foram medidas para calcular o percentual de gordura [41]. No mesmo dia foi realizada a primeira coleta sanguínea que foi utilizada para a extração do DNA genômico. Os valores máximos de consumo de oxigênio (VO₂max) foram obtidos através de uma avaliação realizada duas semanas antes do início do estudo utilizando o teste de campo *YoYo Endurance Test* nível 2 [1]. Os sujeitos

foram genotipados para o gene do ACTN3 e depois divididos em grupos de acordo com seu genótipo (Tabela 1).

Tabela. 1- Características da Amostra.

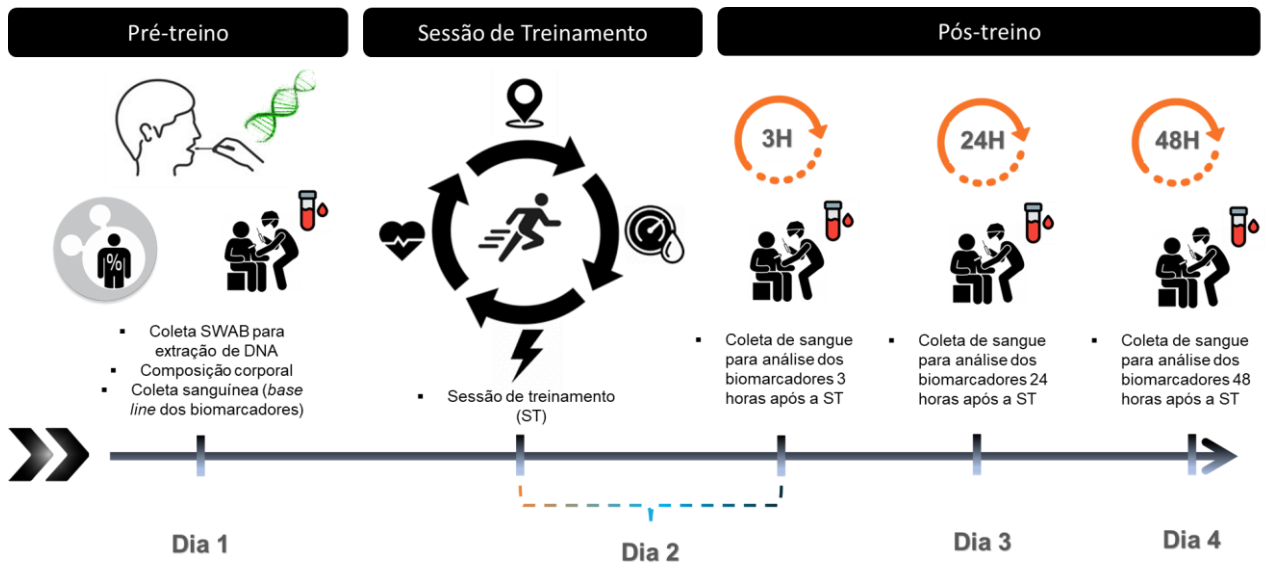
| | Média ± DP | Mínimo | Máximo |
|--|-------------|--------|--------|
| Idade (Anos) | 19 ± 1 | 18 | 20 |
| Peso (kg) | 75,4 ± 8,6 | 65,4 | 91,0 |
| Estatura (cm) | 176,1 ± 7,1 | 167,3 | 193,0 |
| Percentual Gord (%) | 10,4 ± 2,3 | 6,4 | 14,9 |
| VO2 máx (mL.kg. ⁻¹ .min ⁻¹) | 56,8 ± 4,4 | 49,6 | 66,9 |

Legenda: m= metros; °C= graus Celsius; %FC= percentual da frequência cardíaca máxima. Os dados estão apresentados em média ± DP, mínimo e máximo. Os dados estão apresentados em média ± DP, mínimo e máximo de cada variável.

Após a caracterização da amostra, no segundo dia do estudo, foi realizada a segunda coleta de sangue para a obtenção do *base line* dos biomarcadores inflamatórios e após uma hora, deu-se início a sessão de treinamento. Ainda no segundo dia do estudo, três horas após o treinamento, foi realizada a terceira coleta sanguínea para análise dos biomarcadores. A quarta coleta de amostras de sangue foi realizada no dia seguinte (dia 3), 24 horas após o término da sessão de treinamento. Finalmente, 48 horas após o treinamento (dia 4), a quarta e última amostra de sangue foi coletada.

Durante o estudo, desde os procedimentos de caracterização da amostra até o momento 48 horas após a sessão de treinamento, os sujeitos foram acomodados nas instalações do clube, onde todas as refeições seguiram a orientação de um nutricionista esportivo. Os participantes não estavam tomando nenhum medicamento ou suplemento dietético com ação anti-inflamatória por pelo menos 2 semanas antes do estudo. Atletas aptos a realizarem o treinamento, mas ainda em processo de recuperação de lesões recentes foram excluídos da amostra, pois esses são constantemente submetidos a tratamentos e protocolos de recuperação que alteram as respostas inflamatórias. A figura 1 ilustra o desenho experimental do presente estudo.

Fig. 1- Desenho Experimental.



Fonte: Elaboração própria.

Protocolo de treinamento

Os sujeitos estavam familiarizados com o treinamento proposto [42], mas não realizavam estes tipos de exercícios pelo menos 1 mês antes do estudo, embora estivessem treinando regularmente durante 2 semanas, tendo participado de pelo menos 7 sessões de treinamento por semana, realizando tanto exercícios cardiovasculares quanto de resistência. Após os exercícios de aquecimento, os atletas foram divididos aleatoriamente e fizeram, por duas vezes, um circuito composto por cinco estações com exercícios intermitentes combinando saltos, mudanças de direção, acelerações e desacelerações. A permanência em cada estação tinha a duração de 3 minutos com intervalos de 30 segundos para a mudança da estação. As atividades eram realizadas em velocidade máxima e acompanhadas de incentivos verbais por parte dos treinadores. O tempo total de duração do treinamento foi de 45 minutos. A análise da carga da sessão de treinamento foi realizada pelo registro da frequência cardíaca (FC) e outras variáveis como a distância total percorrida e ações em alta intensidade. Essas variáveis, foram registradas através de dispositivos de GPS integrados com a frequência cardíaca da marca Polar (Polar Team Pro®, Finlândia). As condições ambientais (temperatura e umidade relativa do ar) de todo o treinamento foram registradas através do Termo-higrômetro digital (Instrutherm® HT-260). Os dados referentes a demanda física da sessão e as condições ambientais do treinamento estão na Tabela 2.

Tabela. 2 - Demanda Física e Condições Ambientais da Sessão de Treinamento.

| Variáveis | Média ± DP | Mínimo | Máximo |
|------------------------------------|-------------|--------|--------|
| Distância (m) | 3,102±166,2 | 2,702 | 3,377 |
| Distância em alta intensidade (m) | 160,6±37,3 | 86,5 | 270,0 |
| Sprints | 20±5 | 13 | 31 |
| Acelerações em alta intensidade | 61±7 | 50 | 72 |
| Desacelerações em alta intensidade | 52±9 | 30 | 72 |
| Total de ações em alta intensidade | 132±18 | 90 | 175 |
| % FC | 79,8±3,4 | 75,5 | 90,2 |
| Temperatura (°C) | 26 | - | - |
| Umidade Relativa do Ar | 68% | - | - |

Legenda: m= metros; °C= graus Celsius; %FC= percentual da frequência cardíaca máxima. Os dados estão apresentados em média ± DP, mínimo e máximo.

Coleta de amostras sanguíneas e de raspado bucal

As coletas de sangue foram realizadas nos momentos de caracterização da amostra, pré-treino, 3, 24 e 48 horas após o treinamento e para análise das respostas inflamatórias, foram utilizados os valores máximos obtidos para cada marcador em suas respectivas cinéticas. Em cada coleta, foram colhidos de cada atleta 4mL de sangue em tubo EDTA (catálogo: 454036 – Greiner®), e 24mL (seis tubos) de soro (catálogo: 454071 – Greiner®). As amostras de EDTA foram refrigeradas a 4°C, e as amostras sorológicas foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos e refrigeradas a 4°C.

Para a coleta de raspado de células bucais, um swab estéril foi friccionado na lateral interna da boca de cada participante por 6 vezes, após ele permanecer por pelo menos 30 min sem ingerir alimentos sólidos.

Análises hematológicas e bioquímicas

Nas amostras colhidas em tubo EDTA foram realizadas as análises hematológicas (hemograma). Nas amostras de soro foram realizadas as análises dos biomarcadores: creatinofosfoquinase (CK), proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade (PCR), fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina 6 (IL-6) e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1). O hemograma foi obtido por contagem celular automatizada através de citometria de realizada pelo equipamento Série-XN® da marca Roche (Roche

Laboratórios, Brasil). A CK foi mensurada através do método cinético ultravioleta e a PCR por turbidimetria, para ambos os métodos foi utilizado o analisador Atellica® Solution (Siemens Healthineers, Brasil). As citocinas (TNF α e IL-6) e o IGF-1 foram quantificados pelo analisador Immulite® (Siemens Healthineers, Brasil) através dos métodos de quimiluminescência e radioimunoensaio, respectivamente.

Genotipagem

O material genético foi extraído dos swabs utilizando a técnica de beads magnéticas com o kit MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit (catálogo: A36570, Thermo Fisher®), segundo instruções do fabricante. As amostras foram eluídas com 50 μ L de tampão de eluição e congeladas à -80°C até a realização do sequenciamento. Todas as amostras foram avaliadas quanto a qualidade e quantidade de DNA por sistema de eletroforese usando a ferramenta TapeStation (Agilent®).

Sequenciamento de Nova Geração (NSG) do genoma completo

As bibliotecas genômicas foram construídas a partir de 1 μ g de DNA de cada participante utilizando-se o kit TruSeq DNA PCRFree (Illumina®) e o equipamento Covaris para cisalhamento do DNA genômico (gDNA) por ultrassom. A construção da biblioteca começou com a fragmentação do gDNA para se obter fragmentos de ácido nucleico com adaptadores anexados em ambas as extremidades. Cada amostra teve uma combinação única de índice (conjunto exclusivo de sequências no adaptador que permite que os dados sejam atribuídos à amostra indicada). As sequências P5 e P7 dos adaptadores foram complementares aos oligos ligados à superfície da célula de fluxo. Além disso, as sequências RD1 e RD2 SP dos adaptadores foram os primers usados para iniciar o sequenciamento. As bibliotecas foram então misturadas e preparadas para o início do sequenciamento (amplificação clonal em cluster). Cada cluster representa milhares de cópias da mesma fita de DNA em um ponto. A geração de cluster ocorreu em uma célula de fluxo (lâmina de vidro espessa com canais revestidos aleatoriamente com oligos que são complementares aos adaptadores de biblioteca). Após desnaturação, a molécula de fita simples se vira e forma uma ponte por hibridização com o iniciador complementar adjacente. O ciclo de amplificação da ponte foi repetido até que várias pontes fossem formadas. Ocorreu então, o sequenciamento por química de síntese na plataforma NovaSeq 6000 (Illumina, USA) com profundidade média de 44x. O sequenciamento foi previamente analisado em softwares específicos utilizando parâmetros

como número de *reads*, policlonalidade, qualidade das *reads* e histograma de tamanho para avaliação das amostras e controles.

Análise Bioinformática

O mapeamento das *reads* e montagem do genoma baseado na versão GRCh38 do genoma humano foi realizada utilizando a plataforma DRAGEN Germline App v3.7.5. disponível no depósito de arquivos em nuvem *basespace* (Illumina, USA). A partir dos arquivos no formato FastaQ foram obtidos então os arquivos no formato bam contendo o genoma sequenciado, alinhado e montado em relação ao genoma de referência. Para a observação das variantes em relação ao GRCh38, foi realizada a chamada de variantes utilizando-se a ferramenta *DRAGEN™ variant caller* para a obtenção dos arquivos no formato vcf.

Utilizando-se a ferramenta *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (Broad Institute, University of California, USA), foram extraídos os genótipos dos SNPs escolhidos para cada um dos participantes do estudo.

Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas no programa R Studio versão 3.5.2. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado para verificar se as frequências genotípicas estavam em equilíbrio. Posteriormente, foram verificados os pressupostos de normalidade através do teste Kolmogorov-Sminorv. Para a estatística descritiva, foram utilizados os valores mínimos, máximos, média e desvio padrão.

O pacote SNPAssoc [43] foi utilizado para verificar a associação entre um polimorfismo e o fenótipo através de modelos de dominância, codominância, recessividade. Para verificar a associação entre os biomarcadores inflamatórios e os polimorfismos maneira combinada, foi utilizada a regressão linear múltipla. O coeficiente de determinação (R^2) ajustado foi usado como medida da variância explicada. Para avaliar o efeito das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes foi utilizado o tamanho de efeito f^2 , classificado como pequeno ($0.02 < f^2 \leq 0.15$), médio ($0.15 < f^2 < 0.35$) e grande ($f^2 > 0.35$) [44,45]. A análise de poder post-hoc foi calculada para cada modelo de regressão gerado [44,46]. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Resultados

Foram obtidos e avaliados nesse trabalho 28 polimorfismos previamente identificados na literatura com fenótipos relacionados à inflamação decorrentes da prática esportiva. Tabela 03 apresenta a lista dos 28 SNP pré-selecionados e o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizado para verificar sua frequência alélica e distribuição. Apenas dois SNP apresentaram desvio do equilíbrio (*CCL2* rs5857656 e *MMP3* rs 679620).

Tabela. 3 - SNP pré-selecionados e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

| SNP | Equilíbrio de HWE | | |
|---|-------------------|--------------------|-------|
| | Alelos | Frequência alélica | HWE |
| <i>ACTN3</i> rs1815739 | C/T | 61,4 | 1.000 |
| <i>CCL2</i> rs2857656 | G/C | 58 | 0,03* |
| <i>CCL2</i> rs3917878 | C/T | 94,3 | 1.000 |
| <i>CK-M</i> rs1803285 | C/A | 98,9 | 1.000 |
| <i>COL1A1</i> rs1800012 | C/A | 86,4 | 1.000 |
| <i>COL5A1</i> rs12722 | C/T | 65,9 | 0,74 |
| <i>COL5A1</i> rs3196378 | C/A | 67,4 | 0,49 |
| <i>EMILIN1</i> rs2289360 | T/C | 54,5 | 0,36 |
| <i>HGF</i> rs5745697 | G/T | 90,9 | 0,29 |
| <i>HIF1A</i> rs11549465 | C/T | 95,5 | 1.000 |
| <i>IGF1</i> rs35767 | G/A | 72,7 | 0,25 |
| <i>IGF2</i> rs3213221 | C/G | 53,4 | 0,77 |
| <i>IL-1</i> rs1143634 | G/A | 79,5 | 0,66 |
| <i>IL-6</i> rs1800795 | G/C | 73,9 | 0,13 |
| <i>LIN28A</i> rs6598964 | G/A | 75 | 0,70 |
| <i>MLC</i> rs2700352 | G/A | 80,7 | 1.000 |
| <i>MMP3</i> rs591058 | C/T | 71,6 | 0,46 |
| <i>MMP3</i> rs650108 | G/A | 61,4 | 0,35 |
| <i>MMP3</i> rs679620 | C/T | 64,8 | 0,04* |
| <i>SLC26A10</i> rs11613457 | G/A | 98,9 | 1.000 |
| <i>SLC30A8</i> rs13266634 | C/T | 84,1 | 0,57 |
| <i>SOD</i> rs4880 | A/G | 50 | 1.000 |
| <i>SOX15</i> rs4227 | T/G | 61,4 | 1.000 |
| <i>SPPI</i> rs28357094 | T/G | 87,5 | 0,51 |
| <i>TNC</i> rs2014772 | C/T | 76,1 | 0,68 |
| <i>TNFα</i> rs1800629 | G/A | 95,5 | 1.000 |
| <i>TRIM63</i> rs2275950 | A/G | 81,8 | 0,61 |
| <i>VEGFA</i> rs2010963 | G/C | 55,7 | 0,77 |

Legenda: SNP= polimorfismo; HWE= equilíbrio de Hardy-Weinberg; *SNP fora do HWE.

A associação entre genótipos e fenótipos foi verificada a partir dos valores máximos obtidos em cada biomarcador sanguíneo e os SNP de maneira individual e combinada, gerando modelos de codominância; com exceção do polimorfismo da *ACTN3* com o qual foi gerado um modelo de recessividade. Dos SNP analisados, 9 (*ACTN3* rs1815739, *COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795, *MMP3* rs679620, *SLC30A8* rs13266634, *SOX15* rs4227) foram associados com biomarcadores (tabela 4).

Tabela. 4 – SNPs individualmente associados com biomarcadores.

| SNP | Biomarcador | Modelo | N | Média ± EP | p | AIC |
|---------------------------|--------------|---------|----|-----------------|------|-------|
| <i>ACTN3</i> rs1815739 | IGF1 | R/R R/X | 38 | 19,18 ± 1,01 | 0,02 | 286,3 |
| | | X/X | 6 | 13 ± 1,51 | | |
| <i>COL5A1</i> rs12722 | Neutrófilos | C/C | 18 | 4860 ± 399,6 | 0,02 | 765,6 |
| | | C/T | 22 | 3679 ± 243,5 | | |
| | | T/T | 4 | 3373 ± 319,5 | | |
| | IL6 | C/C | 18 | 4,33 ± 0,39 | 0,02 | 271,9 |
| | | C/T | 22 | 4,23 ± 0,37 | | |
| | | T/T | 4 | 12,35 ± 4,10 | | |
| <i>COL5A1</i> rs3196378 | IL-6 | C/C | 18 | 4,32 ± 0,40 | 0,01 | 262,9 |
| | | C/A | 22 | 4,22 ± 0,43 | | |
| | | A/A | 3 | 15,10 ± 3,72 | | |
| <i>HGF</i> rs5745697 | Neutrófilos | G/G | 37 | 3866 ± 199,8 | 0,01 | 761,0 |
| | | G/T | 6 | 5971 ± 743,6 | | |
| | | T/T | 1 | 3048 ± 0 | | |
| <i>IGF1</i> rs35767 | TNF α | C/C | 25 | 7,91 ± 0,26 | 0,01 | 236,9 |
| | | C/T | 14 | 8,63 ± 0,41 | | |
| | | T/T | 5 | 15,76 ± 4,46 | | |
| <i>IL-6</i> rs1800795 | Monócitos | G/G | 26 | 432,62 ± 21,36 | 0,04 | 556,3 |
| | | C/G | 13 | 469,90 ± 39,75 | | |
| | | C/C | 5 | 588,10 ± 78,15 | | |
| | CK | G/G | 26 | 384,30 ± 31,79 | 0,01 | 597,5 |
| | | C/G | 13 | 433,72 ± 69,52 | | |
| | | C/C | 5 | 698,81 ± 119,34 | | |
| <i>MMP3</i> rs679620 | Monócitos | C/C | 15 | 432,13 ± 23,23 | 0,04 | 556,2 |
| | | T/C | 27 | 491,2 ± 27,98 | | |
| | | T/T | 2 | 277,00 ± 9,00 | | |
| <i>SLC30A8</i> rs13266634 | PCR | G/G | 27 | 1,34 ± 0,25 | 0,01 | 164,5 |
| | | A/G | 16 | 1,84 ± 0,44 | | |
| | | A/A | 1 | 5,30 ± 0 | | |
| <i>SOX15</i> rs4227 | IGF1 | T/T | 16 | 16,12 ± 1,5 | 0,01 | 283,2 |
| | | G/T | 22 | 21,14 ± 1,32 | | |
| | | G/G | 6 | 14,00 ± 0,37 | | |

Legenda: SNP= polimorfismo. Os dados estão apresentados em média ± erro padrão (EP).

Sete SNPs (*COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *COL5A1* rs1800012, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795 e *MMP3* rs679620) em combinação, explicaram de 16% a 40% da variação das respostas inflamatórias em atletas de futebol (tabela 5). Os SNPs *HGF* rs5745697, *COL5A1* rs12722 e *COL5A1* rs3196378 explicaram juntos, 22% da variação da atividade dos neutrófilos ($R^2= 0,22$, $F= 3,37$, $p= 0,01$, $f^2= 0,28$, Poder= 0,81). Em conjunto, os SNPs *IL-6* rs1800795 e *MMP3* rs679620 explicaram 16% da atividade dos monócitos ($R^2= 0,16$, $F= 2,41$, $p= 0,04$, $f^2= 0,19$, Poder= 0,71). Os SNPs *COL5A1* rs12722 e *COL5A1* rs3196378 explicaram juntos, 22% da resposta inflamatória através das concentrações de *IL-6* ($R^2= 0,22$, $F= 6,92$, $p< 0,01$, $f^2= 0,28$, Poder= 0,87). Por fim, de maneira combinada, os SNPs *COL1A1* rs1800012 e *IGF1* rs35767 explicaram 88% da expressão de $TNF\alpha$ ($R^2= 0,40$, $F= 4,77$, $p< 0,01$, $f^2= 6,76$, Poder= 0,99).

Tabela. 5 – Análise combinada dos SNPs e biomarcadores.

| Biomarcador | SNPs | R ² ajustado | F | p | f ² | Poder |
|--------------|-------------------------|-------------------------|------|--------|----------------|-------|
| Neutrófilos | <i>HGF</i> rs5745697 | 0,22 | 3,37 | 0,01 | 0,28 | 0,81 |
| | <i>COL5A1</i> rs12722 | | | | | |
| | <i>COL5A1</i> rs3196378 | | | | | |
| Monócitos | <i>IL-6</i> rs1800795 | 0,16 | 2,41 | 0,04 | 0,19 | 0,71 |
| | <i>MPP3</i> rs679620 | | | | | |
| IL-6 | <i>COL5A1</i> rs12722 | 0,22 | 6,92 | < 0,01 | 0,28 | 0,87 |
| | <i>COL5A1</i> rs3196378 | | | | | |
| TNF α | <i>COL1A1</i> rs1800012 | 0,40 | 7,44 | < 0,01 | 0,67 | 0,99 |
| | <i>IGF1</i> rs35767 | | | | | |

Legenda: SNPs= polimorfismos.

Discussão

O objetivo do presente estudo foi verificar a influência de polimorfismos de forma individual e combinada nas respostas inflamatórias após uma sessão de treinamento com predominância de ações excêntricas em atletas de futebol. Em resumo, os resultados mostraram que houve associação significativa entre os polimorfismos *ACTN3* rs1815739, *HGF* rs5745697, *COL5A1* rs12722, *IL-6* rs1800795, *MMP3* rs679620, *SOX15* rs4227, *COL5A1* rs3196378, *IGF1* rs35767 e *SLC30A8* rs13266634 (de maneira individual e combinada) e as respostas inflamatórias em jogadores de futebol após uma sessão de treinamento.

A associação entre os polimorfismos com e os fenótipos no presente estudo, buscou identificar em atletas de futebol, se a magnitude das respostas inflamatórias pode ser

explicada em parte, por fatores genéticos. Por exemplo, já é bem documentado na literatura que fatores genéticos têm influência nas concentrações de citocinas e outros biomarcadores envolvidos na cascata inflamatória e conseqüentemente na ativação e resolução da inflamação [15,17]. Deste modo, a hipótese inicial compreendia que polimorfismos previamente relacionados ao processo inflamatório (individualmente e de maneira combinada), estariam associados a resposta inflamatória em futebolistas. Na presente investigação, dos 28 SNPs analisados, 9 analisados individualmente (*ACTN3* rs1815739, *COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795, *MMP3* rs679620, *SLC30A8* rs13266634, *SOX15* rs4227) e 7 em diferentes combinações (*COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *COL5A1* rs1800012, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795 e *MMP3* rs679620), apresentaram associações significativas com a magnitude da resposta inflamatória.

