

**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular**

**IELER FERREIRA RIBEIRO**

**Avaliação das interações entre a suplementação antioxidante com o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) e os polimorfismos nos genes da  $\alpha$ -actinina-3 (ACTN-3), eritropoetina (EPO) e seu receptor (EPOR) nos resultados do hemograma, marcadores bioquímicos e peroxidação lipídica, em corredores de rua**

Brasília-DF

2013

**IELER FERREIRA RIBEIRO**

**Avaliação das interações entre a suplementação antioxidante com o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) e os polimorfismos nos genes da  $\alpha$ -actinina-3 (ACTN-3), eritropoetina (EPO) e seu receptor (EPOR) nos resultados do hemograma, marcadores bioquímicos e peroxidação lipídica, em corredores de rua**

Dissertação apresentada para obtenção de título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Koppe Gisolia

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>.Ana Luisa Miranda-Vilela

Brasília-DF

2013

## **IELER FERREIRA RIBEIRO**

**Avaliação das interações entre a suplementação antioxidante com o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) e os polimorfismos nos genes da  $\alpha$ -actinina-3 (ACTN-3), eritropoetina (EPO) e seu receptor (EPOR) nos resultados do hemograma, marcadores bioquímicos e peroxidação lipídica, em corredores de rua**

### **BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Luzitano Brandão Ferreira  
Centro Universitário de Brasília- UniCEUB

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Felipe Saldanha de Araújo  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Universidade de Brasília

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Cesar Koppe Grisolia  
Departamento de Genética e Morfologia  
Universidade de Brasília  
Orientador

Brasília

2013

*Dedico aos meus pais,  
exemplos de vida e união.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Universidade de Brasília, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, pela oportunidade de ingressar-me no curso de mestrado.*

*Ao CNPq pela bolsa de pesquisa concedida desde o início do curso, o que me permitiu dedicação exclusiva ao trabalho.*

*Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, e demais programas pelos ensinamentos.*

*Ao Laboratório de Genética Humana, Universidade de Brasília, por todo o suporte material e físico para realização dos procedimentos de genotipagem, em especial à professora Maria Nazaré Klautau Guimarães, que me deu toda liberdade para conduzir esta pesquisa.*

*Ao Laboratório de Estresse Oxidativo, Universidade de Brasília, pelo empenho e esclarecimentos quanto à análise do perfil antioxidante das amostras, especialmente à aluna de mestrado Viviane Yllena e à professora Élide.*

*Ao meu orientador Dr. Cesar Koppe Grisolia por ter acreditado em mim desde o primeiro momento, quando o procurei para estagiar (na época da graduação), pelo carinho paterno, paciência, amizade e ensinamentos durante todos esses anos de convivência.*

*A minha amiga e coorientadora Dra. Ana Luisa Miranda-Vilela por ter permitido e confiado que eu poderia dar continuidade aos estudos de genotipagem com os atletas, além de ter dado total assistência em todas as etapas da pesquisa. Muito obrigada por tudo, Aninha!*

*Ao estatístico Alexandre, pelas valiosas explicações para a compreensão dos diversos testes e dados estatísticos gerados neste trabalho.*

*Aos muitos colaboradores do Departamento de Genética e Morfologia (Adriana, Sr. Antônio, Sr. Gilberto, Janaína, Silvinha, Dona Zélia, etc) pelo carinho e suporte logístico diário.*

*Aos meus amigos do Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade de Brasília (Bélin, Franciele, Graciana, Igor, Ingrid Freire, Ingrid Reale, José Filho, Karina, Lilian Barbosa, Maria Luiza, Mariana Roll, Miguel, Paolin, Thaís, Vinícius Natan e Wânia) por permitirem os muitos momentos descontração, pela “ajudinha”*

*na hora da dificuldade e pelos deliciosos lanchinhos ao término dos experimentos. Obrigada por tornarem o nosso ambiente de trabalho um lugar acolhedor e divertido!*

*A minha amiga Bélin, pela paciência e empenho nessa fase final da dissertação e por me dar força para continuar. Serei sempre grata, amiga.*

*As minhas amigas Carinne, Graciana, Lilian, Ingrid, Paolin Maria Luiza e Mariana, pelo carinho, pelos conselhos por estarem sempre dispostas a me socorrerem nos momentos de sufoco.*

*Aos meus amigos, em especial a Danielle Alexandre, José Renato e Leilah, por torcerem por mim.*

*Ao Ricardo, pelo apoio e incentivo para que eu ingressasse no mestrado e pela amizade, compreensão e carinho que tem demonstrado por mim.*

*Aos meus amados pais, dona Luzia e Seu Idelberto, e irmãos, Juninho, Maninha e Ilúber, por formarem essa família unida e por estarem comigo sempre, por me apoiarem e acreditarem nas minhas decisões. Amo-os.*

*Por todos aqueles que me ajudaram de alguma forma e não foram citados diretamente aqui.*

*A DEUS, pelas lições e experiências vividas; por me guiar e proteger; por tudo que conquistei e por cada momento que recebo.*

*Não tenha medo de pensar diferente dos outros,  
tenha medo de pensar igual e descobrir que todos estão errados!*

*Eça de Queiroz*

## LISTA DAS FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Origem e respostas celulares às Espécies Reativas.....	25
<b>Figura 2</b>	Mecanismo de ação dos antioxidantes enzimáticos SOD, catalase e GPx.....	27
<b>Figura 3</b>	Principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.....	28
<b>Figura 4</b>	Imagens do fruto pequi ( <i>Caryocar brasiliense</i> Camb.).....	31
<b>Figura 5</b>	Esquema da organização molecular da proteína $\alpha$ - actinina e a sua localização.....	34
<b>Figura 6</b>	Estrutura das $\alpha$ -actinina-2 e $\alpha$ -actinina-3.....	36
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática da regulação da eritropoiese.....	39
<b>Figura 8</b>	Genotipagem PCR-RFLP do gene ACTN-3 em gel de poliacrilamida a 10%.....	50
<b>Figura 9</b>	Distribuição das freqüências genotípicas dos genes da EPO e da ACTN-3 de acordo com o gênero do atleta.....	71

## LISTA DE QUADRO

- Quadro 1** Composição lipídica do óleo do pequi utilizado para produzir as cápsulas, pela análise de cromatografia gasosa.....43
- Quadro 2** Concentrações dos reagentes para o preparo das reações de amplificações dos genes da EPO e ACTN-3, para um volume final 25 µL por amostra.....48
- Quadro 3** Programas adotados para amplificação dos genes da EPO e ACTN-3 pelo termociclador *MJ Research PTC-100 Programmable Thermal Cycler Control®*.....49
- Quadro 4** Sequências de *primers* (iniciadores) dos genes EPO, EPOR e ACTN-3 adotados na amplificação.....51

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b>	Resultados do cálculo do tamanho amostral mínimo dos dados quantitativos obtidos antes e após o pequi para o grupo total, por sexo, faixa etária e distância percorrida.....	56
<b>Tabela 2</b>	Distribuição geral dos atletas de acordo com a faixa etária e percurso percorrido.....	57
<b>Tabela 3</b>	Distribuição dos atletas de acordo o gênero, faixa etária e percurso percorrido.....	57
<b>Tabela 4</b>	Valores totais de CK, AST, ALT, PCR, PCR-us e teste Tbars de acordo com o gênero dos corredores de rua do Distrito Federal antes e depois da suplementação com óleo de pequi.....	60
<b>Tabela 5</b>	Hemograma total de acordo com o gênero dos corredores de rua do Distrito Federal antes e depois da suplementação com óleo de pequi. (A) Eritrograma; (B) Leucograma; (C) Plaquetograma.....	61
<b>Tabela 6</b>	Valores totais de CK, AST, ALT, PCR, PCR-us e teste Tbars dos atletas divididos em grupos por faixa etária antes e depois da suplementação com óleo de pequi.....	62
<b>Tabela 7</b>	Hemograma por grupos etários dos atletas antes e depois da suplementação com óleo de pequi. (A) Eritrograma; (B) Leucograma; (C) Plaquetograma. ....	63
<b>Tabela 8</b>	Valores de CK, AST, ALT, PCR, PCR-us e teste Tbars de acordo com distância percorrida (Km) pelos atletas antes e depois da suplementação com óleo de pequi.....	64
<b>Tabela 9</b>	Valores do hemograma de acordo com a distância percorrida (Km) antes e depois da suplementação com óleo de pequi. (A) Eritrograma; (B) Leucograma; (C) Plaquetograma.....	65

<b>Tabela 10</b> Resultados do cálculo do tamanho amostral mínimo dos dados quantitativos, por genótipos dos polimorfismos de EPO e ACTN-3.....	67
<b>Tabela 11</b> Influência dos polimorfismos dos genes EPO (SNP rs1617640) e ACTN-3 R577X (SNPs rs1815739) nos valores de CK, AST, ALT, PCR, PCR-us e teste Tbars antes e depois da suplementação como óleo de pequi em corredores de rua do Distrito Federal.....	68
<b>Tabela 12</b> Influência do polimorfismo do gene da EPO (SNP rs1617640) no hemograma dos corredores de rua do Distrito Federal antes e depois da suplementação com óleo de pequi. (A) Eritrograma; (B) Leucograma; (C) Plaquetograma.....	69
<b>Tabela 13</b> Influência do polimorfismo R577X (SNPs rs1815739) do gene da ACTN-3 no hemograma dos corredores de rua do Distrito Federal antes e depois da suplementação com óleo de pequi. (A) Eritrograma; (B) Leucograma; (C) Plaquetograma.....	70
<b>Tabela 14</b> Distribuição da frequência alélica dos genes da EPO e ACTN-3, parâmetros da diversidade genética, frequência genótipica e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), dados do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).....	72
<b>Tabela 15</b> Frequências dos genótipos e alelos da ACTN-3 em diferentes populações no mundo comparadas com as frequências dos 123 corredores de rua do Distrito Federal.....	81

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	percentual
$\chi^2$	qui-quadrado
®	registrado
$\mu\text{M}$	micromolar
A	adenina
ACTN-3	alfa actinina-3
ALT	alanina aminotransferase
ANOVA	análise de variância
AST	aspartato aminotransferase
ATP	trifosfato de adenosina (do inglês adenosine triphosphate)
BSA	albumina de soro bovino (do inglês, <i>bovine serum albumin</i> )
C	citossina
CHCM	concentração hemoglobínica corpuscular média
CK	creatina quinase
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DMSO	Dimetilsulfóxido (do inglês <i>dimethyl sulfoxide</i> )
DNA	<i>ácido desoxirribonucleico (do inglês deoxyribonucleic acid)</i>
$e^-$	elétron
EDTA	ácido etilenodiamino tetra- acético (do inglês <i>ethylenediaminetetraaceticacid</i> )
EPM	erro padrão da média

EPO	eritropoetina
EPOR	receptor da eritropoetina
ER	espécie reativa
ERC	espécie reativa de carbono
ERCl	espécie reativa de cloro
ERN	espécie reativa de nitrogênio
ERO	espécies reativa de oxigênio
ERS	espécie reativa de Enxofre
FC <sub>max</sub>	frequência cardíaca máxima
FC <sub>reserva</sub>	frequência cardíaca de reserva
G	guanina
GPX	glutaciona peroxidase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	dissulfito de glutaciona ou glutaciona oxidada
H <sup>+</sup>	íon hidrogênio
H <sub>2</sub> O	água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HCM	hemoglobina corpuscular média
HCT	hematócrito
HGB	hemoglobina
HO <sup>•</sup>	radical hidroxila
Km	quilômetro
L	litro

LDL	lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>low density lipoprotein</i> )
LOD	lipoperoxidação
LT	limiar de lactato
M	molar
MDA	malondialdeído
mM	mili-molar
ng	nanograma
NO•	óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	dióxido de nitrogênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	ânion superóxido
°C	graus <i>Celsius</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pb	pares de base
PCR	<i>dosagem bioquímica de proteína C-reativa</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PCR-us	dosagem bioquímica de proteína C-reativa ultra sensível
PDW	amplitude da distribuição do tamanho das plaquetas (do inglês <i>Platelet Distribution Width</i> )
RL	radical livre
RO•	alcoxila
ROO•	peroxila
rs	Ref SNP
SNP	polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i> )

SOD	<i>superóxido dismutase</i>
T	timina
TBA	ácido tiobarbitúrico (TBA, do inglês <i>Thiobarbituric Acid</i> )
Tbars	Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (Tbars, do inglês <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> )
TBE	solução base de Trisborato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
U	unidade
v/v	volume por volume
VCM	volume corpuscular médio
$VO_{2max}$	consumo máximo de oxigênio
$VO_{2R}$	percentual de reserva de consumo de oxigênio
VPM	volume plaquetário médio
$\alpha$	letra grega alfa
$\beta$	letra grega beta
$\mu\text{L}$	microlitro
$\text{pmol}$	pico-mol

## RESUMO

O exercício físico, por aumentar o consumo de oxigênio, pode produzir um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade de defesa antioxidante do organismo, levando ao estresse oxidativo. Esta sobrecarga oxidativa pode acarretar dano celular e graves lesões musculares com consequente processo inflamatório. Neste contexto, muitos atletas consomem suplementos antioxidantes para evitar os danos oxidativos, a inflamação e o consequente comprometimento do desempenho. O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), um fruto típico do cerrado brasileiro, contém diversos componentes antioxidantes, importantes para reduzir ERO produzidas durante a atividade física. Visto que nutrientes presentes na alimentação podem interagir com o genoma humano para influenciar a saúde e a doença, e variabilidade genética também pode influenciar a resposta à dieta, estudos que avaliem esta interação podem contribuir para futuras intervenções dietéticas baseadas no conhecimento do requerimento nutricional, do estado nutricional e do genótipo. Alguns polimorfismos já foram descritos na literatura como agentes interferentes do desempenho atlético em determinadas categorias de esportes. Entre eles, várias variantes sob a forma de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) já foram identificadas, incluindo os SNPs R577X no gene da  $\alpha$ -actinina-3 (ACTN-3), T→G na região promotora do gene da eritropoetina (EPO) e G6002A no receptor de eritropoetina (EPOR). O gene da ACTN-3 codifica a proteína  $\alpha$ -actinina-3, componente altamente conservado da maquinaria contrátil das fibras rápidas da musculatura esquelética, e é expresso apenas em miofibras tipo II, que são fibras glicolíticas do músculo esquelético. O polimorfismo da ACTN-3 resulta na substituição de uma arginina (R) por um códon prematuro de parada (X) na posição 577 e cria uma proteína não funcional. A eritropoetina (EPO) é o principal hormônio endógeno regulador da eritropoiese, que permite a sobrevivência, proliferação, diferenciação das células progenitoras e, conseqüentemente, aumento da oxigenação dos tecidos. Assim, polimorfismos no gene da EPO ou de seu receptor (EPOR) podem afetar o desempenho atlético, por influenciarem a expressão de EPO. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência dos SNPs rs1815739 no gene da ACTN-3, rs1617640 na região promotora do gene da EPO, e rs121918116 no gene da EPOR na peroxidação lipídica (Teste Tbars), hemograma completo e dosagens bioquímicas de creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e proteína C-reativa (PCR e PCR-us), em uma amostra de corredores de rua do Distrito Federal (N=123), antes e depois da suplementação com 400mg de óleo de pequi em cápsulas ingeridas diariamente por 14 dias consecutivos. As amostras de sangue foram coletadas imediatamente após cada uma das corridas para realizar os testes. O DNA foi obtido por extração da fração leucocitária, e a genotipagem foi realizada por PCR seguida por corte com enzimas de restrição. Os dados estatísticos para as frequências alélicas e genotípicas foram gerados pelo programa Genepopweb®, e os demais dados pelo programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Os resultados demonstraram que todos os genótipos estudados encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Apesar dos muitos parâmetros analisados apresentarem diferença significativa entre os sexos, faixas etárias e distâncias percorridas, nenhuma correlação entre esses parâmetros e os polimorfismos analisados foi encontrada. O polimorfismo da EPO influenciou os resultados do eritrograma e do plaquetograma, sugerindo uma vantagem aeróbica para o genótipo

TG, e uma desvantagem para o genótipo GG sobre possíveis eventos de complicações microvasculares, enquanto não foi encontrada associação do polimorfismo da ACTN-3 com o desempenho de resistência. Ambos os polimorfismos influenciaram as respostas dos corredores ao óleo de pequi, onde respostas significativas foram observadas para o genótipo selvagem da EPO (TT) nos valores de eritrócitos ( $p=0,000$ ), hematócrito (HCT,  $p=0,001$ ), hemoglobina corpuscular média (HCM,  $p=0,000$ ) e concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM,  $p=0,001$ ); e para os genótipos TT e TG ( $p=0,000$  para ambos) nos valores da amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW). Diferenças significativas também foram observadas no plaquetograma só para os genótipos TT e TG. O polimorfismo da ACTN-3 influenciou principalmente os valores de AST e CK, onde os heterozigotos RX tiveram uma redução significativa nos valores de AST ( $p=0,037$ ), e os homozigotos XX, nos valores de CK ( $p=0,010$ ) após a suplementação o óleo de pequi. Esses resultados de resposta diferenciada de cada polimorfismo à suplementação com cápsulas de pequi demonstram a importância dos efeitos da nutrigenômica no desempenho do atleta.

**Palavras-chave:** *Caryocar brasiliense*; polimorfismos genéticos; genotipagem; alfa-actinina-3; eritropoetina.

## ABSTRACT

Physical exercise, by increasing oxygen consumption, can produce an imbalance between the generation of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense capacity of the organism, leading to oxidative stress. This oxidative overload can cause cell damage and severe muscle damage with consequent inflammation. In this context, many athletes consume antioxidant supplements to prevent oxidative damage, inflammation and consequent impairment of performance. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), a typical fruit of the Brazilian Cerrado, contains several antioxidant components that are important to reduce ROS produced during physical activity. Since nutrients present in food can interact with the human genome to influence health and disease, and genetic variability may also influence the response to diet, studies evaluating this interaction may contribute to future dietary interventions based on knowledge of nutritional requirement, nutritional status and genotype. Some polymorphisms have been described in the literature as agents interfering in athletic performance in certain categories of sports. Among them, several variants in the form of single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified, including the SNPs R577X in the  $\alpha$ -actinin-3 gene (ACTN-3), T→G in the promoter region of the erythropoietin (EPO) gene, and G6002A in the erythropoietin receptor (EPOR). The ACTN-3 gene encodes protein  $\alpha$ -actinin-3, a highly conserved component of the contractile machinery of the fast skeletal muscle fibers, and is expressed only in type II myofibers, which are glycolytic fibers of skeletal muscle. The ACTN-3 polymorphism results in substitution of an arginine (R) by a premature stop codon (X) at position 577 and creates a non-functional protein. Erythropoietin (EPO) is the main endogenous hormone regulator of erythropoiesis, which allows the survival, proliferation, and differentiation of progenitor cells and, hence, increased oxygenation of the tissues. Thus, polymorphisms in the EPO gene or in its receptor can affect athletic performance by influencing the expression of EPO. The aim of this study was to investigate the influence of the SNPs rs1815739 in the ACTN-3 gene, rs1617640 in the promoter region of the EPO gene, and rs121918116 EPOR gene in the lipid peroxidation (TBARS assay), taking a complete hemogram and biochemical dosages of creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and C-reactive protein (CRP and hs-CRP), in a sample of street runners from the Federal District (N=123), before and after supplementation of 400mg of pequi oil capsules taken daily for 14 consecutive days. Blood samples were taken immediately after racing to perform the tests. DNA was obtained by extraction of leukocyte fraction, and genotyping was performed by PCR followed by cut with restriction enzymes. Statistical data for the allele and genotype frequencies were generated by the program Genepopweb®, and other data by the program *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Results showed that all genotypes were found in Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). Although many examined parameters showed significant differences between sexes, age group and distance covered, no correlation between these parameters and the analyzed polymorphisms was found. EPO polymorphism influenced results of erythrogram and plateletgram, suggesting an aerobic advantage for TG genotype and a disadvantage for GG genotype concerning possible microvascular complication events, while no association was found for ACTN-3 polymorphism with endurance performance. Both polymorphisms influenced runner's response to pequi oil, where the significant

responses were observed for EPO wild type genotype (TT) in the red blood cells, hematocrit, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration values; and for TT and TG genotypes in the red cell distribution width values. Significant differences were also observed in the plateletgram only for TT and TG genotypes. ACTN-3 mainly influenced AST and CK values, where heterozygous RX had significant decrease in AST values ( $p=0.037$ ), and homozygous XX in CK values ( $p=0.010$ ) after pequi oil supplementation. These results of differential response of each polymorphism to the supplementation with pequi capsules demonstrate the importance of the effects of nutrigenomics on athletic performance.

**Keywords:** *Caryocar brasiliense*; genetic polymorphisms, genotyping, alpha-actinin-3; erythropoietin.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>24</b>
2.1. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	24
2.1.1. Sistema antioxidante enzimático e não enzimático.....	26
2.1.1.2 Peroxidação lipídica.....	27
2.1.2. ERO e atividade física.....	29
2.2. Pequi ( <i>Caryocar brasiliense</i> Camb).....	30
2.2.1. Composição Química do Fruto Pequi ( <i>Caryocar brasiliense</i> Camb).....	31
2.3. Polimorfismo Genético.....	32
2.3.1. Polimorfismos Genéticos Associados à Performance Atlética.....	33
2.3.2. Família das $\alpha$ -actininas.....	33
2.3.2.1. Polimorfismo R577X no gene da ACTN-3.....	35
2.3.3. Eritropoetina (EPO) e polimorfismos nos genes da EPO e de seu receptor (EPOR).....	38
2.4. Nutrigenômica.....	41
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>42</b>
3.1. Objetivo Geral.....	42
3.1.1. Objetivos Específicos.....	42
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
4.1. Extração do Pequi.....	43
4.2. Comitê de Ética.....	44
4.3. Delineamento do estudo e participantes.....	44
4.4. Análise Bioquímica e Hemograma.....	45
4.5. Teste de TBARS.....	46
4.6. Extração de DNA.....	47
4.7. Condições de amplificação.....	48
4.7.1. Genotipagem.....	49
4.7.2. Eletroforese vertical com gel de acrilamida.....	51
4.8. Análises Estatísticas.....	52
4.8.1. Cálculo do tamanho amostral (N).....	52

4.8.2 Diferenças entre sexo, faixa etária e genótipos da ACTN-3, EPO e EPOR no hemograma completo, dosagens bioquímicas da creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e Proteína C Reativa (PCR e PCR-us), e teste de Tbars.....	53
4.8.3 Teste de correlação.....	55
4.8.4 Estatística de populações.....	55
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
5.1 Resultados das dosagens bioquímicas e do hemograma total por grupo total, sexo, faixa etária e distância percorrida antes e depois a suplementação com óleo de pequi.....	56
5.2 Resultados das dosagens bioquímicas e do hemograma total por genótipos de ACTN-3, EPO e EPOR antes e depois a suplementação com óleo de pequi.....	66
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>84</b>
<b>8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>
ANEXO A - Parecer da CONEP.....	100

## 1. INTRODUÇÃO

O fenômeno da performance física humana sempre foi alvo de interesse de médicos especialistas em medicina desportiva e fisiologistas do exercício (DIAS et al., 2007). Neste contexto, avaliações antropométricas, cardiopulmonares e análise de parâmetros hormonais, imunológicos e enzimáticos têm sido realizadas (BOUCHARD et al., 1995; LAC & MASO, 2004; GHORAYEB et al., 2005; CRUZAT et al., 2007; DIAS et al., 2007; DOURADO, 2007; FOSCHINI et al., 2008). Entretanto, algumas das características avaliadas, como estatura, massa corporal, adiposidade, força muscular, flexibilidade, velocidade, capacidade aeróbica máxima, bem como composição de fibras musculares e capacidade de adaptação ao treinamento são, em parte, geneticamente determinadas (BOUCHARD et al., 1995; BEUNEN & THOMIS, 1999; SMITH, 2003). Sendo assim, o status em performance física humana é multifatorial e requer a combinação integrada de fatores ambientais (como treinamento e acompanhamento nutricional específicos) e genéticos (que estão fora do controle dos atletas e dos técnicos), tendo a predisposição genética grandes implicações na caracterização do indivíduo como um atleta de destaque (SKINNER, 2002; SMITH, 2003; DIAS et al., 2007).

