



20º Congresso de Iniciação Científica

EFEITO DA VELOCIDADE DE CONTRAÇÃO EXCÊNTRICA AGUDA E A RELAÇÃO COM OS POLIFORMISMOS DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E O DANO MUSCULAR

Autor(es)

GIULIELE APARECIDA DOS SANTOS OLIVEIRA

Orientador(es)

ROZANGELA VERLENGIA

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPq

1. Introdução

O dano celular decorrente da prática de exercício físico de alta intensidade e/ou quando praticado por indivíduos não habituados na realização deste, inclui a ruptura da matriz extracelular, lâmina basal e sarcolema, resultando na liberação de proteínas do meio intracelular para a corrente sanguínea (BRANCACCIO; LIPPI; MAFFULLI, 2010). Do ponto de vista funcional, o dano muscular pode promover alterações na performance neuromuscular, como a diminuição da força máxima, isométrica e potência muscular; sintomas que podem estar presentes por vários dias após a realização da sessão de exercício de força (NOSAKA; NEWTON; SACCO 2002; CHAPMAN et al., 2006; CHEN; NOSAKA, 2006; NEWTON et al., 2008; IDE et al., 2011).

Concentrações séricas de creatina quinase muscular (CK-MM) tem sido utilizada como marcador do dano muscular, principalmente pelo baixo custo financeiro do método (colorimétrica) quando comparado a outras análises, como por exemplo, o Western Blotting (CLARKSON; HUBAL, 2002). Contudo, tem-se observado uma variabilidade no perfil da resposta da concentração desta enzima frente ao dano muscular promovido pelo exercício físico de alta intensidade (NEWHAN et al., 1983; NOSAKA; CLARKSON, 1996). Desta forma, alguns autores (CLARKSON; NOSAKA; BRAUN, 1992; CHEN, 2006; MACHADO; WILLARDSON, 2010; MACHADO et al., 2011), classificam as respostas individuais pós-sessão exercício de acordo com a concentração do pico de CK no sangue. Assim, indivíduos classificados como baixo respondedores apresentam valores inferiores de 500 U/L, médios respondedores entre 500-2.000 U/L e altos respondedores acima de 2.000 U/L.

Dentre os fatores descritos que contribuem para tal variabilidade temos o fator genético (VINCENT et al., 2007; PIMENTA et al., 2011). Destes, o polimorfismo (rs1799752) indel no gene da enzima conversora de angiotensina (ECA) tem sido o foco de vários pesquisadores, que investigam a relação genética com o desempenho cardiorrespiratório de atletas e não atletas, bem como a sua relação com o dano muscular (HELED et al., 2007; YAMIN et al., 2008).

O treinamento de força promove adaptações crônicas que visam melhoria de força e potência muscular, decorrentes de adaptações neurais e musculares (KRAEMER; RATAMESS, 2004). Fator que promove diferenças nos níveis de dano muscular quando comparado com indivíduos sedentários (NEWTON et al., 2008). Desta forma, estudos a partir da população treinada podem contribuir para a melhora dos protocolos de treinamento.

2. Objetivos

Analisar a influência do polimorfismo ECA *indel* (rs1799752) após uma sessão de exercício excêntrico sobre o comportamento dos marcadores indiretos de dano muscular (CK) ao longo do tempo pós-sessão (24 a 96 horas) em homens treinados.

3. Desenvolvimento

Participaram deste estudo 20 homens (idade média de $25,4 \pm 2,9$ anos; massa corporal de $77,9 \pm 9,1$ Kg; estatura de $1,75 \pm 2,9$ m e percentual de gordura $13,2 \pm 6,5$ %) com experiência média de $5,4 \pm 2,7$ anos de treinamento de força. Todos os voluntários, foram informados sobre os procedimentos dos testes, responderam um questionário de avaliação da saúde e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Metodista de Piracicaba – SP – Brasil sob o número de protocolo: 21/11.

Os critérios de inclusão e exclusão para participação do estudo foram: (a) ter no mínimo um ano de experiência em treinamento de força com pesos livres; (b) estar treinando de forma ininterrupta por no mínimo 6 meses; (d) não ter sofrido qualquer tipo de lesão que venha interferir no estudo; (e) não estar utilizando suplementos nutricionais à base de creatina e esteróides anabolizantes; (e) possuir estatura entre 1,70 a 1,80 metros.