ACTN3 rs1815739

Nos resultados aqui apresentados, observou-se associação isolada do SNP *ACTN3* rs1815739 com os valores máximos de IGF-1. De todos os polimorfismos que têm sido associados ao dano muscular e respostas inflamatórias induzidas pelo exercício, o mais investigado é o SNP da *ACTN3* R577X [16,18,42,47-49]. North *et al.* [50] identificaram no gene *ACTN3*, a mudança do nucleotídeo C para T na posição 1,747 do exon 16, ou seja, uma mutação resultante na conversão do aminoácido arginina em um stop-codon prematuro no resíduo 577 (R577X) [51]. A variante R577X resulta em duas versões do gene *ACTN3* em humanos, um alelo R funcional e um outro nulo que apresenta o genótipo XX. Os indivíduos homocigotos para o alelo X são incapazes de expressar α -actinina-3, em oposição aos indivíduos que têm o genótipo RX ou RR [52,53]. Curiosamente, os indivíduos com o genótipo *ACTN3* XX compensam a deficiência de α -actinina-3 com uma expressão superior de α -actinina-2 [19]. Já é bem estabelecido na literatura, que o genótipo *ACTN3* XX está associado a um menor volume muscular e menor força muscular [42,48,54]. Além disso, acredita-se que indivíduos que não expressavam a proteína α -actinina-3, demonstraram uma mudança nas propriedades das fibras musculares de contração rápida em direção a um perfil mais oxidativo, menor produção de força muscular, massa muscular reduzida e diâmetro reduzido das fibras tipo IIb [55,56].

Seto *et al.* [19], relataram que como consequência da super compensação de α -actinina-2 em indivíduos homocigotos XX, mais cal sarcina-2 está vinculada a α -actinina-2 e menos calcineurina. A afinidade de ligação de cal sarcina-2, que por sua vez funciona como um

inibidor da ativação da calcineurina, é maior para a α -actinina-2 em comparação com a α -actinina-3 [15]. Dessa forma, um nível mais alto de calcineurina livre é capaz de ativar uma sinalização para um processo miogênico mais lento. Embora as vias dependentes da calcineurina estejam implicadas no crescimento muscular e adaptação à sobrecarga funcional [57,58], as actininas α também interagem diretamente com fatores de sinalização solúveis, fosfatidilinositol3-cinase (PI3K), fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, e fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato [59-61]. Todos estes fatores impulsionam as vias de fluxo descendente que regulam uma série de funções celulares, incluindo o PI3K/Akt/mTOR sinalizando a cascata que regula a síntese proteica, proliferação celular, proteção das células contra a apoptose bem como no aumento da produção de IGF-1 [62,63].

Estes dados sugerem que a deficiência de α -actinina-3 altera a regulação da massa muscular, modificando a nível molecular a sinalização para a síntese e degradação proteica, o que pode influenciar negativamente as adaptações do treinamento e o processo de remodelação do tecido muscular após estímulos de alta demanda física e fisiológica como treinamentos e jogos. Nesse estudo, indivíduos XX para o SNP *ACTN3* rs1815739 apresentaram menores valores de IGF-1 em comparação aos indivíduos que carregam o alelo R. Uma possível explicação para isso, pode ser o aumento da calcineurina circulante em homozigotos XX, o que como citado anteriormente, influencia negativamente a sinalização de diversos processos importantes para o reparo tecidual, incluindo a diminuição das concentrações de IGF-1.

COL5A1 rs12722, COL5A1 rs3196378 & COL1A1 rs1800012

Os colágenos são um grupo de proteínas de matriz extracelular, e são as proteínas mais abundantes nos mamíferos, constituindo cerca de 25% a 35% do conteúdo proteico de todo o corpo. Os colágenos, na forma de fibrilhas alongadas, são encontrados principalmente em tecidos conjuntivos (fibrosos) como tendões, ligamentos e pele, e são abundantes na córnea, cartilagem, osso, vasos sanguíneos, intestino e disco intervertebral [64]. SNPs específicos do gene *COL5A1* (rs12722, rs1800012 e rs3196378) foram associados com a prevalência de lesões ligamentares e tendinosas (por exemplo, tendinopatia/ruptura do tendão de Aquiles e ruptura do ligamento cruzado anterior) [65-67]. Quando estratificada por etnia, a combinação resultados indicaram que o polimorfismo rs12722 foi significativamente associado com lesões de tecido mole em caucasianos, mas não asiáticos [68]. Entretanto, muito pouco se sabe sobre os mecanismos que sustentam essa associação e sobre a potencial associação genética desses SNPs com as respostas inflamatórias em resposta à prática esportiva [69].

Massidda *et al.* [70] identificaram que o genótipo TT para o SNP rs12722 do *COL5A1* aumenta o risco de lesões musculoesqueléticas em jogadores de futebol italianos e outros estudos encontraram relação entre o alelo C e resistência aos danos em tecidos moles [58,59]. Os resultados sugerem que indivíduos que carregam o alelo C possuem um mecanismo de proteção contra o dano muscular. Analisando de maneira isolada, os resultados aqui apresentados, indicaram que indivíduos TT, estimulam menor atividade neutrofílica e valores mais elevados de IL-6 em comparação com indivíduos que carregam o alelo C. Entretanto, para ambos os biomarcadores, a variante rs12722 interagiu significativamente com outros SNPs (*COL5A1* rs3196378 e *HGF* rs5745697) e explicaram juntos 22% das variações nas concentrações de neutrófilos e IL-6 (tabela 5). No presente estudo, o baixo número de casos de indivíduos TT é um fator limitante, sendo necessário novos estudos com uma amostra mais representativa dos genótipos analisados. É possível que o alelo C influencie positivamente nas propriedades do tecido colágeno devido à influência deste SNP na estabilidade do mRNA *COL5A1*, onde o alelo C está associado com uma produção de colágeno tipo V superior ao alelo T e pode contribuir para maiores níveis de resistência à tração e rigidez das fibras de colágeno na musculatura esquelética.

Entretanto, apesar do alelo T ter sido associado com gravidade da lesão musculoesquelética, risco mais elevado de lesões tendinosas e maior risco de lesão do ligamento cruzado anterior (LCA) [70], Hall *et al.* [71] relataram que em atletas que ainda não passaram da puberdade, o alelo C do *COL5A1* rs12722 e os homozigotos CC sofreram relativamente mais lesões musculares e lesões ligamentares, respectivamente, em comparação com indivíduos que carregam o alelo T. O que indica que a associação de fatores genéticos e lesões musculares e ligamentares pode ser dependente do status maturacional do atleta.

Heffernan *et al.* [72], estudaram dois SNPs no gene *COL5A1* (rs12722 C/T e rs3196378 C/A) associados a patologias tendinosas e ligamentares em 1105 participantes atletas de rugby e não atletas. Para rs12722, o genótipo CC protetor contra lesões e o alelo C estavam mais representados em atletas do que não atletas ($p < 0,01$). Da mesma forma, para rs3196378, o genótipo CC e o alelo C eram mais comuns em atletas em comparação com não atletas ($p = 0,02$). De maneira mais expressiva, ao considerar os dois SNPs em conjunto, as combinações de alelos inferidos foram maiores no grupo de atletas (atletas homozigotos CC = 18% e atletas que carregam o alelo C = 43%) do que os não-atletas (não atletas homozigotos CC = 13% e não atletas que carregam o alelo C = 40%; $p < 0,01$) [72]. Esses dados nos indicam que os alelos C, genótipos CC e os haplótipos resultantes de ambos rs12722 e rs3196378

parecem ser vantajosos para atletas podendo fornecer inclusive um efeito protetor contra lesões nos tecidos moles, apesar da exposição ao ambiente de alto risco do esporte de alto rendimento [72,73].

O gene *COL1A1* tem sido frequentemente investigado por seu potencial associação com o risco de lesões musculoesqueléticas, tendíneas e articulares. Estudos sugerem que existem associações do *COL1A1* rs1800012 com lesões articulares crônicas [73]. Especificamente, o raro genótipo TT da variante rs1800012, foi associada à diminuição do risco de lesões agudas, incluindo luxações do ombro [74], rupturas do LCA [75], e rupturas do tecido mole em análise combinada com outros fatores genéticos [75]. Nesse contexto, Wang *et al.* [77], relataram a associação do genótipo rs1800012 TT com risco reduzido de lesões ligamentares e tendinosas relacionadas à prática esportiva. Em contrapartida, o genótipo rs1800012 TT foi associado ao aumento do risco de hérnia de disco lombar em jovens recrutas militares [78]. Além disso, o genótipo GG foi associado à redução do risco de rupturas do LCA sofridas durante a prática de esqui [79]; entretanto, os mecanismos que resultam nessas lesões são propostos para serem diferentes daqueles que resultam em rupturas do LCA sofridas durante atividades terrestres. Em contraste com estas associações, vários estudos não conseguiram associar estas variantes com o risco de lesões músculo-esqueléticas dos tecidos moles [75,80]. No presente estudo o SNP *COL1A1* rs1800012 individualmente não foi associado com nenhum biomarcador, entretanto em conjunto com o SNP IGF1 rs35767, explicaram 40% da expressão de TNF α . A diferença nos resultados dos estudos pode ser explicada pelas diferenças nas populações estudadas, nos níveis de condicionamento físico dos sujeitos e nas modalidades esportivas investigadas. Até o presente momento esse é o primeiro estudo a analisar globalmente tais SNPs e a magnitude das respostas inflamatórias através de biomarcadores sanguíneos.

HGF rs5745697

O fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) desempenha um papel na regulação da proliferação e diferenciação das células satélites [81] e é codificado pelo gene HGF [73]. O HGF ativo está presente dentro da matriz extracelular do músculo [82] e para que haja a migração de células satélites para a musculatura lesionada é necessário que haja a sinalização do HGF com seu receptor (proteína Met) [83]. Devido ao papel específico do HGF em resposta à lesão muscular, ele poderia ser considerado um gene candidato apropriado para associações com as respostas inflamatórias e com lesões decorrentes da prática esportiva. No entanto, até o presente momento, nenhum estudo buscou identificar associações entre SNPs

do gene *HGF* e respostas inflamatórias decorrentes da prática esportiva e apenas um estudo investigou a associação entre os SNPs do gene *HGF* e lesões esportivas [36]. Os autores encontraram nessa investigação, associações entre o SNP *HGF* rs5745697, lesões musculares sem contato e tempo de recuperação em uma amostra de 73 jogadores de futebol de elite. Os resultados demonstraram que atletas portadores do genótipo GG para o SNP rs5745697, tiveram uma taxa de lesões menor em comparação com os portadores do alelo T (8,4 e 12,3/1000 h, respectivamente).

Além disso, o *HGF* rs5745697 foi associado com o tempo de recuperação de lesões musculares, onde jogadores portadores do alelo C do rs5745697 tiveram uma média de ausência em função de lesões de 20,7 dias em comparação com 27,5 dias dos homozigotos TT. Atualmente, há pouca explicação funcional para as associações descritas por Pruna *et al.* [36]. Os autores citam pesquisas anteriores e sugerem que uma interação estabelecida entre o HGF e seu receptor permite a sinalização correta na cascata do processo inflamatório, resultando em proliferação e migração de células satélites, e que a ausência ou redução na atividade do conjunto HGF e seu receptor (Met) leva a um reparo inadequado do tecido muscular esquelético [84]. Além disso, o HGF parece desempenhar um papel importante em relação à interação entre a matriz extracelular das células musculares e a migração de mioblastos [85]. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual SNPs do gene *HGF* podem influenciar lesões musculares em jogadores de futebol permanece pouco claro.

No presente estudo, o SNP *HGF* rs5745697 foi associado (individualmente e em conjunto com outros SNPs (*COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378) com as concentrações sanguíneas de neutrófilos. Os resultados sugerem que indivíduos GG possuem menor atividade dos neutrófilos após uma sessão de treinamento com predominância de ações excêntricas em comparação com indivíduos que carregam o alelo T. Como já citado anteriormente, de maneira conjunta com SNPs do gene *COL5A1*, o *HGF* rs5745697 explicou em 22% a variação nas concentrações sanguíneas de neutrófilos. Uma possível explicação para a relação do HGF e a atividade dos neutrófilos, é a teoria que neutrófilos, monócitos e macrófagos estão envolvidos na limpeza das células mortas e danificadas, e na sinalização das células satélites para começar a diferenciar e reconstruir as fibras musculares danificadas. É importante que esses processos ocorram com precisão para uma regeneração muscular bem-sucedida. Vale salientar que na amostra aqui analisada, foi observado apenas um atleta com genótipo TT para o SNP *HGF* rs5745697, o que limita a interpretação dos dados. Trabalhos futuros devem procurar confirmar estas associações em populações similares com amostras

mais representativas dos genótipos envolvidos, e investigar as consequências moleculares deste e de outros SNPs de *HGF*.

IGF1 rs35767

Já é bem estabelecido na literatura, que o IGF-1 tem um papel fundamental na diferenciação e ativação de células satélites e conseqüentemente nos processos de hipertrofia e reparo do tecido muscular esquelético. O receptor do IGF-1 (IGF1R) é um receptor transmembrana que regula os efeitos do IGF1. Estudos com modelo animal, demonstraram que ratos sem o IGF1R mostram uma redução dramática na massa corporal, indicando a forte influência desse receptor no crescimento e desenvolvimento da massa corporal (mais especificamente, na massa muscular esquelética) [86]. Ben-Zaken *et al.* [87], em um estudo com atletas de força e potência, descobriram que o alelo T do SNP IGF1 rs35767 foi mais frequente nos atletas israelenses de alto nível (nível internacional e olímpico) em comparação com atletas de nível nacional. Verificou-se que o alelo T (rs35767 C/T) estava associado a níveis mais altos de IGF1 circulantes, e possivelmente com o aumento da massa muscular e processo de recuperação muscular otimizado. Esses resultados não estão de acordo com os dados aqui apresentados. Apesar de ter sido observado em valores gerais, uma maior média de IGF-1 para indivíduos TT (20,3 µg/L contra 16,7µg/L e 18,4µg/L para indivíduos CC e CT, respectivamente), não houve associação significativa do SNP *IGF1* rs35767 com as concentrações de IGF. O número de atletas com o genótipo TT presentes na amostra foi baixo, o que pode ter sido um fator limitante para as análises.

Entretanto, no nosso estudo, o rs35767 apresentou associação significativa com as concentrações de TNF α , tanto na análise individual, onde indivíduos TT apresentaram maiores concentrações de TNF α em comparação com indivíduos CC e CT, quanto na análise em conjunto com outros fatores genéticos, onde o SNP *IGF1* rs35767 juntamente com o *COL1A1* rs1800012, explicaram em 40% as variações nas concentrações de TNF α . A associação do SNP *IGF1* rs35767 com TNF- α e os efeitos biológicos sobre as respostas inflamatórias decorrentes do exercício, ainda precisa de esclarecimentos. Até a presente data, não foram encontrados estudos que descreveram relação simultânea dos SNPs *IGF1* rs35767 e o *COL1A1* rs1800012 com fenótipos relacionados a prática esportiva.

Nesse contexto, considerando que os genes exercem influência na produção de suas proteínas correspondentes, Ocarino e Serakides [88], encontram relação direta entre o IGF-1 e colágeno nas primeiras fases do reparo tecidual. O IGF-1 promove a síntese de colágeno pelas

células osteogênicas, aumentando a formação de matriz óssea [89]. Em seres humanos, supõem-se que, mesmo não havendo alterações nas concentrações plasmática, a liberação local de IGF-1 é a responsável pelo efeito anabólico do exercício sobre o tecido ósseo [90]. Novos estudos com um número maior de atletas, poderiam confirmar as associações aqui encontradas e podem proporcionar uma melhor compreensão fisiológica a respeito da associação do colágeno e as respostas inflamatórias após o treinamento físico.

IL-6 rs1800795

O polimorfismo *IL6* rs1800795 (-174 G/C) parece alterar a resposta transcricional. Há uma diferença geneticamente determinada no grau de resposta da IL-6 a estímulos estressantes entre os indivíduos, sendo que o alelo C se encontra associado às concentrações plasmáticas significativamente mais baixas de IL-6. Diferentes estudos, investigaram o SNP rs1800795 em atletas de elite caucasianos do sexo masculino (atletas de resistência e de potência) e um grupo controle de atletas. As frequências do genótipo GG e do alelo G foram significativamente mais altas em atletas de modalidades de potência em comparação com os atletas de resistência e grupo controle [23,91], indicando que o alelo G poderia favorecer o desempenho esportivo em modalidades esportivas que demandam de grande produção de força e potência como o futebol. De maneira não consistente com esses resultados, Eynon *et al.* [92] relataram que não houve diferenças nas frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo *IL6* rs1800795 entre atletas de elite em modalidades de resistência e potência e um grupo controle de não atletas (população israelense).

Na presente investigação, individualmente, o *IL6* rs1800795, foi associado à atividade dos monócitos e aos valores de CK. Indivíduos com o genótipo CC apresentaram maior atividade monocitária ($p < 0,01$) e a presença do alelo G foi associada a menores valores de CK ($p < 0,01$). Após o dano tecidual, os monócitos migram para o tecido lesionado e se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas [93]. Dessa forma, uma maior atividade de monócitos indica um dano muscular aumentado na musculatura ativa [94] e o que por sua vez, gera um aumento das concentrações de CK.

Em concordância com os nossos achados, estudos em indivíduos jovens demonstraram que os portadores do alelo C do SNP rs1800795, apresentaram valores de CK mais altos após exercício excêntrico em comparação com os homozigotos GG [95,96]. Nos esportes que demandam elevada potência muscular, onde o dano muscular é elevado em treinamentos e competições, indivíduos que carregam o alelo G podem ter benefícios com uma recuperação

mais rápida e inflamação sistêmica crônica de baixo grau. Entretanto, Deuster *et al.* [97], que não observaram nenhuma associação entre o SNP *IL6* rs1800795 e a rabiomiólise em resposta a esforço, desafiam esta conclusão. Dessa forma, a influência do *IL6* rs1800795 sobre as respostas inflamatórias decorrentes do treinamento físico, não está totalmente clara e precisa de mais investigações, particularmente estudos com maior número de atletas e outras modalidades esportivas.

MMP3 rs679620

As metaloproteinases matriciais (MMP) têm um papel importante na manutenção da integridade funcional das fibras musculares através da degradação dos componentes da matriz extracelular, assim como em processos como a regulação da migração e diferenciação de células satélites e regeneração das células musculares esqueléticas [98-99]. Um equilíbrio ótimo entre deposição e degradação de colágeno é importante para a formação de tecido cicatricial [98] e contribui para a rigidez muscular [100], o que supostamente aumenta a tolerância a lesões subsequentes [101]. Variações na expressão do gene *MMP* estão ligadas a várias doenças, como patologias musculares [102], pois supostamente, essas variações são capazes de alterar a função da matriz extracelular e influenciar a taxa de regeneração muscular [103].

O SNP rs679620 do gene *MMP3* é uma mutação caracterizada por uma substituição T>C com alto desequilíbrio de ligação à variante rs3025058, um polimorfismo funcional localizado dentro da região promotora do gene [104]. Acredita-se que o alelo C do *MMP3* rs679620 diminui a transcrição do *MMP3* [105]. Entretanto, a atividade que os alelos promovem parece ser dependente da população e dos tecidos [106]. Não há uma imagem clara se a substituição do rs679620 T>C resulta em aumento ou diminuição da expressão *MMP3* [104,107].

As MMP são produzidas por diversos tipos de células incluindo neutrófilos, fibroblastos e monócitos/macrófagos [108]. Esse conceito pode ajudar a explicar em parte os resultados aqui encontrados que demonstraram associações entre o SNP *MMP3* rs679620 e a atividade dos monócitos tanto na análise individual ($p= 0,04$) quanto na análise em conjunto, onde juntamente com o SNP *IL6* rs35767 o modelo de regressão gerado explicou em 16% da variação das concentrações de monócitos ($F= 2,41$, $p= 0,04$, $f^2= 0,19$, Poder= 0,71). Observamos que indivíduos que carregam o alelo C apresentam maiores concentrações de monócitos em relação ao homozigoto TT ($p= 0,02$). Considerando que uma maior atividade

dos neutrófilos estaria relacionada à uma maior produção de MMP3 [109], nossos resultados contrariam os achados de Foster *et al.*, [105]. É importante ressaltar que no presente estudo, a frequência de indivíduos com o genótipo TT foi baixa (N=2). Além disso, as concentrações plasmáticas de MMP3 não foram utilizadas como marcador inflamatório e o SNP *MMP3* rs679620 não estava dentro do HWE e esses fatores limitam a interpretação dos dados.

Os poucos estudos existentes com o SNP rs679620, referem-se principalmente ao risco de lesão nos tendões [110,111], embora tenha sido considerado um papel na lesão muscular. As conclusões que emergem das investigações da variante rs679620 em relação às lesões esportivas ainda apresentam divergências. Pruna *et al.* [36], em um estudo com 74 atletas de futebol de elite, não encontraram associação do SNP *MMP3* rs679620 com lesões musculares sem contato. O estudo foi realizado durante 5 temporadas competitivas e os autores observaram um total de 220 lesões musculares. Por outro lado, Larruskain *et al.* [17], relataram associação significativa entre o SNP rs679620 e lesões no tendão em futebolistas de alto nível, foram investigadas 160 lesões tendíneas em uma amostra de 107 jogadores. Esses achados poderiam ser interpretados para sugerir que a expressão elevada do MMP3, através da presença de ambos os alelos T, poderia dobrar o risco de lesão ao tendão do tendão do tendão. Entretanto, até o momento, estes são os únicos estudos existentes sobre lesões musculares relacionadas ao esporte e SNPs do gene *MMP3*, e os mecanismos fisiológicos sugeridos para as associações relatadas permanecem especulativos. Mais evidências sobre SNPs *MMP3* e o processo inflamatório são necessárias antes de considerar o gene como um marcador relacionado ao padrão de inflamação dos atletas e com o risco de lesões aumentado.

SLC30A8 rs13266634

O sistema imunológico e a função macrofágica depende do zinco durante um evento inflamatório. A homeostase do zinco é regulada pela família dos transportadores de metais, como a família *SLC30A8* [112]. O gene da proteína da família transportadora de soluto 30 (transportador de zinco) membro oito (*SLC30A8*) é expresso principalmente em células beta das ilhotas pancreáticas e transporta zinco do citoplasma para vesículas intracelulares, o que é crucial para os processos de cristalização, armazenamento e secreção da insulina [113,114]. O SNP *SLC30A8* rs13266634 está associado à diminuição da insulina sistêmica de jejum e à atenuação da secreção de insulina em resposta à glicose. [115,116].

A sinalização de insulina aumenta o fluxo sanguíneo e a síntese de proteínas em repouso, e reduz o catabolismo após o exercício, melhorando assim o equilíbrio líquido de

proteínas musculares pelo aumento da disponibilidade de aminoácidos [117]. Além disso, o dano muscular induzido pelo exercício tem sido associado à uma redução na síntese e absorção de glicose [118]. Provavelmente, isso ocorre pois o dano muscular reduz a sensibilidade muscular à insulina [119], o que por sua vez, poderia estar relacionado ao aumento da expressão de TNF atenuando a sinalização de insulina, induzindo posteriormente a resistência à insulina no músculo esquelético [120] suprimindo a ativação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) em fibras musculares [121].