A principal questão não é saber se há um componente genético associado com o status atlético, mas como o perfil genético contribui para a performance atlética (EYNON et al., 2011). Contudo, a análise genética somente pode ser considerada como um fator preditivo crucial quando o gene em análise tem uma forte influência em uma via fisiológica no desempenho de um adulto (CALO & VONA, 2008). Portanto, estudos com os polimorfismos genéticos associados aos fenótipos de performance física podem ajudar a compreender a influência do genoma humano e da variabilidade genética no desempenho físico de atletas.

A pesquisa genética humana baseia-se na aplicação de biomarcadores para avaliar as características genéticas e a relação destas com o ambiente, objetivando a compreensão do fenótipo desejado que, neste caso, seria o desempenho esportivo (DIAS et al., 2007).

Com a perspectiva de aumentar a performance física de atletas, diversos estudos têm demonstrado que o bom desempenho em uma competição é resultante

de uma combinação de fatores que interagem com o meio (como treinamento e acompanhamento nutricional específico) e a genética do indivíduo (SKINNER, 2002; SMITH, 2003; DIAS et al., 2007; LIPPI et al., 2010). Nesse contexto surge a nutrigenômica, ciência que estuda as interações entre os componentes químicos nutricionais e o genoma humano. Os conceitos fundamentais deste campo são que a progressão de um fenótipo saudável a um fenótipo de doença deve ocorrer por alterações na expressão de genes ou por diferenças nas atividades de proteínas e enzimas, e que produtos químicos da dieta regulam direta ou indiretamente a expressão da informação genômica. Isto porque, em nível celular, os nutrientes podem: (1) atuar como ligantes de receptores de fatores de transcrição; (2) ser metabolizados pelas vias metabólicas primárias ou secundárias, alterando assim as concentrações de substratos ou intermediários; e (3) afetar positiva ou negativamente as vias de sinalização celulares (KAPUT & RODRIGUES, 2004).

A atividade física intensa pode exigir maior consumo de antioxidantes exógenos para a defesa contra o estresse oxidativo aumentado durante o exercício, circunstância em que a ingestão adequada de alimentos ricos em antioxidantes, como o pequi, é recomendada (WATSON et al., 2010). Assim, estudos que investiguem as interações entre a suplementação antioxidante e os polimorfismos genéticos associados com fenótipos de performance física podem ajudar na compreensão de como a dieta antioxidante interage com o genoma humano para influenciar o desempenho, e como a variabilidade genética influencia a resposta à dieta antioxidante, contribuindo assim para futuras intervenções dietéticas baseadas no conhecimento do requerimento nutricional, do estado nutricional e do genótipo.

Nosso estudo propõe, portanto, verificar a interação entre a suplementação com cápsulas com óleo de pequi e os polimorfismos nos genes da alfa-actinina 3 (ACTN-3, SNP rs1815739), eritropoetina (EPO, SNP rs1617640) e a mutação G6002A no gene do receptor da EPO (EPOR, SNP rs121918116) nos resultados do hemograma, marcadores bioquímicos e peroxidação lipídica. Esse último marcador genético (EPOR), apesar de estar relacionado com eritrocitose familiar 1, também tem sido relatado como um evento “de novo”, e por isso será testado neste trabalho, em um grupo de corredores de rua do Distrito Federal (PERCY et al., 1998).

É importante conhecermos a frequência desses polimorfismos em nossa população de atletas e compararmos suas frequências com as de outras populações

descritas na literatura, visto que a população brasileira é miscigenada, primariamente como consequência de cruzamentos interétnicos entre europeus, africanos e ameríndios (ALVES-SILVA et al., 2000), e esta mistura genética tri-híbrida pode influenciar a distribuição de certos polimorfismos (LORDELO et al., 2012).

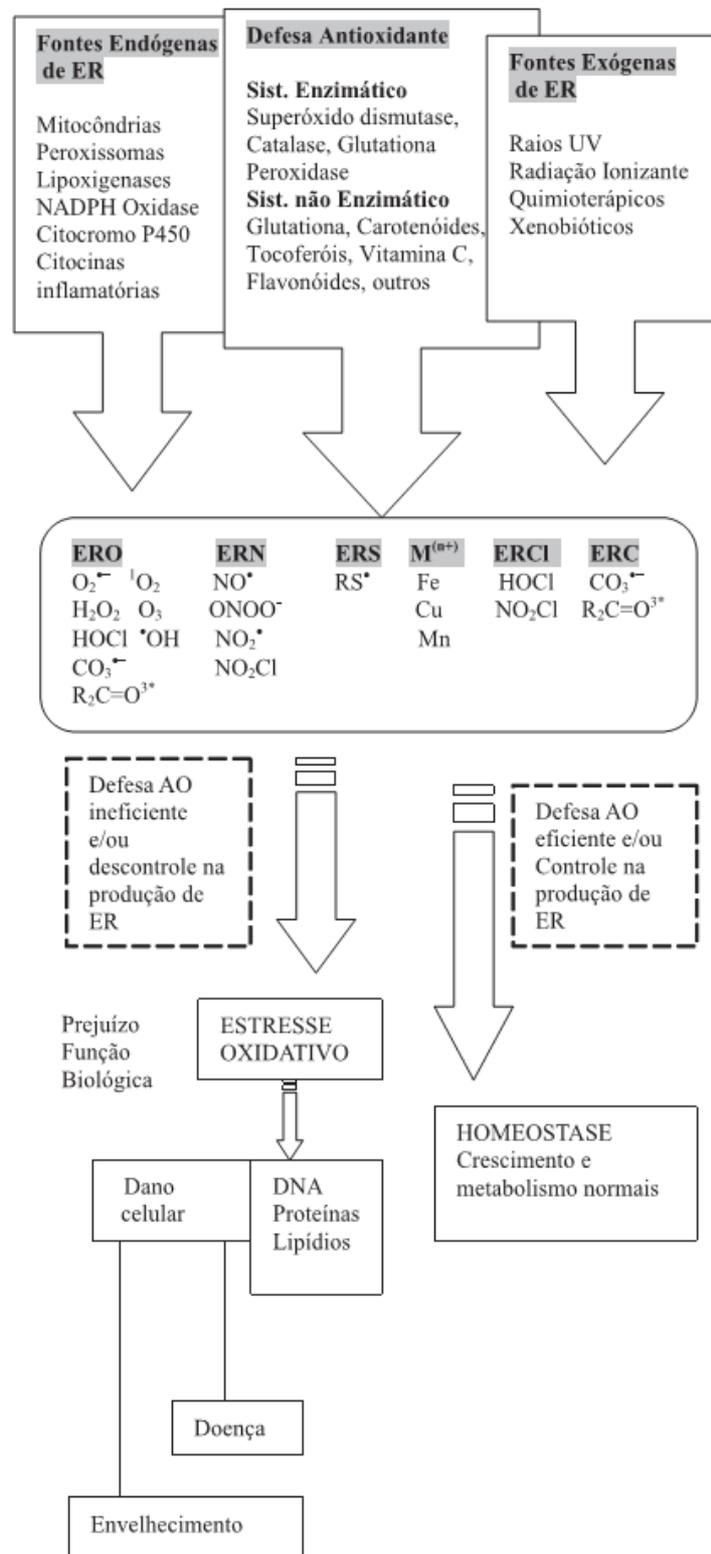
## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

A reação de oxidação consiste na transferência de elétrons de um átomo para outro e representa uma parte essencial do metabolismo aeróbico, já que o oxigênio é acceptor final de elétrons no sistema de fluxo de elétrons que produz energia sob a forma de ATP (POSTON et al., 2011). No entanto, quando o fluxo de elétrons torna-se desacoplado (transferência não emparelhada de elétrons isolados), há geração de radicais livres (RL), espécies químicas com meia-vida curtíssima, altamente instáveis e muito reativas, que se multiplicam rapidamente em cascata pelo sequestro de elétrons de outras moléculas, que também se transformam em RL (HERMES-LIMA, 2004; GULÇIN, 2012).

Os RL podem apresentar o elétron não-pareado centrado no átomo de oxigênio ou no átomo de nitrogênio, sendo denominados respectivamente de “espécies reativas de oxigênio” (ERO) e “espécies reativas de nitrogênio” (ERN) (HERMES-LIMA, 2004; BARREIROS et al., 2006). Exemplos de radicais livres conhecidos como ERO incluem ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), peroxila ( $ROO^{\bullet}$ ), alcoxila ( $RO^{\bullet}$ ), enquanto ERN incluem o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) (HERMES-LIMA, 2004; VASCONCELOS et al., 2007). ERO e ERN podem também ser espécies não radicalares (não apresentam número ímpar de elétrons), como por exemplo o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), mas que são capazes de gerar espécies danosas e altamente reativas, particularmente o radical hidroxila (BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

As ERO e ERN são continuamente produzidas no corpo em processos fisiológicos naturais como a respiração, controle da pressão sanguínea, sinalização celular, apoptose, algumas em funções imunes mediadas por células e no processo de fagocitose de agentes patogênicos, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor (Figura 1) (VASCONCELOS et al., 2007; GULÇIN, 2012).



**Figura 1:** Origem e respostas celulares às Espécies Reativas (ER) de Oxigênio (ERO), de Nitrogênio (ERN), derivados de Enxofre (ERS), de Cloro (ERCI), de carbono (ERC) e metais de transição [ $M^{n+}$ ] (VASCONCELOS et al., 2007).

Apesar de RL serem moléculas altamente instáveis, capazes de existirem independentemente e de oxidar moléculas biológicas, em concentrações fisiológicas podem ser necessárias para o funcionamento da célula. Em baixas concentrações, estão envolvidas em funções de sinalização intracelular, ativadas por estímulo que influencia o estado REDOX (oxidação-redução, do inglês *reduction-oxidation*) (SIES et al., 2005; GULÇIN, 2012).

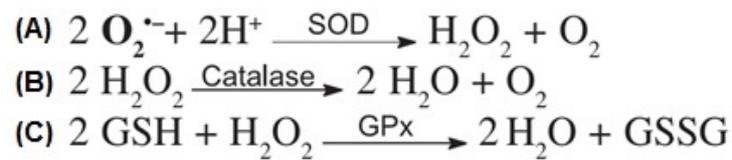
Um desequilíbrio entre a geração de ERO e seus sistemas de eliminação gera uma série de danos às células, pois, para atingirem estabilidade, estas moléculas reagem com as biomoléculas celulares como os ácidos nucleicos, as proteínas, os carboidratos e os lipídios da membrana para sequestrar elétron (SIES et al., 2005; GULÇIN, 2012).

### 2.1.1 Sistema antioxidante enzimático e não enzimático

As espécies reativas (ER) são neutralizadas por um complexo sistema de defesa antioxidante (URSO & CLARKSON, 2003). Esse sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático (HERMES-LIMA, 2004).

O sistema antioxidante enzimático (Figura 2) é constituído principalmente pelas enzimas: (A) superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$ ; (B) catalase (CAT), que atua na decomposição de  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$  (enzima particularmente abundante nos eritrócitos, que metaboliza cerca de 90% do peróxido de hidrogênio); e (C) glutathiona peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathiona reduzida (GSH) como co-fator (VASCONCELOS et al., 2007).

O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutathiona (GSH), principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis (vitaminas E), ascorbato, ácido úrico, vitaminas A, ubiquinona, flavonóides e  $\beta$ -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina), entre outras (URSO & CLARKSON, 2003; HERMES-LIMA, 2004).



**Figura 2:** Mecanismo de ação dos antioxidantes enzimáticos SOD, catalase e GPx. Figura 2A: Reação da enzima do SOD, que catalisa a aniquilação do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio e água. Figura 2B: Reação da enzima da CAT, enzima que catalisa a reação do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular. Figura 2C: Reação da enzima GPx: reduz peróxido de hidrogênio à água (VASCONCELOS et al., 2007).

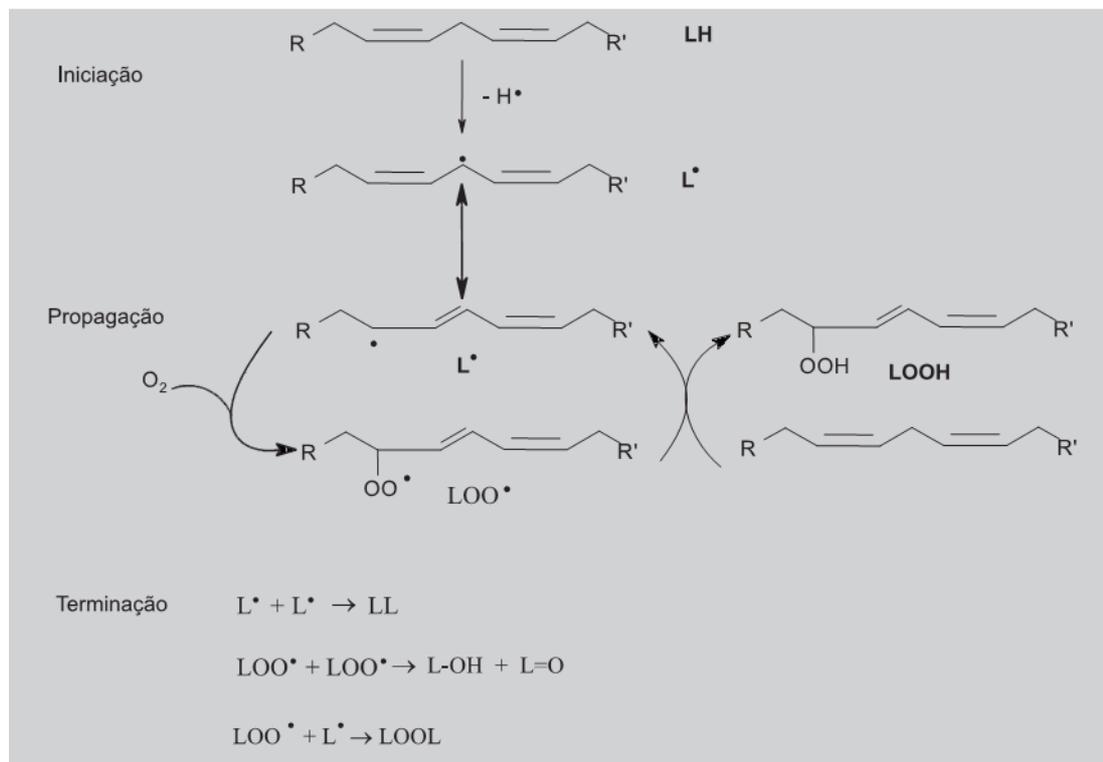
O sistema antioxidante enzimático e a GSH estão presentes, predominantemente, no meio intracelular, daí a utilização do eritrócito para sua análise, enquanto o sistema antioxidante não enzimático localiza-se, principalmente, no meio extracelular, sendo por isso analisado em plasma e soro (VASCONCELOS et al., 2007).

#### 2.1.1.2 Peroxidação lipídica

O processo de peroxidação lipídica, também conhecido como lipoperoxidação (LPO), é iniciado pela reação de um RL com um ácido graxo insaturado e propagado por radicais peroxilas (LIMA & ABDALLA, 2001). A LPO constitui um evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a perda da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na ausência da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (LIMA & ABDALLA, 2001).

A LPO ocorre pelo ataque de uma ER (geralmente  $\text{OH}^{\cdot-}$ ), que abstrai um átomo de hidrogênio de um grupo metileno alílico (Figura 3), normalmente de um ácido graxo poli-insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono e,

caracterizando assim, a etapa de iniciação. Este radical é usualmente estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Sob condições aeróbicas, o carbono radicalar do dieno conjugado reage com  $O_2$  e forma o radical peroxila. Este radical peroxila é capaz de abstrair  $H^\bullet$  de moléculas de lipídeos adjacentes, e formar outro radical peroxila e assim sucessivamente, caracterizando a reação em cadeia da etapa de propagação (VASCONCELOS et al., 2007).



**Figura 3:** Principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica (VASCONCELOS et al., 2007).

O radical peroxila combina-se com o  $H^\bullet$  abstraído, gerando o lipídeo hidroperóxido (LOOH) que ao sofrer quebra forma aldeídos. Na decomposição dos hidroperóxidos lipídicos são gerados radicais peroxila e alcóxila através da reação de Fenton. A terceira e última etapa da peroxidação lipídica, a etapa de terminação, instala-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno,  $NO^\bullet$ ) ou pela reação de dois radicais lipídicos formando produtos não radicalares (HERMES-LIMA, 2004).

Nos sistemas biológicos, a peroxidação lipídica pode ocorrer por via enzimática (ciclooxigenases e peroxidases) e por via não enzimática (auto-oxidação) (HERMES-LIMA, 2004; VASCONCELOS et al., 2007).

Todas estas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com expansão do líquido intracelular e risco de ruptura das membranas das células e das organelas, com conseqüente morte celular (ANDRADE et al., 2005a).

Essa cascata de eventos bioquímicos, envolvendo os vários intermediários entre si, leva à formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malonaldeído (que reage com o grupo amina de purinas), 4-hidroxinonanal e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para se avaliar o estresse oxidativo (LIMA & ABDALLA, 2001, REY et al., 2001).

### 2.1.2 ERO e atividade física

A atividade física regular é reconhecida por aumentar a concentração de enzimas antioxidantes e, conseqüentemente, a resistência ao estresse oxidativo. Entretanto, o esforço demandado por desportistas durante o treinamento pode levar a um estado de estresse oxidativo crônico, devido ao desequilíbrio entre as ERO sintetizadas endogenamente e as enzimas antioxidantes (BAGETTI et al., 2011; PESIC et al., 2012).

O desequilíbrio gerado pelo excesso de ERO induzido por exercícios depende de muitos fatores, como a intensidade, o tipo (aeróbicos ou anaeróbicos), consumo de oxigênio e a duração do treinamento e o perfil do atleta, como sexo, idade e hábitos alimentares (URSO & CLARKSON, 2003; FISHER-WELLMAN & BLOOMER, 2009; PESIC et al., 2012). Essa produção excessiva de ERO pode danificar as membranas celulares e o DNA, provocando mutações cancerígenas (BAGETTI et al., 2011; PESIC et al., 2012).

Diversos estudos inferem que a suplementação com agentes antioxidantes é capaz de compensar esse desequilíbrio bioquímico (SCHRÖDER et al., 2000; PLUNKETT et al., 2010; WATSON et al., 2010). Além de trabalhos experimentais,

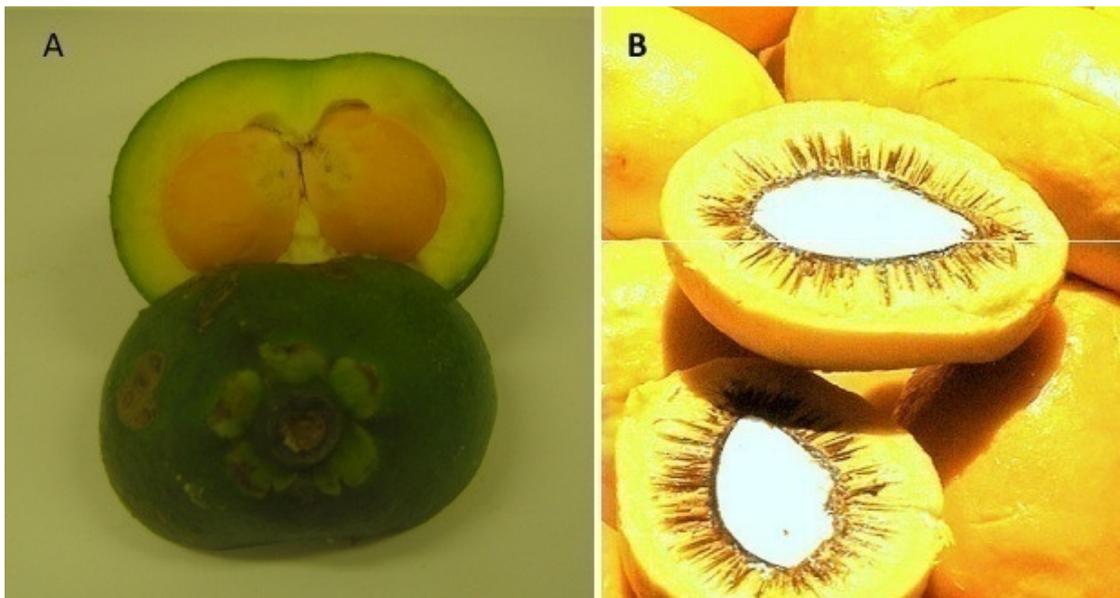
existem evidências epidemiológicas que sugerem que a alta concentração de antioxidantes presentes na alimentação de determinadas populações favorecem o baixo risco de doenças cardiovasculares e certos tipos de neoplasias (WINKLHOFER-ROOB et al., 2003). No entanto, considerando que ERO podem atuar como sinais que regulam eventos moleculares de adaptação celular ao exercício, a consequência prática é que a administração de antioxidantes pode impedir tais adaptações quando o exercício é moderado, uma vez que este tipo de exercício aumenta a expressão das enzimas antioxidantes. Portanto, a recomendação do uso de suplementos antioxidantes deve ser feita apenas para aqueles casos de exercícios exaustivos que causam estresse oxidativo e dano celular (GOMEZ-CABRERA et al., 2008; MIRANDA-VILELA, 2012).