A determinação da força muscular máxima excêntrica foi avaliada no exercício supino reto com barra livre pelo teste de 1RMexc (HOLLANDER et al., 2007). Antes da execução dos testes, os voluntários realizaram aquecimento de 2 a 3 séries de 5 a 10 repetições com aproximadamente 40-60% de 1RM do estimado. O teste de 1RMexc foi realizado na cadência de 3 segundos para a totalidade da amplitude de movimento, com o controle de um metrônomo (60 batidas por minuto). A avaliação foi realizada com número máximo de 5 tentativas e intervalos de 3-5 minutos de recuperação entre cada tentativa. Os voluntários foram fortemente encorajados verbalmente a realizar esforços máximos durante a realização dos testes.

O protocolo experimental foi constituído de exercícios no supino reto com barra livre realizado em 4 séries de 8 repetições, com intensidade de 70% de 1RMexc e 2 minutos de intervalo entre as séries, na cadência de 3 segundos para toda amplitude articular. Para manutenção da ação excêntrica de forma isolada, houve a necessidade da colaboração de dois assistentes, posicionados um em cada lado da barra do supino reto, os quais ao término do movimento excêntrico voltavam à barra na posição inicial no intervalo de 2 segundos. O controle da velocidade de execução do movimento foi realizado por meio do metrônomo, com 60 batidas por minuto e simultânea instrução verbal. Todas as análises experimentais foram realizadas entre 7:00 e 11:00.

Amostras de sangue foram obtidas por punção venosa em tubos sem anticoagulante (marca: Becton Dickinson, Cidade: Juiz de Fora - MG). O soro foi separado por meio de centrifugação a 2.000 rpm durante 20 minutos a 4°C e foi armazenado à -70°C para posterior análise. A determinação da CK foi analisada utilizando o equipamento automatizado Konelab 60i (Wiener Lab®, Rosário, Argentina), utilizando kit comercial (Wiener Lab®, Rosário, Argentina) a 37°C. O valor de referência para atividade da CK utilizando este método é de 195 U/L.

A extração do DNA genômico foi isolada a partir de células brancas do sangue (~5mL), obtidas por punção venosa em tubos a vácuo contendo anticoagulante, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e utilizando kit comercial (Blood Genomic, Prep. Min spn, GE HealthCare®, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

O polimorfismo ECA *indel* (rs1799752) foi analisado pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) conforme descrito por Rigat et al. (1990). O produto final de amplificação gerou a presença de fragmentos com 490bp e 190bp, para os genótipos homozigotos I e D, respectivamente e de 490bp e 190bp para o genótipo ID (heterozigoto). Posteriormente, as amostras classificadas como DD tiveram sua genotipagem confirmada (PCR confirmatório) utilizando-se o conjunto de *primers* conforme descrito por Kreutz et al. (1995). Após este procedimento, apenas as amostras heterozigotas (ID) geraram um fragmento amplificado de 335bp, que também foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, adotando testes paramétricos. Em seguida, foi realizada análise de variância com um fator (ANOVA One-way). Para avaliar as diferenças entre os tempos estudados de um mesmo genótipo, bem como as diferenças entre os genótipos, realizou-se o teste de Turkey. O teste T não pareado foi conduzido para comparar os valores obtidos dos testes antropométricos e força muscular entre grupos. O equilíbrio de Hardy-Weinberg para distribuição dos genótipos foi testado pelo teste Qui-quadrado (χ^2). O índice de significância adotado foi $p < 0,05$. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão (DP).

4. Resultado e Discussão

Não houve diferença significativa entre os grupos DD e ID/II para as variáveis: idade ($P = 0.90$), massa corporal ($P = 0.28$), altura ($P = 0.26$), experiência em treino de força ($P = 0.46$). A distribuição genotípica do polimorfismo ACE *indel* ficou dentro das expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1.66$; $P = 0.19$).

A força máxima muscular determinada no teste de 1RMexc foi de $116,8 \pm 18,2$ Kg e $135,8 \pm 19,2$ Kg para os grupos DD e ID/II, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre grupos ($P = 0.07$).

O volume total de carga (séries x repetições x carga [kg]) da sessão de exercício excêntrico foi de $2.665,6 \pm 384,1$ Kg para o grupo DD, e $3.043,4 \pm 430,9$ Kg para o grupo ID/II. Não foi observada diferença significativa ($P = 0.07$) entre grupos.