O genótipo TT de um SNP (C>T; rs13266634) dentro do gene *SLC30A8*, foi associado com menores concentrações plasmáticas de CK, níveis de dor mais baixos e níveis de mioglobina atenuados após o dano muscular induzido pelo exercício excêntrico (flexão de cotovelo) em indivíduos do sexo masculino fisicamente ativos [116]. Aparentemente o alelo C pode reduzir a função do zinco gerando uma função macrofágica perturbada e redução da produção de insulina. Ao aumentar a via catabólica, níveis mais baixos de insulina podem levar a um balanço proteico líquido negativo [122]. Portanto, esses resultados indicam que os portadores do alelo C do SNP *SLC30A8* rs13266634, podem precisar de períodos de recuperação mais longos após exercícios extenuantes.

No presente estudo encontramos associação significativa entre o rs13266634 e as concentrações de PCR ($p= 0,01$). Atletas com o alelo C, apresentaram menores valores de PCR em comparação com o genótipo TT ($p< 0,01$). Uma hipótese que suporta esse achado, seria a relação da PCR com a atividade de células do sistema imune no processo opsonização após o dano muscular. Por ser uma proteína de fase aguda, a PCR é amplamente utilizada no contexto de análise do estado muscular e pode apresentar elevações de até 1000 vezes em quadros de processo inflamatório [123,124]. Essa elevação ocorre, principalmente pela sua funcionalidade como opsonina ligando-se a cromatina de células lesadas para que principalmente os neutrófilos e macrófagos (na isoforma LyC6^{pos}) possam englobar e fagocitar a estrutura danificada, sem exacerbar a microlesão [123,124]. Dessa forma, considerando que menor sinalização de PCR pode representar menor atividade fagocitária, indivíduos com o genótipo TT, podem apresentar um fator de proteção contra o dano muscular após um treinamento de alta demanda fisiológica. Entretanto, em nossa amostra observamos apenas um indivíduo com o genótipo TT, o que mais uma vez se apresenta como fator limitante na interpretação resultados aqui apresentados. Outros estudos, com novos marcadores sanguíneos e maiores frequências genótípicas para o *SLC30A8*, devem investigar se a produção de insulina dependente do genótipo *SLC30A8* está associada às adaptações

agudas e crônicas relacionadas à prática esportiva, no que diz respeito à síntese proteica muscular e à hipertrofia muscular, respectivamente.

SOX15 rs4227

A proteína HMG-box (Sox15) que é codificada pelo gene *SOX15* é postulada para assumir um papel importante na diferenciação miogênica, determinando o destino das células musculares esqueléticas durante o desenvolvimento [125]. Foi identificado um pequeno número de polimorfismos *SOX15*, embora que ainda não esteja claro se estes influenciam a função do músculo esquelético ou a lesão muscular. O SNP rs4227 envolve uma substituição G>T, onde o alelo T representa o alelo ancestral e o G é o alelo menor. As conseqüências funcionais e moleculares desta substituição não são claras. Entretanto, Pruna *et al.* [36] relataram associação entre o rs4227 SNP e a incidência de lesões musculares, expressa por 1000 h de exposição ao futebol (treinamentos e jogos). Os atletas homozigotos para o alelo T ancestral (genótipo TT) tiveram a menor incidência de lesões (7,8 lesões por 1000 h) em comparação com os portadores do alelo G (10,2/1000 h e 14,8/1000 h para os genótipos GT e GG, respectivamente).

Enquanto uma explicação mecanicista permanece pouco clara, Pruna *et al.* [36] sugerem em seus resultados uma indicação de que o alelo T é necessário para a formação adequada do músculo esquelético, e que indivíduos homozigóticos GG apresentam maiores taxas de lesão devido a um efeito negativo ou inativação da função SOX. Nesse contexto, Lee *et al.* [125] mostraram que os músculos de ratos com ação normal de SOX15 apresentaram desenvolvimento muscular esquelético normal, por outro lado, imagens transversais do músculo esquelético indicaram uma matriz extracelular menos pronunciada nos ratos com deficiência de SOX15. Embora esta teoria seja baseada na sugestão de que a inativação da SOX15 diminui a proliferação de células miogênicas e perturba a regeneração muscular, são necessários novos estudos para testar a hipótese.

Os resultados da presente investigação, demonstraram associação do SNP *SOX15* rs4227 com as concentrações de IGF-1. Em valores gerais, indivíduos TT e GT apresentaram maiores concentrações de IGF-1 em comparação com indivíduos GG (16,12 µg/L e 21,14 µg/L contra 14,00 µg/L respectivamente); entretanto apenas o genótipo GT apresentou diferença significativa em relação ao genótipo GG ($p < 0,01$). Como já abordado anteriormente, assumindo que o IGF-1 influencia diretamente na diferenciação e ativação de células satélites para o reparo tecidual, esses achados podem contribuir com a sugestão de

Pruna *et al.* [36] que indicam que o alelo T está relacionado a um menor risco de lesão por ativação da SOX15 que por sua vez, contribui para uma melhor construção muscular. Portanto, o mecanismo de desenvolvimento muscular mais adequado através da ativação da SOX15 pode estar relacionado à maiores concentrações plasmáticas de IGF-1. Entretanto, futuros estudos devem procurar confirmar essa e outras associações, a fim de trazer mais esclarecimentos mecanicistas e fisiológicos dos efeitos do SNP rs4227 sobre músculo esquelético.

Conclusão

Individualmente, 9 SNPs (*ACTN3* rs1815739, *COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795, *MMP3* rs679620, *SLC30A8* rs13266634, *SOX15* rs4227) foram significativamente associados com biomarcadores inflamatórios. Em combinação, sete SNPs (*COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378, *COL5A1* rs1800012, *HGF* rs5745697, *IGF1* rs35767, *IL-6* rs1800795 e *MMP3* rs679620), explicaram em quatro modelos de 16% a 40% da variação das respostas inflamatórias em atletas de futebol.

Apesar dos mecanismos que sustentam as associações genéticas dos SNPs relacionados a produção de colágeno com as respostas inflamatórias em resposta à prática esportiva não estarem claros, nossos resultados identificaram diversas associações envolvendo os SNPs *COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378 e *COL5A1* rs1800012. Individualmente os SNPs *COL5A1* rs12722 e *COL5A1* rs3196378 foram associados com as concentrações máximas de IL-6 e neutrófilos. Em conjunto, os SNPs relacionados ao colágeno (*COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378 e *COL5A1* rs1800012) apareceram como preditores em três dos quatro modelos gerados. O SNP *COL1A1* rs1800012 em conjunto com o *IGF1* rs35767, explicou no modelo mais robusto aqui apresentado, 40% da expressão de TNF α em atletas de futebol. Esses resultados indicam que esses polimorfismos podem exercer papel importante na cascata inflamatória após a prática esportiva. Entretanto, novos estudos são necessários para confirmar essas associações e elucidar os processos fisiológicos que suportam essas associações.

Tais evidências podem ser usadas no futuro para a construção de um painel genético aperfeiçoado que auxilie no entendimento da demanda inflamatória de atletas com o intuito de auxiliar as comissões técnicas nas tomadas de decisões para um controle de carga otimizado e elaboração de estratégias de recuperação em uma clara aplicação de conceitos de medicina de precisão na ciência do esporte. Nosso objetivo foi trazer um olhar mais relacionado a

influência de fatores genéticos sobre fenótipos relacionados ao processo inflamatório, porém, a inclusão de variáveis não-genéticas (como idade, composição corporal etc.) podem melhorar os modelos aqui apresentados.

Referências

1. BANGSBO, J. The physiology of soccer – with special reference to intense intermittent exercise. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.151, n.619, p.1-155, 1994.
2. ISPIRLIDIS I.; FATOUROS, I.G.; JAMURTAS, A.Z.; NIKOLAIDIS, M.G.; 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. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 18, n. 5, p. 423-431, 2008.
3. BLOOMFIELD, J.; POLMAN, R.; O'DONOGHUE, P. Physical demands of different positions in FA Premier League soccer. **Journal of Sports Science and Medicine**, v.6, n.1, p.63-70, 2007.
4. RIENZI, E.; DRUST, B.; REILLY, T.; CARTER, J.E.; MARTIN, A. Investigation of anthropometric and work-rate profiles of elite South American international soccer players. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v.40, p.162–169, 2000.
5. LITTLE, T.; WILLIAMS, A. G. Suitability of soccer training drills for endurance training. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.20, n.2, p.316–319, 2006.
6. STØLEN, T.; CHAMARI, K.; CASTAGNA, C.; WISLØFF, U. Physiology of soccer. **Sports medicine**, v.35, n.6, p.501–536, 2005.
7. DRUST, B.; REILLY, T.; CABLE, N.T. Physiological responses to laboratory-based soccer-specific intermittent and continuous exercise. **Journal of Sports Science**, n.18, p. 885-892, 2000.
8. CASTAGNA, C.; VARLEY, M.; POVOAS ARAUJO, S.C.; D'OTTAVIO, S. The evaluation of the match external load in soccer: methods comparison. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v.12, n.4, p.490-495, 2017.
9. NOSAKA, K.; NEWTON, M.J.; SACCO, P. Attenuation of Protective Effect Against Eccentric Exercise-Induced Muscle Damage, **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.30, n.5, p.529-542, 2005.
10. ARMSTRONG, R.B. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 16, n.6, p. 529–538, 1984.
11. ARMSTRONG, R.B.; WARREN, G.L.; WARREN, J.A. Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. **Sports Medicine**, 12(3):184–207
12. TRICOLI, V. Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular tardia. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.9, p.39-44, 2001.
13. 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**, v.9, n.1, p.101-6, 2007.

14. SOUGLIS, A.G.; PAPAPANAGIOTOU, A.; BOGDANIS, G.C.; TRAVLOS, A.K.; APOSTOLIDIS, N.G.; GELADAS, N.D. Comparison of Inflammatory Responses to a Soccer Match Between Elite Male and Female Players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.29, n.5, p.1227–1233, 2015.
15. BAUMERT, P.; LAKE, M.J.; STEWART, C.E.; DRUST, B.; ERSKINE, R.M. Genetic variation and exercise-induced muscle damage: implications for athletic performance, injury and ageing. **European Journal of Applied Physiology**, v.116, p.1595-1625, 2016.
16. AHMETOV, I.I.; FEDOTOVSKA, O.N. Current progress in sports genomics. **Advances in Clinical Chemistry**, v.70, p.247-314, 2015.
17. LARRUSKAIN, J.; CELORRIO, D.; BARRIO, I.; ODRIUZOLA, A.; GIL, S.M.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.R.; NOZAL, R.; ORTUZAR, I.; LEKUE, J.A.; AZNAR, J.M. Genetic Variants and Hamstring Injury in Soccer: An Association and Validation Study. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 50, n. 2, p. 361-368, 2018.
18. SETO, J.N.; ROESZLER, K.N.; MEEHAN, L.R. et al. ACTN3 genotype influences skeletal muscle mass regulation and response to dexamethasone. **Science Advances**. v.7, n.27, p. eabg0088, 2021.
19. SETO, J.T.; LEK, M.; QUINLAN, K.G. *et al.* Deficiency of a-actinin-3 is associated with increased susceptibility to contraction-induced damage and skeletal muscle remodeling. **Human Molecular Genetics**. v. 20: p. 2914–2927, 2011.
20. KIBLER, W.B.; CHANDLER, T.J.; STRACENER, E.S. 4: musculoskeletal adaptations and injuries due to overtraining. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 20, n. 1, p. 99–126, 1992.
21. CLANSEY, A.C.; HANLON, M.; WALLACE E.S.; LAKE, M.J. Effects of fatigue on running mechanics associated with tibial stress fracture risk. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.10, p. 1917–1923, 2012.
21. KAMBOURIS, M.; DEL BUONO, A.; MAFFULLI, N. Genomics DNA profiling in elite professional soccer players: a pilot study. **Traditional Medicine**, v.9, n.3, p.18-22, 2014.
22. EHLERT, T.; SIMON, P.; MOSER, D.A. Epigenetics in sports. **Sports Medicine**, n.43, v.2, p.93-110, 2013.
23. RUIZ, J.R.; ARTETA, D.; BUXENS, A.; *et al.* Can we identify a power-oriented polygenic profile? **Journal of Applied Physiology**, v. 108, p.561-566, 2010.
24. HUGHES, D.C.; DAY, S.H.; AHMETOV, I.I.; WILLIAMS, A.G. Genetics of muscle strength and power: polygenic profile similarity limits skeletal muscle performance. **Journal of Sports Science**, v. 29, p. 1425-1434, 2011.
25. MACIEJEWSKA-SKRENDO, A.; SAWCZUK, M.; CIĘSZCZYK, P.; AHMETOV, I.I. **Genes and Power Athlete Status. In: Sports, Exercise, and Nutritional Genomics: Current Status and Future Directions.** D.Barh. and I. Ahmetov, eds. Academic Press, p. 41-72, 2019.

26. AHMETOV, I.I.; MOZHAYSKAYA, I.A.; LYUBAEVA, E.V.; VINOGRADOVA, O.L.; ROGOZKIN, V.A. PPARG Gene polymorphism and locomotor activity in humans. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.146, p. 630-632, 2008.
27. FEDOTOVSKAYA, O.N.; POPOV, D.V.; VINOGRADOVA, O.L.; AKHMETOV, I.I. Association of Muscle- Specific Creatine Kinase (CKMM) Gene Polymorphism with Physical Performance of Athletes. **Human Physiology**, v. 38, p. 89–93, 2012.
28. GABBASOV, R.T.; ARKHIPOVA, A.A.; BORISOVA, A.V.; *et al.* The HIF1A gene Pro582Ser polymorphism in Russian strength athletes. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 27, p. 2055-2058, 2013.
29. ZAREBSKA, A.; AHMETOV, I.I.; SAWCZYN, S.; *et al.* Association of the MTHFR 1298A>C (rs1801131) polymorphism with speed and strength sports in Russian and Polish athletes. **Journal of Sports Science**, v. 32, p. 375-382, 2014.
30. GINEVICIENE, V.; JAKAITIENE, A.; AKSENOV, M.O.; *et al.* Association analysis of ACE, ACTN3 and PPARGC1A gene polymorphisms in two cohorts of European strength and power athletes. **Biology of Sports**, v. 33, p. 199-206, 2016.
31. BEN-ZAKEN, S.; ELIAKIM, A.; NEMET, D.; MECKEL, Y. Genetic Variability Among Power Athletes: The Stronger vs. the Faster. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.33, p. 1505-1511, 2019.
32. GRISHINA, E.E.; ZMIJEWSKI, P.; SEMENOVA, E.A.; *et al.* Three DNA Polymorphisms Previously Identified as Markers for Handgrip Strength Are Associated With Strength in Weightlifters and Muscle Fiber Hypertrophy. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 33, p. 2602–2607, 2019.
33. HOMMA, H.; KOBATAKE, N.; SEKIMOTO, Y.; *et al.* Ciliary Neurotrophic Factor Receptor rs41274853 Polymorphism Is Associated With Weightlifting Performance in Japanese Weightlifters. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 34, n.11, p. 3037-3041, 2020.
34. ARTELLS, R.; PRUNA, R.; DELLAL, A.; MAFFULLI, N. Elastin: a possible genetic biomarker for more severe ligament injuries in elite soccer. A pilot study. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 6, n. 2, p. 188-192, 2016.
35. TODENDI, P.F.; POSSUELO, L.G.; KLINGER, E.I.; REUTER, C.P.; BURGOS, M.S.; MOURA, D.J.; FIEGENBAUM, M.; VALIM, A.R.M. Low-grade inflammation markers in children and adolescents: Influence of anthropometric characteristics and CPR and IL-6 polymorphisms. **Cytokine**, v.88, p.177-183, 2016.
36. PRUNA, R.; ARTELLS, R; LUNDBLAD, M; MAFFULLI, N. Genetic biomarkers in non-contact muscle injuries in elite soccer players. **Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy**, v.25, n.10, p.3311–8, 2017.
37. LEE, K.E.; KIM, J.H.; CHUNG, J.E.; LEE, G.Y. CHO, Y.J. CHANG, B.C.; GWAK, H.S. Association of inflammatory gene polymorphisms with mechanical heart valve reoperation. **SpringerPlus**, v.5, n.1, p.937-943, 2016.
38. NAITZA, S.; PORCU, E.; STERI, M.; TAUB, D.; MULAS, A.; XIAO, X.; STRAIT, J.; DEI, M.; LAI, S.; BUSONERO, F.; MASCHIO, A.; USALA, G.; ZOLEDZIEWSKA, M.;

- SIDORE, C.; ZARA, I.; PITZALIS, M.; LOI, A.; VIRDIS, F.; PIRAS, R.; DEIDDA, F.; WHALEN, M.B.; CRISPONI, L.; CONCAS, A.; PODDA, C.; UZZAU, S.; SCHEET, P.; LONGO, D.L.; LAKATTA, E.; ABECASIS, G.R.; CAO, A.; SCHLESSINGER, D.; UDA, M.; SENNA, S.; CUCCA, F. A genome-wide association scan on the levels of markers of inflammation in sardinians reveals associations that underpin its complex regulation. **PLoS Genetics**, v.8, n.1, e1002480, 2012.
39. COLLINS, M.; SEPTEMBER, A.V.; POSTHUMUS, M. Biological variation in musculoskeletal injuries: current knowledge, future research and practical implications. **British Journal of Sports Medicine**, v. 49, p. 1497-1503, 2015.
40. BAHR, R. Why screening tests to predict injury do not work-and probably never will: a critical review. **British Journal of Sports Medicine**, v.50, n.13, p.776–80, 2016.
41. JACKSON, A.S.; POLLOCK, M.L. Generalized equations for predicting body density of men. **British Journal of Nutrition**, v.40, n.3, p.497-504, 1978.
42. PIMENTA, E.M.; COELHO, D.B.; CRUZ, I.R.; MORANDI, R.F.; VENEROSO, C.E.; DE AZAMBUJA PUSSIELDI, G.; CARVALHO, M.R.; SILAMI-GARCIA, E.; DE PAZ FERNÁNDEZ, J.A. The ACTN3 genotype in soccer players in response to acute eccentric training. **European Journal of Applied Physiology**, v.112, p.1495-150, 2012.
43. GONZALEZ, J. R.; ARMENGOL, L.; SOLE, X.; GUINO, E. *et al.* SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. **Bioinformatics**, v. 23, n. 5, p. 644-645, 2007.
44. COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. New York, NY: Routledge Academic, 1988.
45. HAIR, J.F.; HULT, G.T.M.; RINGLE, C.M.; SARSTEDT, M. **A primer on Partial Least Squares Structural Equation modelling** (2nd ed.). Thousand Oaks: Sage, 2017.
46. COHEN. J.; COHEN, P.; WEST, S.G.; AIKEN, L.S. **Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences**. Routledge; 2013.
47. VINCENT, B.; WINDELINCKX, A.; NIELENS, H. *et al.* Protective role of alpha-actinin-3 in the response to an acute eccentric exercise bout. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, p. 564–573, 2010.
48. AHMETOV, I.I.; KULEMIN, N.A.; POPOV, D.V. *et al.* Genome-wide association study identifies three novel genetic markers associated with elite endurance performance. **Biology of Sport**, v.32, p.3-9, 2015.
49. COELHO, D.B.; PIMENTA, E.M.; ROSSE, I.C. *et al.* Alpha-Actinin-3 R577X Polymorphism Influences Muscle Damage and Hormonal Responses After a Soccer Game. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 33, n. 10, p. 2655-2664, 2019.
50. NORTH, K.N.; YANG, N.; WATTANASIRICHAIGOON, D.; MILLS, M.; EASTEAL, S.; BEGGS, A.H. A common nonsense mutation results in alphaactinin-3 deficiency in the general population. **Nature Genetics**. v. 21, p. 353–354, 1999.
51. SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLEOD, S.A. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Physical Therapy**. v. 81, p. 1810–1816, 2001.

52. MACARTHUR, D.G.; NORTH, K.N.; A gene for speed? The evolution and function of alpha-actinin-3. **Bioessays**. v. 26, p. 786–795, 2004.
53. LEE, F.X.Z.; HOUWELING, P.J.; NORTH, K.N.; QUINLAN, K.G.R. How does α -actinin-3 deficiency alter muscle function? Mechanistic insights into ACTN3, the ‘gene for speed’. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**. v. 1863, n. 4, p. 686-693, 2016.
54. ERSKINE, R.M.; WILLIAMS, A.G.; JONES, D.A.; STEWART, C.E.; DEGENS, H. The individual and combined influence of ACE and ACTN3 genotypes on muscle phenotypes before and after strength training. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 24, n. 4, p. 642–648, 2014.
55. MACARTHUR, D.G.; SETO, J.T.; RAFTERY, J.M.; *et al.* Loss of ACTN3 gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans. **Nature Genetics**, v. 39, n.10, p. 1261–1265, 2007.
56. CHAN, S.; SETO, J.T.; HOUWELING, P.J.; YANG, N.; NORTH, K.N.; HEAD, S.I. Properties of extensor digitorum longus muscle and skinned fibers from adult and aged male and female Actn3 knockout mice. **Muscle & Nerve**, v. 43, n.1, p. 37–48, 2011.
57. AKHMETOV, I.I.; POPOV, D.V.; MOZHAYSKAYA, I.A.; MISSINA, S.S.; ASTRATENKOVA, I.V.; VINOGRADOVA, O.L.; ROGOZKIN, V.A. Association of regulatory genes polymorphisms with aerobic and anaerobic performance of athletes. **Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova**, v. 93, p. 837–843, 2007.
58. PICKERING, C.; SURACI, B.; SEMENOVA, E.A. *et al.* A Genome-Wide Association Study of Sprint Performance in Elite Youth Football Players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.33, n.9, p.2344-2351, 2019.
59. AHMETOV, I.I.; DONNIKOV, A.E.; TROFIMOV, D.Y. ACTN3 genotype is associated with testosterone levels of athletes. **Biology of Sports**, v. 31, p. 105–108, 2014.
60. KIKUCHI, N.; TSUCHIYA, Y.; NAKAZATO, K.; ISHII, N.; OCHI, E. Effects of the ACTN3 R577X genotype on the muscular strength and range of motion before and after eccentric contractions of the elbow flexors. **International Journal of Sports Medicine**, v. 39, p. 148–153, 2018.
61. STEBBINGS, G.K.; WILLIAMS, A.G.; HERBERT, A.J.; LOCKEY, S.J.; HEFFERNAN, S.M.; ERSKINE, R.M.; MORSE, C.I.; DAY, S.H. TTN genotype is associated with fascicle length and marathon running performance, **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 28, p. 400–406, 2018.
62. LUO, H.R.; HATTORI, H.; HOSSAIN, M.A.; HESTER, L.; HUANG, Y.; LEE-KWON, W.; DONOWITZ, M.; NAGATA, E.; SNYDER, S.H. Akt as a mediator of cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n.20, p. 11712-7, 2003.
63. SEABORNE, R.A.; HUGHES, D.C.; TURNER, D.C.; *et al.* UBR5 is a novel E3 ubiquitin ligase involved in skeletal muscle hypertrophy and recovery from atrophy, **The Journal of Physiology**, v. 597 p. 3727–3749, 2019.