## **2.2 Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**

O pequizeiro, *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae), é uma importante opção de renda e alimento para populações que vivem na região do cerrado brasileiro (LEITE et al., 2006; ROESLER et al., 2008). Está amplamente distribuído nesse bioma, sendo encontrado principalmente nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás. Também pode ser encontrado nos Estados do Pará, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais e Paraná e nos Estados nordestinos, Piauí, Ceará e Maranhão (LIMA et al., 2007; MARIANO et al., 2009).

O pequizeiro floresce de agosto a novembro e seus frutos iniciam a maturação a partir de setembro, podendo ser coletados de novembro até o início de fevereiro (ALMEIDA & SILVA, 1994; ALMEIDA et al., 1998; VERA et al. 2005). O fruto é conhecido popularmente como piqui, piqui-do-cerrado, grão de cavalo, amêndoa do Brasil, amêndoa de espinho, ou simplesmente pequi, que é uma palavra indígena que significa "cobertura espinhosa" (ARAÚJO, 1995). Sua polpa pode ser consumida *in natura* ou em diversas preparações alimentícias (doce, conservas, suco, sorvete, geleias, licor e com outros alimentos tradicionais da região) (ROESLER et al., 2008). Também tem sido usada para a produção de produtos cosméticos, lubrificantes e na indústria farmacêutica (ARAÚJO, 1995).

A constituição anatômica do fruto do pequi (Figura 4) é dada pelo exocarpo ou pericarpo (coloração esverdeada ou marrom-esverdeada), mesocarpo externo (polpa branca, com coloração amarelo-esbranquiçada) e mesocarpo interno, região que forma a porção comestível do fruto ou polpa, possuindo coloração amarelada, e separa-se facilmente do mesocarpo externo quando maduro (Figura 4A). O endocarpo (porção espinhosa) forma uma proteção à semente ou amêndoa, sendo revestida por um tegumento fino e marrom (Figura 4B) (LIMA et al., 2007).



**Figura 4:** Imagens do fruto pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Figura 4A: Fruto constituído pelo pericarpo (casca ou revestimento cor verde), mesocarpo externo (mesocarpo externo) e mesocarpo interno (porção de cor amarela)<sup>1</sup>. Figura 4B: mesocarpo interno, endocarpo (porção espinhosa e de cor marrom) e a semente (porção branca mais central)<sup>2</sup>.

### 2.2.1 Composição química do fruto pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)

Os lipídios são os constituintes predominantes da polpa (20 a 33,4%) (GARCIA et al., 2007, LIMA et al., 2007). A grande quantidade de óleo presente no

<sup>1</sup> Figura 4A: Laboratório de Genética Toxicológica.

<sup>2</sup> Figura 4B: Januário, Larissa. Sem medidas. Ode puro amor ao piqui (ou pequi, como preferir), 2012. Disponível em: <<http://semmedida.com/receitas/sem-categoria/ode-puro-amor-ao-piqui-ou-pequi-como-preferir/>>. Acesso em 7 de dezembro de 2012.

fruto ajuda a conservar as vitaminas e os sais minerais, mesmo após o cozimento (SILVA et al., 2001). Na polpa do pequi predomina ácidos graxos insaturados (51,68 a 65,13%). O ácido oleico, insaturado, está presente, variando de 48,7 a 57,4%, seguido pelo ácido palmítico, saturado (34,4 a 46,79 %) (LIMA et al., 2007).

A polpa também apresenta alto valor energético, bem com elevado teor de fibra, sendo uma boa fonte de antioxidantes tais como vitamina C (ácido ascórbico), carotenóides, vitamina E (tocoferóis) e compostos fenólicos (BAGETTI et al., 2011; CARDOSO et al., 2013).

A estrutura dos compostos fenólicos permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula instável e interrompendo o mecanismo de oxidação por RL. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres inertes (RAMALHO & JORGE, 2006). No pequi a concentração de fenólicos totais é inferior apenas à acerola (*Malpighia glabra*) e à manga (*Mangifera indica*), o que indica que a polpa possui elevada capacidade antioxidante, visto que existe uma correlação direta entre a quantidade de compostos fenólicos totais e a proteção antioxidante (KUSKOSKI et al., 2005; LIMA et al., 2007).

Os dados presentes na literatura indicam variação dos teores de carotenóides totais e dos principais tipos presentes na polpa do fruto do *C. brasiliense* Camb., o que pode ser em consequência da natureza dos extratos e métodos analíticos adotados, bem como da região e época da coleta do fruto destinado em cada estudo (OLIVEIRA et al., 2006). De forma geral, foram encontrados, zeaxantina e  $\beta$ -caroteno, além da  $\beta$ -criptoxantina, violanxantina, luteína, licopeno, neoxantina e anteraxantina (GODOY & RODRIGUES-AMAYA, 1994; OLIVEIRA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2012).

### **2.3 Polimorfismo genético**

O polimorfismo genético é uma variação canônica relatada em uma determinada posição da sequência de DNA, onde há mais de um alelo envolvido para um fenótipo presente na população (OSTRANDER et al., 2009). Segundo Beiguelman (2008), um gene que possua mais de um alelo com frequência entre 1%

e 99% deve ser classificado como polimórfico. Entende-se, portanto, que os polimorfismos são caracteres que resultam de locos que incluem pelo menos dois alelos polimórficos.

### 2.3.1 Polimorfismos genéticos associados à performance atlética

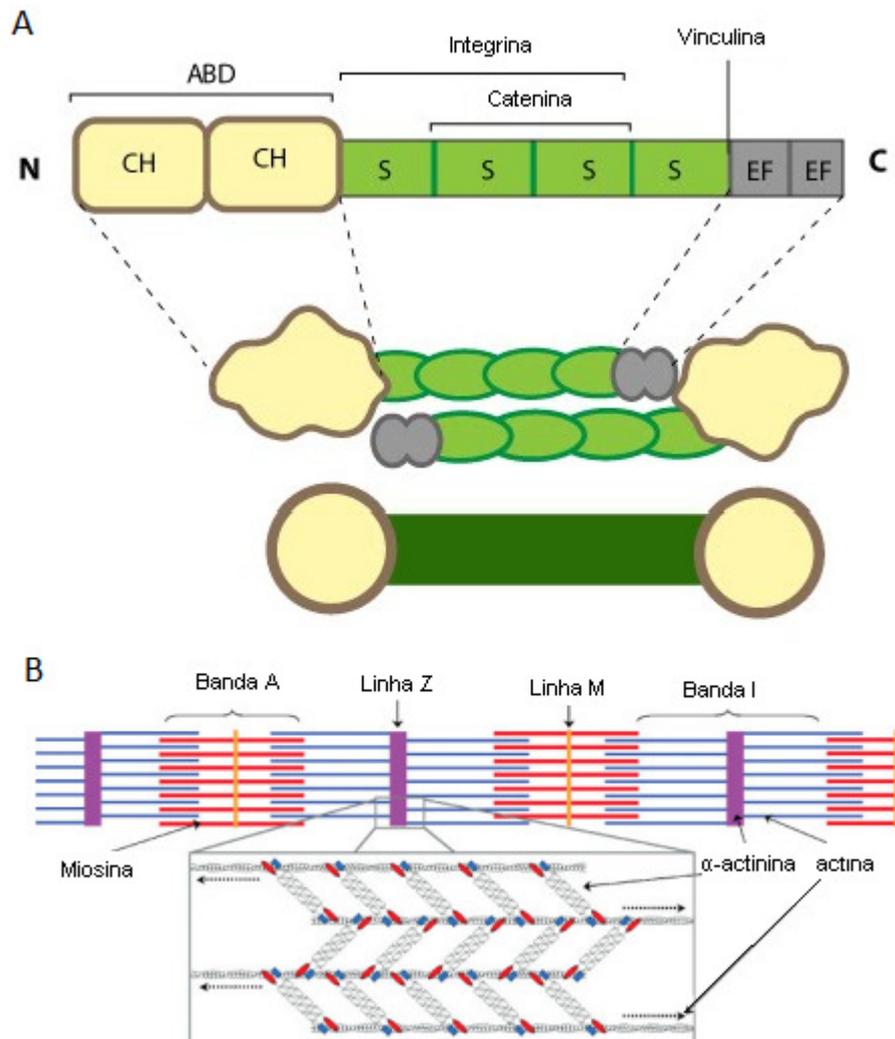
Existem variações na sequência de DNA que estão associadas com a melhoria do desempenho de atletas: os chamados polimorfismos de melhora de desempenho ou PEPs (do inglês *Performance Enhancing Polymorphisms*). Um grande número dessas variantes genéticas já está bem documentado, mostrando associação com fenótipos e performance física (OSTRANDER et al., 2009). Entre eles, várias variantes sob a forma de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single-Nucleotide Polymorphism*) já foram identificadas, incluindo o polimorfismo R577X no gene da  $\alpha$ -actinina-3 (ACTN-3, SNP rs1815739) e o polimorfismo no gene do receptor da eritropoetina (EPOR, SNP rs121918116), entre muitos outros (MACARTHUR & NORTH, 2005; NIEMI & MAJAMAA, 2005; DIAS et al., 2007; LIPPI, 2008; TONG et al., 2008; LIPPI et al., 2010).

### 2.3.2 Família das $\alpha$ -actininas (ACTN)

A família das  $\alpha$ -actininas (ACTN) é constituída por quatro proteínas de ligação à actina (duas são musculares e as restantes são isoformas não musculares), sendo codificadas por uma família multigênica e associadas à distrofia (YANG et al., 2003; LEK & NORTH, 2010). As  $\alpha$ -actininas sarcoméricas são os principais componentes da linha Z, que cruzam os filamentos finos de actina; elas desempenham uma função estática de manutenção do arranjo miofibrilar, bem como função regulatória na coordenação da contração fibromuscular (GOEL & MITTAL, 2005).

A estrutura de uma proteína ACTN é compreendida por três domínios: um domínio NH<sub>2</sub>- terminal de ligação à actina, um domínio formado por haste central

contendo quatro sequências internas repetidas de 122 aminoácidos e um domínio COOH-terminal contendo dois sítios de ligação ao cálcio (Figura 5). Os quatro motivos repetitivos da actinina possuem homologia compartilhada com espectrina (proteína de ligação à actina no citoesqueleto), sugerindo uma origem evolutiva comum às proteínas actinina e a família da espectrina (BERMAN & NORTH, 2010).



**Figura 5:** Esquema da organização molecular da proteína  $\alpha$ -actinina<sup>3</sup> e a sua localização. Figura 5A: Domínios e regiões necessários para a ligação à actina e interação proteína-proteína estão destacados: ABD (Domínio de Ligação à Actina);  $\beta$ -integrina;  $\alpha$ -catenina e vinculina). Figura 5B: Filamentos cruzados e ligados de dímeros de actina e estabilizados por força contrária gerada pelo aparato contrátil (Inserção superior; setas tracejadas indicam a direção da força). A parte inferior da inserção ilustra a linha Z sarcomérica de fibras musculares do tipo II (fibras brancas ou de contração rápida), relacionadas à força e potência musculares e com predomínio de metabolismo energético de tipo anaeróbico (OMIM +102574; MACARTHUR & NORTH, 2004; DIAS et al., 2007).

<sup>3</sup>Mechanobiology Institute, National University of Singapore, Republic of Singapore. Illustrator: PhamThiPhuongThao (2010). Alpha ( $\alpha$ )-actinin. Disponível em <<http://www.mechanobio.info/Home/glossary-of-terms/mechano-glossary--a/alpha-actinin#PMID18488141>>. Acesso em 26 de agosto de 2012.

Existem quatro genes da actinina em seres humanos (ACTN-1, ACTN-2, ACTN-3 e ACTN-4). Em células não musculares, as ACTN-1 e ACTN-4, isoformas do citoesqueleto, são encontradas ao longo dos feixes de microfilamentos. No músculo esquelético, as ACTN-2 e ACTN-3 são as principais constituintes estruturais da linha Z que se ancoram à actina em filamentos finos, além de manter relação espacial entre os miofilamentos (YANG et al., 2003).

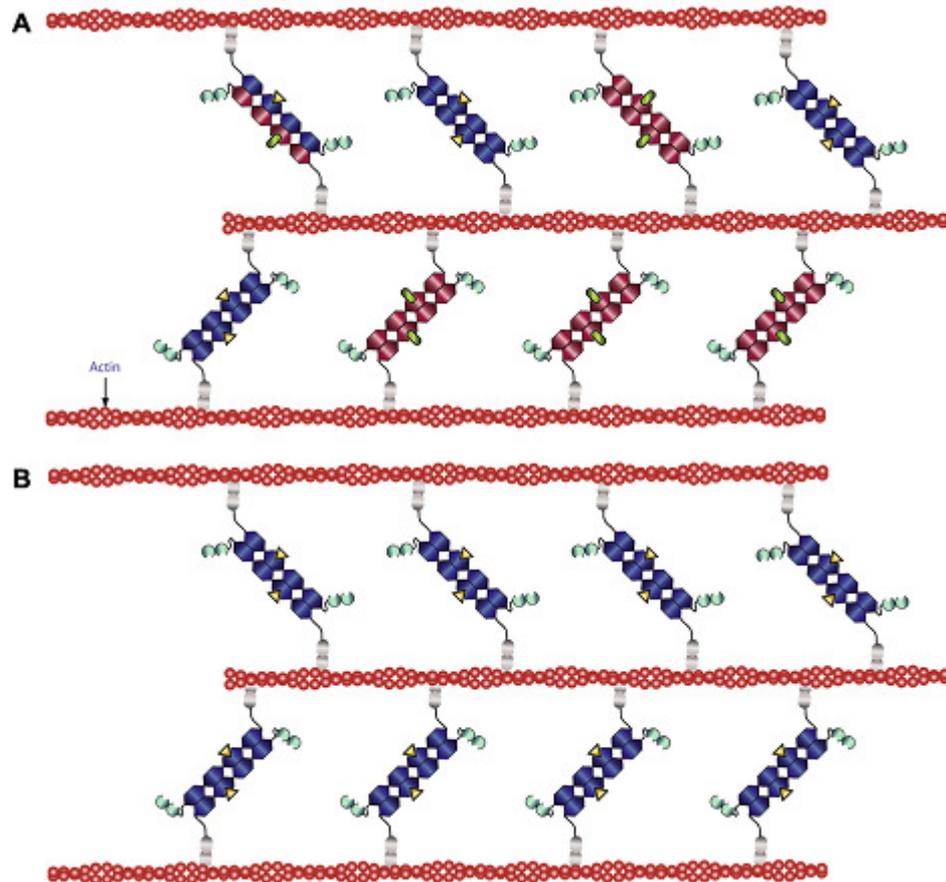
As ACTN's do músculo esquelético (codificadas pelos genes da ACTN-2 e ACTN-3) são inicialmente caracterizadas como componentes estruturais do aparato contrátil da fibra muscular (LEK & NORTH, 2010). ACTN-2 é expressa em todas as fibras musculares, enquanto que ACTN-3, apenas nas fibras musculares de contração rápida (Figura 6) (GOEL & MITTAL, 2005; LEK & NORTH, 2010).

#### 2.3.2.1 Polimorfismo R577X no gene da ACTN-3

O gene da ACTN-3 está localizado no cromossomo 11q13-q14 e é expresso apenas em miofibras tipo II (fibras brancas), que são fibras glicolíticas do músculo esquelético, o que permite geração de uma maior quantidade de força e obtenção de velocidades mais elevadas durante o movimento (NORTH et al., 1999; GOEL & MITTAL, 2005; PAPARINI et al., 2007). De acordo com Papparini e colaboradores (2007), recentes estudos sugerem que ACTN-3 pode influenciar na funcionalidade muscular e na aptidão individual ao esporte.

O grupo de North e colaboradores (1999) identificou um polimorfismo comum no gene da ACTN-3, R577X, onde a troca de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição do nucleotídeo 1.747 do éxon 16 provoca a substituição do aminoácido arginina (R) por um códon de parada prematuro (X) na posição 577 da proteína (NORTH et al., 1999), resultando em uma proteína não funcional ("arg577-to-ter") (NORTH et al., 1999; YANG et al., 2003). Assim, a produção de ACTN-3 é o resultado de um indivíduo possuindo pelo menos uma cópia do alelo R (GOEL & MITTAL, 2005). Em homozigose (577XX), este polimorfismo *nonsense* (mutação sem sentido) da ACTN-3 resulta na deficiência completa da proteína sem gerar

nenhum problema patológico, o que sugere um sistema compensatório pela proteína homóloga ACTN-2 (Figura 6B) (NORTH et al.; 1999; DIAS et al., 2007).



**Figura 6:** Estrutura das ACTN-2 e ACTN-3. As actininas sarcoméricas se dimerizam por reticular a actina à linha-Z. Os dímeros azuis e vermelhos representam a ACTN-2 e ACTN-3. Figura 6A: Pode haver interações com a ACTN-2 ou ACTN-3, que são isoformas específicas, representadas por um triângulo amarelo ou retângulo arredondado verde. Figura 6B: As interações específicas da ACTN-3 são perdidas (hipóteses para a ausência da ACTN-3) (LEK & NORTH, 2010).

De acordo com Yngvadottir e colaboradores (2009), os genes ACTN-3 (MIM 102574) e caspase 12, CASP12 (MIM \* 608633), são exceções no genoma humano, uma vez que neles ocorre seleção positiva para uma mutação sem sentido. Embora os SNPs *nonsense* sejam causas comuns de doença genéticas, os alelos mutantes dos genes CASP12 e ACTN-3 são encontrados em frequências altas e em homozigose, e parecem ter sido uma variação vantajosa para a evolução humana

recente. Observa-se que portadores dessa mutação no gene CASP12 são mais resistentes à sepse grave (YNGVADOTTIR et al., 2009).

Estima-se que 16% da população mundial apresente deficiência congênita para ACTN-3 (NORTH et al., 1999). Conforme demonstrado por North et al.(1999), o códon de parada do polimorfismo 577X está presente em diferentes populações étnicas.

O gene ACTN-3, na presença do alelo R, tem a função protetora no sarcômero do músculo esquelético contra mecanismos destrutivos ocasionados durante esforços repetitivos, como corridas de curtas distâncias (100-200 metros) (MORAN et al., 2007). Curiosamente, o genótipo para a deficiência da ACTN-3 (577XX) não resulta num fenótipo patológico como distrofia muscular ou miopatias e tem sido encontrado com maior frequência em atletas de resistência do que na população em geral, sugerindo contribuir com uma melhor performance em provas de resistência (NORTH et al., 1999; DIAS et al., 2007).

Os indivíduos que expressam o gene ACTN-3 apresentam vantagem em modalidades que exigem explosão e força muscular quando comparados com indivíduos com genótipo modificado, que não expressam esta proteína. Portanto, quando o genótipo nulo XX está presente em atletas de elite de corrida de velocidade (*sprint*), ele se associa com redução da força muscular e de desempenho de *sprint* em não atletas. No entanto, está super-representado em atletas de *endurance*, o que sugere aumento da resistência muscular com o custo de geração de energia (MACARTHUR & NORTH, 2004).

Acredita-se que a deficiência da proteína ACTN-3 reduza a atividade da enzima glicogênio fosforilase, além de aumentar para mais vias oxidativas de utilização de energia (BERMAN & NORTH, 2010). Por outro lado, o genótipo 577RR tem sido associado à melhor performance em provas que exigem força e explosão muscular (DRUZHEVSKAYA et al., 2008; MASSIDDA et al., 2009).

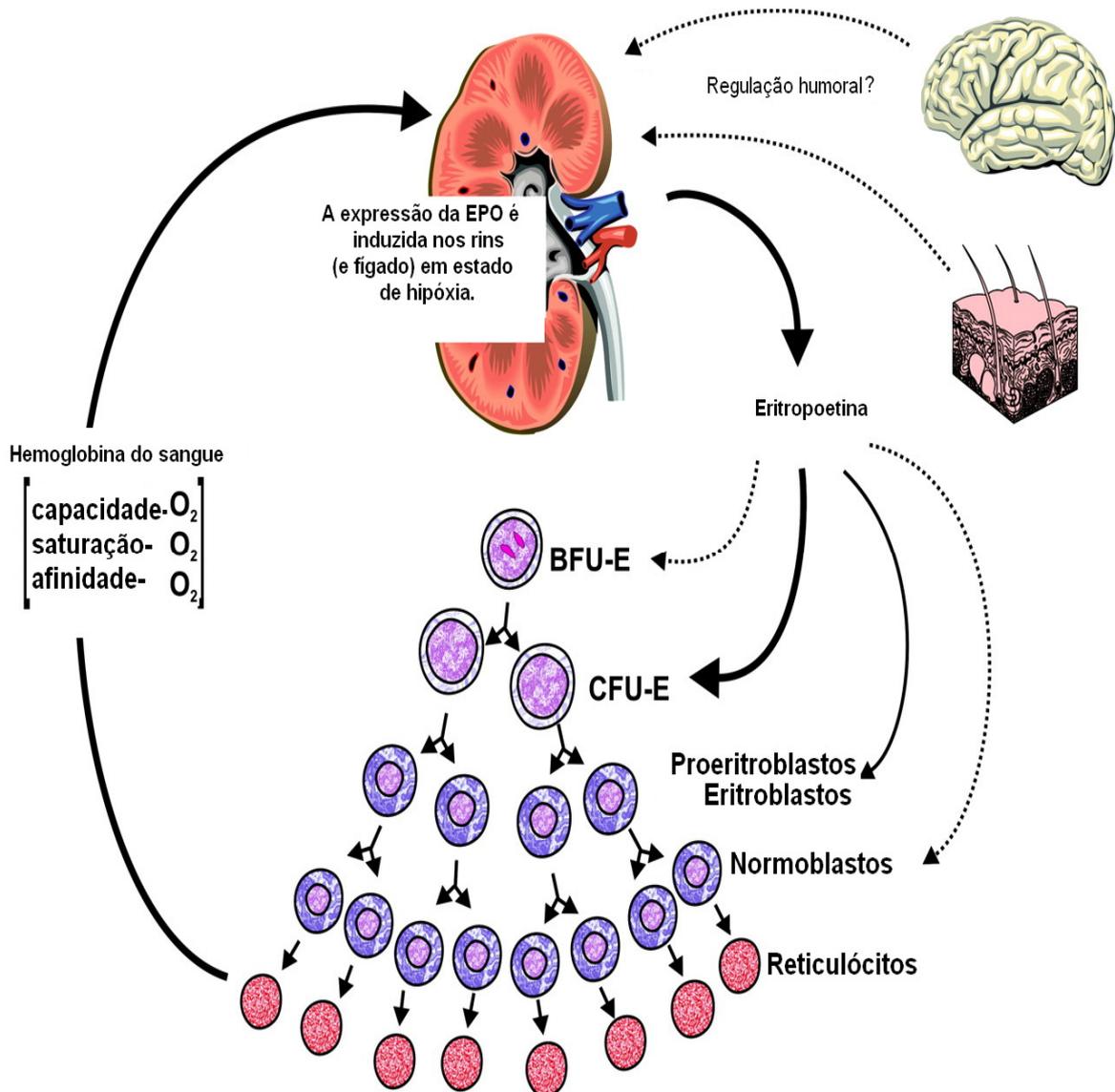
Para compreender os efeitos da deficiência da ACTN-3 na função muscular, MacArthur e colaboradores (2008) realizaram *knockout* no gene da ACTN-3 em camundongos e verificaram que a proteína está intimamente relacionada à ACTN-2 que está aumentada (*up-regulated*) e expressa em todos os tipos de fibras nos animais estudados, padrão semelhante ao observado no músculo humano. O aumento da expressão de ACTN-2 em fibras musculares glicolíticas rápidas é

suficiente para evitar o desenvolvimento de uma doença muscular, mas não suficiente para compensar a ausência de ACTN-3. Em nível fisiológico, os camundongos que não expressaram a proteína ACTN-3, diminuíram a força muscular, mas melhoraram a resistência e uma redução significativa na massa muscular em comparação com os camundongos selvagens para o gene da ACTN-3 (MACARTHUR et al., 2008).