Conforme demonstrado na figura 1, ambos os grupos (DD e ID/II) atingiram os valores pico sérico de CK em 72 horas pós-sessão de exercício. No entanto, não foi encontrada diferença significativa ($p > 0.05$) em nenhum período pós-sessão de exercício intra e inter grupos. Para o grupo genótipo DD ($n = 5$) foram identificados 2 indivíduos como médios respondedores, representado uma frequência de 40%. Enquanto o grupo genótipo ID/II ($n = 15$) apresentou uma frequência de 47% para os indivíduos classificados como médios respondedores ($n = 7$); e dentre estes nenhum possuíam o genótipo II. Não foram observados indivíduos classificados como altos respondedores (valores acima de 2.000 U/L) em ambos os grupos (DD e ID/II).

O principal achado do estudo foi a não associação entre os genótipos DD e ID/II com a resposta do dano muscular, avaliados de forma indireta por meio da atividade sérica da CK.

Estes dados apresentados na cinética da CK, podem ser explicados devido ao nível de treinabilidade da população avaliada. Embora a prática diária destes voluntários não envolvesse o exercício predominantemente excêntrico de alta intensidade, a rotina de treinamento de força envolvia ações musculares dinâmicas (excêntrico e concêntrico) realizados em máquinas e pesos livres. Prática esta que promove adaptações crônicas de ordem neural e muscular no processo de treinamento, que promovem um efeito de proteção muscular (neural, celular e mecânica) frente às sessões repetidas de exercício (MCHUGH, 1999; NOSAKA; AOKI, 2011).

Em relação a possível influência genética sobre a atividade sérica da CK, não foram observadas interações significativas entre grupos em nenhum período pós-sessão de exercício excêntrico. Portanto, a magnitude do dano muscular se comportou de forma semelhante para ambos os grupos (genótipo DD e ID/II). Nossos dados corroboram com os obtidos por Heled et al. (2007) que não encontraram associação significativa entre os genótipos (II, DI e DD) com a resposta da CK circulante pós-sessão de exercício que induziu ao dano muscular.

No presente estudo, devido ao pequeno número amostral foram identificados apenas dois indivíduos mutantes (genótipo II); estes que foram classificados como baixos respondedores por apresentar valores de CK inferiores de 500 U/L, ao longo do tempo pós-sessão de exercício. Assim, se faz necessário a continuação do presente estudo, a fim de aumentar o número amostral, para que seja investigada a influência de apenas um grupo composto de indivíduos do genótipo II; diferentemente do presente estudo que incluiu os indivíduos heterozigotos (ID) e homozigotos (II) em um mesmo grupo para a análise estatística.

5. Considerações Finais

Em conclusão, os dados relatados no presente estudo não corroboram com o conceito de que a variação genética presente no locus do gene da ECA (rs1799752) está associada com a resposta da concentração sérica de CK pós-sessão de exercício excêntrico com pesos livres, realizados por homens treinados em força. No entanto, necessita-se a continuação do presente estudo para o aumento do número amostral, e confirmação de tais achados.

Referências Bibliográficas

- BRANCACCIO, P.; LIPPI, G.; MAFFULLI, N. Biochemical markers of muscular damage. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 48, n. 6, p. 757-767, 2010.
- CHAPMAN, D. W.; NEWTON, M.; SACCO, P.; NOSAKA, K. Greater muscle damage induced by fast versus slow velocity eccentric exercise. **International Journal of Sports Exercise**, v. 27, n. 8, p. 591-598, 2006.
- CHEN, T. C. Variability in muscle damage after eccentric exercise and the repeated bout effect. **Research Quarterly for Exercise and Sport**, v. 77, p. 374-383, 2006.
- CHEN, T. C.; NOSAKA, K. Responses of elbow flexors to two strenuous eccentric exercise bouts separated by three days. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 20, n. 1, p. 108-116, 2006.

CLARKSON, P.; HUBAL, M. Exercise-induced muscle damage in humans. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 81, p. 52-69, 2002.

CLARKSON, P. M.; NOSAKA, K.; BRAUN, B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. **Medicine and Science in Sports Exercise**, v.24, p.512-520, 1992.

HELED, Y.; BLOOM, M. S.; WU, T. J.; STEPHENS, Q.; DEUSTER, P. A. CM-MM and ACE genotypes and physiological prediction of the creatine kinase response to exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v.103, p.504–10, 2007.