64. AHMETOV, I.I.; HALL, E.; SEMENOVA, E.A.; PRANCKEVIČIENĖ, E.; GINEVIČIENĖ, V. Advances in sports genomics. **Advances in clinical chemistry**, 107, 215–263, 2022.
65. COLLINS, M. & RALEIGH, S.M. Genetic risk factors for musculoskeletal soft tissue injuries. **Medicine Sport and Science**, v. 54, p.136–149, 2009.
66. LAGUETTE, M. J.; ABRAHAMS, Y.; PRINCE, S.; COLLINS, M. Sequence variants within the 3'-UTR of the COL5A1 gene alters mRNA stability: implications for musculoskeletal soft tissue injuries. **Matrix biology : Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 30, n.5-6, p. 338–345, 2011.
67. BELL R.D.; SHULTZ, S.J.; WIDEMAN, L.; HENRICH, V.C. Collagen gene variants previously associated with anterior cruciate ligament injury risk are also associated with joint laxity. **Sports Health**, v. 4, n.4, p. 312–318, 2012.
68. GUO, R.; JI, Z.; GAO, S.; AIZEZI, A.; FAN, Y.; WANG, Z.; NING, K. Association of COL5A1 gene polymorphisms and musculoskeletal soft tissue injuries: a meta-analysis based on 21 observational studies. **Journal of orthopedic surgery and research**, v. 17, n.1, p. 129, 2022.
69. HOROZOGLU, C.; ASLAN, H.E.; KARAAGAC, A. Effects of genetic variations of mlck2, ampd1, and col5a1 on muscle endurance. **Rev Bras Med Esporte**, v. 4, p. 261-266, 2022.
70. MASSIDDA, M.; BACHIS, V.; CORRIAS, L.; PIRAS, F.; SCORCU, M.; CALO, C.M. Influence of the COL5A1 rs12722 on musculoskeletal injuries in professional soccer players. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 55, n. 11, p. 1348-1353, 2015.
71. HALL, E.; SEMENOVA, E.A.; BONDAREVA, E.A.; *et al.* Association of muscle fiber composition with health and exercise-related traits in athletes and untrained subjects. **Biology of Sport**, v. 38, n.4, p. 659–666, 2021.
72. HEFFERNAN, S.M.; KILDUFF, L.P.; ERSKINE, R.M.; *et al.* COL5A1 gene variants previously associated with reduced soft tissue injury risk are associated with elite athlete status in rugby. **BMC genomics**, v. 18, (Suppl 8), 820, 2017.
73. BAUMERT, P.; HALL, E.C.; ERSKINE, R.M. **The genetic association with exercise-induced muscle damage and muscle injury risk. In: Sports, Exercise, and Nutritional Genomics: Current Status and Future Directions.** D.Barh. and I. Ahmetov, eds. Academic Press, p. 375-407, 2019.
74. KHOSCHNAU, S.; MELHUS, H.; JACOBSON, A.; *et al.* Type I collagen alpha1 Sp1 polymorphism and the risk of cruciate ligament ruptures or shoulder dislocations. **The American journal of sports medicine**, v. 36, n.12, p. 2432–2436, 2008.
75. POSTHUMUS, M., SEPTEMBER, A. V., O'CUINNEAGAIN, D.; *et al.* The COL5A1 gene is associated with increased risk of anterior cruciate ligament ruptures in female participants. **The American journal of sports medicine**, v. 37, n.11, p. 2234–2240, 2009.
76. COLLINS, M.; POSTHUMUS, M.; SCHWELLNUS, M.P. The COL1A1 gene and acute soft tissue ruptures. **British Journal of Sports Medicine**, v. 44, p. 1063-1064, 2010.

77. WANG, C.; LI, H.; CHEN, K.; WU, B.; LIU, H. Association of polymorphisms rs1800012 in COL1A1 with sports-related tendon and ligament injuries: a meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n.16, p. 27627–27634, 2017.
78. TILKERIDIS, C.; BEI, T.; GARANTZIOTIS, S.; STRATAKIS, C. A. Association of a COL1A1 polymorphism with lumbar disc disease in young military recruits. **Journal of medical genetics**, v. 42, n.7, e44, 2005.
79. STĘPIEN-SŁODKOWSKA, M., FICEK, K., EIDER, J.; *et al.* The +1245g/t polymorphisms in the collagen type I alpha 1 (colla1) gene in polish skiers with anterior cruciate ligament injury. **Biology of Sport**, v. 30, n.1, p. 57–60, 2013.
80. ERDURAN, M.; ALTINISIK, J.; MERIC, G.; ATES, O.; ULUSAL, A.E.; AKSEKI, D. Is Sp1 binding site polymorphism within COL1A1 gene associated with tennis elbow? **Gene**, v. 537, n. 2, p. 308-311, 2014.
81. GAL-LEVI, R.; LESHEM, Y.; AOKI, S.; NAKAMURA, T.; HALEVY, O. Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1402, n. 1, p. 39–51, 1998.
82. TATSUMI, R. & ALLEN, R.E. Active hepatocyte growth factor is present in skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle & nerve**, v. 30, n. 5, p.654–658, 2004.
83. WEBSTER, M.T., & FAN, C.M. c-MET regulates myoblast motility and myocyte fusion during adult skeletal muscle regeneration. **PloS one**, v. 8, n. 11, e81757, 2013.
84. GUTIÉRREZ, J.; CABRERA, D.; BRANDAN, E. Glypican-1 regulates myoblast response to HGF via Met in a lipid raft-dependent mechanism: effect on migration of skeletal muscle precursor cells. **Skeletal muscle**, n. 4, v.1, 5, p.1-16, 2014.
85. GONZÁLEZ, M.N.; DE MELLO, W.; BUTLER-BROWNE, G.S.; SILVA-BARBOSA, S.D.; MOULY, V.; SAVINO, W.; RIEDERER, I. HGF potentiates extracellular matrix-driven migration of human myoblasts: involvement of matrix metalloproteinases and MAPK/ERK pathway. **Skeletal muscle**, v. 7, n. 1, 20, p. 1-13, 2017.
86. MAO, K.; QUIPILDOR, G.F.; TABRIZIAN, T.; *et al.* Late-life targeting of the IGF-1 receptor improves healthspan and lifespan in female mice. **Nature Communication**, v. 9, p. 2394, 2018.
87. BEN-ZAKEN, S.; MECKEL, Y.; NEMET, D.; ELIAKIM, A. Can IGF-I polymorphism affect power and endurance athletic performance? **Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, v. 23, n. 5, p. 175–178, 2013.
88. OCARINO, N.;M.; & SERAKIDES, R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 3, p. 164-168, 2006.
89. NOMURA, S. & TAKANO-YAMAMOTO, T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. **Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 19, p. 91–96, 2000.
90. BRAHM, H.; PIEHL-AULIN, K.; SALTIN, B.; LJUNGHALL, S. Net fluxes over

working thigh of hormones, growth factors and biomarkers of bone metabolism during short lasting dynamic exercise. **Calcified tissue international**, v. 60, n. 2, p. 175–180, 1997.

91. EIDER J.; MACIEJEWSKA-KARLOWSKA A.; SAWCZUK M.; *et al.* The VEGFR2 gene His472Gln polymorphism in Polish endurance athletes: original research article. **International SportMed Journal**, v. 14, p. 29-35, 2013.

92. EYNON, N.; MECKEL, Y.; ALVES, A. J.; NEMET, D.; ELIAKIM, A. Is there an interaction between BDKRB2 -9/+9 and GNB3 C825T polymorphisms and elite athletic performance? **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 21, n.6, p. 242-246, 2011.

93. YANG, J.; ZHANG, L.; YU, C.; YANG, X.F.; WANG H. Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v. 2, n.1, p.1, 2014.

94. PENCE, B.D. & YARBRO, J.R. Aging impairs mitochondrial respiratory capacity in classical monocytes. **Experimental gerontology**, v. 108, p. 112–117, 2018.

95. YAMIN, C.; DUARTE, J.A.; OLIVEIRA, J.M.; AMIR, O.; SAGIV, M.; EYNON, N.; SAGIV, M.; AMIR, R.E. IL6 (-174) and TNFA (-308) promoter polymorphisms are associated with systemic creatine kinase response to eccentric exercise. **European journal of applied physiology**, v. 104, n.3, p. 579–586, 2008.

96. YAMIN C. Reply to "IL6 genotype and creatine kinase response to exercise". **European journal of applied physiology**, v. 107, n.3, 375, 2009.

97. DEUSTER, P.A.; CONTRERAS-SESVOLD, C.L.; O'CONNOR, F.G.; *et al.* Genetic polymorphisms associated with exertional rhabdomyolysis. **European journal of applied physiology**, v. 113, n.8, p. 1997–2004, 2013

98. CHEN, X. & LI, Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. **Cell adhesion & migration**, v. 3, n.4, p. 337–341, 2009.

99. DAVIS, M.E.; GUMUCIO, J.P.; SUGG, K.B.; BEDI, A.; MENDIAS, C.L. MMP inhibition as a potential method to augment the healing of skeletal muscle and tendon extracellular matrix. **Journal of applied physiology** (Bethesda, Md. : 1985), v. 115, v.6, p. 884–891, 2013.

100. FEIT, H.; KAWAI, M.; MOSTAFAPOUR, A.S. The role of collagen crosslinking in the increased stiffness of avian dystrophic muscle. **Muscle & nerve**, v. 12, n. 6, p. 486–492, 1989.

101. LAPIER, T.K.; BURTON, H.W.; ALMON, R.; & CERNY, F. Alterations in intramuscular connective tissue after limb casting affect contraction-induced muscle injury. **Journal of applied physiology** (Bethesda, Md.: 1985), v. 78, n.3, p. 1065–1069, 1995.

102. CHOI, Y.C. & DALAKAS, M.C. Expression of matrix metalloproteinases in the muscle of patients with inflammatory myopathies. **Neurology**, v.54, n. 1, p. 65–71, 2000.

103. GOETSCH, K.P.; MYBURGH, K.H.; NIESLER, C.U. In vitro myoblast motility models: investigating migration dynamics for the study of skeletal muscle repair. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 34, p. 333–347, 2013.

104. YE, S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. **Cardiovascular Research**, 69, 636–645, 2006.
105. FOSTER, B.P.; MORSE, C.I.; ONAMBELE, G.L. AHMETOV, I.I.; WILLIAMS, A.G. Genetic Variation, Protein Composition and Potential Influences on Tendon Properties in Humans. **The Open Sports Medicine Journal**, v. 6, p. 8-21, 2012.
106. ZHANG, Q.W. Association of the matrix metalloproteinase-3 polymorphisms rs679620 and rs3025058 with ischemic stroke risk: a meta-analysis. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 14, p. 419–427, 2018.
107. CHEN, Y.; NIXON, N.B.; DAWES, P.T.; MATTEY, D.L.; Influence of variations across the MMP-1 and -3 genes on the serum levels of MMP-1 and -3 and disease activity in rheumatoid arthritis. **Genes and immunity**, v. 13, n. 1, p. 29–37, 2012.
108. KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Tissue Renewal and Repair: Regeneration, Healing, and Fibrosis. In: Robbins and Cotran, **Pathologic Basis of Disease**, Philadelphia: Elsevier, p.87-118, 2005.
109. VILELA, P.G.F. **Avaliação da liberação de metaloproteínas da matriz (mmp-3 e mmp-8) por macrófagos ativados por diferentes concentrações de endotoxinas (lps) em variados períodos de tempo**, 2009. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, disponível em: www.repositorio.unesp.br.
110. EL KHOURY, L.; RIBBANS, W.J.; RALEIGH, S.M.; et a. MMP3 and TIMP2 gene variants as predisposing factors for Achilles tendon pathologies: Attempted replication study in a British case-control cohort. **Meta gene**, v. 9, p. 52–55, 2016.
111. RALEIGH, S.M.; VAN DER MERWE, L.; RIBBANS, W.J.; SMITH, R.K.; SCHWELLNUS, M.P.; COLLINS, M. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. **British journal of sports medicine**, v. 43, n. 7, p. 514–520, 2009.
112. GAO, H.; ZHAO, L.; WANG, H. Metal transporter Slc39a10 regulates susceptibility to inflammatory stimuli by controlling macrophage survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 49, p. 12940–12945, 2017.
113. LEMAIRE, K.; RAVIER, M.A.; SCHRAENEN, A.; et al. Insulin crystallization depends on zinc transporter ZnT8 expression but is not required for normal glucose homeostasis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 35, p. 14872–14877, 2009.
114. CHENG, L.; ZHANG, D.; ZHOU, L.; ZHAO, J.; CHEN, B. Association between SLC30A8 rs13266634 Polymorphism and Type 2 Diabetes Risk: A Meta-Analysis. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, p. 2178–2189, 2015.
115. KIRCHHOFF, K.; MACHICAO, F.; HAUPT, A.; et al. Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. **Diabetologia**, v. 51, n. 4, 597–601, 2008.

116. SPROUSE, C.; GORDISH-DRESSMAN, H.; ORKUNOGLU-SUER, E.F.; et al. SLC30A8 nonsynonymous variant is associated with recovery following exercise and skeletal muscle size and strength. **Diabetes**, v. 63, n. 1, p. 363–368, 2014.
117. FUJITA, S.; RASMUSSEN, B.B.; CADENAS, J.G.; GRADY, J.J.; VOLPI, E. Effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 291, n. 4, p. 745–754, 2006.
118. NIELSEN, J.; FARUP, J.; RAHBK, S.K.; DE PAOLI, F. V.; VISSING, K. Enhanced Glycogen Storage of a Subcellular Hot Spot in Human Skeletal Muscle during Early Recovery from Eccentric Contractions. **PloS one**, v. 10, n. 5, e0127808, 2015.
119. KIRWAN, J.P.; BOUREY, R.E.; KOHRT, W.M.; STATEN, M.A.; HOLLOSZY, J.O. Effects of treadmill exercise to exhaustion on the insulin response to hyperglycemia in untrained men. **Journal of applied physiology**, v. 70, n.1, p. 246–250, 1991.
120. PLOMGAARD, P.; BOUZAKRI, K.; KROGH-MADSEN, R.; MITTENDORFER, B.; ZIERATH, J.R.; PEDERSEN, B.K. Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2939–2945, 2005.
121. ASP, S.; DAUGAARD, J.R.; RICHTER, E.A. Eccentric exercise decreases glucose transporter GLUT4 protein in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 482, p. 705–712, 1995.
122. SACHECK, J.M.; HYATT, J.P.; RAFFAELLO, A.; JAGOE, R.T.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R.; LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. **FASEB journal**, v. 21, n.1, p. 140–155, 2007.
123. WU, X.; HAKIMI, M.; WORTMANN, M. et al. Gene expression of inflammasome components in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of vascular patients increases with age. **Immunity & Ageing**, v, 12, p, 1-5 2015.
124. YAO, Z.Y.; ZHANG, Y.; WU, H.B. Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation. **Inflammation Research**, v. 68, n. 10, p. 815–823, 2019.
125. LEE, H.J.; GÖRING, W.; OCHS, M.; et al. Sox15 is required for skeletal muscle regeneration. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 19, p. 8428–8436, 2004.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nessa pesquisa foram realizados três estudos diferentes, avaliando mais de 47 atletas de futebol masculino da categoria sub-20 de times da primeira divisão do futebol brasileiro, proporcionando a possibilidade de maior compreensão sobre a influência de fatores genéticos sobre a resposta inflamatória após uma sessão de treinamento de alta demanda fisiológica.

Os resultados do estudo 1, mostraram que tanto a cinética quanto as concentrações sanguíneas de biomarcadores inflamatórios podem sofrer influência dos genótipos para o gene *ACTN3*, que é o gene mais estudado em relação a fenótipos da performance física. Nesse estudo, observamos através das concentrações de moléculas pró-inflamatórias (como neutrófilos, monócitos, IL-6 e TNF α) e de IGF-1, que indivíduos XX, possivelmente, apresentam fase aguda inflamatória prolongada e indicativos de um relativo atraso no processo de reparo tecidual em comparação com os indivíduos RR/RX. Esses achados corroboram com outros estudos que apontam que além de seu papel estabelecido na estrutura muscular e no desempenho físico, o polimorfismo *ACTN3* R577X potencialmente, pode modificar as adaptações ao treinamento e a recuperação após o exercício.

No estudo 2, nossos resultados sugerem que a abordagem de distância genética baseada em 10 SNPs relacionados ao desempenho e *Fst*, em comparação com *1000genomes*, foram replicáveis em populações similares, mas independentes de jogadores de futebol. Isto é difícil de conseguir em populações misturadas devido à sua heterogeneidade. Estudar populações altamente heterogêneas, como a população brasileira, representa um grande desafio para compreender a genômica dentro e entre grupos étnicos. Se a "vantagem genética" estiver presente em um grupo étnico, ela não será revelada pela comparação de casos e controles no mesmo grupo, mas sim pela comparação de indivíduos de origens diferentes. Em contrapartida, uma população miscigenada contém a maioria dos alelos de um fenótipo procurado, o que pode ser vantajoso na busca pelo entendimento da influência genética sobre fenótipos específicos. Dessa forma, a etnicidade é uma variável importante a ser considerada ao examinar o papel da hereditariedade no desempenho físico e demanda fisiológica no esporte. Portanto, nossos resultados de replicação indicam mais uma vez uma possível pressão seletiva sobre os genes relacionados ao desempenho de jogadores de futebol de elite, possivelmente relacionados simultaneamente ao desempenho físico, ambiental, cognitivo e aspectos socioculturais.

No estudo 3, dos 28 SNPs avaliados, 9 foram associados individualmente com diferentes biomarcadores e 7 SNPs de maneira combinada, explicaram de 16 a 40% das repostas inflamatórias em atletas de futebol. No entanto, cabe ressaltar que nesse estudo utilizamos apenas variáveis genéticas como preditores. Com isso, futuros estudos com a inclusão de variáveis não-genéticas (como idade, composição corporal etc.) podem melhorar os modelos de predição. Outro achado interessante do terceiro estudo, foram as associações encontradas entre diferentes SNPs relacionados à produção de colágeno (*COL5A1* rs12722, *COL5A1* rs3196378 e *COL5A1* rs1800012) e marcadores pró-inflamatórios (neutrófilos, IL-6 e TNF α), indicando que esses polimorfismos podem exercer papel importante na cascata inflamatória após a prática esportiva. Entretanto, novos estudos são necessários para confirmar esses achados e elucidar os processos fisiológicos que suportam essas associações.

O uso de painéis genômicos baseados em polimorfismos genéticos ainda tem resultados um tanto controversos (MONNERAT *et al.*, 2019). O fato de que os genes selecionados não são aleatórios, mas selecionados a partir de dados prévios referentes aos fenótipos, justifica uma investigação mais profunda. Entretanto, a alta densidade de SNPs no genoma humano e a possibilidade de que muitos deles estejam em desequilíbrio de ligação e não se segreguem independentemente fazem com que cada um dos painéis de SNPs represente haplótipos característicos de muitos marcadores genéticos simultaneamente, fazendo com que sua aplicação possa ser maior do que os dados isoladamente mostram. Assim, espera-se que o uso de painéis genômicos cada vez mais precisos e aperfeiçoadas pelas novas tecnologias genômicas de geração massiva de dados como o Sequenciamento de Nova geração, possam aproximar a ciência do exercício de uma real e eficiente aplicação da medicina de precisão em seus resultados esportivos.

Por fim, as evidências apresentadas nessa tese, podem ser usadas no futuro para a construção de um painel genético aperfeiçoado que auxilie no entendimento da demanda inflamatória de atletas. A obtenção do conhecimento prévio de como um atleta provavelmente irá responder a um determinado tipo de exercício, ajudaria as comissões técnicas na gestão da carga de treinamento maximizando os processos de recuperação e adaptações positivas ao treinamento, reduzindo o risco de lesões. Para isso, o uso de técnicas de geração massiva de dados será preponderante para que mais investigações com amostras ainda maiores, com um grande número de variantes genéticas e incluindo fatores ambientais sejam realizadas para se entender melhor a influência de genética sobre as respostas inflamatórias.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7 ed. Edition. Philadelphia: Saunders, 2012.
- ADAMS, G.R. Invited Review: Autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 3, p. 1159–1167, 2002.
- AHMETOV, I.I.; HALL, E.; SEMENOVA, E.A.; PRANCKEVIČIENĖ, E.; GINEVIČIENĖ, V. Advances in sports genomics. **Advances in clinical chemistry**, v. 107, p. 215–263, 2022.
- AHMETOV, I.I.; KULEMIN, N.A.; POPOV, D.V.; et al. Genome-wide association study identifies three novel genetic markers associated with elite endurance performance. **Biology of Sport**, v.32, n. 1, p.3-9, 2015.
- AHMETOV, I.I.; FEDOTOVSKA, O.N. Current progress in sports genomics. **Advances in Clinical Chemistry**, v.70, p. 247-314, 2015.
- ALVES, A.L.; SILAMI GARCIA, E.; MORANDI, R.F.; CLAUDINO, J.G.; PIMENTA, E.M.; SOARES, D.D. Individual analysis of creatine kinase concentration in Brazilian elite soccer players. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.21, n. 2, p.112-116, 2015.
- AL-KHELAIIFI, F.; YOUSRI, N.A.; DIBOUN, I.; et al. Genome-wide association study reveals a novel association between mybpc3 gene polymorphism, endurance athlete status, aerobic capacity and steroid metabolism. **Frontiers in genetics**, v. 11, p. 595, 2020.
- ASCENSÃO, A.; LEITE, M.; REBELO, A.N.; MAGALHÃES, S.; MAGALHÃES, J. Effects of cold water immersion on the recovery of physical performance and muscle damage following a one-off soccer match. **Journal of Sports Sciences**, v. 29, n. 3, p. 217–225, 2011.
- BAHR, R. Why screening tests to predict injury do not work-and probably never will: a critical review. **British Journal of Sports Medicine**, v.50, n.13, p.776–80, 2016.
- BAIRD, M. F.; GRAHAM, S.M.; BAKER, J.S.; BICKERSTAFF, G.F. Creatine-kinase- and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v.2012, p.1- 13, 2012.
- BANGSBO, J. The physiology of soccer – with special reference to intense intermittent exercise. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.151, n.619, p.1-155, 1994.
- BAUMERT, P.; LAKE, M.J.; STEWART, C.E.; DRUST, B.; ERSKINE, R.M. Genetic variation and exercise-induced muscle damage: implications for athletic performance, injury and ageing. **European Journal of Applied Physiology**, v.116, p.1595-1625, 2016.
- BASSEL-DUBY. R.; OLSON, E.N. Signaling pathway in skeletal muscle remodeling. **Annual Review of Biochemistry**, v.75, p.19-37, 2006.
- BELL, P.; STEVENSON, E.; DAVISON, G.; HOWATSON, G. The effects of montmorency tart cherry concentrate supplementation on recovery following prolonged, intermittent exercise. **Nutrients**, v.8, n.7, p.441-452, 2016.
- BEZERRA, J.A.; FARIAS, N.O; MELO, S.C.; et al. Responses of physiological indicators to a soccer match. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, n.

3, p. 200–205, 2016.