### 2.3.3. Eritropoetina (EPO) e polimorfismos nos genes da EPO e de seu receptor (EPOR)

O hormônio hematopoiético eritropoetina (EPO) é o principal regulador da produção de eritrócitos, garantindo a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação das células progenitoras (Figura 7). Portanto a EPO é o principal hormônio endógeno regulador da eritropoiese (OGUNSHOLA et al., 2006).

A EPO é de natureza glicoprotéica e sua expressão é induzida nos rins e no fígado por anemia ou hipóxia (SEMENZA et al., 1991; BENTO et al., 2003). Além de células hematopoiéticas (Figura 7), a expressão do receptor da EPO (EPOR) e a resposta da EPO são encontradas em outros tipos celulares incluindo células endoteliais e nervosas (OGUNSHOLA et al., 2006).



**Figura 7:** Representação esquemática da regulação da eritropoiese. A escassez de gás oxigênio (hipóxia) é um estímulo para a síntese de eritropoetina (EPO), inicialmente nos rins. EPO é um fator de proliferação e diferenciação de progenitores de eritrócitos, particularmente as unidades formadoras de eritrócitos (CFU-E) (JELKMANN, 2011).

Devido à sua capacidade inerente de estimular a produção de glóbulos vermelhos e, conseqüentemente, aumentar o aporte de oxigênio para os tecidos, sua utilização no esporte foi proibida pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) a partir de 1987, sendo seu uso considerado doping (BENTO et al., 2003; ARTIOLI et al., 2007). No entanto, suas formas recombinantes (sintéticas) vêm sendo usadas indiscriminadamente por atletas, principalmente em esportes de resistência, por

aumentarem a concentração de hemácias, gerando maior aporte de oxigênio para o tecido muscular (PARDOS et al., 1999; BENTO et al., 2003; DE ROSE et al., 2004).

Sua ação nas células alvo ocorre através da ligação ao domínio N-terminal na porção extracelular do receptor da EPO (EPOR). A eritrocitose tem muitas causas diferentes, ocorrendo frequentemente secundária a condições que resultam em estado de hipóxia tecidual ou distúrbios associados com a produção autóno-ectópica da EPO (produção de EPO fora do local de origem), que leva ao aumento da massa dos glóbulos vermelhos. A eritrocitose primária, por outro lado, não é desencadeada por um aumento apropriado ou inadequado na produção de EPO, mas está associada a uma anomalia intrínseca das células progenitoras hematopoiéticas, resultando na proliferação autônoma de células vermelhas do sangue tais como as observadas na policitemia (ARCASOY et al, 1997).

A administração da EPO pode dar origem a um hematócrito elevado, o que aumenta a viscosidade do sangue e compromete a atividade endotelial e neuroprotetora associada com a EPO. Por exemplo, a resposta endotelial à demanda excessiva de oxigênio através do número de eritrócitos elevado ou a vasodilatação por óxido nítrico pode aumentar a produção de ERO e ser prejudicial. Esses eventos estão associados com efeitos adversos que incluem hipertensão, aumento de marcadores inflamatórios e trombose (OGUNSHOLA et al., 2006; ELLIOTT, 2008).

Visto que alterações na produção de EPO geram um desequilíbrio na sua concentração plasmática e podem ocasionar vários tipos de patologias relacionadas ao sistema hematopoético, sua utilização no esporte é bastante discutível (BENTO et al., 2003). Por outro lado, mutações benignas no gene de seu receptor (EPOR, cromossomo 19p13.3-p13.2 - OMIM \*133171) podem favorecer o desempenho físico aeróbico (DE LA CHAPELLE et al., 1993). De fato, até agora apenas uma variante alélica na região promotora do gene da EPO (cromossomo 7q21 - OMIM \*133170) foi descrita, estando associada a complicações no diabetes (TONG et al., 2008). Por outro lado, para EPOR, várias variantes já foram descritas (PRCHAL et al., 1985; JUVONEN et al., 1991; DE LA CHAPELLE et al., 1993; SOKOL et al., 1995; LE COUEDIC et al., 1996; ARCASOY et al.; 1997; KRALOVICS et al., 1997; KRALOVICS et al., 1998; WATOWICH et al., 1999), estando uma delas, a transição no nucleotídeo 6002, de uma guanina (G) para uma adenina (A) (G6002A, SNP

rs121918116) no éxon 8, associada com o favorecimento da performance em competições de esqui. Esta mutação resulta na substituição do aminoácido triptofano por um códon de parada (trp439-to-ter ou W439X), causando uma terminação prematura na região citoplasmática do receptor, (OMIM \*133171; DE LA CHAPELLE et al., 1993; PERCY et al., 1998). Apesar de ela estar associada à eritrocitose familiar 1, já foi também descrita como decorrente de um evento “de novo” (PERCY et al., 1998).

## 2.4 Nutrigenômica

A nutrigenômica associa o suprimento de nutrientes e consequentes efeitos sobre a base molecular da expressão gênica e na compreensão das diferenças relacionadas à resposta à dieta com base na composição genética individual (SIES et al., 2005; SUBBIAH, 2008). Ou seja, observa se as variações no estado nutricional levam a adaptações metabólicas, que são afetadas pelo perfil genético (SUBBIAH, 2008). Por combinar novas tecnologias de biologia molecular aos estudos da nutrição clássica, esta abordagem integrada e multidisciplinar tem como objetivo compreender como a dieta interage com o genoma humano para influenciar a saúde e a doença e como a variabilidade genética influencia a resposta à dieta (KAPUT & RODRIGUEZ, 2004; STOVER, 2004).

A nutrigenômica surgiu a partir de estudos baseados em conceitos das áreas de etnofarmacologia e fitoterapia, que mostraram que os nutrientes das plantas podem interagir com o genoma causando alterações marcantes na expressão do gene (SUBBIAH, 2008). Consequentemente, esse conhecimento já proporcionou o desenvolvimento comercial de produtos nutracêuticos e alimentos funcionais que podem modificar os efeitos negativos para a saúde do perfil genético individual através da interação "alimento/genoma" (SUBBIAH, 2008). Porém apesar de ser uma área nova e promissora, faltam estudos de intervenção em grande escala para compreender melhor mecanismo e real impacto na população (SUBBIAH, 2008).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar a influência dos SNP's rs1815739 no gene da ACTN-3, rs1617640 no gene da EPO, e rs121918116 no gene da EPOR na peroxidação lipídica (Teste de Tbars), hemograma completo e dosagens bioquímicas da creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e proteína-C reativa (PCR e PCR-us), em uma amostra de corredores de rua do Distrito Federal, antes e depois da suplementação com 400mg de óleo de pequi em cápsulas ingeridas diariamente por 14 dias consecutivos.

##### 3.1.1 Objetivos Específicos

- a- Verificar se o polimorfismo da EPOR, G6002A (SNP rs121918116), está presente na amostra de atletas analisada.
- b- Verificar a frequência dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) R577X (SNPs rs1815739) no gene da ACTN-3 e na região promotora do gene da EPO (rs1617640), T→G, em um grupo de 123 corredores de rua do Distrito Federal e compará-la com a de outras populações.
- c- Verificar se houve correlação entre os sexos, faixa etária e distância percorrida e os polimorfismos estudados.
- d- Verificar se houve alteração nos parâmetros do hemograma, marcadores bioquímicos e peroxidação lipídica (teste de Tbars) quando analisados os parâmetros sexos, faixa etária e distância percorrida de cada atleta, antes e após a suplementação com óleo de pequi.
- e- Verificar se houve alteração nos parâmetros do hemograma, de marcadores bioquímicos e na peroxidação lipídica (teste de Tbars), de acordo com o polimorfismo de cada atleta, antes e após a suplementação com óleo de pequi.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Extração do Pequi

O mesocarpo interno foi descascado ou triturado para obter a polpa, que foi armazenada em um recipiente coberto e congelado a  $-86^{\circ}\text{C}$ . O óleo da polpa do pequi foi extraído por maceração fria usando clorofórmio como solvente. O extrato foi submetido à evaporação sob pressão reduzida e secado sob vácuo elevado para a remoção completa do solvente.

O óleo foi extraído no Laboratório de Genética da UnB e o solvente foi removido no Laboratório de Química e encapsulado pela Farmacotécnica (empresa de manipulações farmacêuticas bem estabelecida no Distrito Federal). A produção das cápsulas foi patenteada com o número PI0601631-6 (Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI).

**Quadro 1:** Composição lipídica do óleo do pequi utilizado para produzir as cápsulas, pela análise de cromatografia gasosa (MIRANDA-VILELA et al., 2009a).

<b>Ácidos Graxos Saturados</b>	<b>Quantidade (% por 100g de polpa)</b>
Palmítico	41,78
Esteárico	1,28
Araquídico	0,12
<b>Total</b>	<b>43,18</b>
<b>Ácido graxo insaturado</b>	<b>Quantidade (% por 100g de polpa)</b>
<b>Mono-insaturado</b>	
Oleico	54,28
Palmitoleico	0,67
<b>Bi-insaturado</b>	
Linoleico	1,36
<b>Tri-insaturado</b>	
Linolênico	0,51
<b>Total</b>	<b>56,82</b>

## **4.2 Comitê de Ética**

A coleta do sangue dos voluntários desta pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), processo número 25000.001668/2005-18. Todos os voluntários convidados foram informados dos objetivos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

## **4.3 Delineamento do estudo e participantes**

A primeira etapa do estudo foi concluída como parte da tese de doutorado de Miranda-Vilela (2009). O ensaio foi realizado após testes pré-clínicos e toxicológicos em camundongos (MIRANDA-VILELA et al., 2008). Nesse primeiro momento, foram selecionados corredores de rua treinados de ambos os sexos e de diferentes faixas etárias, que tinham desempenho de execução de pelo menos 4.000m, e que foram avaliados por diferentes parâmetros previamente publicados (MIRANDA-VILELA et al., 2009b; MIRANDA-VILELA et al., 2009c; MIRANDA-VILELA et al., 2010; MIRANDA-VILELA et al., 2011a; MIRANDA-VILELA et al., 2011b).

Em linhas gerais, apenas desportistas treinados foram incluídos no estudo e, embora os atletas tivessem um grau variável de intensidade de treino, a quantidade de treinamento semanal foi semelhante (em número de dias e horas de treinamento). O grupo recrutado de atletas correu em épocas diferentes (de agosto de 2007 a abril de 2008) e os grupos foram separados pela distância escolhida (4 a 21 Km), todos eles sendo monitorados por diferentes membros da equipe do nosso grupo, dentro de uma rota previamente definida por nós. A distância escolhida e o tempo necessário para percorrê-la foram escolhidos de acordo com o tipo, intensidade e duração do treinamento semanal, para garantir a inexistência de estresse físico adicional além do que os atletas estavam acostumados.

Os voluntários participaram de duas corridas, antes e depois da suplementação com 400mg de óleo de pequi, fornecidos em cápsulas durante 14

dias consecutivos. A única alteração na rotina diária dos atletas, entre a primeira e a segunda corrida, foi a ingestão das cápsulas de óleo de pequi. Portanto a participação dos voluntários na pesquisa também não implicou em mudanças no estilo de vida ou treinamento físico. As duas corridas ocorreram ao ar livre, em trilhas planas, adotando a mesma distância por igual intervalo de tempo.

Somente aqueles atletas que seguiram as instruções corretamente e que participaram de ambas as corridas foram incluídos no estudo, o que totalizou 125 atletas (49 mulheres e 76 homens). Posteriormente, os indivíduos foram classificados por idade de acordo com os seguintes grupos: adolescentes (15-19 anos), adultos jovens (20-40 anos) e adultos de meia idade (41-58 anos de idade), seguindo os critérios de idade para os valores de referência de parâmetros bioquímicos: para fins clínicos, alguns valores de referência são diferentes para idades de até 19 anos de idade (FREIRE et al., 2008). Como havia apenas dois corredores com idade acima de 58 anos, eles foram excluídos da amostra. Assim, o tamanho final da amostra aqui estudada foi de 123 (49 mulheres e 74 homens).

As amostras do sangue periférico foram coletadas imediatamente após as corridas em tubos *Vacutainer* contendo EDTA e foram usadas para análise do hemograma completo e para genotipagem dos polimorfismos, enquanto as amostras de soro foram submetidas ao teste Tbars e às dosagens bioquímicas de creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e proteína-C reativa (PCR e PCR ultra-sensível – PCR-us).

#### **4.4 Análises bioquímicas e hemograma**

O hemograma foi realizado no analisador automatizado Cell-Dyn® 3700 (*Abbott Diagnostics*), considerando-se os valores de referência previamente reportados na literatura (FLEGAR-MEŠTRIĆ et al., 2000). As análises de CK, AST, ALT e das dosagens bioquímicas de PCR foram realizadas em um analisador químico automatizado ADVIA® 1650 (*Bayer Diagnostics*), enquanto a dosagem bioquímica de PCR-us foi feita por ensaio imunométrico (*Immulite 2000®*, DPC,

Medlab), usando os reagentes químicos apropriados, controles e protocolos de acordo como os fabricantes.

Os valores de referência de indicadores biológicos utilizados como parâmetros para interpretação dos resultados de valores obtidos foram de acordo com os descritos na literatura para fins clínicos e para atletas, conforme descrito a seguir: os valores de referência para a CK são de até 171U/L para os homens e 145U/L para mulheres (FREIRE et al. 2008) para fins clínicos; os atletas têm valores de referência de CK mais elevados que os indivíduos não-atletas, sendo estes de 82-1083U/L para homens e de 47-513U/L para as mulheres (MOUGIOS, 2007). Para fins clínicos, os valores de referência para AST estão na faixa de 15-37U/L para os homens e de 13-31U/L para mulheres; para ALT eles estão na faixa de 10-40U/L para homens e de 07-35U/L para as mulheres (SCHUMANN & KLAUKE, 2003; FREIRE et al., 2008). Por causa dos valores mais elevados de CK para atletas (MOUGIOS, 2007), o limite superior de referência para AST é esperado, uma vez que o nível sérico dessa enzima pode aumentar em casos de lesões musculares (MIRANDA-VILELA et al., 2009; MIRANDA-VILELA, 2012). Para PCR e PCR-us, ambos os testes medem a mesma molécula no sangue, mas a dosagem bioquímica de PCR-us foi adotada para detectar PCR em níveis mais baixos, sendo muito mais sensível para o diagnóstico (RIFAI & RIDKER, 2003). De acordo com a *American Heart Association* e *US Center for Disease Control*, os valores de referência para a proteína C-reativa são <3mg/L (Ridker, 2003), sendo que as mulheres geralmente apresentam valores mais baixos que os homens (RIFAI & RIDKER, 2003).

#### 4.5 Teste de Tbars

Para a detecção fluorimétrica de Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (Tbars, do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), foi adotado o protocolo de Wasowicz et al. 1993. A primeira etapa consistiu na preparação das soluções de ácido tiobarbitúrico (TBA, do inglês *Thiobarbituric Acid*)<sup>4</sup> e da solução estoque de

---

<sup>4</sup> TBA: dissolveu-se TBA (Merck ®), em ácido acético (Merck ®) para uma concentração final de TBA 29 mM, ácido acético 8,75M.

malonaldeído (MDA)<sup>5</sup>. No momento do uso, a solução foi diluída em água mili-Q para produzir uma solução de trabalho de MDA de 10 $\mu$ M.

O sangue foi centrifugado (1500 x g; a 4° C por 10 minutos) para obtenção do soro, que foi recolhido cuidadosamente em microtubos (*Eppendorfs*®) de 1,5mL com EDTA (1,34mM) e GSH (0,65mM) e congelado em nitrogênio líquido (-196° C) e armazenado em freezer a -80° C até o momento de uso.

O teste usou 50 $\mu$ L de soro ou volume adequado de solução de MDA (curva-padrão) que foram colocados em tubos de vidro de 10mL contendo 1mL de água mili-Q. Em seguida, foi adicionada solução de TBA (29mM) em ácido acético (8,75mM), constituindo uma solução de pH 2,4-2,6. O tubos foram agitados em vórtex e deixados em banho-maria por 1 hora a temperatura de 95-100° C.

Após o resfriamento das amostras à temperatura ambiente, foram adicionados 25 $\mu$ L de HCl 5M e 3mL de butanol. Os tubos foram agitados em vórtex por 5 segundos e a fase alcoólica foi separada por centrifugação por 10 minutos a 1.500 x g. A leitura da fluorescência foi feita no equipamento Espectrofotômetro FP-777 (JASCO), utilizando-se os comprimentos de onda 525 nm para excitação e 547 nm para emissão. A curva-padrão foi realizada a partir de soluções de MDA de 0 a 0,15 nmol/mL.

#### 4.6 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído da fração leucocitária do sangue periférico (*buffy-coat*) pelo kit de extração de DNA *Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit*, GE Healthcare®, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas pelo quantificador Nanovue, GE Healthcare®, e diluídas em água mili-Q para uma concentração final de 50 ng/ $\mu$ L e armazenadas em freezer a -20° C.

---

<sup>5</sup>MDA: dissolveu-se 480 $\mu$ L de 1,1,3,3- tetraetoxipropano (Sigma ®) em 100mL de etanol (Merck ®).

#### 4.7 Condições para amplificação

Essa etapa visou amplificar a região gênica de cada um dos três marcadores, que foram posteriormente genotipados. Os reagentes foram misturados (Quadro 2) e distribuídos em volumes de 24  $\mu\text{L}$  em cada microtúbulo de 500  $\mu\text{L}$ , contendo previamente 1  $\mu\text{L}$  DNA, homogeneizados e recobertos com uma gota de óleo mineral. As concentrações e os respectivos programas adotados estão descritos nos Quadros 2 e 3. A PCR foi executada no termociclador *MJResearch PTC-100 Programmable Thermal Cycler Control (United States)*.

A amplificação dos marcadores foi confirmada por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 6% e corado com nitrato de prata.

**Quadro 2:** Concentrações dos reagentes para o preparo das reações de amplificações dos genes da EPO e ACTN-3, para um volume final 25  $\mu\text{L}$  por amostra.

Reagente	Concentração		
	EPO	EPOR	ACTN-3
Água mili-Q	-	-	-
Tampão 10X <sup>6</sup>	1X	1X	1X
dNTP <sup>7</sup>	80mM	200 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$
Primer F <sup>8</sup>	50 $\mu\text{mol}$	0,5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{mol}$
Primer R	50 $\mu\text{mol}$	0,5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{mol}$
MgCl <sub>2</sub> <sup>9</sup>	2,5mM	1,5mM	1,5mM
BSA <sup>10</sup>	0,01%	0,01%	-
DMSO	8%	-	-
<i>Taq DNA polimerase</i> <sup>11</sup>	1U	1U	2,87U
DNA	50ng	100ng	90ng

<sup>6</sup>tampão 10X, *Invitrogen* ®: 200mM Tris-HCl (pH8,0), 0,1mM EDTA, 1Mm DDT, 50%(v/v) glicerol, estabilizadores;

<sup>7</sup>dNTP, do inglês *deoxyribonucleotidetriphosphates*, *Invitrogen* ®;

<sup>8</sup>primer (cada) *Invitrogen* ®;

<sup>9</sup>MgCl<sub>2</sub>, cloreto de magnésio, *Invitrogen* ®;

<sup>10</sup>BSA, do inglês *bovine serum albumin*, *Promega* ®;

<sup>11</sup>*Taq DNA Polymerase*, *Invitrogen* ®.

**Quadro 3:** Programas adotados para amplificação dos genes da EPO, EPOR e ACTN-3 pelo termociclador *MJResearch PTC-100 Programmable Thermal Cycler Control*®.

<b>EPO</b>			
<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
Desnaturação Inicial	95 °C	5'	
Desnaturação	95 °C	30''	35
Anelamento	60 °C	30''	
Extensão	72 °C	45''	
Extensão Final	72 °C	10'	
<b>EPOR</b>			
<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
Desnaturação Inicial	-	-	
Desnaturação	94 °C	1'	30 vezes
Anelamento	60 °C	1'	
Extensão	72 °C	1'	
Extensão Final	72 °C	7'	
<b>ACTN-3</b>			
<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
Desnaturação Inicial	94 °C	5'	
Desnaturação	94 °C	30''	25
Anelamento	60 °C	30''	
Extensão	72 °C	1'	
Extensão Final	72 °C	7'	

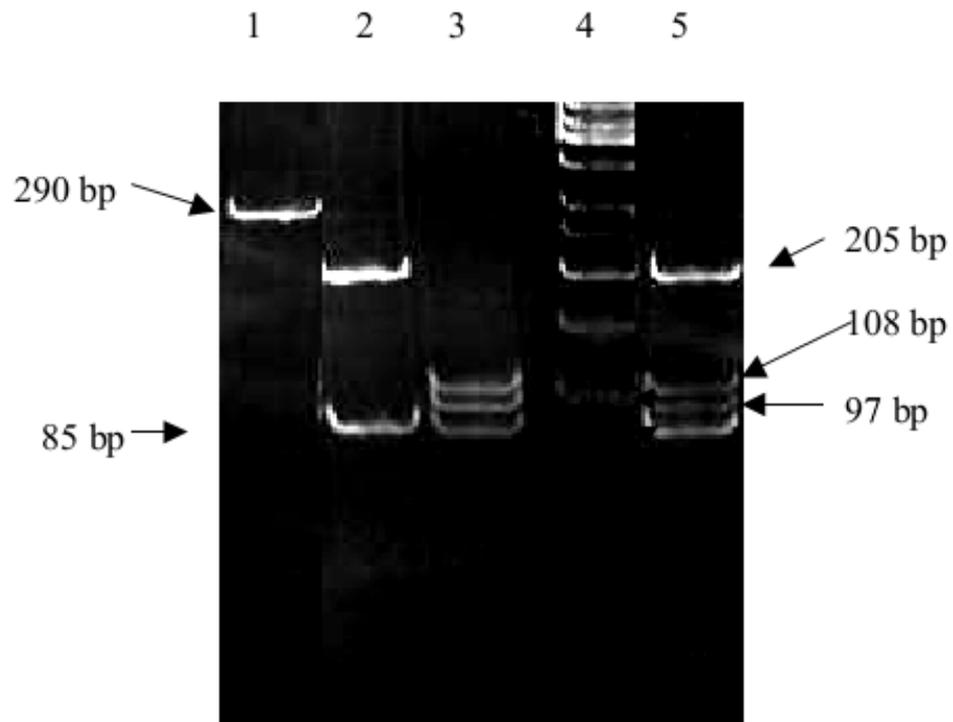
Os tamanhos dos fragmentos foram observados com auxílio do marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen®), que para os genes da EPO, EPOR e ACTN-3 foram, respectivamente, 369, 333 e 489 pares de bases (pb).