HOLLANDER, D. B.; KRAEMER, R. R.; KILPATRICK, M. W.; RAMADAN, Z. G.; REEVES, G. V.; FRANCOIS, M.; HEBERT, E. P.; TRYNIECKI, P. Maximal eccentric and concentric strength discrepancies between young men and women for dynamic resistance exercise. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 21, n. 1, p. 34-40, 2007.

IDE, B. N.; LEME, T. C.; LOPES, C. R.; MOREIRA, A.; DESCHECHI, C. J.; SARRAIPA, M. F.; Da MOTA, G. R.; BRENZIKOFER, R.; MACEDO, D. V. Time course of strength and Power recovery after resistance training with different movement velocities. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 25, n. 7, p. 2025-2033, 2011.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. **Medicine and Science in Sports Exercise**, v. 36, n. 4, p. 674-88, 2004.

KREUTZ, R.; HÜBNER, N.; GANTEN, D.; LINDPAINTNER, K. Plasma angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity levels are not modified by hypertension but strongly genetically determined by the ACE gene locus. **Journal of the American Society Nephrology**, v.6, p.626, 1995.

MACHADO, M.; WILLARDSON, J. M. Short Recovery Augments the Magnitude of Muscle Damage in High Responders. **Medicine and Science in Sports Exercise**, v. 46, p. 1370-1374, 2010.

MACHADO, M.; KOCH, A. J.; WILLARDSON, J. M.; PEREIRA, L. S.; CARDOSO, M. I.; MOTTA, M. K. S. Effect of varying rest intervals between sets of assistance exercises on creatine kinase and lactate dehydrogenase responses. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v.24, 2011.

MCHUGH, M. P.; CONNOLLY, D. A.; ESTON, R. G.; GLEIM, G. W. Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. **Sports Medicine**, v. 27, n. 3, p. 157-170, 1999.

NEWTON, M. J.; MORGAN, G. T.; SACCO, P.; CHAPMAN, D. W.; NOSAKA, K. Comparison of responses to strenuous eccentric exercise of flexors between resistance-trained and untrained men. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 22, n. 2, p. 597-607, 2008.

NEWHAM, D. J.; MCPHAIL, G.; MILLS, K. R.; EDWARDS, R. H. Ultra structural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. **Journal of the Neurological Sciences**, v.61, p.109–122, 1983.

NOSAKA, K.; AOKI, S. Repeated bout effect: research update and future perspective. **Brazilian Journal of Biomotricity**, vol. 5, n. 1, p. 5-15, 2011.

NOSAKA, K.; CLARKSON, P. M. Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors. **Medicine and Science in Sports Exercise**, v. 28, p.953–961, 1996.

NOSAKA, K.; NEWTON, M.; SACCO, P. Muscle damage and soreness after endurance exercise of the elbow flexors. **Medicine and Science in Sports Exercise**, v. 34, p. 920-927, 2002.

PIMENTA, E.; COELHO, D.; CRUZ, I.; MORANDI, R.; VENEROSO, C.; PUSSIELDI, G.; CARVALHO M.; SILAMI-GARCIA E.; FERNÁNDEZ, J. The ACTN3 genotype in soccer players in response to acute eccentric training. **European Journal of Applied Physiology**, 2011.

RIGAT, B.; HUBERT, C.; ALHENC-GELAS, F.; CAMBIEN, F.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **The Journal of Clinical Investigation**, v.86, p.1343–1346, 1990.

VINCENT, B.; De BOCK, K.; RAMAEKERS, M.; EEDE, E.; LEEMPUTTE, M.; HESPEL, P.; THOMIS, M. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. **Physiological Genomics**, v. 32, p. 58–63, 2007.

YAMIN, C.; DUARTE, J. A. R.; OLIVEIRA, J. M. F.; 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, p. 579–586, 2008.

Anexos

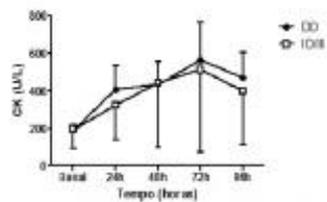


Figura 1: Concentrações séricas de creatina quinase (CK) (média e DP) nos tempos basal, 24, 48, 72 e 96 horas pós-início do exercício para os grupos DD e DD+.