BLOOMFIELD, J.; POLMAN, R.; O'DONOGHUE, P. Physical demands of different positions in FA Premier League soccer. **Journal of Sports Science and Medicine**, v.6, n.1, p.63-70, 2007.

BOULYGINA, E.A.; BORISOV, O.V.; VALEEVA, E.V.; et al. Whole genome sequencing of elite athletes. **Biology of sport**, v. 37, n. 3, p. 295–304, 2020.

BOUCHARD, C.; LESAGE, R.; LORTIE, G.; SIMONEAU, J.A.; HAMEL, P.; BOULAY, M.R.; PÉRUSSE, L.; THÉRIAULT, G.; LEBLANC, C. Aerobic performance in brothers, dizygotic and monozygotic twins. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.18, n.6, p.639–46, 1986.

BOUCHARD, C. & MALINA, R.M. Genomics, genetics, and exercise biology. In: Tipton, C.M. (Ed.), **History of Exercise Physiology**. Human Kinetics, p. 105–135, 2014.

BRANCACCIO, P.; LIPPI, G.; MAFFULLI, N. Biochemical markers of muscular damage. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.48, n.6, p.757-767, 2010.

BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; LIMONGELLI, F. M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **British Medical Bulletin**, v.81-82, p. 209-30, 2007.

BRAY, M.S. Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, p. 788-792, 2000.

BUTTERFIELD, T.A.; BEST, T.M.; MERRICK, M.A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. **Journal of Athletic Training**, v.41, p.457-465, 2006.

CAUSI, S.; DI SANTOLO, M.; RYCKMAN, K.K.; WILLIAMS, S.M.; BANFI, G. Variable number of tandem repeat polymorphisms of the interleukin-1 receptor antagonist gene IL-1RN: a novel association with the athlete status. **BMC Medical Genetics**, v.11, n.1:29, 2010.

CASTAGNA, C.; VARLEY, M.; POVOAS ARAUJO, S.C.; D'OTTAVIO, S. The evaluation of the match external load in soccer: methods comparison. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v.12, n.4, p.490-495, 2017.

CHEN, X. LI, Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. **Cell Adhesion & Migration**, v.3, n.4, p.337–41, 2009.

CHENG, A.J.; JUDE, B.; LANNER, J.T. Intramuscular mechanisms of overtraining. **Redox Biology**, v. 35, n. February, p. 101480, 2020.

CLARKSON, P.M.; HUBAL, M.J. Exercise-induced muscle damage in humans. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation** v.81, 2002.

COLLINS, M.; SEPTEMBER, A.V.; POSTHUMUS, M. Biological variation in musculoskeletal injuries: current knowledge, future research and practical implications. **British Journal of Sports Medicine**, v.49, n.23, p.1497–503, 2015.

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 & Desempenho Humano, v.13, p.189-194, 2011.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O' DONNELL, M. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CRUZAT, V.F.; ROGERO, M.M.; BORGES, M.C.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.13, n.5, p. 336-42, 2007.

DA SILVA, F.O.C. & MACEDO, D.V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v.13, n.5, p. 320-328, 2011.

DAHMEN, S.R. A obra de Boltzmann em Física. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.28, n. 3, p.281-295, 2006.

DENNIS, R.A.; TRAPPE, T.A.; SIMPSON, P.; CARROL, C. HUANG, B.E.; NAGARAJAN, R.; BEARDEN, E.; GURLEY, C.; DUFF, G.W.; EVANS, W.J. Interleukin-1 polymorphisms are associated with the inflammatory response in human muscle to acute resistance exercise. **The Journal of Physiology**, v.560, n.3, p. 617-626, 2004.

DENARDI, C.A.S.; CASELLA FILHO, A.; CHAGAS, A.C.P. A Proteína C-reativa na atualidade. **Revista da SOCERJ**. V.21, n.5, p.329-334, 2008.

DEUSTER, P.A.; CONTRERAS-SESVOLD, C.L.; O'CONNOR, F.G.; et al. Genetic polymorphisms associated with exertional rhabdomyolysis. **European Journal of Applied Physiology**, v.113, n.8, p.1997-2004, 2013.

DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, A.; KASKI, J.C.; ABREU-GONZÁLEZ, P.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.J. C-reactive protein kinetics: significance of light/ dark variations in C-reactive protein in acute coronary syndrome. **Revista Española de Cardiología**, v.59, p.1204-1205, 2006.

DÖRING, F.; ONUR, S.; FISCHER, A.; BOULAY, M.R.; PÉRUSSE, L.; RANKINEN, T.; RAURAMAA, R.; WOLFARTH, B.; BOUCHARD, C. A common haplotype and the Pro582Ser polymorphism of the hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF1A) gene in elite endurance athletes. **Journal of Applied Physiology**, v.108, n.6, p.1497-1500, 2010.

DRUST, B.; REILLY, T.; CABLE, N.T. Physiological responses to laboratory-based soccer-specific intermittent and continuous exercise. **Journal of Sports Science**, n.18, p. 885-892, 2000.

EHLERT, T.; SIMON, P.; MOSER, D.A. Epigenetics in sports. **Sports Medicine**, n.43, v.2, p.93-110, 2013.

FELDENS, B.; DIAS, P.M.C.; SANTOS, W.M.S. E assim se fez o quantum. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.32, p.1-11, 2010.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J.S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v.102, n.7, p.1369-76, 1998.

FLUCK, M.; MUND, S.I.; SCHITTNY, J.C.; KLOSSNER, S.; DURIEUX, A.C.; GIRAUD, M.N. Mechano-regulated tenascin-C orchestrates muscle repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.105, v.36, 13662–7, 2008.

FORCINA, L.; MIANO, C.; PELOSI, L.; MUSARÒ, A. An overview about the biology of skeletal muscle satellite cells. **Current Genomics**, v. 20, n. 1, p. 24–37, 2019.

FORCINA, L.; COSENTINO, M.; MUSARÒ, A. Mechanisms Regulating Muscle Regeneration: Insights into the Interrelated and Time-Dependent Phases of Tissue Healing. **Cells**, v. 9, n. 5, 2020.

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**, v.9, n.1, p.101-6, 2007.

GHAFOURIAN, M.; ASHTARY-LARKY, D.; CHINIPARDAZ, R.; ESKANDARY, N.; MEHAVARAN, M. Inflammatory biomarkers' response to two different intensities of a single bout exercise among soccer players. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v.18, n.2, e21498, 2016.

GLEESON, M.; BISHOP, N.C. Immunology. In R. J. Maughan (Editor) *Basic and Applied Sciences for Sports Medicine*. **Oxford: Butterworth Heinemann**, 1999.

GLEESON, M. Immune system adaptation in elite athletes. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.9, p.659-665, 2006.

GLEESON, M.; BISHOP, N.; WALSH, N. Exercise Immunology. **Abingdon: Routledge**, 2013.

GORDON, D.; FINCH, S.J.; NOTHNAGEL, M.; OTT, J. Power and sample size calculations for case-control genetic association tests when errors present application to single nucleotide polymorphisms. **Human Heredity**, v.54, p.22-33, 2002.

GROBLER, L. COLLINS, M.; LAMBERT, M.I. Remodeling of skeletal muscle following exercise-induced muscle damage: review article. **International SportMed Journal**, v.5, n.2, p.67-83, 2004.

GUILHERME, J.; SEMENOVA, E.A.; ZEMPO, H.; et al. Are Genome-wide association study identified single-nucleotide polymorphisms associated with sprint athletic status? a replication study with 3 different cohorts. **International journal of sports physiology and performance**, v. 16, n. 4, p. 489–495, 2021.

HAN, D.; ZHAO, H.; PARADA, C.; HACIA, J.G.; BRINGAS, P.JR.; CHAI, Y. A TGFβ-Smad4- Fgf6 signaling cascade controls myogenic differentiation and myoblast fusion during tongue development. **Development**, v.139, p.1640-1650, 2012.

HIROSE, L.; NOSAKA, K.; NEWTON, M.; LAVEDER, A.; KANO, M.; PEAKE, J. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. **Exercise immunology review**, v.1, p.75–90, 2004.

HORTOBÁGYI, T.; DENAHAN, T. Variability in creatine kinase: methodological, exercise, and clinically related factors. **International Journal of Sports Medicine**, v.10, n.2, p.69-80, 1989.

HÖGLUND, J.; RAFATI, N.; RASK-ANDERSEN, M.; ENROTH, S.; KARLSSON, T.; EK, W.E.; JOHANSSON, Å. Improved power and precision with whole genome sequencing data in genome-wide association studies of inflammatory biomarkers. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, 16844, 2019.

ISPIRLIDIS I.; FATOUROS, I.G.; JAMURTAS, A.Z.; et al. Time-course of changes in inflammatory and performance responses following a soccer game. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 18, n. 5, p. 423-431, 2008.

KAMBOURIS, M.; DEL BUONO, A.; MAFFULLI, N. Genomics DNA profiling in elite professional soccer players: a pilot study. **Traditional Medicine**, v.9, n.3, p.18-22, 2014.

KARIMI, M.; GOLDIE, L.C.; CRUICKSHANK, M.N.; MOSES, E.K.; ABRAHAM, L.J. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assay for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. **European Journal of Human Genetics**, v.17, n.11, p.1454-1462, 2009.

KASAPIS, C.; THOMPSON, P. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. **Journal of the American College of Cardiology**, v.45, p.1563-1569, 2005.

KELEMPISIOTI, A.; ESKOLA, P.J.; OKULOFF, A.; et al. Genetic susceptibility of intervertebral disc degeneration among young Finnish adults. **BMC Medical Genetics**, v.12, p.153, 2011.

KOSTRZEWA-NOWAK, D.; BURYTA, R.; NOWAK, R. Comparison of selected CD45+ cell subsets' response and cytokine levels on exhaustive effort among soccer players. **Journal of Medical Biochemistry**, v.38, n.3, p.256–267, 2019.

KUROSAKA, M.; MACHIDA, S. Exercise and skeletal muscle regeneration. **Journal of Sports and Medicine and Physical Fitness**, v.1, n.3, p.537-540, 2012.

KUSHNER, I.; RZEWNICKI, D.; SAMOLS, D. What does minor elevation of C-reactive protein signify? **The American Journal of Medicine**, v.116, n. 2, p. 17-28, 2006.

LARRUSKAIN, J.; CELORRIO, D.; BARRIO, I.; et al. Genetic variants and hamstring injury in soccer: an association and validation study. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. 2018 Feb;50(2):361-368.

LEE, K.E.; KIM, J.H.; CHUNG, J.E.; LEE, G.Y. CHO, Y.J. CHANG, B.C.; GWAK, H.S. Association of inflammatory gene polymorphisms with mechanical heart valve reoperation. **SpringerPlus**, v.5, n.1, p.937-943, 2016.

LEESON. C.P.; HINGORANI, A.D.; MULLEN, M.J.; et al. Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism interacts with environmental and dietary factors to influence endothelial function. **Circulation Research**, v.90, n.11, p.1153–8, 2002.

LIN, W.P.; WANG, X.J.; WANG, C.R.; ZHANG, L.Q.; LI, N.; WANG, F.S.; LIN, J.H.; Polymorphism in the hypoxia-inducible factor 1alpha gene may confer susceptibility to LDD in Chinese cohort. **PLoS One**, v.8, n.8, e73158, 2013.

LINDHOLM, M.E.; RUNDQVIST, H. Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise. **Experimental Physiology**, v.101, n.1, p.28–32, 2016.

LITTLE, T.; WILLIAMS, A. G. Suitability of soccer training drills for endurance training. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.20, n.2, p.316–319, 2006.

MATHENY, R.W.JR.; NINDL, B.C.; ADAMO, M.L. Minireview: Mechano-growth factor: a putative product of IGF-I gene expression involved in tissue repair and regeneration. **Endocrinology**; 151: 865–875, 2010.

MOLDOVEANU, A.I.; SHEPHARD, R.J.; SHEK, P.N.; The cytokine response to physical activity and training. **Sports Medicine**; v.31, p.115-144, 2001.

MOHR, M.; DRAGANIDIS, D.; CHATZINIKOLAOU, A.; et al. Muscle damage, inflammatory, immune and performance responses to three football games in 1 week in competitive male players. **European Journal of Applied Physiology**, v.116, n.1, p.179-193, 2016.

MONTGOMERY, H.E.; MARSHALL, R.; HEMINGWAY, H.; et al. Human gene for physical performance. **Nature**, v.393, p. 221-222, 1998.

MONNERAT, G.; MAIOR, A. S.; TANNURE, M.; BACK, L.; SANTOS, C. Single-Nucleotide-Polymorphism-Panel Population-Genetics Approach Based on the 1000 Genomes Database and Elite Soccer Players. **International journal of sports physiology and performance**, 14(6), 711–717, 2019.

MUÑOZ-CANOVES, P.; SCHEELE, C.; PEDERSEN, B.K.; SERRANO, A.L.; Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? **FEBS Journal**, v.280, n.17, p.4131–48, 2013.

NAITZA, S.; PORCU, E.; STERI, M.; et al. A genome-wide association scan on the levels of markers of inflammation in sardinians reveals associations that underpin its complex regulation. **PLoS Genetics**, v.8, n.1, e1002480, 2012.

NINDL, B.C.; PIERCE, JR. Insulin-like growth factor I as a biomarker of health, fitness, and training status. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.42, p.39–49, 2010.

NOSAKA, K.; NEWTON, M.J.; SACCO, P. Attenuation of protective effect against eccentric exercise-induced muscle damage, **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.30, n.5, p.529-542, 2005.

PAULSEN, G.; MIKKELSEN, U.R.; RAASTAD, T.; PEAKE, J.M. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? **Exercise Immunology Review**, v.18, p.42-97, 2012.

PEAKE, J.; DELLA, G.P.; CAMERON-SMITH, D. Aging and its effects on inflammation in skeletal muscle at rest and following exercise-induced muscle injury. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.286, n.6, p.1485-1495, 2010.

PETERSEN, W.; VAROGA, D.; ZANTOP, T.; HASSENPFUG, J.; MENTLEIN, R.; PUFE, T. Cyclic strain influences the expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) in tendon fibroblasts. **Journal of Orthopaedic Research**, v.22, n.4, p.847–853, 2004.

PETERSEN, A.M.W.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.95, p.1154-1162, 2005.

PICKERING, C.; SURACI, B.; SEMENOVA, E.A.; et al. A genome-wide association study of sprint performance in elite youth football players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.33, n.9, p.2344-2351, 2019.

PIMENTA, E.M.; COELHO, D.B.; CRUZ, I.R.; et al. The ACTN3 genotype in soccer players in response to acute eccentric training. **European Journal of Applied Physiology**, v.112, p.1495-150, 2012.

POPEJOY, A.B.; FULLERON, S.M. Genomics is falling on diversity. **Nature**, v.538, p.161-164, 2016.

PROSKE, U.; ALLEN, T.J. Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 33, n. 2, p. 98–104, 2005.

PRUNA, R.; ARTELLS, R.; RIBAS, J.; MONTORO, B.; COS, F.; MUÑOZ, C.; RODAS, G.; MAFFULLI, N. Single nucleotide polymorphisms associated with non-contact soft tissue injuries in elite professional soccer players: influence on degree of injury and recovery time. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v.14, p. 221-229, 2013.

PRUNA, R.; ARTELLS, R.; LUNDBLAD, M.; MAFFULLI, N. Genetic biomarkers in non-contact muscle injuries in elite soccer players. **Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy**, v.25, n.10, p.3311–3318, 2017.

RAHIM, M.; GIBBON, A.; HOBBS, H.; VAN DER MERWE, W.; POSTHUMUS, M.; COLLINS, M.; SEPTEMBER, A.V.; The association of genes involved in the angiogenesis-associated signaling pathway with risk of anterior cruciate ligament rupture. **Journal of Orthopaedic Research**, v.32, n.12, p.1612–1620, 2014.

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. **Medicine Science and Sports Exercises**, 2010; v. 42, p. 835-846.

RANKINEN, T.; FUKU, N.; WOLFARTH, B.; et al. No evidence of a common dna variant profile specific to world class endurance athletes. **PloS one**, v. 11, n. 1, e0147330, 2016.

REBBECK, T.R.; SPITZ, M.; WU, X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. **Nature Reviews Genetic**, v. 5, p. 589-597, 2004.

RICO-SANZ, J.; RANKINEN, T.; JOANISSE, D.R.; LEON, A.S.; SKINNER, J.S.; WILMORE, J.H.; RAO, D.C.; BOUCHARD, C. Associations between cardiorespiratory responses to exercise and the C34T AMPD1 gene polymorphism in the HERITAGE Family Study. **Physiol Genomics**, v.14, n.2, p.161-166, 2003.

RIENZI, E.; DRUST, B.; REILLY, T.; CARTER, J.E.; MARTIN, A. Investigation of anthropometric and work-rate profiles of elite South American international soccer players. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v.40, p.162–169, 2000.

RING, E.F.; AMMER, K. Infrared thermal imaging in medicine. **Physiological Measurement**, v.33, n.3, p. 33-46, 2012.

SAUNDERS, C.J.; VAN DER MERWE, L.; POSTHUMUS, M.; COOK, J.; HANDLEY, C.J.; COLLINS, M.; SEPTEMBER, A.V. Investigation of variants within the COL27A1 and TNC genes and Achilles tendinopathy in two populations. **Journal of Orthopaedic Research**, v.31, n.4, p.632–637, 2013.

SCHMITT, N.; UENO, H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. **Current Opinion in Immunology**, v.34, p.130-136, 2015.

SEPTEMBER, A.V.; NELL, E.M.; O'CONNELL, K.; et al. A pathway-based approach investigating the genes encoding interleukin-1A, interleukin-6 and the interleukin-1 receptor antagonist provides new insight into the genetic susceptibility of Achilles tendinopathy. **British Journal of Sports Medicine**. v.45, n.13, p.1040–7, 2011.

SMITH, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.32, p.317-331, 2000.

SMITH, L.L. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.18, n.1, p.185-193, 2004.

SOUGLIES, A.; BOGDANIS, G.C.; GIANNOPOULOU, I. Comparison of inflammatory responses and muscle damage indices following a soccer, basketball, volleyball and handball games at an elite competitive level. **Research in Sports Medicine**, v.23, p.59-72, 2015.

SOUGLIS, A.G.; PAPAPANAGIOTOU, A.; BOGDANIS, G.C.; TRAVLOS, A.K.; APOSTOLIDIS, N.G.; GELADAS, N.D. Comparison of inflammatory responses to a soccer match between elite male and female players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.29, n.5, p.1227–1233, 2015.

STAMLER, J.S, MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiological Reviews**, v.81, n.1, p.209–37, 2001.

STEWART, C.E.; PELL, J.M. Point: Counterpoint: IGF is/is not the major physiological regulator of muscle mass. Point: IGF is the major physiological regulator of muscle mass. **Journal of Applied Physiology**, (1985) v.108, p.1820–1821, 2010

STEWART, C.E.; NEWCOMB, P.V.; HOLLY, J.M.P. Multifaceted roles of TNF α in myoblast destruction: a multitude of signal transduction pathways. **Journal of Cellular Physiology**, v.198, n.2, p.237-247, 2004.

STØLEN, T.; CHAMARI, K.; CASTAGNA, C.; WISLØFF, U. Physiology of soccer. **Sports medicine**, v.35, n.6, p.501–536, 2005.

STUPKA, N.; TARNOPOLSKY, MA.; YARDLEY, N.J.; PHILLIPS, S.M. Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. **Journal of Applied Physiology**, v.91, p.1669-78, 2001.

STRUDWICK, A.; REILLY, T.; DORAN, D. Anthropometric and fitness profiles of elite players in two football codes. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v.42, n.2, p.239-242, 2002.

TANIMOTO, K.; YOSHIGA, K.; EGUCHI, H.; et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. **Carcinogenesis**, v.24, n.11, p.1779–83, 2003.

TEIXEIRA, D.A.; SOUSA, C.F.P.; PEREIRA, G.L.H.; MAIA, L.F.L; TEIXEIRA, F.H; LISITA, C.L.F. Proteína c-reativa: associação entre inflamação e complicações pós-infarto agudo do miocárdio em idosos. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.7, n.1, p.24-26, 2009.

TIDBALL, J.G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 4, p. 2029–2062, 2011.

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

TIERNEY, M.T.; GROMOVA, A.; SESILLO, FB.; SALA, D.; SPENLÉ, C.; OREND, G.; SACCO, A. Autonomous extracellular matrix remodeling controls a progressive adaptation in muscle stem cell regenerative capacity during development. **Cell Reports**, v.14, n.8, p.1940-52, 2016.

TODENDI, P.F.; POSSUELO, L.G.; KLINGER, E.I.; REUTER, C.P.; BURGOS, M.S.; MOURA, D.J.; FIEGENBAUM, M.; VALIM, A.R.M. Low-grade inflammation markers in children and adolescents: Influence of anthropometric characteristics and CPR and IL-6 polymorphisms. **WOL**

TRICOLI, V. Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular tardia. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.9, p.39-44, 2001.

TURNER, N.J. & BADYLAK, S.F. Regeneration of skeletal muscle. **Cell and Tissue Research**, v. 347, n. 3, p. 759–774, 2012.

WANG, G.; PADMANABHAN, S.; MIYAMOTO-MIKAMI, E.; FUKU, N.; TANAKA, M.; MIYACHI, M.; PITSILADIS, Y.P. GWAS of elite jamaican, african american and japanese sprint athletes. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.46, p.596, 2014.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, 171, n. 4356, p. 737-738, Apr 1953.

WILLIAMSON, D.L.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Acute treatment with TNF-alpha attenuates insulin-stimulated protein synthesis in cultures of C2C12 myotubes through a MEK1-sensitive mechanism. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v.289, p.95-104, 2005.

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. **Medicine and Science Sports and Exercises**, v. 37: p. 881-903, 2005.

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. **The American Journal of Human Genetics**, v.73, n.3, p.627–631, 2003.

ANEXOS

Anexo I – Parecer de aprovação do COEP / UFMG

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de Associação Ampla do Genoma (GWAS) e a Identificação de Polimorfismos Genéticos em Jogadores de Futebol e suas Associações com Fenótipo Físicos, Dano Muscular e Respostas Inflamatórias.

Pesquisador: Eduardo Mendonça Pimenta

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Versão: 5

CAAE: 69253417.1.0000.5149

Instituição Proponente: Escola de Educação Física da Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.481.549

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos Apresentação do Projeto, Objetivo da Pesquisa e Avaliação dos Riscos e Benefícios foram retiradas dos documentos submetidos e informações inseridas pelo pesquisador responsável na Plataforma Brasil em 18.10.2017.