#### 4.7.1 Genotipagem

Após a reação de PCR e confirmação da amplificação, os produtos amplificados foram submetidos ao corte com enzimas de restrição (RFLP) (Quadro 4). Para digestão do gene da EPO, foram usados 3,125 unidades da enzima *BseRI*<sup>12</sup>, por 7 horas, a 37° C, em um volume de 7,515 µL, enquanto para EPOR foi

<sup>12</sup> Enzimas de restrição *Ddel* (*Desulfovibrio desulfuricans*) e *BseRI* (*Bacillus species* R), New England ® Biolab.

necessário 1 unidade da enzima *NcoI*<sup>13</sup>, por 4 horas a 37° C, em um volume de 20 µL. Para a digestão do fragmento amplificado da região de interesse do gene da ACTN-3, foram usadas 3,5 unidades da enzima *DdeI*<sup>8</sup> por 16 horas a 37° C, em um volume final de reação 15 µL (Figura 8).



**Figura 8:** Genotipagem por PCR-RFLP do gene ACTN-3 em gel de poliacrilamida a 10%. Poço 1, produto não digerido de PCR de 290 pb; poço 2, genótipo RR; poço 3, genótipo XX; poço 4, marcador de peso molecular de 4,50 pb e poço 5, genótipo RX (GOEL & MITTAL, 2005).

Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida em concentrações de 6% ou 10 %, dependendo do tamanho dos fragmentos, e corados por nitrato de prata. Os protocolos para genotipagem seguiram TONG et al., 2008 (EPO), LA CHAPELLE et al., 1993 (EPOR) e CLARKSON et al., 2005 (ACTN-3).

<sup>13</sup> Enzima de restrição *NcoI* (*Nocardia corallina*), Promega ®.

**Quadro 4:** Sequências de *primers* (iniciadores) dos genes EPO, EPOR e ACTN-3 adotados na amplificação.

<b>Gene</b>	<b>Forward primer (5'→3')</b>	<b>Reverse primer (5'→3')</b>
<b>EPO</b>	GTCCATTGTGCAGGACACAC	AACTCCTGGGCTCAAAGGAT
<b>EPOR</b>	TCCTGCTCATCTGCTTTGG	CATCTGCAGCCTGGTGTCC
<b>ACTN-3</b>	CGCCCTTCAACAAGTGGCTGGA (ACTN3--E15F)	GGGTGATGTAGGGATTGG TGGAG (ACTN-3-E16R)

#### 4.7.2 Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida

A eletroforese vertical é um método adequado para identificação e separação de DNA ou proteínas com diferentes pesos moleculares através de gel de poliacrilamida (Figura 10). Para esta pesquisa, tal procedimento foi empregado com a finalidade de confirmar a amplificação e o tamanho das bandas amplificadas e, posteriormente, para verificar os tamanhos obtidos após a digestão com enzima de restrição.

Em uma cuba contendo solução tampão de Tris-borato-EDTA (TBE1X)<sup>14</sup> foi inserido um par de placas de vidro contendo gel de acrilamida polimerizada. Esse gel foi anteriormente preparado com solução de acrilamida, 6 ou 10%, e polimerizada após a adição dos catalisadores persulfato de amônio (APS) 10% e da solução N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED). Em seguida à fixação das placas de vidro na cuba de eletroforese, foi adicionado tampão de corrida<sup>15</sup> na parte superior do equipamento e só então as amostras (produtos de PCR ou de restrição) foram aplicadas. Concluída essa etapa, a cuba foi fechada e os eletrodos foram

<sup>14</sup> TBE 10X: TRIS (108g), ácido bórico (55g), EDTA (9,3g). Completar para um litro. Para solução TBE 1X, misturar 100mL de TBE 10X e completar para 1L com água destilada.

<sup>15</sup> Tampão de corrida (*Dye solution*): xileno cianol (2,5%), azul de bromofenol (2,5%), glicerina (30%), EDTA (0,5M, pH8,0).

inseridos nos respectivos polos. As corridas foram realizadas a 160 volts por, aproximadamente, 2 horas.

Ao término da eletroforese, o gel foi liberado das placas e fixado, sob agitação baixa e constante, em 200 mL de solução fixadora<sup>16</sup> e solução de nitrato de prata a 10% para uma concentração final de 1%, por 5 minutos. Em seguida, o excesso de prata foi retirado com água destilada e foi adicionado ao gel 200 mL de solução reveladora<sup>17</sup> (aquecida a 70° C, com 2 mL de formaldeído). O gel foi novamente submetido à agitação baixa e constante até a visualização das bandas.

## 4.8 Análises Estatísticas

### 4.8.1 Cálculo do tamanho amostral (N)

A definição de uma amostra envolve premissas que dizem respeito às características do evento estudado, dos fatores que exerçam influência sobre este evento e da análise que se pretenda fazer. Um plano amostral deve em primeiro lugar reconhecer o universo a que se refere o estudo, a população que será estudada e a unidade amostral (o objeto sobre o qual se fará medidas do evento de interesse no estudo). Na maioria dos estudos em saúde o pesquisador busca aleatoriedade para evitar o erro sistemático ou vício de amostragem que torne inconclusivos os resultados de seu estudo (LWANGA & LEMESHOW, 1991; CALLEGARI-JACQUES, 2003; MIOT, 2011; LABORATÓRIO DE EPIDEMIOLOGIA E ESTATÍSTICA, 2013). Assim, o tamanho amostral foi determinado a partir da análise estatística dos dados quantitativos obtidos, considerando o erro máximo tolerável de amostragem (erro padrão ou erro amostral) variando de 0,05 a 0,20, de acordo com uma menor ou maior variação nos resultados dos exames realizados e tamanhos das amostras após estratificação do grupo, segundo a fórmula:

---

<sup>16</sup> Solução fixadora: ácido acético (6 mL), álcool (144 mL) e água destilada (750 mL)

<sup>17</sup> Solução reveladora: 22,5g hidróxido de sódio. Completar com água destilada para volume de 1L.

$$(\sqrt{n})^2 = (1,96)^2 \times \frac{(\sigma)^2}{(E)^2} \rightarrow n = (1,96)^2 \times \frac{\sigma^2}{E^2}$$

Onde:

n = tamanho amostral

$\sigma$  = desvio padrão

E = erro máximo tolerável =  $1,96 \times \sigma_x$ , onde  $\sigma_x$  = erro padrão da média

(EPM). Assim,  $E = 1,96 \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ , porque o intervalo de confiança de 95% =  $\bar{x} \pm$

$1,96 \sigma_x$ , onde  $\bar{x}$  = média

Esta fórmula foi usada para todos os cálculos, incluindo aqueles decorrentes da estratificação da amostra por sexo, faixa etária, distância percorrida e genótipos dos polimorfismos estudados de ACTN-3 e EPO.

Visto o cuidado adicional necessário com o superdimensionamento amostral, o qual pode reduzir os intervalos de confiança das estimativas e permitir a detecção de diferenças entre subgrupos que, apesar de estatisticamente significantes, não possuem relevância clínica (MIOT, 2011), as variáveis quantitativas que apresentam naturalmente valores de referência com intervalos muito grandes não foram consideradas nos cálculos do tamanho amostral.

4.8.2 Diferenças entre sexo, faixa etária e genótipos da ACTN-3, EPO e EPOR no hemograma completo, dosagens bioquímicas da creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e Proteína C Reativa (PCR e PCR-us), e teste de Tbars.

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa SPSS® (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0. Os dados foram expressos pela média e desvio padrão (DP) e os valores  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. As variáveis contínuas foram testadas para a

distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Para os parâmetros analisados, incluindo exames laboratoriais e frequências genóticas, possíveis diferenças entre os sexos foram avaliados pelo teste-T para amostras independentes ou de Mann-Whitney (dados não-normalizados), enquanto diferenças entre os grupos etários, distância percorrida e genótipos foram avaliadas por ANOVA ou pelo teste de Kruskal-Wallis (quando os dados não seguiram a distribuição normal), acompanhado, respectivamente, pelo teste de Bonferroni ou de Mann-Whitney. Para verificar as diferenças nas comparações antes e depois à suplementação com óleo de pequi, a significância estatística foi avaliada pelo teste-T para amostras pareadas ou pelo teste de Wilcoxon (quando os dados não apresentaram distribuição normal).

Testes não-paramétricos ou de distribuição livre são mais apropriados quando (1) não se conhece a distribuição dos dados em uma população, (2) quando a distribuição é assimétrica e não se deseja realizar uma transformação dos dados, e (3) quando a distribuição é gaussiana em alguns grupos e assimétrica em outros. São, portanto, testes de aplicação mais ampla do que os paramétricos (PONTES & CORRENTE, 2001; CALLEGARI-JACQUES, 2003), sendo os mais comuns, (1) o teste de Kruskal-Wallis (KRUSKAL & WALLIS, 1952), usado quando existem mais de dois grupos a serem comparados, e (2) o teste de Mann-Whitney (MANN & WHITNEY, 1947), usado para comparar as funções de distribuição de uma variável em duas amostras independentes. Enquanto o teste de Kruskal-Wallis é a alternativa não-paramétrica para ANOVA *one way*, o teste de Mann-Whitney é a alternativa não-paramétrica para o teste T para amostras independentes.

De maneira semelhante, o teste de Wilcoxon (*Wilcoxon Matched-Pairs*) é um dos mais úteis e poderosos testes não-paramétricos de hipóteses para comparação de duas amostras pareadas, sendo a alternativa não-paramétrica para o teste *T de Student* para amostras pareadas, quando os dados apresentam distribuição que não satisfazem as exigências deste último (quando não há homogeneidade das variâncias, ou seja, quando ocorre uma distribuição não-normal dos dados, ou quando as amostras são tão pequenas que não permitem verificar se isto ocorre) (BELLERA et al., 2010).

#### 4.8.3 Teste de correlação

O teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) é adequado para verificar se existe associação entre duas variáveis qualitativas, sendo então chamado de teste  $\chi^2$  de associação (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Assim, possíveis associações entre os parâmetros sexo/grupos etários, sexo/distância percorrida, grupos etários/distância percorrida, sexo/polimorfismos genéticos, grupos etários/polimorfismos genéticos e distância percorrida/polimorfismos genéticos foram analisadas por meio da correlação com o teste do  $\chi^2$ . Os testes foram realizados usando o programa SPSS versão 17.0 e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4.8.4 Estatística de populações

Os polimorfismos estudados foram submetidos ao teste de probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) pelo método convencional do  $\chi^2$ , o qual serve para verificar se uma distribuição observada de dados ajusta-se a uma distribuição esperada (teórica) (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Os p-valores foram estimados pelo programa *Genepop on the web* versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>), sendo  $p > 0,05$  considerado em EHW. O mesmo programa foi usado para calcular as frequências alélicas e genotípicas de cada loco e os parâmetros de diversidade genética tais como heterozigosidade observada ( $H_i$ ), heterozigosidade esperada ( $H_s$ ) e coeficiente de endogamia intrapopulacional (FIS).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados das dosagens bioquímicas e do hemograma total por grupo total, sexo, faixa etária e distância percorrida antes e depois à suplementação com óleo de pequi

Os resultados do cálculo do tamanho amostral mínimo antes e após o pequi para o grupo total, por sexo, faixa etária e distância percorrida são mostrados na Tabela 1, onde a suplementação com as cápsulas de pequi reduziu a variabilidade da amostra e, conseqüentemente, o tamanho amostral necessário.

**Tabela 1:** Resultados do cálculo do tamanho amostral mínimo dos dados quantitativos obtidos antes e após o pequi para o grupo total, por sexo, faixa etária e distância percorrida.

	Grupos	Antes	Depois	Erro máximo tolerável	N final do estudo
	Total	134	102	0,05	123
		95	67	0,10	
Sexos	Mulheres	42	23	0,10	49
	Homens	78	74	0,10	74
Faixa Etária	15-19 anos	32	20	0,10	20
	20-40 anos	119	74	0,05	78
	41-58 anos	30	25	0,10	25
Distância percorrida	4-5 Km	32	29	0,10	50
	6-7 Km	35	31	0,10	38
	8-10 Km	34	9	0,10	28
	16-21 Km	19	4	0,20	7

A amostra estudada de atletas foi constituída principalmente por adultos jovens (20 a 40 anos) do sexo masculino (Tabela 2 e 3). A maioria dos atletas

percorreu trechos na faixa 4-5 km; enquanto que trechos com mais de 16 km foram pouco frequentes, conforme dados dispostos na tabela 2.

**Tabela 2:** Distribuição geral dos atletas de acordo com a faixa etária e percurso percorrido.

Faixa Etária	Percurso ( Km)				Total
	4-5 Km	6-7 Km	8-10 Km	16-21 Km	
15-19 anos	14	6	0	0	20
20-40 anos	31	25	18	4	78
41-58 anos	5	7	10	3	25
Total	50	38	28	7	123

**Tabela 3:** Distribuição dos atletas de acordo o gênero, faixa etária e percurso percorrido.

Sexo	Faixa Etária	Percurso (Km)	N(%)
Feminino	15-19 anos	4-5 Km	5(71,4)
		6-7 Km	2(28,6)
		Total	7(100,0)
	20-40 anos	4-5 Km	14(50,0)
		6-7 Km	9(32,1)
		8-10 Km	4(14,3)
		16-21 Km	1(3,6)
		Total	28(100,0)
	41-58 anos	4-5 Km	3(21,4)
		6-7 Km	5(35,7)
		8-10 Km	6(42,9)
		Total	14(100,0)
Masculino	15-19 anos	4-5 Km	9(69,2)
		6-7 Km	4(30,8)
		Total	13(100,0)
	20-40 anos	4-5 Km	17(34,0)
		6-7 Km	16(32,0)
		8-10 Km	14(28,0)
		16-21 Km	3(6,0)
		Total	50(100,0)
	41-58 anos	4-5 Km	2(18,2)
		6-7 Km	2(18,2)
		8-10 Km	4(36,4)
		16-21 Km	3(27,3)
		Total	11(100,0)

Com exceção dos valores “antes” e “depois” das dosagens bioquímicas de ALT e PCR, diferenças significativas entre os sexos foram observadas tanto nas dosagens bioquímicas quanto no eritrograma para os mesmos parâmetros descritos na literatura com valores de referência diferentes para os gêneros feminino e masculino (RIFAI & RIDKER, 2003; SCHUMANN & KLAUKE, 2003; MOUGIOS, 2007; FREIRE et al., 2008). No entanto, após suplementação com óleo de pequi essas diferenças desapareceram para a dosagem bioquímica de PCR-us (Tabelas 4 e 5A).

Nas comparações “antes e depois” à suplementação com as cápsulas de óleo de pequi, as reduções significativas observadas para o grupo total nos valores de CK ( $p=0,015$ ) e ALT ( $p=0,040$ ) foram relacionadas, respectivamente, ao sexo masculino ( $p=0,012$ ) e feminino ( $p=0,043$ ). Mulheres também apresentaram diminuições significativas nas dosagens bioquímicas de AST ( $p=0,007$ ) e aumento significativo na dosagem de PCR ( $p=0,027$ ) (Tabela 4).

Ainda considerando as comparações antes-depois, as reduções significativas observadas no grupo total nos valores de eritrócitos ( $p=0,001$ ), HCT ( $p=0,002$ ) e plaquetas ( $p=0,000$ ), bem como o aumento significativo nos valores de HCM ( $p=0,000$ ) e CHCM ( $p=0,002$ ) foram relacionadas a ambos os sexos, enquanto as reduções significativas nos valores de RDW ( $p=0,000$ ) e plaquetócrito ( $p=0,000$ ) foram relacionadas ao sexo masculino (Tabelas 5A e 5C).

Nas comparações por as faixas etárias, o grupo de 41-58 anos apresentou valores significativamente menores de PCR-us ( $p=0,046$ ) em relação ao grupo de 15-19 anos, o qual por sua vez apresentou valores significativamente menores que a faixa etária de 20-40 anos ( $p=0,002$ ) antes do pequi. Os valores de Tbars foram significativamente maiores para os grupos etários de 20-40 ( $p=0,009$ ) e 41-58 ( $p=0,021$ ) anos, quando comparados com 15-19 anos antes do pequi, enquanto a faixa etária de 41-58 anos apresentou valores significativamente aumentados de ALT tanto antes ( $p=0,011$ ) quanto depois ( $p=0,019$ ) do pequi em comparação com a faixa de 20-40 anos, e valores significativamente menores de CK em relação à faixa de 15-19 anos ( $p=0,034$ ) depois do pequi (Tabela 6). O grupo de 41-58 anos também se diferiu significativamente dos grupos de 15-19 e 20-40 anos nos valores de eritrócitos ( $p=0,032$  e  $p=0,025$ , respectivamente) e VCM ( $p=0,013$  e  $p=0,033$ , respectivamente), e do grupo de 20-40 anos nos valores de e HCM ( $p=0,003$  e

$p=0,007$ ) antes do pequi, o qual por sua vez apresentou valores de RDW significativamente aumentados em relação à faixa etária de 15-19 anos ( $p=0,013$ ). Após o pequi, as diferenças em relação aos eritrócitos e RDW desapareceram (Tabela 7A).

Diferenças significativas nas comparações antes-depois foram observadas no grupo de 15-19 anos para AST ( $p=0,019$ ), eritrócitos ( $p=0,007$ ), hemoglobina ( $p=0,022$ ), hematócrito ( $p=0,008$ ), eosinófilos ( $p=0,048$ ) e monócitos ( $p=0,048$ ); e no grupo de 20-40 anos para CK ( $p=0,009$ ), eritrócitos ( $p=0,020$ ), hematócrito ( $p=0,033$ ), HCM ( $p=0,001$ ), CHCM ( $p=0,013$ ), RDW ( $p=0,000$ ), basófilos ( $p=0,036$ ), monócitos ( $p=0,046$ ), plaquetas ( $p=0,000$ ) e plaquetócrito ( $p=0,000$ ) (Tabela 6, 7A, 7B e 7C).

Nas avaliações por distância percorrida, óleo de pequi foi particularmente eficaz na redução dos valores de CK ( $p=0,004$ ), AST ( $p=0,027$ ), plaquetas ( $p=0,001$ ) e plaquetócrito ( $p=0,016$ ) para a distância de 6-7 km; de RDW até 8-10 km ( $p=0,002$  para 4-5 Km;  $p=0,005$  para 6-7 Km;  $p=0,002$  para 8-10 Km); e de plaquetas ( $p=0,007$ ) para a distância de 8-10 Km (Tabelas 8, 9A, 9B e 9C).

**Tabela 4:** Valores totais de CK, AST, ALT, PCR, PCR-us e teste Tbars de acordo com o gênero dos corredores de rua do Distrito Federal antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Grupo	N (%)	CK (U/L)		AST (U/L)		ALT (U/L)		PCR (mg/dL)		PCR-us (mg/dL)		Tbars (nmol/mL de MDA)	
		Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>Total</b>	123(100)	285,86 / 341,83	237,62 / 228,98 <sup>#</sup>	29,81 / 8,82	28,20 / 7,28	23,02 / 11,46	21,55 / 9,06 <sup>#</sup>	0,33 / 0,33	0,37 / 0,30	1,60 / 2,22	1,54 / 1,81	0,0266 / 0,008	0,0264 / 0,007
<b>Feminino</b>	49 (39.8)	149,92 / 118,93	150,76 / 126,48	27,84 / 9,25	24,92 / 6,22 <sup>#</sup>	22,04 / 12,49	19,24 / 6,27 <sup>#</sup>	0,26 / 0,20	0,34 / 0,27 <sup>#</sup>	1,05 / 1,09	1,48 / 1,82	0,0271 / 0,008	0,0271 / 0,005
<b>Masculino</b>	74(60.2)	379,68 / 408,76	297,56 / 263,13 <sup>#</sup>	31,15 / 8,32	30,43 / 7,14	23,69 / 10,74	23,12 / 10,29	0,38 / 0,39	0,38 / 0,32	2,02 / 2,72	1,59 / 1,81	0,0264 / 0,008	0,0260 / 0,007
	<b>p-valores</b>	0,000	0,000	0,006	0,000	0,246	0,078	0,121	0,695	0,030	0,407	0,649	0,272

Dados numéricos são expressos como média / desvio padrão (DP). N= tamanho da amostra; CK= creatina quinase; AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; PCR= proteína-C reativa; PCR-us= PCR ultra sensível; U/L= unidade por litro; mg/dL= miligramas por decilitro; nmol/mL de MDA= nanomols de malondialdeído por mililitro de soro. Os p-valores foram gerados pelo teste de Mann-Whitney. O símbolo # indica diferenças significativas nas comparações antes e depois à suplementação do com óleo de pequi, de1fotectadas pelo teste de Wilcoxon.

**Tabela 5:** Hemograma total de acordo com o gênero dos corredores de rua do Distrito Federal antes e depois da suplementação com óleo de pequi. (A) Eritrograma; (B) Leucograma; (C) Plaquetograma.