INTRODUÇÃO

O futebol é um esporte caracterizado por ações intermitentes de alta intensidade. Estas ações demandam grande geração de força excêntrica, a qual está relacionada com o aumento do dano muscular e da resposta inflamatória após treinamentos e jogos. A resposta inicial após o dano muscular é chamada de fase aguda da inflamação, da qual predominam fenômenos como a migração de leucócitos, produção de radicais livres e a elevação das concentrações de biomarcadores inflamatórios na corrente sanguínea. Em conjunto deste processo inflamatório ocorre um aumento da vascularização tecidual local. Nesta resposta inflamatória aguda, alguns sinais cardinais são produzidos pelo organismo tais como: calor, rubor, dor e tumor. Desta forma, em função de uma maior vascularização, geração de calor nos músculos exercitados, tem sido sugerido que a temperatura da pele (TP) registrada nas regiões corporais exercitadas pode ser

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 2.481.549

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Atletas na faixa acima de 13 anos, que estiverem vinculados a clubes da primeira divisão do futebol brasileiro, que realizem treinamentos regulares e participe de competições regidas pela federação deste esporte. O atleta deverá se encontrar saudável para a sua atividade e concordar com o termo de consentimento livre e esclarecido.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

A não participação no treinamento por motivos de lesões ortopédicas ou qualquer outro motivo. A presença de gêmeos univitelinos nos grupos a serem estudados por possuírem perfis genéticos idênticos, apenas os dados referentes a um deles farão parte desta investigação. E por fim, atletas que fazem uso de alguma medicação que influencie nas variáveis coletadas para as análises das respostas inflamatórias.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar através de GWAS, possíveis polimorfismos genéticos relacionados à fenótipos físicos, ao dano muscular e à diferentes respostas inflamatórias após um treinamento excêntrico em atletas de futebol brasileiros.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**RISCOS**

Os riscos deste estudo são relativamente pequenos e estão associados com dores musculares, cansaço e possível desconforto devido à atividade física. Outro risco está relacionado com a coleta sanguínea. No entanto, a coleta de sangue será feita pelo médico responsável pelo departamento médico do clube seguindo todas as recomendações necessárias para esse tipo de procedimento. Outro risco possível é o de constrangimento. Para minimizá-lo, as coletas serão realizadas sempre individualmente, pelo médico do clube, em uma sala separada e a confidencialidade dos dados será sempre mantida.

BENEFÍCIOS

A análise e o entendimento da influência de fatores genéticos sobre as respostas inflamatórias de atletas de futebol podem auxiliar na prescrição de carga para atletas de futebol, maximizando o processo de recuperação, reduzindo assim o risco de lesões.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.481.549

RESPOSTA: Solicitação atendida conforme texto grifado: Em estudos de genética as amostras são armazenadas para estudos futuros e criação de bancos de dados. O BANCO DE DADOS SÓ SERÁ CRIADO APÓS A DEVIDA APROVAÇÃO DA CONEP, MEDIANTE SUBMISSÃO DE PROTOCOLO DE DESENVOLVIMENTO, CONFORME ANEXO II DA NORMA OPERACIONAL Nº 001 DE 2011. Os dados de cada participante receberão um código e não terão nenhuma identificação que permita associá-lo a um participante em particular. O cadastro das amostras é realizado através de um banco de dados, onde apenas a equipe de pesquisadores, envolvida no projeto, tem acesso. As amostras restantes serão acondicionadas a 4 graus (por um período máximo de 05 anos), no Laboratório de Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, devidamente identificadas com os respectivos códigos. Caso algum pesquisador queira utilizá-la futuramente, o mesmo deverá submeter um novo projeto e, somente depois da aprovação do mesmo no Comitê de Ética, terá acesso ao banco de dados. Reforçamos que todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em sigilo.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|--------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_922547.pdf | 14/11/2017 20:23:26 | | Aceito |
| Outros | Carta_Resposta_CONEP2.pdf | 14/11/2017 20:22:12 | Eduardo Mendonça Pimenta | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_para_responsaveis.docx | 14/11/2017 20:19:34 | Eduardo Mendonça Pimenta | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de | TALE.docx | 14/11/2017 20:16:24 | Eduardo Mendonça Pimenta | Aceito |

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.481.549

| | | | | |
|---|---|------------------------|-----------------------------|--------|
| Ausência | TALE.docx | 14/11/2017 20:16:24 | Eduardo Mendonça Pimenta | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx | 14/11/2017 20:16:09 | Eduardo Mendonça Pimenta | Aceito |
| Outros | Carta_de_anuencia.pdf | 16/10/2017 06:43:05 | Eduardo Mendonça Pimenta | Aceito |
| Outros | 692534171parecerassinado.pdf | 12/07/2017 13:59:33 | Vivian Resende | Aceito |
| Outros | 692534171aprovacaoassinada.pdf | 12/07/2017 13:59:26 | Vivian Resende | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_detalhado_Estudo_de_associacao_ampla_do_genoma_em_atletas_de_futebol.docx | 28/06/2017 10:45:20 | Eduardo Mendonça Pimenta | Aceito |
| Outros | Parecer_Consubstanciado.pdf | 02/06/2017 10:17:39 | Eduardo Mendonça Pimenta | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_Rosto.pdf | 31/05/2017 10:19:01 | Eduardo Mendonça Pimenta | Aceito |

Situação do Parecer:
Aprovado

BRASILIA, 02 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA (GWAS) E A IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÕES GENÉTICAS EM JOGADORES DE FUTEBOL E SUAS POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM O DANO MUSCULAR E RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS

Convidamos você para ser voluntário do projeto de pesquisa intitulado “*ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA (GWAS) E A IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÕES GENÉTICAS EM JOGADORES DE FUTEBOL E SUAS POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM O DANO MUSCULAR E RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS*”, cujo objetivo é identificar através de GWAS, possíveis polimorfismos genéticos relacionados a fenótipos físicos, ao dano muscular e à diferentes respostas inflamatórias após um treinamento excêntrico em atletas de futebol brasileiros.

Você treinará normalmente em seu clube de futebol e seguirá a programação de treinos do mesmo. Inicialmente, serão realizadas medidas antropométricas. A massa corporal (kg) será medida com uma balança digital (Filizola[®]) com precisão de 0,02 kg previamente calibrada. A estatura (cm) será medida utilizando-se um estadiômetro acoplado à balança digital (Filizola[®]) com precisão de 0,5 cm. As dobras cutâneas (subescapular, trícepal, peitoral, suprailíaca, supraespinhal, abdominal, coxa e panturrilha) serão obtidas utilizando-se um plicômetro graduado em milímetros (Lange[®]). As circunferências (braço contraído e panturrilha) serão mensuradas através de um trena antropométrica com precisão de 0,1 cm (Sunny[®]) e os diâmetros ósseos (biestilóide rádio-ulnar, biepicondiliano de úmero e biepicondiliano de fêmur) serão obtidos através de um paquímetro antropométrico com precisão de 0,1 cm (Cescorf[®]). Em seguida serão realizados os testes de campo específicos para o futebol, já rotineiros em seu clube.

Após esse momento inicial, no período da manhã do dia 2 do estudo, ocorrerá a primeira coleta de sangue para a genotipagem e análise dos biomarcadores (Hemograma, CK, PCR, IL-6, TNF α , IGF-1). Nesse mesmo período também será realizada a aquisição de imagens

termográficas. Em seguida você realizará a sessão de treinamento excêntrico. Após essa sessão de treinamento, serão realizadas mais 4 coletas sanguíneas para a análise dos biomarcadores. Essas coletas serão realizadas nos momentos imediatamente após, 3 horas após, 24 horas após e 48 horas após a sessão de treinamento. Nos momentos 24 e 48 horas após também será realizada a coleta de imagens termográficas. No momento de aquisição das imagens termográficas você deverá ficar de sunga. Todas essas coletas serão realizadas pelo médico responsável do clube, individualmente, em uma sala separada e aclimatizada a 22°C e 65%URA.

Para monitoramento da sessão de treinamento, 30 minutos antes, lhe será entregue no vestiário por um dos pesquisadores um aparelho de posicionamento por satélite (GPS) com um cardiófrequencímetro acoplado (Polar Team System®, Finlândia) para serem utilizados durante o treino.

Todos os seus dados pessoais serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso a essas informações. Os dados coletados serão utilizados para fins de pesquisa e ensino e ficarão armazenados no Laboratório de Psicologia do Esporte e no Laboratório de Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os riscos deste estudo são relativamente pequenos e estão associados com dores musculares, cansaço e possível desconforto devido à atividade física. Outro risco está relacionado com a coleta sanguínea. No entanto, a coleta de sangue será feita pelo médico responsável pelo departamento médico do clube seguindo todas as recomendações necessárias para esse tipo de procedimento. Outro risco possível é o de constrangimento. Para minimizá-lo, as coletas serão realizadas sempre individualmente, pelo médico do clube, em uma sala separada e a confidencialidade dos dados será sempre mantida. Por outro lado, sua participação nesta pesquisa proporcionará benefícios como produção e disseminação de conhecimento através de artigos científicos que serão gerados, ajudando no processo de trabalho de treinadores esportivos.

Não está prevista qualquer forma de remuneração para os voluntários. Todas as despesas especificamente relacionadas ao estudo são de responsabilidade do Laboratório de Psicologia do Esporte.

Você dispõe de total liberdade para esclarecer as questões que possam surgir durante a pesquisa. Qualquer dúvida, por favor, entre em contato com os pesquisadores responsáveis pelo estudo: Dr. Eduardo Mendonça Pimenta, tel. (31) 99156-3142 e Tane Kanope Ferreira Serpa, (31) 99800-7878 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar, sl. 2005 cep. 31270901 - BH/MG, tel. 34094592, email: coep@prpq.ufmg.br. Você poderá se recusar a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar e sem que isso seja motivo de qualquer tipo de constrangimento para você. Os pesquisadores podem decidir sobre a sua exclusão do estudo por razões científicas, sobre as quais você será devidamente informado.

Antes de concordar em participar desta pesquisa e assinar este termo, os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas e, se você concordar em participar do estudo, deve ser entregue uma via deste termo para você.

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito de todos os dados que li e concordo, voluntariamente, em participar do estudo *“Estudo de Associação Ampla do Genoma (GWAS) e a Identificação de Polimorfismos Genéticos em Jogadores de Futebol e suas Associações com a Fenótipos Físicos, Dano Muscular e Respostas Inflamatórias”*

Belo Horizonte ____ de _____ de 2020

Assinatura do voluntário: _____

Nome: _____

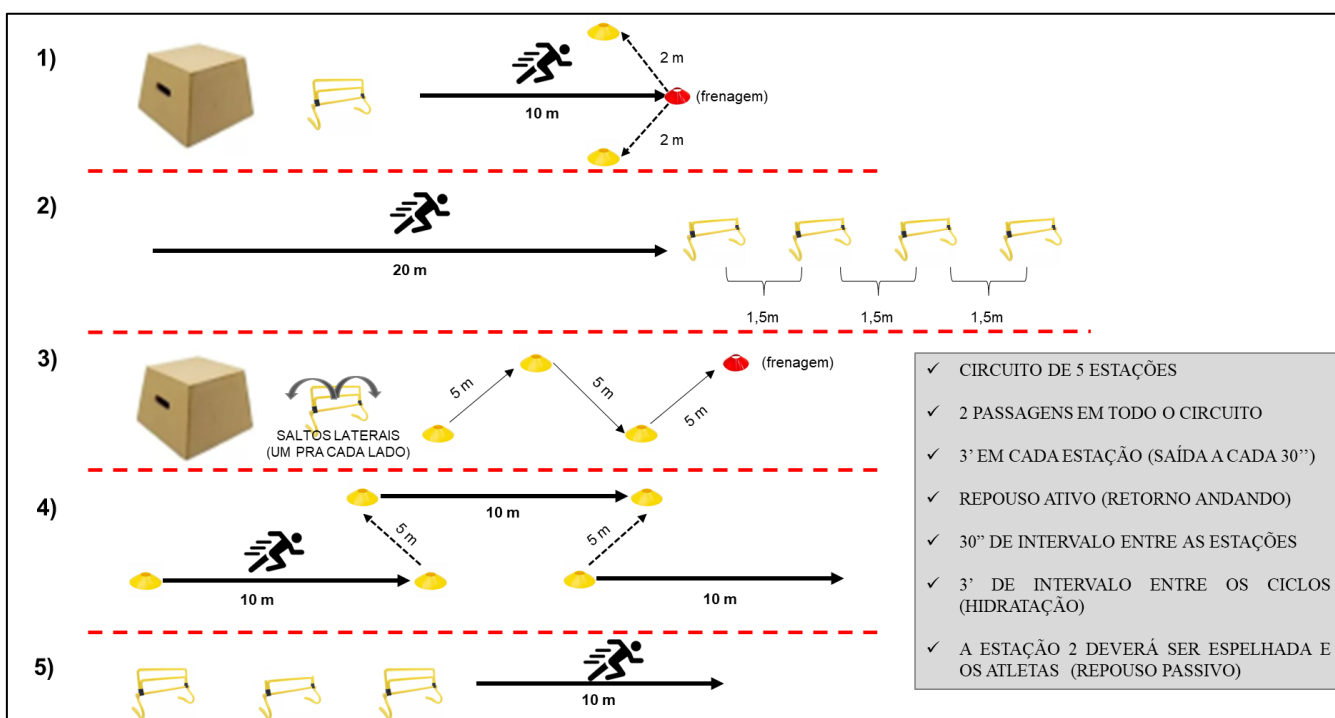
Declaro que expliquei os objetivos deste estudo para o voluntário, dentro dos limites dos meus conhecimentos científicos.

Tane Kanope Ferreira Serpa

Doutorando em Ciências do Esporte – EEEFTO/ UFMG

Dr. Eduardo Mendonça Pimenta
Orientador e Professor da EEEFTO/ UFMG

Anexo III – Protocolo da sessão de treinamento



Anexo IV – Protocolo de extração swab genoma completo

Protocolo de extração swab genoma completoPrepare as amostras e faça a digestão com Proteinase K

- Coloque um cotonete, com a cabeça para baixo, em uma placa de poço profundo.
- Quebre o bastão das zaragatoas de modo que as zaragatoas assentem nos poços sem sobressair.

Os cotonetes recomendados têm um ponto de quebra fácil, abaixo do cotonete, que aparece como um leve recuo na porção da haste do cotonete.

- Prepare uma mistura de Proteinase K suficiente de acordo com a tabela a seguir e, em seguida, inverta suavemente ou pipete várias vezes para cima e para baixo para misturar bem os componentes.

| Componente ¹ | Volume por poço (µL) | Volume por placa (96 poços) (mL) | Volume 55 amostras (µL) |
|-------------------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Enhacer Solution | 40 | 4,22 | 2200 |
| PBS | 400 | 42,24 | 22000 |
| Proteinase K | 40 | 4,22 | 2200 |
| Volume total | 480 | 50,68 | 26400 |

¹Pipete os componentes na ordem em que estão listados na tabela.

IMPORTANTE! Faça uma mistura suficiente para uso imediato. A mistura não é estável por períodos prolongados e resultará em uma redução do rendimento de DNA.

- Adicione 480 µL da mistura de Proteinase K a cada poço contendo um cotonete.

Tenha cuidado para evitar tocar a ponta da pipeta no cotonete ao pipetar a Mistura de Proteinase K para os poços de amostra.

- Selecione a placa com filme adesivo MicroAmp™ e agite a placa selada a 900 rpm (configuração 9) por 5 minutos.
- Retire a placa do agitador de placas e incube a 65°C por ≥ 20 minutos.

IMPORTANTE! Organize as placas na incubadora para permitir o fluxo adequado em torno dos poços da placa para garantir que as amostras alcancem e mantenham rapidamente a temperatura de incubação.

Adicionar beads de ligação de DNA

- Durante a digestão da Proteinase K, prepare o DNA Binding Bead Mix de acordo com a tabela a seguir.

| Componente | Volume por poço (µL) | Volume por placa (96 poços) (mL) | Volume 55 amostras (µL) |
|------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------|
|------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------|

| | | | |
|---------------------|------------|--------------|--------------|
| Binding Solution | 400 | 42,24 | 22000 |
| DNA Binding Beads | 40 | 4,22 | 2200 |
| Volume total | 440 | 46,46 | 24200 |

- b. Após a digestão com Proteinase K, transfira os lisados para os poços correspondentes de uma nova placa de poços profundos e, em seguida, descarte os esfregaços bucais.

| Para remover o swab do lisado | Procedimento |
|--|--|
| Transfira o lisado para uma nova placa | 1. Utilizando a multicanal, pipete 480µL da placa com lisado para uma nova placa, uma coluna por vez |
| | 2. Certifique-se de que cada pocinho contenha entre 420-480µL depois da transferência. |

- c. Adicione 440 µl de DNA Binding Bead Mix a cada poço de amostra e pipete para cima e para baixo 5 vezes para misturar.

Nota: a mistura é viscosa, pipete lentamente para garantir que a quantidade correta seja adicionada.

IMPORTANTE! Evite criar bolhas durante a mistura e alíquota.

- d. Sele a placa com o filme adesivo transparente MicroAmp™, garantindo que esteja adequadamente selado ao redor dos poços individuais.
- e. Agite a placa selada por 5 minutos a 800 rpm (configuração 8).
- f. Coloque a placa selada no suporte magnético por pelo menos 5 minutos ou até que todas as beads tenham sido coletadas.

Lave as beads de ligação de DNA

- a. Mantendo a placa sobre o ímã, remova cuidadosamente a tampa e aspire lentamente e descarte o sobrenadante de cada poço.

IMPORTANTE! Evite encostar nas beads.

- b. Remova a placa do suporte magnético e adicione 1 mL de Solução de Lavagem I a cada amostra.
- c. Volte a selar a placa e agite durante 1 minuto a 800 rpm (configuração 8).
- d. Coloque a placa de volta no suporte magnético por 1 minuto ou até que todas as beads tenham sido coletadas.
- e. Mantendo a placa no ímã, remova a tampa com cuidado e descarte o sobrenadante de cada poço.

IMPORTANTE! Evite encostar nas beads.

- f. Repita as etapas b – e usando 1 mL de solução Wash II.
- g. Repita as etapas b – e usando 500 µL de solução Wash II.
- h. Seque as beads agitando a placa (descoberta) por 2 minutos a 900 rpm (configuração 9).

Eluir o DNA

- a. Adicione 50–100 μL de solução de eluição a cada amostra e sele a placa com o filme adesivo transparente MicroAmp™.
- b. Coloque a placa em uma incubadora a 70°C por 5 minutos.
- c. Remova a placa da incubadora e coloque no agitador de titulação por 5 minutos a 800 rpm (configuração 8).
- d. Coloque a placa selada no suporte magnético por 3 minutos para sedimentar as beads contra os ímãs.
- e. Mantenha a placa no ímã e remova cuidadosamente o selo, em seguida, transfira os eluatos (que contêm o gDNA purificado) para uma placa padrão nova (não de poço profundo).

IMPORTANTE! Para evitar a evaporação, vede a placa que contém o eluato imediatamente após a conclusão das transferências.

O DNA purificado está pronto para uso imediato. Como alternativa, armazene a placa a 2–6°C por 24 horas ou a $\leq -20^\circ\text{C}$ para armazenamento de longo prazo.

Anexo V – Protocolo de sequenciamento do genoma completo (WGS)

PROCOLO WGS ILLUMINA

1. Quantificar as amostras no Qubit (máximo 7 dias antes da execução).
2. Deixar o reagente RSB atingir a temperatura ambiente.
3. Calibrar o shaker de placas para 1800 rpm.
4. Identificar as placas com o barcode (DNA, CFP, CSP, IMP).
5. Normalizar as amostras com RSB (Resuspension Buffer).
 - a. Acrescentar volume de RSB às amostras conforme tabela 1 (lug de DNA para fragmentos de **350 bp**).

Tabela 1 - Tabela de diluição das amostra

| ID | Sigla | Atleta | Quantificação 07/07 (ng/μL) | Volume de amostra (μL) | Concentração para seq | Volume Seq (μL) | Volume RSB (μL) |
|----|---------|--|-----------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | MICCO | MATHEUS ISAIAS CARVALHO CHAGAS DE OLIVEIRA | 45,3 | 22,07 | 18,18 | 55 | 32,93 |
| 2 | RCSP | RIQUELME COSTA SANTOS PAULO | 23,2 | 43,10 | 18,18 | 55 | 11,90 |
| 3 | OLZ | OSMAR LUCAS ZOCCHI | 31,9 | 31,34 | 18,18 | 55 | 23,66 |
| 4 | Joarley | Joarley | 26,4 | 37,88 | 18,18 | 55 | 17,13 |
| 5 | LE | Luis Eduardo | 49,3 | 20,28 | 18,18 | 55 | 34,72 |
| 6 | LO | Luis Otávio | 49,8 | 20,08 | 18,18 | 55 | 34,92 |
| 7 | DT | Daivison Tiburcio | 37,6 | 26,59 | 18,18 | 55 | 28,41 |
| 8 | IC | Iago Campos | 41,3 | 24,21 | 18,18 | 55 | 30,79 |
| 9 | MBR | MICHAEL BATISTA RODRIGUES | 80,4 | 12,44 | 18,18 | 55 | 42,56 |
| 10 | NB | Natan Brito | 49,5 | 20,20 | 18,18 | 55 | 34,80 |
| 11 | SE | Samuel Ethor | 100 | 10,00 | 18,18 | 55 | 45,00 |
| 12 | GS | Guilherme Souza | 85,4 | 11,71 | 18,18 | 55 | 43,29 |
| 13 | VHMR | VINICIUS HENRIQUE MARTINS REIS | 16,2 | * | 18,18 | 55 | ** |
| 14 | GA | Giovane Albuquerque | 39,6 | 25,25 | 18,18 | 55 | 29,75 |
| 15 | LMS | LUCAS MORAIS DE SOUZA | 32,3 | 30,96 | 18,18 | 55 | 24,04 |
| 16 | TJ | Thiago Juan | 96,2 | 10,39 | 18,18 | 55 | 44,61 |
| 17 | IS | Isaque Storoli | 74,2 | 13,48 | 18,18 | 55 | 41,52 |
| 18 | WH | Wesley Hudson | 55 | 18,18 | 18,18 | 55 | 36,82 |
| 19 | PCBS | PEDRO CESAR BARONI SERRANO | 45,5 | 21,98 | 18,18 | 55 | 33,02 |
| 20 | JGFMD | JOÃO GABRIEL FERREIRA MACARIO DIAS | 18,2 | * | 18,18 | 55 | ** |
| 21 | LSS | LUCAS DOS SANTOS SOUZA | 38 | 26,31 | 18,18 | 55 | 28,69 |
| 22 | MV | Michael Vitorino | 54 | 18,52 | 18,18 | 55 | 36,48 |
| 23 | MS | Micael dos Santos | 58 | 17,24 | 18,18 | 55 | 37,76 |
| 24 | GS | Guilherme Santos | 60 | 16,67 | 18,18 | 55 | 38,34 |
| 25 | LF | Luis Fernando | 88,2 | 11,34 | 18,18 | 55 | 43,66 |
| 26 | RR | Rian Roberto | 49,5 | 20,20 | 18,18 | 55 | 34,80 |
| 27 | LO | Luciano Oliveira | 26,1 | 38,31 | 18,18 | 55 | 16,69 |
| 28 | VVM | VINICIUS VENTURA MOREIRA | 3,36 | - | 18,18 | 55 | - |
| 30 | PC | Patrick Cruz | 25,4 | 39,37 | 18,18 | 55 | 15,63 |

| | | | | | | | |
|----|------|---|-------|-------|-------|----|--------|
| 31 | CRBB | CAIO RANGEL BARBOSA BARREIROS | 41,1 | 24,33 | 18,18 | 55 | 30,67 |
| 32 | EAT | ELDER AZEVEDO TIMM | 47,1 | 21,23 | 18,18 | 55 | 33,77 |
| 33 | CS | Caleb silva | 39,7 | 25,19 | 18,18 | 55 | 29,81 |
| 34 | IM | Iury Marley | 48,4 | 20,66 | 18,18 | 55 | 34,34 |
| 35 | MC | Matheus Campos | 60 | 16,67 | 18,18 | 55 | 38,34 |
| 36 | CC | Claúdio Coelho | 81,6 | 12,25 | 18,18 | 55 | 42,75 |
| 37 | VAST | VINICIUS AUGUSTO DOS SANTOS TOMAZ | 38,1 | 26,24 | 18,18 | 55 | 28,76 |
| 38 | HR | Hiago Ribeiro | 156,8 | 6,38 | 18,18 | 55 | 48,62 |
| 39 | ML | Matheus Lima | 33,3 | 30,03 | 18,18 | 55 | 24,97 |
| 40 | KSS | KEVYN DA SILVA SOARES | 8,06 | * | 18,18 | 55 | ** |
| 41 | MHAS | MATEUS HENRIQUE ALVES SILVA | 29,3 | 34,13 | 18,18 | 55 | 20,87 |
| 42 | CD | Carlos Daniel | 146,8 | 6,81 | 18,18 | 55 | 48,19 |
| 43 | NA | Alex Nascimento | 53 | 18,87 | 18,18 | 55 | 36,13 |
| 44 | KK | Kevin Kesley | 45,9 | 21,78 | 18,18 | 55 | 33,22 |
| 45 | GHF | GUILHERME HENRIQUE FRANCHESCHI | 3,25 | - | 18,18 | 55 | - |
| 46 | VGMC | VICTOR GABRIEL DA MATA CORREA | 31,9 | 31,34 | 18,18 | 55 | 23,66 |
| 47 | LC | Lucas Dias | 54 | 18,52 | 18,18 | 55 | 36,48 |
| 48 | GC | Gabriel Chagas | 35,4 | 28,25 | 18,18 | 55 | 26,75 |
| 49 | RS | Rocyan Santiago | 12,2 | 81,96 | 18,18 | 55 | -26,96 |
| 50 | EE | Emmanuel Elias | 48,5 | 20,62 | 18,18 | 55 | 34,38 |

*Usar todo o volume de amostra

**Completar para 55 µL

6. Vortexar as amostras à 1800 rpm por 2 minutos.
7. Centrifugar as amostras à 280 x g por 1 minuto.
8. Acondicionar as amostras em recipiente de forma a mantê-las congeladas.
9. Levar as amostras para a USP para fragmentação.

Fragmentação do DNA - USP

1. Transferir **53µL** do DNA separadamente nas strips COVARIS.
2. Centrifugar à 280 x g por 5 segundos.
3. Colocar no equipamento conforme protocolo:

| | |
|--------------------------|------|
| Duty Cycle (%) | 20 |
| Intensity | - |
| Peak/Displayer Power (W) | 75 |
| Cycles/Burst | 1000 |
| Duration (seconds) | 35* |
| Mode | - |
| Temperature (°C) | 7 |

*O tempo vai variar entre 30, 35 ou 34 segundos se for realizado em microtubo individual, microtubo em strip ou em placa, respectivamente. 15 minutos aproximadamente para 24 amostras.

4. Centrifugar à 280 x g por 5 segundos.
5. Transferir **50µL** das amostras para tubo de low bind.
6. Acondicionar as amostras em recipiente de forma a mantê-las congeladas.
7. Levar as amostras de volta ao DLE.

Clean Up

1. Retirar o reagente SPB por, no mínimo, 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Preparar etanol 80% em volume suficiente para 800 μ L/amostra (21,6mL).

| | | |
|------------------|-----|-------|
| | 1 | X 30 |
| Etanol | 640 | 19200 |
| H ₂ O | 160 | 4800 |
| Total | 800 | 24000 |

3. Transferir as amostras fragmentadas para placa CFP. Conforme abaixo.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------------------------------------|-----------|---|-----------|---|------------|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 1 - MICCO | | 9 - MBR | | 17 - IS | | | | | | | |
| B | 2 - RCSP | | 10 - NB | | 18 - WH | | | | | | | |
| C | 3 - OLZ | | 11 - SE | | 19 - PCBS | | | | | | | |
| D | 4 - JT | | 12 - GS | | 20 - JGFMD | | | | | | | |
| E | 5 - LE | | 13 - VHMR | | 21 - LSS | | | | | | | |
| F | 6 - LO | | 14 - GA | | 22 - MV | | | | | | | |
| G | 7 - DT | | 15 - LMS | | 23 - MS | | | | | | | |
| H | 8 - IC | | 16 - TJ | | 24 - GS | | | | | | | |
| PLACA BIBLIOTECA 01 – 12 e 13/07/2021 | | | | | | | | | | | | |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------------------------------------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|---|---|---|----|----|----|
| A | | 25 - LF | | 34 - IM | | 42 - CD | | | | | | |
| B | | 26 - RR | | 35 - MC | | 43 - NA | | | | | | |
| C | | 27 - LO | | 36 - CC | | 44 - KK | | | | | | |
| D | | 28 - VVM | | 37 - VAST | | 46 - VGMC | | | | | | |
| E | | 30 - PC | | 38 - HR | | 47 - LD | | | | | | |
| F | | 31 - CRBB | | 39 - ML | | 50 - EE | | | | | | |
| G | | 32 - EAT | | 40 - KSS | | | | | | | | |
| H | | 33 - CS | | 41 - MHAS | | | | | | | | |
| PLACA BIBLIOTECA 02 – 14 e 15/07/2021 | | | | | | | | | | | | |

4. Vortexar SPB.
5. Dispensar 80 μ L de SPB em cada poço.
6. Vortexar à 1800 rpm por 2 minutos.
7. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
8. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.
9. Colocar a placa na rack magnética e esperar até que o líquido esteja claro (aproximadamente 8 minutos).
10. Remover e descartar o sobrenadante.
11. Adicionar 200 μ L de etanol 80% em cada poço.
12. Incubar na rack magnética por 30 segundos.
13. Remover e descartar todo o sobrenadante.
14. Adicionar 200 μ L de etanol 80% em cada poço.
15. Incubar na rack magnética por 30 segundos.
16. Remover e descartar todo o sobrenadante.

17. Utilizar uma pipeta de 20 μ L para remover o etanol residual.
18. Deixar secar à temperatura ambiente na rack magnética por 5 minutos.
19. Adicionar 62 μ L RSB a cada poço e retire a placa da raque magnética.
20. Vortexar à 1800rpm por 2 minutos.
21. Incubar à temperatura ambiente por 2 minutos
22. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.
23. Colocar a placa na rack magnética e esperar até que o líquido esteja claro (2-5 minutos).
24. Transferir 60 μ L do sobrenadante para a placa IMP.

Preparação dos fragmentos

1. Deixar os reagentes ERP 2 atingirem a temperatura ambiente e conserve no gelo
2. Pré-aqueça o termociclador a 30°C.
3. Identifique as midi plates como ALP e CEP.
4. Adicionar 40 μ L de ERP2.
5. Vortexar a placa à 1800 rpm por 2 minutos.
6. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.
7. Aquecer a placa no termociclador à 30°C por 30 minutos.
8. Colocar a placa imediatamente no freezer, até a próxima etapa.
9. Vortexar o SPB e prepara-lo em um tubo cônico de 15 mL conforme abaixo.

| Reagentes | 1 | X 30 |
|-----------|--------|--------|
| SPB | 109,25 | 3277,5 |
| H2O | 74,75 | 2242,5 |

Remoção de fragmentos grandes

1. Vortexar o SPB diluído.
2. Adicionar 160 μ L do SPB em cada poço.
3. Vortexar a placa à 1800 rpm por 2 minutos.
4. Incubar à temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.
6. Colocar a placa na rack magnética e esperar até que o líquido esteja claro (aproximadamente 5 minutos).
7. Transfira 250 μ L do sobrenadante para a placa CEP.
8. Descarte o SPB residual.

Remoção de fragmentos pequenos

1. Vortexar SPB (não diluído).
2. Adicionar 30 μ L de SPB (não diluído) em cada poço.
3. Vortexar à 1800 rpm por 2 minutos.
4. Incubar à temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.
6. Colocar a placa na rack magnética e esperar até que o líquido esteja claro (aproximadamente 5 minutos).
7. Remover e descartar o sobrenadante.
8. Adicionar 200 μ L de etanol 80%.
9. Incubar na rack magnética à temperatura ambiente por 30 segundos.
10. Remover e descartar todo o sobrenadante.
11. Adicionar 200 μ L de etanol 80%.

12. Incubar na rack magnética à temperatura ambiente por 30 segundos.
13. Remover e descartar todo o sobrenadante.
14. Utilizar uma pipeta de 20 μ L para remover todo o etanol residual.
15. Deixar secar na rack magnética à temperatura ambiente por 5 minutos.
16. Adicionar 17,5 μ L RSB e remover da rack magnética.
17. Vortexar a placa à 1800 rpm por 2 minutos.
18. Incubar à temperatura ambiente por 2 minutos.
19. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.
20. Colocar a placa na rack magnética e esperar até que o líquido esteja claro (aproximadamente 5 minutos).
21. Transfira 15 μ L do sobrenadante para a placa ALP.
22. Selar a placa com Microseal B
23. Armazenar a placa entre -25°C e -15°C.

PONTO DE PARADA

Preparação da biblioteca

1. Deixar os reagentes ATL atingir a temperatura ambiente.
2. Deixar o RSB por 30 minutos à temperatura ambiente.
3. Programar o termociclador conforme abaixo, iniciar o programa e pausar quando atingir a primeira temperatura:

| Temperatura | Tempo (minutos) | Ciclo |
|-------------|-----------------|----------|
| 37°C | 30 | 1 |
| 70°C | 5 | 1 |
| 4°C | HOLD | ∞ |

4. Adicionar 2,5 μ L de RSB em cada poço.
5. Centrifugar ATL à 600 x g por 5 segundos.
6. Adicionar 12,5 μ L ATL em cada poço.
7. Vortexar a placa à 1800 rpm por 2 minutos.
8. Colocar a placa no termociclador e continuar a corrida com a tampa aquecida.
9. Colocar a placa no freezer, imediatamente, por 5 minutos.

Ligação dos adaptadores

1. Deixar o reagente CTL à temperatura ambiente e mantê-lo no gelo.
2. Deixar os reagentes RSB e SPB por 30 minutos à temperatura ambiente
3. Retirar os adaptadores DNA 10 minutos antes do uso.
4. Pré-aquecer o termociclador à 30°C.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|---|---|---|----|----|----|
| A | 1 - MICCO | 9 - MBR | 17 - IS | 25 - LF | 34 - IM | 42 - CD | | | | | | |
| B | 2 - RCSP | 10 - NB | 18 - WH | 26 - RR | 35 - MC | 43 - NA | | | | | | |
| C | 3 - OLZ | 11 - SE | 19 - PCBS | 27 - LO | 36 - CC | 44 - KK | | | | | | |
| D | 4 - JT | 12 - GS | 20 - JGFMD | 28 - VVM | 37 - VAST | 46 - VGMC | | | | | | |
| E | 5 - LE | 13 - VHMR | 21 - LSS | 30 - PC | 38 - HR | 47 - LD | | | | | | |
| F | 6 - LO | 14 - GA | 22 - MV | 31 - CRBB | 39 - ML | 50 - EE | | | | | | |
| G | 7 - DT | 15 - LMS | 23 - MS | 32 - EAT | 40 - KSS | | | | | | | |
| H | 8 - IC | 16 - TJ | 24 - GS | 33 - CS | 41 - MHAS | | | | | | | |
| PLACA BARCODES | | | | | | | | | | | | |

5. Identificar as placas com CAP barcode e outra com a etiqueta de barcode.
6. Centrifugar a placa à 280 x g por 1 minuto.
7. Remover cuidadosamente o selo.
8. Identifique a placa com a etiqueta “Index Adapter Barcode”.
9. Retire o reagente LIG2 do freezer e manter no cooler.
10. Adicione os reagentes na ordem listada:
 - a. 2,5µL de CTL (ou RSB);
 - b. 2,5µL de DNA adapters;
 - c. 2,5µL de LIG2.
11. Selar a placa.
12. Vortexar a placa à 1800 rpm por 2 minutos.
13. Centrifugar a placa à 280 x g por 1 minuto.
14. Incubar a placa por 10 minutos à 30°C no termociclador, com a tampa fechada e aquecida.
15. Preparar etanol 80% em volume suficiente para 800µL/amostra (21,6mL).

| | | |
|------------------|-----|-------|
| | 1 | X 30 |
| Etanol | 640 | 19200 |
| H ₂ O | 160 | 4800 |
| Total | 800 | 24000 |

16. Colocar imediatamente no gelo. Até a próxima etapa estar pronta.
17. Centrifugar o STL à 600 rpm por 5 segundos.
18. Adicionar 5µL de STL em cada poço.
19. Vortexar à 1800 rpm por 2 minutos.
20. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.

Remoção dos fragmentos não ligados

1. Adicionar 42,5µL de SPB em cada poço.
2. Vortexar à 1800 rpm por 2 minutos.
3. Incubar à temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.
5. Colocar a placa na rack magnética e esperar até que o líquido esteja claro (2-5 minutos).
6. Remover e descartar o sobrenadante.
7. Adicional 200µL de etanol 80%.
8. Incubar na rack magnética por 30 segundos.
9. Remover e descartar todo o sobrenadante.
10. Adicional 200µL de etanol 80%.
11. Incubar na rack magnética por 30 segundos.
12. Remover e descartar todo o sobrenadante.
13. Utilizar pipeta de 20µL para remover todo o resíduo de etanol.
14. Deixar secar à temperatura ambiente por 5 minutos.
15. Adicionar 52,5µL RSB
16. Remover a placa da rack magnética.
17. Vortexar à 1800 rpm por 2 minutos.
18. Incubar à temperatura ambiente por dois minutos.
19. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.

20. Colocar a placa na rack magnética e esperar até que o líquido esteja claro (2-5 minutos).
21. Transferir 50µL do sobrenadante para a placa CAP.
22. Adicionar 50µL de SPB em cada poço.
23. Vortexar à 1800 rpm por 2 minutos.
24. Incubar à temperatura ambiente por 5 minutos.
25. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.
26. Colocar a placa na rack magnética e esperar até que o líquido esteja claro (2-5 minutos).
27. Remover e descartar o sobrenadante.
28. Adicional 200µL de etanol 80%.
29. Incubar na rack magnética por 30 segundos.
30. Remover e descartar todo o sobrenadante.
31. Adicional 200µL de etanol 80%.
32. Incubar na rack magnética por 30 segundos.
33. Remover e descartar todo o sobrenadante.
34. Utilizar pipeta de 20µL para remover todo o resíduo de etanol.
35. Deixar secar à temperatura ambiente por 5 minutos.
36. Adicionar 22,5µL RSB
37. Remover a placa da rack magnética.
38. Vortexar à 1800 rpm por 2 minutos.
39. Incubar à temperatura ambiente por dois minutos.
40. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.
41. Colocar a placa na rack magnética e esperar até que o líquido esteja claro (2-5 minutos).
42. Transferir 20µL do sobrenadante na placa TSP1.
43. Selar a placa.
44. Armazenar a placa à entre -25°C e -15°C.

PONTO DE PARADA

Quantificação da biblioteca - KAPA

1. Adicione 1mL do Primer Premix (10X) no reagente KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) (5mL).
2. Diluir as amostras usando o DNA buffer (10mM Tris-HCl) conforme abaixo:

| Diluição | vol de amostra (µL) | Vol de Buffer (µL) |
|----------|---------------------|--------------------|
| 1:100 | 2 | 98 |
| 1:1.000 | 5 | 45 |
| 1:10.000 | 5 | 45 |
| 1:20.000 | 25 | 25 |

Devido ao grande volume de amostras, levando em consideração que haverá duas diluições para cada amostra e que elas deverão estar em duplicata, a quantificação deve ser dividida em 2 placas (placa 1 e 2 primeira batelada e placa 3 e 4 segunda batelada).

3. Pipetar em cada poço:

| Reagente | Vol/amostra (µL) | Vol MIX 1 (x 100) | Vol MIX 2 (x 35) |
|----------|------------------|-------------------|------------------|
| | | | |

| | | | |
|---|----|------|-----|
| KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) + Primer Premix (10X) | 12 | 1200 | 420 |
| H ₂ O | 4 | 400 | 140 |
| Biblioteca | 4 | - | - |
| Total | 20 | 1600 | 560 |

4. Distribuir 16 μ L do mix em cada poço conforme abaixo.

a. Placa 1 (Mix 1)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | C1 | C1 | AM 03 | AM 03 | AM 11 | AM 11 | AM 19 | AM 19 | AM 05 | AM 05 | AM 13 | AM 13 |
| B | C2 | C2 | AM 04 | AM 04 | AM 12 | AM 12 | AM 20 | AM 20 | AM 06 | AM 06 | AM 14 | AM 14 |
| C | C3 | C3 | AM 05 | AM 05 | AM 13 | AM 13 | NTC | NTC | AM 07 | AM 07 | AM 15 | AM 15 |
| D | C4 | C4 | AM 06 | AM 06 | AM 14 | AM 14 | | | AM 08 | AM 08 | AM 16 | AM 16 |
| E | C5 | C5 | AM 07 | AM 07 | AM 15 | AM 15 | AM 01 | AM 01 | AM 09 | AM 09 | AM 17 | AM 17 |
| F | C6 | C6 | AM 08 | AM 08 | AM 16 | AM 16 | AM 02 | AM 02 | AM 10 | AM 10 | AM 18 | AM 18 |
| G | AM 01 | AM 01 | AM 09 | AM 09 | AM 17 | AM 17 | AM 03 | AM 03 | AM 11 | AM 11 | AM 19 | AM 19 |
| H | AM 02 | AM 02 | AM 10 | AM 10 | AM 18 | AM 18 | AM 04 | AM 04 | AM 12 | AM 12 | AM 20 | AM 20 |
| Amostras Diluidas 1:100 | | | | | | Amostras Diluidas 1:1000 | | | | | | |

b. Placa 2 (Mix 2)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------------|-------|-------|--------------------------|-------|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | C1 | C1 | AM 23 | AM 23 | | | | | | | | |
| B | C2 | C2 | AM 24 | AM 24 | | | | | | | | |
| C | C3 | C3 | NTC | NTC | | | | | | | | |
| D | C4 | C4 | | | | | | | | | | |
| E | C5 | C5 | AM 21 | AM 21 | | | | | | | | |
| F | C6 | C6 | AM 22 | AM 22 | | | | | | | | |
| G | AM 21 | AM 21 | AM 23 | AM 23 | | | | | | | | |
| H | AM 22 | AM 22 | AM 24 | AM 24 | | | | | | | | |
| Amostras Diluidas 1:100 | | | Amostras Diluidas 1:1000 | | | | | | | | | |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | C1 | C1 | AM 27 | AM 27 | AM 35 | AM 35 | AM 43 | AM 43 | AM 29 | AM 29 | AM 37 | AM 37 |
| B | C2 | C2 | AM 28 | AM 28 | AM 36 | AM 36 | AM 44 | AM 44 | AM 30 | AM 30 | AM 38 | AM 38 |
| C | C3 | C3 | AM 29 | AM 29 | AM 37 | AM 37 | NTC | NTC | AM 31 | AM 31 | AM 39 | AM 39 |
| D | C4 | C4 | AM 30 | AM 30 | AM 38 | AM 38 | | | AM 32 | AM 32 | AM 40 | AM 40 |
| E | C5 | C5 | AM 31 | AM 31 | AM 39 | AM 39 | AM 25 | AM 25 | AM 33 | AM 33 | AM 41 | AM 41 |
| F | C6 | C6 | AM 32 | AM 32 | AM 40 | AM 40 | AM 26 | AM 26 | AM 34 | AM 34 | AM 42 | AM 42 |
| G | AM 25 | AM 25 | AM 33 | AM 33 | AM 41 | AM 41 | AM 27 | AM 27 | AM 35 | AM 35 | AM 43 | AM 43 |
| H | AM 26 | AM 26 | AM 34 | AM 34 | AM 42 | AM 42 | AM 28 | AM 28 | AM 36 | AM 36 | AM 44 | AM 44 |
| Amostras Diluidas 1:100 | | | | | | Amostras Diluidas 1:1000 | | | | | | |

c. Placa 3 (Mix 1)

d. Placa 4 (Mix 2)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------------|-------|-------|--------------------------|-------|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | C1 | C1 | AM 47 | AM 47 | | | | | | | | |
| B | C2 | C2 | AM 48 | AM 48 | | | | | | | | |
| C | C3 | C3 | NTC | NTC | | | | | | | | |
| D | C4 | C4 | | | | | | | | | | |
| E | C5 | C5 | AM 45 | AM 45 | | | | | | | | |
| F | C6 | C6 | AM 46 | AM 46 | | | | | | | | |
| G | AM 45 | AM 45 | AM 47 | AM 47 | | | | | | | | |
| H | AM 46 | AM 46 | AM 48 | AM 48 | | | | | | | | |
| Amostras Diluidas 1:100 | | | Amostras Diluidas 1:1000 | | | | | | | | | |

5. Anotar as concentrações dos calibradores, conforme abaixo.

| | |
|----------------|-----------|
| DNA Standard 1 | 20 pM |
| DNA Standard 2 | 2 pM |
| DNA Standard 3 | 0.2 pM |
| DNA Standard 4 | 0.02 pM |
| DNA Standard 5 | 0.002 pM |
| DNA Standard 6 | 0.0002 pM |

6. Correr as placas segundo o protocolo abaixo.

| | Temperatura | Tempo | Ciclos |
|----------------------|-------------|--------|--------|
| Desnaturação inicial | 95°C | 5 min | 1 |
| Desnaturação | 95°C | 30 seg | 35 |
| Annealing/Extensão | 60°C | 40 seg | |

7. Para análise das concentrações, levar em consideração o tamanho dos controles como 452bp.

8. Fazer o cálculo das concentrações de acordo com a curva de calibração. Use a média das réplicas para determinar a concentração das diluições. Faça o ajuste no cálculo avaliando a diferença de tamanho dos fragmentos da biblioteca (não utilizar o tamanho obtido no Bioanalyzer) e o controle (STD 0) de 452 pb. Calcular a concentração das amostras não diluídas de acordo com os fatores de diluição (use a média das réplicas). Caso uma réplica seja fora do desvio padrão, ele pode ser omitido do cálculo, se as duas réplicas estiverem fora, repita a quantificação.

$$a) [\text{Concentração da amostra em pM}] = \exp^{\frac{(Ct_{amostra} - P_y)}{\text{slope da curva de calibração}}}$$

$$b) \text{ Correção do tamanho do fragmento} = [\text{Concentração da amostra em pM}] \times (452^a | 470^b)$$

$$c) [\text{Concentração corrigida em pM}] = [\text{Correção do tamanho do fragmento}] \times \text{diluição da amostra}^c$$

$$d) [\text{Concentração da amostra em nM}] = \frac{[\text{Concentração corrigida em pM}]}{1000}$$

$$e) \text{ Concentração média}^d = \frac{(\text{Concentração da amostra em nM da replica 1} + \text{Concentração da amostra em nM da réplica 2})}{2}$$

$$f) \text{ Concentração final da amostra}^e = \frac{(\text{Concentração média}_1 + \text{Concentração média}_2)}{2}$$

Legenda: $Ct_{amostra}$ = Ciclo de amplificação em que a reação acumula fluorescência suficiente para ultrapassar a linha de threshold do alvo. P_y = Ponto de interceptação em y, onde o gráfico da função intercepta o eixo y. a Tamanho do controle; b Tamanho da biblioteca;

c 10.000 ou 20.000, de acordo com a diluição da amostra;

d Média entre as réplicas da amostra na mesma diluição;

e Média entre as réplicas da amostra nas concentrações de 1: 10.000 e 1: 20.000.