**(A) Eritrograma**

Grupo	Eritrócitos (milhões/mm <sup>3</sup> )		HGB (g/dL)		HCT (%)		VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/% ou g/dL)		RDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>Total</b>	5,23 / 0,51	5,15 / 0,50 <sup>#</sup>	14,44 / 3,00	14,38 / 3,04	44,98 / 3,78	44,31 / 3,68 <sup>#</sup>	86,18 / 3,76	86,22 / 3,81	29,43 / 1,54	29,76 / 1,51 <sup>#</sup>	34,15 / 1,00	34,52 / 0,66 <sup>#</sup>	14,83 / 1,00	14,25 / 1,07 <sup>#</sup>
<b>Feminino</b>	4,83 / 0,34	4,75 / 0,33 <sup>#</sup>	13,88 / 2,24	13,81 / 2,22	41,98 / 3,06	41,17 / 2,79 <sup>#</sup>	86,99 / 3,28	86,89 / 3,14	29,68 / 1,38	30,08 / 1,29 <sup>#</sup>	34,12 / 1,07	34,63 / 0,63 <sup>#</sup>	14,65 / 0,93	14,38 / 1,21
<b>Masculino</b>	5,48 / 0,43	5,41 / 0,41 <sup>#</sup>	14,79 / 3,36	14,74 / 3,42	46,85 / 2,87	46,27 / 2,67 <sup>#</sup>	85,67 / 3,97	85,80 / 4,14	29,27 / 1,62	29,56 / 1,60 <sup>#</sup>	34,16 / 0,96	34,45 / 0,66 <sup>#</sup>	14,95 / 1,03	14,17 / 0,97 <sup>#</sup>
<b>P-valores</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,065	0,110	0,169	0,096	0,973	0,118	0,115	0,306

**(B) Leucograma**

Grupo	Leucócitos totais (/mm <sup>3</sup> )		Linfócitos (/mm <sup>3</sup> )		Segmentados (/mm <sup>3</sup> )		Bastonetes (/mm <sup>3</sup> )		Basófilos (/mm <sup>3</sup> )		Eosinófilos (/mm <sup>3</sup> )		Monócitos (/mm <sup>3</sup> )	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>Total</b>	7399,13 / 2250,40	7398,26 / 1912,79	2654,92 / 969,21	2609,55 / 1001,53	3998,68 / 1741,89	3949,05 / 1440,22	26,70 / 83,76	26,96 / 84,76	85,19 / 51,35	98,34 / 47,29	140,22 / 106,97	148,47 / 113,33	492,64 / 221,04	542,04 / 198,68 <sup>#</sup>
<b>Feminino</b>	7542,22 / 2595,41	7593,33 / 1977,30	2562,58 / 1008,98	2552,58 / 1036,74	4255,47 / 1916,82	4172,67 / 1364,94	21,22 / 59,76	27,71 / 86,50	91,09 / 46,01	92,71 / 45,95	122,82 / 86,15	136,31 / 94,43	477,47 / 199,96	538,40 / 189,28
<b>Masculino</b>	7307,14 / 2012,38	7272,86 / 1873,76	2713,45 / 945,71	2645,66 / 984,30	3835,93 / 1614,30	3807,32 / 1477,87	30,21 / 96,34	26,46 / 84,24	81,45 / 54,45	101,92 / 48,09 <sup>#</sup>	151,24 / 117,54	156,17 / 123,86	502,25 / 234,30	544,35 / 205,71
<b>P-valores</b>	0,977	0,383	0,227	0,419	0,243	0,103	0,807	0,791	0,357	0,624	0,241	0,544	0,577	0,812

**(C) Plaquetograma**

Grupo	Plaquetas (mil/mm <sup>3</sup> )		Plaquetócrito (%)		VPM (fl)		PDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>Total</b>	335,24 / 69,70	312,12 / 65,03 <sup>#</sup>	0,36 / 0,09	0,33 / 0,08 <sup>#</sup>	10,54 / 1,63	10,36 / 1,64	18,01 / 1,17	18,09 / 1,03
<b>Feminino</b>	332,89 / 70,41	316,29 / 68,35 <sup>#</sup>	0,37 / 0,11	0,35 / 0,10	10,88 / 1,70	10,99 / 1,70	18,04 / 1,17	18,32 / 0,96
<b>Masculino</b>	336,71 / 69,71	309,51 / 63,22 <sup>#</sup>	0,35 / 0,08	0,31 / 0,07 <sup>#</sup>	10,34 / 1,56	9,98 / 1,50	18,00 / 1,17	17,95 / 1,05
<b>P-valores</b>	0,722	0,586	0,395	0,025	0,079	0,001	0,843	0,062

Dados numéricos são expressos como média / desvio padrão (DP). HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração hemoglobínica corpuscular média; RDW= amplitude ou variação de distribuição dos eritrócitos; VPM= volume plaquetário médio; PDW= amplitude ou variação de distribuição de plaquetas; g/dL= gramas por decilitro; fl= femtolitros; pg= picogramas; g/%= gramas por porcentagem. P-valores de eritrócitos, HCT, VCM, RDW antes e depois, HCM antes, leucócitos totais depois e plaquetas depois foram gerados pelo Teste-T para amostras independentes, enquanto os outros p-valores foram gerados pelo Teste Mann-Whitney. O símbolo # indica diferenças significativas nas comparações antes e depois à suplementação de óleo de pequi, detectadas pelo Teste-T para amostras pareadas (eritrócitos, HCT, VCM e RDW) ou pelo teste de Wilcoxon (demais variáveis).

**Tabela 6:** Valores totais de CK, AST, ALT, PCR, PCR-us e teste Tbars dos atletas divididos por faixa etária antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Faixa etária	N (%)	CK (U/L)		AST (U/L)		ALT (U/L)		PCR (mg/dL)		PCR-us (mg/dL)		Tbars (nmol/mL de MDA)	
		Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>15-19</b> (adolescente)	20(16.3)	433,85 / 620,92	327,75 / 263,84	32,55 / 9,68	27,60 / 7,10 <sup>#</sup>	21,70 / 6,41	21,25 / 9,21	0,29 / 0,24	0,38 / 0,35	1,35 / 2,47	1,66 / 2,55	0,0219 / 0,006	0,0238 / 0,008
<b>20-40</b> (adulto jovem)	78(63.4)	276,82 / 270,01	229,39 / 235,93 <sup>#</sup>	29,19 / 8,72	27,96 / 7,17	22,35 / 12,47	20,60 / 9,06	0,34 / 0,38	0,38 / 0,32	1,85 / 2,44 <sup>a</sup>	1,70 / 1,82	0,0274 / 0,007 <sup>a</sup>	0,0267 / 0,006
<b>41-58</b> (meia-idade)	25(20.3)	191,17 / 140,26	188,54 / 149,91 <sup>a</sup>	29,50 / 8,33	29,46 / 7,96	26,29 / 11,08 <sup>b</sup>	24,88 / 8,52 <sup>b</sup>	0,33 / 0,23	0,31 / 0,18	1,11 / 1,13 <sup>a</sup>	1,03 / 0,81	0,0279 / 0,008 <sup>a</sup>	0,0277 / 0,006
<b>P-valores</b>		0,181	0,080	0,378	0,874	0,031	0,044	0,747	0,859	0,004	0,120	0,008	0,115

Dados numéricos são expressos como média / desvio padrão (DP). N= tamanho da amostra; CK= creatina quinase; AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; PCR= proteína-C reativa; PCR-us= proteína-C reativa ultra-sensível; U/L= unidade por litro; mg/dL= miligramas por decilitro; nmol/mL de MDA= nanomols de malondialdeído por mililitro de soro. Os p-valores do teste Tbars (antes e depois) foram gerados por ANOVA, enquanto os p-valores dos demais parâmetros foram gerados pelo teste de Teste Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as faixas etárias detectadas pelo teste de Bonferroni (Tbars) ou de Mann-Whitney (demais variáveis), sendo a = significativo em comparação com a faixa etária 15-19 anos; b = significativo em relação à faixa etária 20-40 anos. O símbolo # indica diferenças significativas na comparação entre antes e depois à suplementação com óleo de pequi, detectadas pelo Teste-T para amostras pareadas (Tbars) ou pelo teste de Wilcoxon (demais variáveis).

**Tabela 7:** Hemograma por faixas etárias dos atletas antes e depois da suplementação com óleo de pequi. (A) Eritrograma; (B) Leucograma; (C) Plaquetograma.**(A) Eritrograma**

Faixa Etária	Eritrócitos (milhões/mm <sup>3</sup> )		HGB (g/dL)		HCT (%)		VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/% ou g/dL)		RDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>15-19</b>	5,35 / 0,54	5,17 / 0,58 <sup>‡</sup>	15,50 / 1,20	15,07 / 1,32 <sup>‡</sup>	45,35 / 3,73	43,71 / 3,92 <sup>‡</sup>	84,92 / 3,57	84,84 / 3,47	29,05 / 1,50	29,28 / 1,47	34,18 / 0,74	34,51 / 0,57	14,25 / 0,86	14,26 / 1,06
<b>20-40</b>	5,28 / 0,51	5,21 / 0,50 <sup>‡</sup>	13,96 / 3,57	13,97 / 3,65	45,24 / 3,87	44,71 / 3,72 <sup>‡</sup>	85,91 / 3,95	86,03 / 4,04	29,25 / 1,55	29,65 / 1,54 <sup>‡</sup>	34,05 / 1,07	34,47 / 0,68 <sup>‡</sup>	14,96 / 1,04 <sup>a</sup>	14,22 / 1,14 <sup>‡</sup>
<b>41-58</b>	4,97 / 0,35 <sup>a,b</sup>	4,95 / 0,34	15,07 / 1,26	15,10 / 1,19	43,80 / 3,44	43,53 / 3,23	88,12 / 2,48 <sup>a,b</sup>	88,04 / 2,60 <sup>a</sup>	30,33 / 1,23 <sup>a</sup>	30,54 / 1,18 <sup>a</sup>	34,41 / 0,93	34,69 / 0,64	14,93 / 0,84	14,31 / 0,84
<b>P-valores</b>	0,017	0,076	0,295	0,955	0,248	0,292	0,011	0,016	0,006	0,010	0,366	0,332	0,015	0,763

**(B) Leucograma**

Faixa Etária	Leucócitos totais (/mm <sup>3</sup> )		Linfócitos (/mm <sup>3</sup> )		Segmentados (/mm <sup>3</sup> )		Bastonetes (/mm <sup>3</sup> )		Basófilos (/mm <sup>3</sup> )		Eosinófilos (/mm <sup>3</sup> )		Monócitos (/mm <sup>3</sup> )	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>15-19</b>	7180,00 / 1560,23	7420,00 / 1783,73	2750,35 / 928,13	2740,75 / 1306,04	3693,65 / 997,15	3799,15 / 1157,55	26,65 / 108,42	33,47 / 106,31	83,95 / 55,46	81,50 / 32,99	129,15 / 96,38	173,75 / 108,94 <sup>‡</sup>	490,75 / 204,34	587,35 / 205,38 <sup>‡</sup>
<b>20-40</b>	7611,11 / 2414,60	7691,67 / 2010,24	2734,51 / 991,92	2669,63 / 945,47	4104,26 / 1955,86	4138,11 / 1609,71	32,81 / 88,12	27,71 / 84,67	82,33 / 50,73	102,71 / 50,12 <sup>‡</sup>	152,82 / 115,44	151,90 / 122,41	501,70 / 238,29	561,18 / 194,10 <sup>‡</sup>
<b>41-58</b>	6926,09 / 2213,43	6460,87 / 1403,16	2319,35 / 894,02	2304,78 / 848,44	3928,83 / 1534,79	3479,35 / 914,12	7,61 / 25,21	19,22 / 66,44	95,35 / 50,66	99,13 / 46,95	109,83 / 81,08	115,57 / 78,08	465,52 / 180,18	441,91 / 181,80 <sup>a,b</sup>
<b>P-valores</b>	0,574	0,040	0,172	0,227	0,785	0,149	0,286	0,817	0,786	0,298	0,199	0,164	0,805	0,013

**(C) Plaquetograma**

Faixa Etária	Plaquetas (mil/mm <sup>3</sup> )		Plaquetócrito (%)		VPM (fl)		PDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>15-19</b>	322,80 / 73,05	320,95 / 73,43	0,33 / 0,07	0,33 / 0,08	10,23 / 1,31	10,33 / 1,34	17,76 / 1,09	18,02 / 1,00
<b>20-40</b>	341,57 / 68,90	309,95 / 63,34 <sup>‡</sup>	0,37 / 0,10	0,32 / 0,08 <sup>‡</sup>	10,67 / 1,82	10,33 / 1,83	18,16 / 1,23	18,14 / 1,09
<b>41-58</b>	325,70 / 69,88	311,43 / 65,14	0,34 / 0,08	0,33 / 0,09	10,37 / 1,11	10,47 / 1,17	17,75 / 0,94	18,01 / 0,86
<b>P-valores</b>	0,494	0,797	0,303	0,654	0,767	0,595	0,357	0,984

Dados numéricos são expressos como média / desvio padrão (DP). HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração hemoglobínica corpuscular média; RDW= amplitude ou variação de distribuição dos eritrócitos; VPM= volume plaquetário médio; PDW= amplitude ou variação de distribuição de plaquetas; g/dL= gramas por decilitro; fl= femtolitros; pg= picogramas; g/%= gramas por porcentagem. Os p-valores para eritrócitos, HCT, VCM antes e depois e RDW antes foram gerados por ANOVA, enquanto os p-valores dos demais parâmetros foram gerados pelo Teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as faixas etárias detectadas pelo teste de Bonferroni (eritrócitos, HCT, VCM antes e depois e RDW antes) ou de Mann-Whitney (demais variáveis), sendo a = significativo em relação à faixa etária 15-19 anos; b = significativo em relação aos 20-40 anos. O símbolo ‡ indica diferenças significativas nas comparações antes e depois à suplementação com óleo de pequi, detectadas pelo Teste-T para amostras pareadas (eritrócitos, HCT e VCM) ou pelo teste de Wilcoxon (demais variáveis).

**Tabela 8:** Valores de CK, AST, ALT, PCR, PCR-us e teste Tbars de acordo com distância percorrida (Km) pelos atletas antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Km	N(%)	CK (U/L)		AST (U/L)		ALT (U/L)		PCR (mg/dL)		PCR-us (mg/dL)		Tbars (nmol/mL of MDA)	
		Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
4-5	50(40.7)	219,46 /	205,73 /	27,65 /	26,86 /	20,12 /	19,43 /	0,29 /	0,38 /	1,30 /	1,53 /	0,0245 /	0,0255 /
		214,99	165,03	8,07	7,48	8,25	8,92	0,35	0,34	2,34	2,20	0,007	0,006
6-7	38(30.9)	348,14 /	242,14 /	29,49 /	27,24 /	24,43 /	21,95 /	0,30 /	0,35 /	1,85 /	1,54 /	0,0302 /	0,0282 /
		466,93 <sup>a</sup>	204,73 <sup>#</sup>	8,51	8,27 <sup>#</sup>	10,78 <sup>a</sup>	7,68	0,21	0,31	1,87 <sup>a</sup>	1,41	0,007 <sup>a</sup>	0,007 <sup>a</sup>
8-10	28(22.8)	295,68 /	267,46 /	32,89 /	30,64 /	24,64 /	23,07 /	0,41 /	0,37 /	1,80 /	1,68 /	0,0256 /	0,0259 /
		336,81	335,21	9,84 <sup>a</sup>	4,74 <sup>a,b</sup>	15,40	10,68	0,44	0,26	2,58	1,79	0,007 <sup>b</sup>	0,007
16-21	7(5.7)	372,71 /	313,00 /	34,29 /	32,86 /	29,43 /	28,29 /	0,43 /	0,34 /	1,51 /	0,99 /	0,0271 /	0,0253 /
		261,55 <sup>a</sup>	224,48 <sup>a</sup>	7,74 <sup>a</sup>	5,37 <sup>a,b</sup>	13,24 <sup>a</sup>	6,05 <sup>a,b</sup>	0,28	0,10	1,82	0,61	0,008	0,006
<b>P-valores</b>		0,032	0,131	0,013	0,002	0,036	0,015	0,271	0,920	0,024	0,305	0,005	0,170

Dados numéricos são expressos como média / desvio padrão (DP). N= tamanho da amostra; CK= creatina quinase; AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; PCR= proteína-C reativa; PCR-us= proteína-C reativa ultra-sensível; U/L= unidade por litro; mg/dL= miligramas por decilitro; nmol/mL de MDA= nanomols de malondialdeído por mililitro de soro. Os p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as distâncias percorridas detectada pelo teste de Mann-Whitney, sendo a= significativo comparado a 4-5 Km; b= significativo comparado a 6-7 Km. O símbolo # indica diferenças significativas nas comparações antes e depois à suplementação com o óleo de pequi, detectadas pelo teste de Wilcoxon.

**Tabela 9:** Valores do hemograma de acordo com a distância percorrida (Km) antes e depois da suplementação com óleo de pequi. (A) Eritrograma; (B) Leucograma; (C) Plaquetograma.

**(A) Eritrograma**

Km	Eritrócitos (milhões/mm <sup>3</sup> )		HGB (g/dL)		HCT (%)		VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/% ou g/dL)		RDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>4-5</b>	5,32 / 0,55	5,21 / 0,57 <sup>‡</sup>	13,81 / 3,89	13,66 / 3,97	45,53 / 3,96	44,55 / 3,91 <sup>‡</sup>	85,74 / 4,24	85,76 / 4,23	29,30 / 1,70	29,59 / 1,77	34,16 / 0,90	34,50 / 0,66	14,54 / 0,95	13,98 / 0,90 <sup>‡</sup>
<b>6-7</b>	5,12 / 0,40	5,08 / 0,40	15,10 / 1,10	15,10 / 1,12	44,29 / 2,88	44,09 / 3,35	86,84 / 2,78	87,04 / 2,97	29,59 / 1,06	29,82 / 1,08	34,10 / 1,08	34,26 / 0,66	14,80 / 0,85	14,20 / 1,01
<b>8-10</b>	5,25 / 0,56	5,16 / 0,47 <sup>‡</sup>	14,68 / 2,91	14,65 / 2,81	45,31 / 4,18	44,41 / 3,51 <sup>‡</sup>	86,43 / 3,39	86,25 / 3,41	29,49 / 1,57	30,04 / 1,33 <sup>‡</sup>	34,12 / 1,12	34,83 / 0,50 <sup>b,‡</sup>	15,01 / 0,92	14,41 / 0,97 <sup>‡</sup>
<b>16-21</b>	5,05 / 0,33	5,07 / 0,47	14,81 / 1,53	14,97 / 1,54	43,03 / 4,19	43,26 / 4,68	85,09 / 5,59	85,41 / 5,65 <sup>‡</sup>	29,30 / 2,29	29,56 / 2,01 <sup>‡</sup>	34,40 / 0,86	34,64 / 0,70	16,34 / 1,00 <sup>a,b,c</sup>	15,69 / 1,70 <sup>a,b,c</sup>
<b>P-valores</b>	0,238	0,664	0,950	0,816	0,239	0,826	0,499	0,470	0,864	0,672	0,952	0,006	0,000	0,001

**(B) Leucograma**

Km	Leucócitos totais (/mm <sup>3</sup> )		Linfócitos (/mm <sup>3</sup> )		Segmentados (/mm <sup>3</sup> )		Bastonetes (/mm <sup>3</sup> )		Basófilos (/mm <sup>3</sup> )		Eosinófilos (/mm <sup>3</sup> )		Monócitos (/mm <sup>3</sup> )	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>4-5</b>	7372,92 / 1759,44	7737,50 / 1872,72	2818,94 / 941,91	2785,47 / 1011,30	3793,84 / 1146,63	4099,14 / 1386,26	8,14 / 32,82	23,81 / 87,09	85,76 / 56,74	102,47 / 51,52	163,45 / 115,76	158,80 / 110,60	514,04 / 241,27	602,20 / 191,70 <sup>‡</sup>
<b>6-7</b>	6936,36 / 2314,87	6863,64 / 1597,03	2284,48 / 922,34 <sup>a</sup>	2494,85 / 868,28	3908,42 / 1998,94	3445,73 / 1395,05 <sup>a</sup>	49,39 / 106,20 <sup>a</sup>	27,21 / 81,92	78,58 / 44,11	87,85 / 41,36	141,06 / 98,37	176,15 / 138,29	459,73 / 217,91	489,18 / 222,05 <sup>a</sup>
<b>8-10</b>	7757,14 / 2824,68	7517,86 / 2215,95	2753,50 / 1047,34 <sup>b</sup>	2423,32 / 1184,75 <sup>‡</sup>	4285,96 / 2079,81	4332,29 / 1387,24 <sup>b</sup>	26,00 / 98,48	38,22 / 94,52	91,29 / 51,37	102,54 / 47,87	114,29 / 97,74 <sup>a</sup>	109,14 / 78,46	481,39 / 207,20	509,68 / 173,79 <sup>a</sup>
<b>16-21</b>	8483,33 / 2331,88	7066,67 / 2100,16	2892,83 / 654,81 <sup>b</sup>	2672,83 / 508,33	4827,33 / 2545,95	3703,17 / 1903,60	56,50 / 138,40	0,00 / 0,00	88,50 / 50,26	102,83 / 40,10	66,83 / 74,13 <sup>a</sup>	95,33 / 64,76	551,33 / 112,93	492,50 / 117,13
<b>P-valores</b>	0,269	0,225	0,026	0,280	0,597	0,065	0,022	0,307	0,713	0,491	0,043	0,218	0,678	0,020

**(B) Plaquetograma**

Km	Plaquetas (mil/mm <sup>3</sup> )		Plaquetócrito (%)		VPM (fl)		PDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>4-5</b>	324,94 / 62,80	310,16 / 56,82	0,35 / 0,10	0,32 / 0,07 <sup>‡</sup>	10,68 / 1,92	10,17 / 1,50 <sup>‡</sup>	18,06 / 1,24	18,08 / 1,06
<b>6-7</b>	328,39 / 59,85	302,33 / 60,54 <sup>‡</sup>	0,34 / 0,07	0,32 / 0,08 <sup>‡</sup>	10,52 / 1,51	10,51 / 1,78	17,98 / 1,19	17,97 / 1,12
<b>8-10</b>	364,89 / 86,27	334,04 / 77,43 <sup>‡</sup>	0,38 / 0,10	0,36 / 0,11	10,35 / 1,32	10,41 / 1,75	17,89 / 1,02	18,23 / 0,92
<b>16-21</b>	321,00 / 65,67	284,29 / 75,56	0,35 / 0,04	0,31 / 0,07	10,28 / 0,94	10,76 / 1,66	18,42 / 1,29	18,22 / 0,86
<b>P-valores</b>	0,372	0,241	0,579	0,218	0,982	0,714	0,901	0,814

Dados numéricos são expressos como média / desvio padrão (DP). HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração hemoglobínica corpuscular média; RDW= amplitude ou variação de distribuição dos eritrócitos; VPM= volume plaquetário médio; PDW= amplitude ou variação de distribuição de plaquetas; g/dL= gramas por decilitro; fl= femtolitros; pg= picogramas; g/%= gramas por porcentagem. P-valores de eritrócitos, HCT, VCM, RDW antes e depois, HCM antes e leucócitos, plaquetócrito e PDW depois foram gerados por ANOVA enquanto os p-valores dos demais parâmetros foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as distâncias percorridas detectadas pelo teste de Bonferroni (RDW antes e depois) ou de Mann-Whitney (demais variáveis), sendo a= significativo comparado à 4-5 Km; b= significativo comparado à 6-7 Km; c= significativo comparado à 8-10 Km. O símbolo ‡ indica diferença significativa em comparação antes e depois à suplementação de óleo de pequi, detectadas pelo Teste-T para amostras pareadas (eritrócitos, HCT, VCM, RDW) ou pelo teste de Wilcoxon (demais variáveis).

Apesar das diferenças observadas, todos os valores permaneceram dentro dos valores de referência citados na literatura (RIFAI & RIDKER, 2003; SCHUMANN & KLAUKE, 2003; MOUGIOS, 2007; FREIRE et al., 2008). Além disso, apesar da significativa correlação positiva entre faixa etária e distância percorrida (0,368;  $p=0,000$ ) (Tabela 2), nenhuma correlação foi encontrada entre os parâmetros analisados (sexo, faixa etária ou distância percorrida) com os polimorfismos estudados.

## **5.2 Resultados das dosagens bioquímicas e do hemograma total por genótipos de ACTN-3, EPO e EPOR antes e depois a suplementação com óleo de pequi**

Todas as amostras de DNA dos voluntários (100%) foram amplificadas e genotipadas com sucesso para os polimorfismos nos genes ACTN-3, EPO e EPOR. Porém, como todos os atletas apresentaram o genótipo tipo selvagem para EPOR (rs121918116), somente os resultados dos polimorfismos EPO e ACTN-3 serão apresentados.

Os resultados do cálculo do tamanho amostral mínimo antes e após o pequi por genótipos dos polimorfismos de EPO e ACTN-3 são mostrados na Tabela 10. Para os genótipos mais raros considerou-se um erro aleatório de 0,20, enquanto para os demais genótipos, foi considerado o erro de 0,10. A suplementação com as cápsulas de pequi reduziu a variabilidade das amostras e, conseqüentemente, o tamanho amostral necessário.

Para EPO, diferenças significativas antes do pequi foram observadas entre os genótipos TT x TG para CHCM ( $p=0,025$ ), VPM ( $p=0,006$ ) e PDW ( $p=0,003$ ), entre TG x GG ( $p=0,034$ ) e TT x GG ( $p=0,006$ ) para VPM, e entre TT x GG para PDW ( $p=0,003$ ) (Tabelas 12A e C); enquanto após o pequi tais diferenças foram observadas para PCR entre TT x TG ( $p=0,023$ ) (Tabela 11A) e entre TT x GG para bastonetes ( $p=0,018$ ) (Tabela 12B). Para ACTN-3, o genótipo XX apresentou valores significativamente menores de VCM comparado ao genótipo RX ( $p=0,023$ ) antes de pequi, o mesmo ocorrendo depois do pequi com HCM em comparação com o genótipo RX ( $p=0,038$ ) (Tabela 13A). O genótipo XX também apresentou um

aumento de linfócitos antes ( $p=0,014$ ) e após ( $p=0,015$ ) o pequi em comparação com o genótipo RX (Tabela 13B).

**Tabela 10:** Resultados do cálculo do tamanho amostral mínimo dos dados quantitativos, por genótipos dos polimorfismos de EPO e ACTN-3.

<b>Marcadores Genéticos</b>	<b>Antes</b>	<b>Depois</b>	<b>Erro máximo tolerável</b>	<b>N final do estudo</b>
<b>EPO</b>				
TT	33	32	0,10	58
TG	34	16	0,10	54
GG	9	8	0,20	9
<b>ACTN-3 R577X</b>				
RR	25	25	0,10	45
RX	37	28	0,10	57
XX	18	13	0,20	21

Nas comparações antes-depois, o polimorfismo da EPO influenciou principalmente os resultados do eritrograma, onde as respostas significativas para o óleo de pequi foram observadas apenas para os genótipos selvagem (TT) e heterozigoto (TG) nos valores de eritrócitos ( $p=0,001$ ), HCT ( $p=0,001$ ), HCM ( $p=0,000$ ) e CHCM ( $p=0,001$ ), e para os genótipos TT e TG ( $p=0,000$  para ambos) nos valores de RDW (Tabela 10A). O polimorfismo ACTN-3 influenciou os valores de AST e CK, onde os heterozigotos tiveram uma redução significativa nos valores de AST ( $p=0,037$ ), e os homozigotos XX, nos valores de CK ( $p=0,010$ ) (Tabela 11B). Também foi observada influência deste polimorfismo em alguns parâmetros do hemograma: houve aumento significativo dos valores de HCM ( $p=0,000$ ) e CHCM ( $p=0,001$ ) apenas para o genótipo RR (Tabela 13A); enquanto reduções significativas foram observadas nos valores de eritrócitos ( $p=0,017$  e  $0,070$ ), HCT ( $p=0,027$  e  $0,042$ ), plaquetas ( $p=0,000$  e  $0,012$ ) e plaquetócrito ( $p=0,000$  e  $0,041$ ) para os genótipos RR e RX e nos valores de RDW para todos os genótipos: RR ( $p=0,001$ ), RX ( $p=0,001$ ) e XX ( $p=0,007$ ) (Tabela 13A e 13 C).

**Tabela 11:** Influência dos polimorfismos dos genes EPO (SNP rs1617640) e ACTN-3 R577X (SNPs rs1815739) nos valores de CK, AST, ALT, PCR, PCR-us e teste Tbars antes e depois da suplementação com o óleo de pequi em corredores de rua do Distrito Federal.

Marcadores Genéticos	CK (U/L)		AST(U/L)		ALT (U/L)		PCR (mg/dL)		PCR-us (mg/dL)		Tbars (nmol/mL de MDA)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>EPO</b>												
<b>TT</b>	341,93 / 436,21	277,88 / 279,02	29,98 / 8,84	28,43 / 8,31	22,24 / 10,59	21,67 / 10,35	0,37 / 0,37	0,44 / 0,36	1,65 / 2,32	1,97 / 2,20	0,0270 / 0,008	0,0272 / 0,006
<b>TG</b>	243,64 / 217,99	193,58 / 142,35	29,72 / 8,94	27,70 / 5,77	23,43 / 12,55	21,28 / 7,70	0,31 / 0,30	0,29 / 0,22 <sup>a</sup>	1,68 / 2,31	1,09 / 1,00	0,0267 / 0,007	0,0255 / 0,007
<b>GG</b>	173,11 / 156,98	237,44 / 262,54	29,22 / 9,01	29,67 / 8,89	25,67 / 10,65	22,44 / 8,59	0,23 / 0,17	0,33 / 0,24	0,86 / 0,61	1,21 / 1,94	0,0234 / 0,009	0,0265 / 0,005
<b>p-valores</b>	0,151	0,157	0,958	0,981	0,431	0,793	0,527	0,069	0,865	0,138	0,415	0,390
<b>ACTN-3 R577X</b>												
<b>RR</b>	342,86 / 467,83	257,59 / 204,93	29,25 / 7,52	28,48 / 7,30	21,84 / 9,47	21,07 / 9,48	0,33 / 0,36	0,33 / 0,30	1,78 / 2,56	1,61 / 1,79	0,0274 / 0,008	0,027 / 0,008
<b>RX</b>	229,77 / 210,59	243,20 / 273,07	30,67 / 9,55	28,53 / 7,75 <sup>#</sup>	24,39 / 13,31	22,37 / 9,28	0,30 / 0,23	0,36 / 0,25	1,20 / 1,35	1,46 / 1,62	0,0268 / 0,007	0,0261 / 0,006
<b>XX</b>	317,50 / 300,48	178,05 / 112,88 <sup>#</sup>	28,60 / 9,49	26,65 / 5,87	21,75 / 9,66	20,30 / 7,58	0,42 / 0,47	0,46 / 0,42	2,37 / 3,18	1,64 / 2,35	0,0247 / 0,007	0,0262 / 0,006
<b>p-valores</b>	0,069	0,224	0,546	0,739	0,358	0,337	0,799	0,315	0,975	0,464	0,686	0,751

Dados numéricos são expressos pela média / desvio padrão (DP). CK= creatina quinase; AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; PCR= proteína-C reativa C; PCR-us= proteínas-C reativa ultra sensível; U/L= unidade por litro; mg/dL= miligramas por decilitro; nmol/mL de MDA= nanomoles de malondialdeído por mililitro de soro. Para o polimorfismo da EPO, os p-valores do teste de Tbars antes e depois foram gerados por ANOVA, enquanto os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. Para o polimorfismo da ACTN-3, o p-valor do teste Tbars depois foi gerado por ANOVA, enquanto os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas entre os genótipos, detectadas pelo teste de Wilcoxon, sendo a= significativo comparado ao primeiro genótipo de cada marcador. O símbolo # indica diferenças significativas nas comparações antes e depois à suplementação com óleo de pequi, detectadas pelo teste de Wilcoxon (CK e AST).

**Tabela 12:** Influência do polimorfismo do gene da EPO (SNP rs1617640) no hemograma dos corredores de rua do Distrito Federal antes e depois da suplementação com óleo de pequi. (A) Eritrograma; (B) Leucograma; (C) Plaquetograma.

**(A) Eritrograma**

EPO	Eritrócitos (milhões/mm <sup>3</sup> )		HGB (g/dL)		HCT (%)		VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/% ou g/dL)		RDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>TT</b>	5,22 / 0,50	5,11 / 0,53 <sup>‡</sup>	14,14 / 3,20	14,05 / 3,27	44,97 / 3,52	44,01 / 3,62 <sup>‡</sup>	86,43 / 4,01	86,53 / 3,97	29,32 / 1,56	29,82 / 1,58 <sup>‡</sup>	33,92 / 0,99	34,47 / 0,64 <sup>‡</sup>	14,72 / 1,06	14,14 / 0,90 <sup>‡</sup>
<b>TG</b>	5,27 / 0,52	5,22 / 0,47	14,65 / 2,93	14,60 / 2,94	45,20 / 3,79	44,74 / 3,43	85,88 / 3,32	85,88 / 3,53	29,49 / 1,44	29,66 / 1,38	34,34 / 1,01 <sup>a</sup>	34,53 / 0,69	14,94 / 0,89	14,28 / 1,08 <sup>‡</sup>
<b>GG</b>	5,05 / 0,45	5,04 / 0,42	15,07 / 1,89	15,18 / 1,96	43,71 / 5,30	43,62 / 5,35	86,32 / 4,85	86,29 / 4,61	29,73 / 2,06	29,99 / 1,90	34,44 / 0,73	34,74 / 0,55	14,92 / 1,30	14,72 / 1,77
<b>p-valores</b>	0,480	0,402	0,482	0,505	0,555	0,501	0,745	0,683	0,522	0,681	0,052	0,552	0,515	0,300

**(B) Leucograma**

EPO	Leucócitos totais (/mm <sup>3</sup> )		Linfócitos (/mm <sup>3</sup> )		Segmentados (/mm <sup>3</sup> )		Bastonetes (/mm <sup>3</sup> )		Basófilos (/mm <sup>3</sup> )		Eosinófilos (/mm <sup>3</sup> )		Monócitos (/mm <sup>3</sup> )	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>TT</b>	7036,36 / 1878,47	7176,36 / 1893,06	2605,13 / 956,95	2501,67 / 910,80	3705,64 / 1426,58	3869,22 / 1447,01	27,78 / 82,30	15,35 / 59,21	79,13 / 47,98	94,49 / 49,41	135,65 / 97,43	133,49 / 96,18	480,35 / 240,88	532,24 / 224,86
<b>TG</b>	7737,25 / 2512,84	7582,35 / 1894,91	2690,15 / 961,96	2722,54 / 1054,63	4283,83 / 2029,62	4039,31 / 1398,05	23,67 / 81,29	27,45 / 85,01	91,04 / 52,72	105,00 / 43,97	141,54 / 117,92	168,46 / 131,91 <sup>‡</sup>	509,33 / 206,82	553,88 / 171,41
<b>GG</b>	7700,00 / 2673,48	7711,11 / 2200,25	2755,67 / 1177,41	2616,00 / 1251,34	4142,00 / 1573,61	3915,44 / 1767,96	37,67 / 113,00	93,78 / 164,75 <sup>a</sup>	88,44 / 64,47	83,44 / 51,92	160,44 / 105,58	124,44 / 80,50	471,33 / 186,21	533,56 / 192,84
<b>p-valores</b>	0,521	0,487	0,925	0,578	0,367	0,811	0,842	0,075	0,482	0,314	0,824	0,281	0,418	0,848

**(C) Plaquetograma**

EPO	Plaquetas (milhões/mm <sup>3</sup> )		Plaquetócrito (%)		VPM (fl)		PDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>TT</b>	330,88 / 68,72	315,54 / 63,30 <sup>‡</sup>	0,34 / 0,08	0,32 / 0,07	10,23 / 1,41	10,18 / 1,35	17,67 / 0,85	18,00 / 0,82 <sup>‡</sup>
<b>TG</b>	344,63 / 73,99	314,17 / 67,91 <sup>‡</sup>	0,37 / 0,10	0,33 / 0,09 <sup>‡</sup>	10,65 / 1,72	10,40 / 1,86	18,18 / 1,22	18,09 / 1,16
<b>GG</b>	308,11 / 39,28	279,00 / 55,13	0,37 / 0,08	0,32 / 0,09	12,10 / 1,74 <sup>a,b</sup>	11,37 / 1,90	19,43 / 1,68 <sup>a</sup>	18,77 / 1,41
<b>p-valores</b>	0,267	0,200	0,176	0,988	0,022	0,283	0,006	0,178

Dados numéricos são expressos como média / desvio padrão (DP). HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração hemoglobínica corpuscular média; RDW= amplitude ou variação de distribuição dos eritrócitos; VPM= volume plaquetário médio; PDW= amplitude ou variação de distribuição de plaquetas; g/dL= gramas por decilitro; fl= femtolitros; pg= picogramas; g/= gramas por porcentagem. Os p-valores de eritrócitos, HCT, VCM, RDW antes e depois, basófilos antes e leucócitos totais, monócitos e PDW depois foram gerados por ANOVA, enquanto os p-valores dos demais parâmetros foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os genótipos comparados, detectadas pelo teste de Bonferroni (eritrócitos, HCT, VCM, RDW antes e depois, basófilos antes e leucócitos totais, monócitos e PDW depois) ou de Mann-Whitney (demais variáveis), sendo a= significativo comparado ao primeiro genótipo, b= significativo comparado ao segundo genótipo. O símbolo ‡ indica diferenças significativas nas comparações antes e depois à suplementação com óleo de pequi, detectadas pelo Teste-T para amostras pareadas (eritrócitos, HCT e RDW) ou pelo teste de Wilcoxon (demais variáveis).

**Tabela 13:** Influência do polimorfismo R577X (SNPs rs1815739) do gene da ACTN-3 no hemograma dos corredores de rua do Distrito Federal antes e depois da suplementação com óleo de pequi. (A) Eritrograma; (B) Leucograma; (C) Plaquetograma.

**(A) Eritrograma**

ACTN-3	Eritrócitos (milhões/mm <sup>3</sup> )		HGB (g/dL)		HCT (%)		VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/% ou g/dL)		RDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>RR</b>	5,27 / 0,47	5,17 / 0,46 <sup>‡</sup>	14,47 / 3,09	14,40 / 3,13	45,34 / 3,75	44,46 / 3,65 <sup>‡</sup>	86,27 / 4,11	86,37 / 4,01	29,38 / 1,56	29,87 / 1,53 <sup>‡</sup>	34,06 / 0,98	34,59 / 0,60 <sup>‡</sup>	14,89 / 1,10	14,28 / 1,31 <sup>‡</sup>
<b>RX</b>	5,13 / 0,47	5,07 / 0,48 <sup>‡</sup>	14,19 / 3,17	14,14 / 3,22	44,49 / 3,87	43,91 / 3,84 <sup>‡</sup>	86,85 / 3,35	86,73 / 3,53	29,72 / 1,35	29,93 / 1,34	34,22 / 1,01	34,52 / 0,70	14,71 / 0,93	14,17 / 0,92 <sup>‡</sup>
<b>XX</b>	5,41 / 0,62	5,34 / 0,58	15,01 / 2,28	14,97 / 2,34	45,43 / 3,63	44,98 / 3,35	84,23 / 3,46 <sup>b</sup>	84,56 / 3,79	28,78 / 1,81	29,07 / 1,73 <sup>b</sup>	34,14 / 1,05	34,36 / 0,66	15,03 / 0,97	14,39 / 0,81 <sup>‡</sup>
<b>p-valores</b>	0,078	0,113	0,383	0,371	0,456	0,514	0,028	0,968	0,345	0,862	0,319	0,783	0,442	0,716

**(B) Leucograma**

ACTN-3	Leucócitos totais (/mm <sup>3</sup> )		Linfócitos (/mm <sup>3</sup> )		Segmentados (/mm <sup>3</sup> )		Bastonetes (/mm <sup>3</sup> )		Basófilos (/mm <sup>3</sup> )		Eosinófilos (/mm <sup>3</sup> )		Monócitos (/mm <sup>3</sup> )	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>RR</b>	7577,27 / 2436,72	7450,00 / 1950,73	2695,66 / 995,97	2594,68 / 943,88	4142,11 / 2198,34	4010,39 / 1617,18	49,37 / 125,71	33,21 / 100,20	84,89 / 54,65	101,80 / 49,83	145,05 / 118,39	167,09 / 137,01	457,64 / 209,32	538,91 / 187,86 <sup>‡</sup>
<b>RX</b>	7074,51 / 2313,77	7223,53 / 1972,98	2513,50 / 1024,32	2486,35 / 1075,77	3848,46 / 1492,42	3916,94 / 1401,06	10,60 / 32,10	30,40 / 86,22	83,71 / 50,38	93,15 / 46,24	133,94 / 107,20	130,25 / 100,00	488,65 / 191,50	516,25 / 203,59
<b>XX</b>	7835,00 / 1517,71	7730,00 / 1700,81	2933,00 / 695,93 <sup>b</sup>	2962,60 / 880,47 <sup>b</sup>	4073,70 / 1154,83	3897,60 / 1162,98	19,80 / 49,67	4,85 / 21,69	89,70 / 48,58	104,25 / 45,13	145,90 / 80,56	154,85 / 81,59	580,00 / 295,34	616,00 / 200,48
<b>p-valores</b>	0,247	0,401	0,370	0,425	0,755	0,755	0,187	0,919	0,561	0,460	0,609	0,215	0,119	0,161

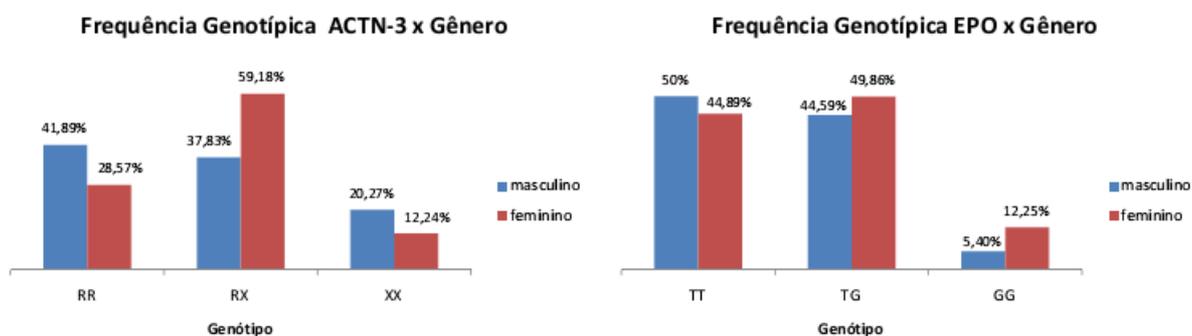
**(C) Plaquetograma**

ACTN-3	Plaquetas (milhões/mm <sup>3</sup> )		Plaquetócrito (%)		VPM (fl)		PDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>RR</b>	342,58 / 71,65	308,80 / 70,12 <sup>‡</sup>	0,36 / 0,10	0,32 / 0,10 <sup>‡</sup>	10,51 / 1,70	10,23 / 1,65	18,16 / 1,24	18,16 / 1,07
<b>RX</b>	327,35 / 66,07	309,87 / 61,94 <sup>‡</sup>	0,34 / 0,07	0,32 / 0,07 <sup>‡</sup>	10,63 / 1,60	10,48 / 1,49	17,98 / 1,06	18,04 / 0,99
<b>XX</b>	339,25 / 75,75	325,45 / 62,56	0,38 / 0,12	0,35 / 0,09	10,30 / 1,59	10,30 / 2,12	17,75 / 1,31	18,07 / 1,09
<b>p-valores</b>	0,272	0,820	0,736	0,359	0,552	0,421	0,695	0,850

Dados numéricos são expressos como média / desvio padrão (DP). HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração hemoglobinica corpuscular média; RDW= amplitude ou variação de distribuição dos eritrócitos; VPM= volume plaquetário médio; PDW= amplitude ou variação de distribuição de plaquetas; g/dL= gramas por decilitro; fl= femtolitros; pg= picogramas; g/= gramas por porcentagem. Os p-valores de eritrócitos, HCT, RDW, Monócitos antes e depois, VCM antes e PDW depois foram gerados por ANOVA, enquanto os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam a diferença significativa entre os genótipos comparados, detectadas pelo teste de Bonferroni (VCM antes) ou de Mann-Whitney (linfócitos antes e depois), sendo b= significativo comparado ao segundo genótipo. O símbolo ‡ indica diferenças significativas em comparação ao antes e depois à suplementação com óleo de pequi, detectadas pelo Teste-T para amostras pareadas (eritrócitos, HCT e RDW) ou pelo teste de Wilcoxon (demais variáveis).

Ambos os polimorfismos genéticos estudados, ACTN-3 e EPO, estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A distribuição alélica e as frequências genótípicas, bem como os parâmetros de diversidade genética e dados EHW de teste  $\chi^2$ , são apresentados na Tabela 14.

A distribuição das frequências dos genótipos de acordo com o sexo (Figura 9) indicou que o genótipo RX (ACTN-3) foi mais frequente nas mulheres, enquanto que os genótipos TT e TG (EPO) foram os mais frequentes para ambos os gêneros. Entretanto, nenhuma diferença significativa na distribuição das frequências genótípicas por sexo foi observada ( $p=0,544$  para ACTN-3 e  $p=0,389$  para EPO).



**Figura 9:** Distribuição das frequências genótípicas dos genes da EPO e da ACTN-3 de acordo com o gênero do atleta.

**Tabela 14:** Distribuição da frequência alélica dos genes da EPO e ACTN-3, parâmetros da diversidade genética, frequência genotípica e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), dados do teste do  $\chi^2$ .