Controle de qualidade das bibliotecas - Verificar o tamanho das bibliotecas no TapeStation.

1. Tirar os reagentes 30 minutos antes de iniciar o processamento.
2. Vortexar os reagentes antes do uso.
3. Prepare o ladder misturando 10 μ L do buffer de amostra (tampa verde) e 1 μ L do Genomic DNA Ladder (tampa amarela).
4. Prepare as amostras misturando 10 μ L do buffer de amostra (tampa verde) e 1 μ L de amostra (concentração 10-100 ng/ μ L).
5. Dar um spin nas amostras.
6. Vortexar utilizando o vortex IKA à 2000 rpm por 1 minuto.
7. Dar um spin das amostras.
8. Abrir o software do equipamento.
9. Inserir a placa no equipamento.
10. Inserir as ponteiras no equipamento.
11. Retire o kit do pacote.
12. Segure o dispositivo ScreenTape com a etiqueta voltada para você e toque levemente a parte superior do dispositivo. Se houver pequenas bolhas presentes, isso as moverá para o topo da câmara.
13. Insira o dispositivo ScreenTape no instrumento, com a etiqueta voltada para a frente do instrumento e o código de barras de frente para a direita.
14. Insira as amostras no instrumento.
15. Selecione os tubos ou poços que deseja executar clicando e arrastando o mouse sobre os locais de amostra na interface do usuário.
 - a. Os poços selecionados mudarão de cor de branco.
 - b. As faixas selecionadas na imagem do dispositivo ScreenTape mudarão de cor.
 - c. Pistas que foram percorridas anteriormente aparecerão cinza
16. A seleção da amostra pode ser excluída clicando com o botão direito na amostra. Um menu aparecerá com as seguintes opções:
 - a. Limpar todas as seleções - isso limpará o poço da escada e todos os poços de amostra selecionados.
 - b. Limpar última seleção - isso irá limpar apenas as últimas amostras a serem selecionadas (em destaque).
17. As descrições das amostras podem ser inseridas manualmente no software antes que o instrumento seja iniciado e enquanto o instrumento estiver operando, antes que o software de análise TapeStation seja iniciado. OU Os dados de amostra podem ser copiados e colados de uma tabela do Excel.
18. Click no botão “Start”. Abrirá uma tela para inserção do nome do arquivo a ser salvo.
19. Levante a tampa do instrumento.
20. Certifique-se de que há ponteiras novas no equipamento e que todas as amostras foram carregadas corretamente com as tampas removidas e correspondem à seleção da amostra na tela.
21. Feche a tampa.
22. Clicar em “OK”.
23. Quando terminar, um pop-up solicitará a remoção do cartucho de ponteira e Dispositivo ScreenTape.
24. Remova-os.
25. Clicar em “OK”.
26. Analisar os resultados.

Lavar o equipamento antes de iniciar a corrida

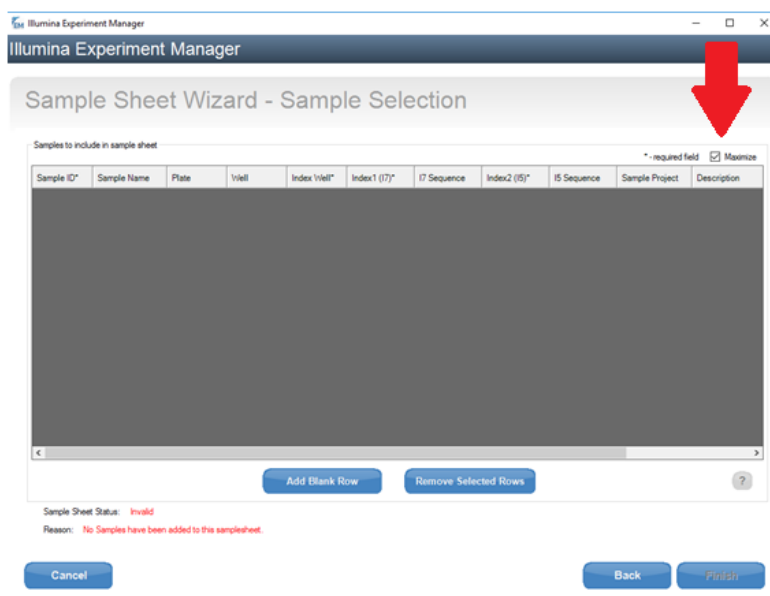
1. 400mL de H₂O Miliq no wash well
2. 5mL de H₂O Miliq no Fill

Este procedimento dura aproximadamente 80 minutos.

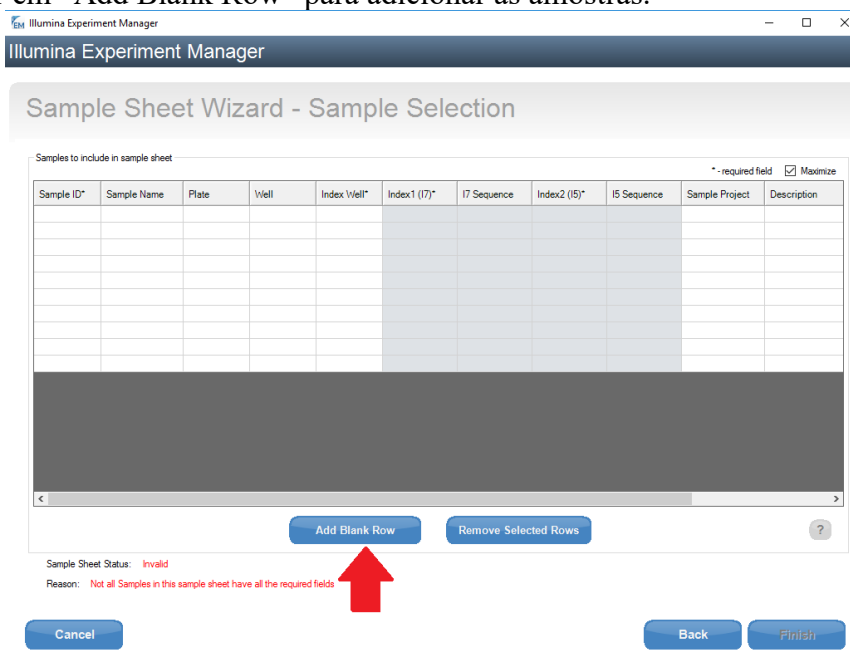
Criação da corrida no Software Illumina Experiment Manager

1. Clicar em “Create Sample Sheet”.
2. Selecionar o equipamento “NovaSeq”.
3. Clicar em “Next”.
4. Clicar em “Next” novamente, pois para este kit neste equipamento só existe a opção de FASTQ.
5. Preencher conforme abaixo:
 - a. Reagent Kit Barcode: Colocar o nome da corrida e data. (ex: OMNI16JULHO2021Dia1);
 - b. Library Prep Workflow: escolher o kit de biblioteca utilizado → TruSeq DNA PCR-Free;
 - c. Index Adapter: escolher o kit de barcode utilizado → IDT-ILMN TruSeq DNA UD Indexes (96 Indexes);
 - d. Index Read: 2 (dual);
 - e. Experiment Name: OMNI_Biblioteca1;
 - f. Read type: Paired End;
 - g. Cycles Read 1: 151 → Flow de 300 ciclos (calculado pela equação: $(\text{Tamanho do tape} - \text{index})/2$;
 - h. Cycles Read 2: 151; →
 - i. Consumable Version: 1.5
 - j. Deixar **desabilitado** o NovaSeq Xp workflow;
 - k. Deixar **habilitado** Use Adpater Trimming;
 - l. Deixar **habilitado** Use Adpater Trimming 2

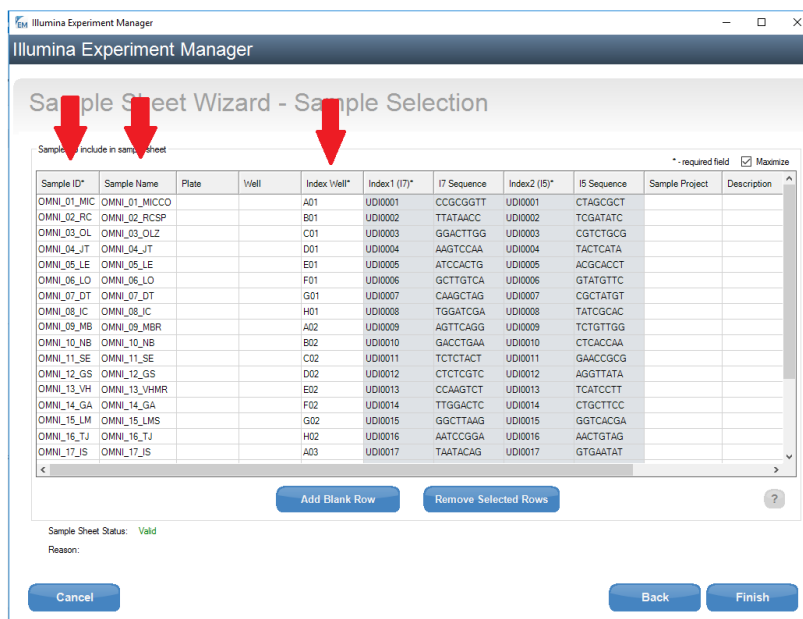
6. Clicar em “Next”.
7. Clicar em “Maximize”



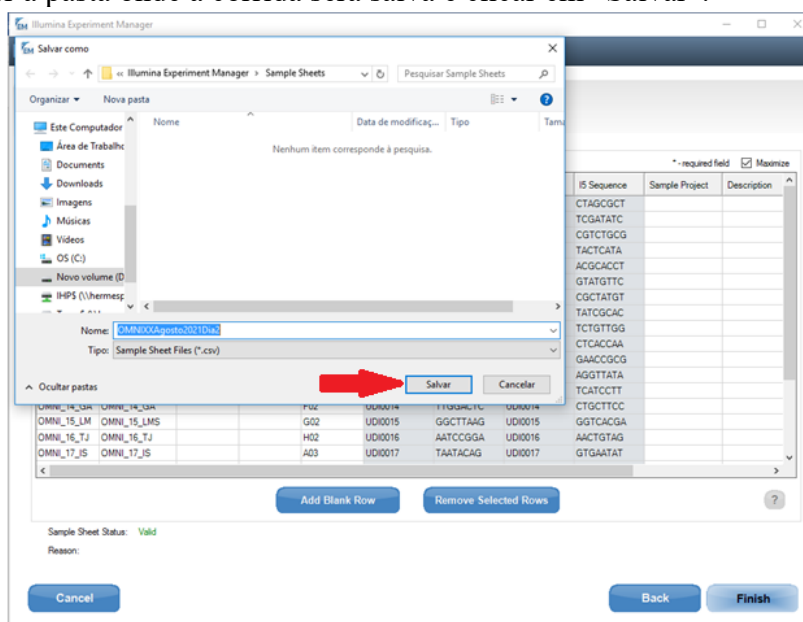
8. Clicar em “Add Blank Row” para adicionar as amostras.



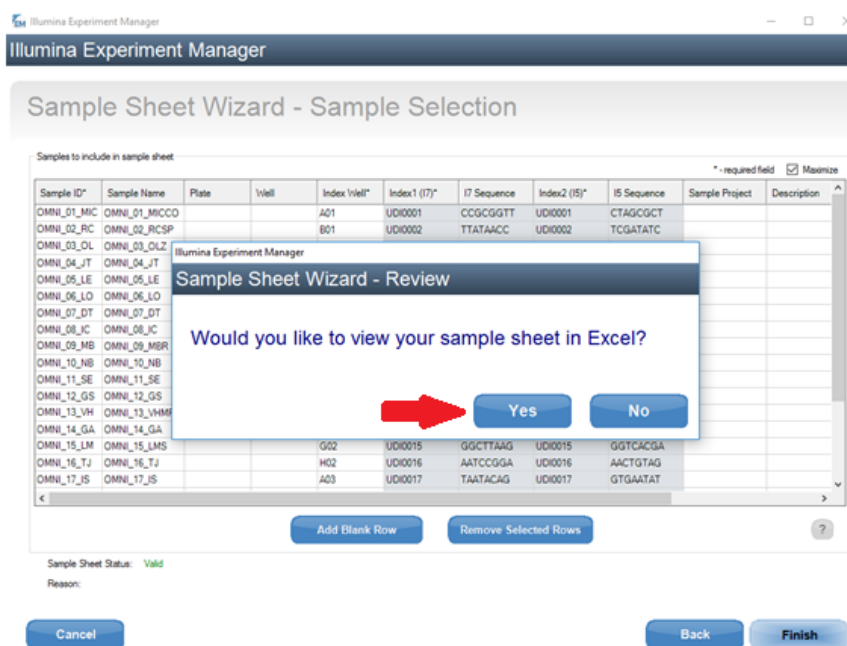
9. Adicionar a identificação de cada paciente nas linhas em branco adicionadas.
 10. Adicionar o nome da amostra.
 11. Adicionar o “Index Well”, indicando qual poço da placa de barcodes utilizado para cada amostra (Ligação de Barcodes – página 5).



12. Clicar em “Finish”.
13. Escolher a pasta onde a corrida será salva e clicar em “Salvar”.



14. Clicar em “Yes”, para abrir o arquivo de excel da corrida para conferir as informações inseridas.



Normalização e Pool de bibliotecas

1. Identificar os tubos de acordo com a identificação dos pacientes.
2. Diluir as amostras para a concentração de 2,8nM, conforme tabela excel (Quantificação da biblioteca Kapa)
3. Vortexar à 1800 rpm por 2 minutos.
4. Centrifugar à 280 x g por 1 minuto.
5. Quantificar no Qubit.
6. Agrupar o volume apropriado de cada biblioteca em um novo tubo para que tenha um volume final de 310µL. Máximo 24 bibliotecas por pool.
7. Armazenar as bibliotecas **não agrupadas** restantes à -25°C.
8. Separar 4 tubos low bind e identificar como POOL, POOL + PhiX, NaOH e TRIS.
9. Diluir PhiX (de 10 nM para 2,5 nM):
 - a. 2,0µL de PhiX a 10nM + 6,0µL de H₂O.
10. Add 1,9µL de PhiX (2,5 nM) ao pool de bibliotecas.

Sequenciamento

1. Descongele os cartuchos de reagentes de SBS e cluster.
2. Coloque cada cartucho em uma rack, para evitar que ele vire.
3. Descongele em banho maria a temperatura ambiente (19°C - 25°C). Não usar água quente para descongelar, pode causar danos ao sequenciamento. Pode durar até 4 horas.
4. Remover e esvaziar os frascos de reagentes usados.

Preparar a lâmina de fluxo

Retire um novo pacote da lâmina de fluxo da geladeira até atingir a temperatura ambiente (demora em torno de 10-15 minutos). Utilizar no máximo 12 horas após retirada da geladeira.

Desnaturação do pool de bibliotecas

1. Prepare uma diluição de Tris-HCl (400nM, pH 8,0), conforme abaixo:
 - a. 40µL de NaOH (1N)

- b. 60µL de H₂O.
2. Prepare uma diluição fresca de NaOH (0,2 N), conforme abaixo:
 - a. 40µL de NaOH (1N)
 - b. 160µL de H₂O.
 - c. Vortexar o tubo.
3. Manter o tubo tampado. Use em até 12 hs.
4. Add 77µL de NaOH (0,2 N) ao pool de bibliotecas, totalizando um volume de 388,9µL.
5. Tampar o tubo e agitar brevemente.
6. Centrifugar à 280 x g por até 1 minuto.
7. Incubar à temperatura ambiente por 8 minutos, para desnaturar.
8. Add 78µL de Tris-HCl (pH 8,0, 400mM), totalizando um volume de 466,9µL.
9. Tampar o tubo e agitar brevemente.
10. Centrifugar à 280 x g por até 1 minuto.
11. Transfira todo o volume para o tubo da biblioteca fornecido com o kit de reagentes NovaSeq 6000.
12. Prosseguir imediatamente para o carregamento do cartucho de cluster e configurar a execução. Se não puder continuar imediatamente, tampar o tubo de bibliotecas e armazenar em -25°C por até 3 semanas. Não congele novamente após descongelamento.

Preparar os cartuchos de SBS e de cluster

1. Seque completamente as bases dos cartuchos. Seque entre os poços também.
2. Inverta os cartuchos dez vezes para misturar os reagentes.
3. Bata levemente a parte inferior de cada cartucho na bancada para reduzir bolhas de ar. Se os reagentes não puderem ser carregados em até 4 horas, conserve-os entre 2°C-8°C, por até 24 horas.

Carregar tubo da biblioteca

Sem perturbar a biblioteca na parte inferior no tubo, insira o tubo contendo as bibliotecas desnaturadas sem tampa no cartucho de cluster descongelado na posição do tubo da biblioteca (no 8).

Configurar execução de sequenciamento

1. Remova todos os itens de superfície de instrumento.
2. Na tela “Home”, selecione “Sequence” e em seguida selecione uma execução de lâmina de fluxo (A+B, A ou B). O software inicia a série de telas de configuração de execução, abrindo a tela “Load”.
3. Selecione “OK” para reconhecer o aviso e abrir a porta de lâmina de fluxo.
4. Coloque um novo par de luvas sem pó para evitar contaminar a superfície de vidro da lâmina de fluxo.
5. Com o pacote sobre uma superfície plana, abra pela vedação angular.
6. Remova a lâmina de fluxo da embalagem. Segure a lâmina pelas laterais para evitar tocar o vidro ou as vedações inferiores.
7. Alinhar a lâmina de fluxo ao longo das quatro fixações levantadas e coloque-a no estágio da lâmina de fluxo.
8. Selecione “Close Flow Cell Door”.

Carregar os cartuchos de SBS e de cluster

1. Abrir as portas de compartimentos de líquidos e em seguida a do refrigerador de reagentes.

2. Remover os cartuchos usados.
3. Carregar os cartuchos preparados nas gavetas de refrigerador de reagentes de modo que as etiquetas “INSERT” fiquem voltadas para a traseira do equipamento.
 - a. Colocar o cartucho SBS (etiqueta cinza) na posição esquerda.
 - b. Colocar o cartucho de cluster (etiqueta laranja) com o tubo de biblioteca destampado na posição direita.
4. Deslizar a gaveta para dentro do refrigerador e fechar a porta do mesmo.

Carregar o cartucho de solução tampão

1. Puxar a alça de metal para abrir a gaveta.
2. Remover o cartucho usado pelo lado direito da gaveta.
3. Colocar um novo cartucho de modo que a etiqueta “Illumina” fique virada para frente.
4. Alinhar o cartucho com as guias levantadas no piso e laterais da gaveta.
5. Fechar a gaveta.
6. Se ambos os frascos tiverem sido esvaziados, marque a caixa de seleção que informa que os reagentes usados estão vazios.
7. Selecione o botão “Log In”
8. Acessar o BaseSpace.

Acessar o BaseSpace

1. Fazer o login.
2. Selecionar “Run Setup”
3. Inserir o nome da corrida no campo “Run Name”
4. Inserir o número de ciclos para cada leitura e duração do índice de execução de sequenciamento (verificar com a Illumina).
5. Expandir a opção “Advanced Options”
6. No item “Samplesheet” fazer upload da planilha CSV com as amostras.
7. Selecionar “Review”.
8. Confirmar os parâmetros de execução.
9. Selecionar “Start Run”.
10. Aguardar 5 minutos até que todas as verificações e execução sejam concluídas.

Anexo VI – Publicação Estudo 2



Communication

Replicative Study in Performance-Related Genes of Brazilian Elite Soccer Players Highlights Genetic Differences from African Ancestry and Similarities between Professional and U20 Youth Athletes

Tane Kanope ¹, Caleb G. M. Santos ^{2,3,*} , Feliciano Marinho ⁴, Gustavo Monnerat ⁵, Mario Campos-Junior ⁶, Ana Carolina P. da Fonseca ^{6,7} , Verônica M. Zembruski ⁶ , Miller de Assis ¹ , Michael W. Pfaffl ² and Eduardo Pimenta ¹

¹ UFMG Soccer Science Center, School of Physical Education, Physiotherapy and Occupational Therapy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 3125810, Brazil; tane.ufjf@gmail.com (T.K.); empimenta@uol.com.br (E.P.)

² Department of Animal Physiology and Immunology, School of Life Sciences, Technical University of Munich, Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising, Germany

³ Teaching and Research Division, Brazilian Army Institute of Biology, Rio de Janeiro 20911270, Brazil

⁴ Instituto Hirmes Pardini SA, Vespasiano 33200000, Brazil

⁵ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941902, Brazil

⁶ Human Genetics Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro 21040360, Brazil

⁷ Laboratory of Immunopharmacology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro 21045900, Brazil

* Correspondence: calebguedes@gmail.com or guedes.caleb@eb.mil.br; Tel.: +55-21-38902135



Citation: Kanope, T.; Santos, C.G.M.; Marinho, F.; Monnerat, G.; Campos-Junior, M.; da Fonseca, A.C.P.; Zembruski, V.M.; de Assis, M.; Pfaffl, M.W.; Pimenta, E. Replicative Study in Performance-Related Genes of Brazilian Elite Soccer Players Highlights Genetic Differences from African Ancestry and Similarities between Professional and U20 Youth Athletes. *Genes* **2023**, *14*, 1446. <https://doi.org/10.3390/genes14071446>

Academic Editors: Juan Del Coso, Agnieszka Maciejewska-Skendo, Paweł Czapczyk, Alison V. September and Ildan I. Ahmetov

Received: 15 June 2023

Revised: 10 July 2023

Accepted: 12 July 2023

Published: 14 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Classically, genetic association studies have attempted to assess genetic polymorphisms related to human physiology and physical performance. However, the heterogeneity of some findings drives the research to replicate, validate, and confirmation as essential aspects for ensuring their applicability in sports sciences. Genetic distance matrix and molecular variance analyses may offer an alternative approach to comparing athletes' genomes with those from public databases. Thus, we performed a complete sequencing of 44 genomes from male Brazilian first-division soccer players under 20 years of age (U20_BFDSC). The performance-related SNP genotypes were obtained from players and from the "1000 Genomes" database (European, African, American, East Asian, and South Asian). Surprisingly, U20_BFDSC performance-related genotypes had significantly larger F_{ST} levels ($p < 0.00001$) than African populations, although studies using ancestry markers have shown an important similarity between Brazilian and African populations (12–24%). U20_BFDSC were genetically similar to professional athletes, showing the intense genetic selection pressure likely to occur before this maturation stage. Our study highlighted that performance-related genes might undergo selective pressure due to physical performance and environmental, cognitive, and sociocultural factors. This replicative study suggests that molecular variance and Wright's statistics can yield novel conclusions in exercise science.

Keywords: population genetics; genetic distance matrix; SNP panel; soccer; athletic performance

1. Introduction

Physical performance is a multifactorial trait to which genetic data can potentially be applied for precision medicine approaches [1]. Classically, genetic association studies (GASs) are used to better understand the effects of genetic variability. Hundreds of previous studies have attempted to assess genetic polymorphisms and link their allele frequencies to human physiology and performance phenotypes. Based on GAS polymorphisms, there are lists of genes commonly associated with sports performance (Table 1) which support