Marcadores Genético	Localização Cromossômica	Frequência Alélica	Heterozigosidade Observada ( $H_o$ )	Heterozigosidade esperada ( $H_e$ )	$F_{is}$ (coeficiente de endogamia)	Genótipos	Frequência genotípica	Número de indivíduos observados	Número de indivíduos esperados	Teste HWE (p-valor)	
<b>EPO T→G</b>	7q22.1	T	0.699	0.44	0.42		TT	48.0	59	60.1	0.8300
		G	0.301				TG	43.9	54	51.8	
							GG	8.1	10	11.1	
<b>ACTN-3 R577X</b>	11q13.2	R	0.598	0.46	0.48		RR	36.6	45	43.8	0.7092
		X	0.402				RX	46.3	57	59.4	
							XX	17.1	21	19.8	

P-valores foram gerados usando o programa de estatística Genepopweb versão 4.0 (<http://genepop.curtin.edu.au>).

## 6. Discussão

Existem vários tipos de estudos experimentais, os quais incluem os randomizados controlados com placebo, os caso-controle, os quasi-experimentais e os antes-depois; cada um com suas próprias características. Visto que a maioria das mudanças fisiológicas e bioquímicas induzidas pelo exercício já foram bem documentadas (JI & LEICHTWEIS, 1997; KARGOTICH et al., 1998; MATTUSCH et al., 2000; URSO & CLARKSON, 2003; KASAPIS et al., 2005; BRANCACCIO et al., 2007; CRUZAT et al., 2007; FERREIRA et al., 2007; MOUGIOS, 2007) e nosso estudo não teve o objetivo de avaliar tais alterações, ele foi projetado para ser um estudo antes-depois, o qual difere de um estudo randomizado controlado com placebo. Estudos antes-depois já estão bem validados na literatura científica (MEADS & DAVENPORT, 2009), e embora possam apresentar algumas limitações em comparação com aqueles randomizados controlados com placebo, nós seguimos todos os passos necessários para garantir o controle de qualidade e a validação do nosso estudo (AMERICAN COLLEGE OF PHYSICIANS, 2002; MEADS & DAVENPORT, 2009), como discutido a seguir.

O treinamento físico induz a adaptações benéficas; no entanto o exercício exaustivo pode aumentar a geração de ERO e causar lesões musculares e em muitos outros órgãos e sistemas corporais responsáveis pela regulação e manutenção da homeostase, fato este que pode comprometer o desempenho do atleta e possivelmente levar à síndrome de sobretreinamento (*overtraining*) (URSO & CLARKSON, 2003; TRABER, 2006; CRUZAT et al., 2007; FERREIRA et al., 2007; RADAK et al., 2007; MIRANDA-VILELA, 2012). Apesar de ser difícil para qualquer estudo controlar todas as variáveis envolvidas, muitas delas foram controladas neste estudo: (1) apenas desportistas treinados foram incluídos; (2) embora os atletas tivessem um grau variável de intensidade de treino, a quantidade de treinamento semanal foi semelhante (em número de dias e horas de treinamento); (3) a distância percorrida e o tempo necessário para finalizarem o trajeto foram escolhidos de acordo com o tipo, intensidade e duração do treinamento semanal de cada atleta, evitando estresse físico adicional além do que eles já estavam habituados; (4) os voluntários executaram o mesmo percurso e distância em ambas as corridas, no

mesmo intervalo de tempo e sob as mesmas condições ambientais; e (5) a única mudança na rotina dos atletas entre as duas corridas foi a suplementação com as cápsulas de óleo de pequi. Desse modo, as diferenças significativas obtidas neste estudo não foram devidas a diferenças na quantidade e intensidade de treinamento. Nossos resultados corroboram esta afirmação, uma vez que não ultrapassaram os valores de referência determinados para fins clínicos (SCHUMANN & KLAUKE 2003; FREIRE et al., 2008) e muito menos para atletas (MOUGIOUS, 2007). Outros estudos com tempos de intervenção inferiores ou iguais ao nosso mostraram também efeitos fisiológicos, com mudanças significativas nos marcadores utilizados (GILL & HARDMAN, 2000; KOLOVOU et al., 2005; PACHECO et al. 2006; BLUM et al. 2006; LÓPEZ et al. 2007).

AST é utilizada para avaliar lesões celulares nos músculos esqueléticos, miocárdio, eritrócitos, fígado, rins e pâncreas, enquanto níveis aumentados de ALT indicam lesões hepáticas (BANFI et al., 2012), e CK é o marcador bioquímico mais utilizado na literatura como indicador da ocorrência de lesão muscular, sobretudo após exercícios extenuantes realizados por indivíduos sem enfermidades (BARBOSA et al., 2003; FOSCHINI et al., 2007). Considerando a tendência geral de queda na média (medida de tendência central) dos valores de CK, AST, ALT, RDW (amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos, do inglês *Red Cell Distribution Width*), plaquetas e plaquetócrito no grupo total e em praticamente todas as estratificações após a suplementação com as cápsulas, nossos resultados sugerem que o óleo de pequi foi eficiente em reduzir as lesões celulares oxidativas induzidas pelo exercício. Os resultados obtidos com os cálculos do tamanho amostral corroboram esta sugestão, visto que a suplementação com as cápsulas de pequi reduziu a variabilidade da amostra e, conseqüentemente, o tamanho amostral necessário. Apesar dos resultados obtidos neste estudo com o teste de Tbars não terem apresentado diferenças significativas nas comparações antes-depois, um estudo anterior de Miranda-Vilela et al. (2011a) sugeriu que a dieta com o óleo de pequi pode reduzir a peroxidação lipídica em atletas, e que os resultados foram influenciados pelos polimorfismos da haptoglobina e da manganês-superóxido dismutase (MnSOD).

O exercício aeróbico regular expande os níveis basais do volume do plasma, e existe uma variabilidade elevada de alterações nesse volume em um mesmo

indivíduo e entre indivíduos diferentes em virtude do desempenho físico (KARGOTICH et al., 1998). Visto que: (1) os atletas correram a mesma distância em ambas as corridas, no mesmo intervalo de tempo e nas mesmas condições ambientais; e (2) cada um dos atletas participou como controle e tratamento, sendo comparados nos testes estatísticos com eles mesmos; a tendência geral de redução na média de eritrócitos, HGB e HCT após a suplementação com as cápsulas sugere que o óleo de pequi pode ter favorecido um maior aumento na expansão do volume do plasma.

Numerosos estudos têm avaliado a anemia dilucional em atletas que participam de provas de resistência, uma vez que eles apresentam menor concentração de hemoglobina e de eritrócitos em comparação à população em geral devido ao aumento do volume plasmático, uma das primeiras adaptações fisiológicas ao exercício aeróbico regular. Trata-se um mecanismo compensatório à perda de volume plasmático que ocorre à medida que o atleta se exercita (EICHNER, 1998; MERCER & DENSMORE, 2005). Os resultados com aumento de HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração média de hemoglobina corpuscular) dentro dos valores de referência, onde HCM infere o conteúdo hemoglobínico de cada eritrócito, ou seja, o peso da hemoglobina em uma hemácia média, enquanto CHCM expressa a taxa de peso da hemoglobina em relação a 1 dL de eritrócitos (ZAGO et al., 2004), corroboram a sugestão acima.

Já é um fato bem conhecido que os parâmetros do sangue variam de acordo com o estresse, a duração e o tipo de exercício: podem ocorrer alterações nos valores do hemograma durante e após o exercício intenso causado por diferenças no estado de treinamento individual, de fatores ambientais e nutricionais (URHAUSEN et al. 1995; LEANDRO et al. 2002; ROSA & VAISBERG 2002; BHATTI & SHAIKH 2007; DESGORCES et al. 2008; VATANSEV & ÇAKMAKÇI 2010). Como a única alteração na rotina dos atletas entre as duas corridas foi a suplementação com óleo de pequi, os resultados das comparações antes-depois sugerem que o aumento de HCM e CHCM após o pequi pode ter ocorrido devido a sua ação protetora nos eritrócitos contra as lesões oxidativas decorrentes do exercício. Isto porque esses índices hematimétricos avaliam indiretamente as características dos eritrócitos quanto ao volume e o conteúdo de hemoglobina, sendo calculados a partir dos resultados obtidos com hemoglobina e eritrócitos (HCM) ou hemoglobina e

hematócrito (CHCM) (ZAGO et al., 2004). A tendência geral de redução na média dos valores de RDW, com retorno aos valores de referência após o uso das cápsulas corrobora esta sugestão, visto que este índice hematimétrico avalia o grau de anisocitose na população de hemácias (ZAGO et al., 2004) e exercícios exaustivos podem comprometer nossa capacidade de detoxificar ERO dentro das células sanguíneas, sendo os eritrócitos mais vulneráveis aos danos oxidativos (PETIBOIS & DÉLÉRIS, 2005; SUREDA et al., 2005).

Uma vez que o aumento dos danos oxidativos relacionados ao envelhecimento têm sido bem documentado, que músculos envelhecidos exibem uma capacidade de adaptação antioxidante inferior aos músculos jovens e que exercícios físicos extenuantes aumentam a geração de ERO (LEEUEWENBURGH et al., 1994; BEJMA et al., 2000; SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004; CRUZAT et al., 2007; FERREIRA et al., 2007; JUDGE & LEEUEWENBURGH, 2007; RADAK et al., 2007; CHEN et al., 2008), nossos resultados com CK e AST também sugerem que as cápsulas de pequi forneceram proteção principalmente para grupos mais jovens e para a distância percorrida de 6-7 Km. Isto pode indicar que corridas de longas distâncias podem ser prejudiciais, principalmente para atletas mais velhos, devido ao aumento do estresse oxidativo acima da capacidade de adaptação do organismo, mesmo com o uso de suplementos antioxidantes.

Nossos resultados também mostraram uma correlação positiva entre faixa etária e distância percorrida, onde as distâncias maiores foram percorridas por atletas adultos jovens e de meia idade, com participação de apenas uma mulher na distância de 16-21 Km. Esta diferença entre homens e mulheres pode ser explicada pelas diferenças de antropometria e fisiologia: os homens têm maior massa muscular do que as mulheres, além de corações maiores, tendo, portanto, um maior débito cardíaco (EICHENBERGER et al., 2012). Tais diferenças também servem para explicar pelo menos parcialmente as diferenças entre os sexos, observadas nos resultados das dosagens bioquímicas e do eritrograma para os mesmos parâmetros descritos na literatura com valores de referência diferentes para os gêneros feminino e masculino (RIFAI & RIDKER, 2003; SCHUMANN & KLAUKE, 2003; MOUGIOS, 2007; FREIRE et al., 2008). Entretanto, o desempenho no esporte de resistência é um fenótipo multifatorial, influenciado por muitos fatores, incluindo aspectos fisiológicos, biometabólicos, físicos, biomecânicos, comportamentais,

psicológicos, sociais e genéticas (BOUCHARD et al., 1997; RANKINEN et al., 2000; OSTRANDER et al., 2009). Assim, mediante o previamente discutido e visto que, apesar as diferenças significativas entre os sexos, faixas etárias e distâncias percorridas, nenhuma correlação foi encontrada entre esses parâmetros e os polimorfismos analisados, é mais provável que as diferenças significativas apresentadas neste estudo estejam relacionadas com a intervenção dietética afetando genes/alelos e com fatores genéticos afetando as respostas a esta suplementação.

Muitos genes envolvidos no metabolismo dos ácidos graxos são regulados por um dos três membros da família de receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), os quais regulam a homeostase da glicose, o metabolismo de lipídeos e a inflamação. Uma descoberta recente indicou que os ácidos oleico, palmítico e linoleico, presentes no óleo de pequi, são ligantes de PPARs (revisado por KAPUT et al., 2004). Sensores lipídicos geralmente heterodimerizam com o receptor X retinóide (RXR), cujo ligando é derivado de uma outra substância química alimentar, o retinol (vitamina A), que também se liga diretamente aos receptores nucleares e influencia a expressão de genes (KAPUT et al., 2004). Assim, visto que o óleo de pequi também apresenta vários carotenóides com atividade pro-vitamina A, é plausível sugerir que a suplementação com as cápsulas de pequi pode ter influenciado a expressão dos genes estudados, corroborando a sugestão acima.

A performance física é um estado fisiológico altamente dependente de diferentes e complexos fatores (CRUZ, 2006). Existem evidências que os fatores genéticos influenciam nos diversos fenótipos relacionados ao desempenho atlético. As variantes gênicas herdadas, conhecidas como polimorfismos, são importantes devido à forma como alteram a fisiologia humana normal para melhorar o desempenho físico atlético (OSTRANDER et al., 2009). Contudo, acredita-se que nutrientes presentes na alimentação sejam capazes de interagir com o nosso genoma e alterar a expressão gênica como ocorre com os agentes antioxidantes que agem compensando o desequilíbrio bioquímico provocado pelo aumento de ERO durante o esforço físico (SCHRÖDER et al., 2000; KAPUT & RODRIGUEZ, 2004; PLUNKETT et al., 2010; WATSON et al., 2010).

Muitos genes candidatos têm sido propostos para explicar diferenças fenotípicas individuais no treinamento de resistência, particularmente aqueles envolvidos no metabolismo energético e função cardiovascular (GÓMEZ-GALLEGO et al., 2009; SCHOENFELDER, 2010); a eficiência muscular tem sido menos estudada na literatura científica e é um fator crítico que determina a performance de resistência (GÓMEZ-GALLEGO et al., 2009). Nesse contexto, embora do perfil cardiorrespiratório não tenha sido estudado em nosso trabalho por métodos convencionais ( $VO_{2max}$ ,  $VO_{2R}$ ,  $FC_{max}$ ,  $FC_{reserva}$  e LT, entre muitos outros), o perfil dos atletas quanto à performance muscular foi verificado aqui através de parâmetros bioquímicos e está em conformidade com relatos anteriores (MIRANDA-VILELA et al., 2009; AKIMOTO et al., 2009). Além disso, uma vez que a capacidade aeróbica é diretamente dependente do transporte de oxigênio pela molécula de hemoglobina, e o nível de eritrócitos é rigidamente controlado de acordo com a demanda de oxigênio (ELLIOT, 2008), as avaliações do eritrograma podem ser um bom parâmetro para ajudar a estimar a aptidão cardiorrespiratória, visto que a demanda de oxigênio desempenha um papel crítico no desempenho atlético (ELLIOT, 2008).

Uma vez que não houve correlação entre os gêneros, faixas etárias e distâncias percorridas com os polimorfismos da EPO e ACTN-3, nossos dados sugerem uma influência significativa do polimorfismo da EPO nos resultados do eritrograma e do plaquetograma. Também sugerem uma vantagem aeróbica para o genótipo TG, que apresentou aumento significativo nos valores de CHCM em relação ao genótipo TT antes do pequi, o que indica um maior aporte de oxigênio, visto que esse índice hematimétrico indica a concentração média de hemoglobina no interior das células vermelhas (em relação a 1 dL de eritrócitos) (MIRANDA-VILELA et al., 2010).

Embora o genótipo TT tenha sido associado com aumento da concentração de eritropoetina no corpo vítreo e complicações no diabetes, incluindo retinopatia diabética proliferativa e doença diabética renal em estágio final (TONG et al., 2008) o alelo T é designado como alelo ancestral no site do NCBI (2012), o que significa que ele é o alelo normal. Assim, o alelo variante G estaria associado com uma menor expressão de EPO e os nossos resultados não estão completamente de acordo com esta premissa. Entretanto, a eritropoetina é o principal hormônio regulador endógeno da eritropoiese, o qual promove a diferenciação dos eritrócitos e

inicia a síntese de hemoglobina. Essa expressão promove proteção contra apoptose de eritrócitos progenitores e é aumentada no fígado e nos rins em estado de hipoxia (SEMENZA et al., 1991; BENTO et al., 2003; OMIM, 2012). Como nosso estudo foi conduzido com atletas e não com pacientes diabéticos, os resultados do eritrograma sugerem que a presença do alelo G nos heterozigotos poderia favorecer uma melhor resposta ao processo de isquemia/perfusão que pode ocorrer nesses órgãos devido ao processo cíclico de contração-relaxamento estabelecido durante a corrida (MIRANDA-VILELA, 2012).

O RDW é o índice mais frequentemente reportado para medir a variação nas dimensões dos eritrócitos, ou seja, o grau de anisocitose em um volume de células dentro da população de eritrócitos (ZAGO et al., 2004). Como os eritrócitos tendem a sofrer danos oxidativos induzidos pelo exercício (SUREDA et al., 2005), estresse mecânico, alterações citosólicas e de pH extracelular (PETIBOIS & DÉLÉRIS, 2005) a redução significativa nos valores de RDW para os genótipos TT e TG, e a redução não significativa para o genótipo GG sugerem que o óleo de pequi apresentou efeitos antioxidantes protetores para os eritrócitos.

Adicionalmente, mediante nossos resultados e dado o fato que hemólise pode também ocorrer como resultado de trauma mecânico nos capilares dos pés dos atletas (CARLSON & MAWADSLEY, 1986) ou ruptura mecânica de eritrócitos por eventos osmóticos e/ou oxidativos (BONILLA et al., 2005), é mais provável que a baixa frequência do genótipo GG encontrada em nosso estudo esteja relacionada a possíveis complicações vasculares devido à ativação plaquetária. Isto por que o parâmetro VPM é um indicador da ativação plaquetária (MIRANDA-VILELA et al., 2011a) e este genótipo apresentou valores de VPM significativamente maiores que os genótipos TT e TG, além de mostrar valores de PDW também significativamente aumentados em relação ao genótipo TT. Como PDW é um indicador da variação do tamanho de plaquetas, o qual tem sido relatado como um sinal ativador da liberação de plaquetas e como um marcador específico de ativação plaquetária, estando aumentado em eventos vaso-oclusivos (VAGDATLI et al., 2010; KARAGÖZ, et al., 2009), nossos resultados do eritrograma e plaquetograma sugerem uma associação maior do alelo G (e não do alelo T) com possíveis eventos associados a complicações microvasculares em atletas de resistência. Visto que alguns nutrientes presentes nos alimentos podem interagir com o genoma humano de forma a

influenciar a saúde e a doença, e a variabilidade genética pode influenciar a resposta à dieta (BURDGE et al., 2012), nossos resultados também sugerem que o óleo de pequi poderia reduzir este risco, já que as diferenças significativas entre os genótipos desapareceu após a suplementação com as cápsulas.

Diversos trabalhos com o gene da EPO (rs 1617640) têm associado esse marcador genético à disfunções do sistema hematopoiético, através de estudos do tipo caso-controle. Os resultados indicam diversas correlações entre alterações patológicas com esse SNP, tais como: alterações microvasculares diabética, como a retinopatia diabética proliferativa e a doença renal estágio final, síndromes mielodisplásicas e mieloproliferativa (TONG et al., 2008; MA et al., 2010; POPOV et al., 2010; SZKANDERA et al., 2012). No entanto não foi encontrado na literatura dados relacionando esse SNP à performance atlética, o que sugere que nosso estudo é pioneiro nessa área.

A variação da expressão genética entre alelos como ocorre no gene da EPO é comum e hereditária e pode contribuir para a variabilidade humana, tal como a suscetibilidade à doença e a resistência a fármacos. Segundo Hoogendoorn et al. (2003), quase um terço das variantes da região promotora pode alterar a expressão gênica e resultar em variação fenotípica. Os efeitos dos diferentes alelos (T vs G) do SNP rs1617640 da região promotora EPO sobre a sua expressão são consistentes com esta ideia (HOOGENDOORN et al., 2003).

O coeficiente de endocruzamento (FIS) é um indicador de endogamia dentro de cada sub-população pela comparação de  $H_s$  (heterozigose média esperada dentro das sub-populações) e  $H_o$  (heterozigose observada dentro das subpopulações) (CARVALHO, 2011). Ou seja, o FIS avalia, em média, a deficiência de heterozigoto dentro das sub-populações. O aumento do valor de FIS se traduz na redução da frequência de heterozigotos numa população, fato que não foi observado para ambos os marcadores: ACTN-3 e EPO.

Um estudo realizado pelo grupo de Yang (2003), em uma coorte internacional de 429 atletas, dividida em 14 categorias de esporte e 436 controles não relacionados, concluiu que cada um dos alelos, R e X da ACTN-3, transmite ao seu hospedeiro uma determinada vantagem para a atividade física desenvolvida. Embora o alelo R pareça aumentar capacidade em corridas de curta distância, o alelo X aumenta desempenho do indivíduo em atividades que exigem alto nível de

resistência. Uma vez que a maioria dos seres humanos requer uma combinação das duas habilidades, Goel e Mittal (2005) sugeriram que seríamos selecionados para possuímos uma cópia de cada alelo. Essa alegação justificaria a maior frequência de heterozigotos encontrados neste estudo que foi de 46,6%.

Segundo dados de Mills et al. (2001), constatou-se que as mutações no gene da ACTN-3 são prevalentes entre os principais grupos humanos: asiáticos, americanos, australianos, africanos e europeus. O alelo X foi mais frequente na Eurásia (0,51) e menos na África (0,16), o que indica ser o menos frequente quando comparada a de todas as outras populações analisadas (MILLS et al., 2001). Em nossos resultados com uma amostra de corredores de rua do DF, o alelo R foi mais frequente que o alelo X (0,598 e 0,402, respectivamente).

Ainda de acordo com dados de Mills et al.(2001), onde foram estudadas 485 amostras de DNA para o gene da ACTN-3 (Tabela 15), observa-se que a nossa amostra de corredores de rua do DF apresentou frequência alélica e genotípica semelhante àquelas da população de europeus brancos, o que poderia ser justificado pela miscigenação com influência da população europeia na população brasileira. Sabe-se, entretanto, que a proteína ACTN-3 está ausente em 18% dos indivíduos brancos em todo mundo, conforme dados de Yang et al. (2003).

**Tabela 15:** Frequências dos genótipos e alelos da ACTN-3 em diferentes populações no mundo, de acordo com MILLS et al. (2001) comparadas com as frequências dos 123 corredores de rua do Distrito Federal\*.

Grupo étnico <sup>1</sup>	Frequência de genótipos			Frequência alélica 577X
	RR	RX	XX	
Asiáticos	0,25	0,5	0,25	0,5
Javaneses	0,17	0,58	0,25	0,54
Europeus Brancos	0,36	0,44	0,2	0,42
Hispânicos	0,34	0,5	0,16	0,41
Aborígenes australianos	0,52	0,38	0,1	0,29
Americanos-africanos	0,6	0,27	0,13	0,27
Africanos Bantu	0,81	0,18	0,01	0,1
Indianos do Norte	0,22	0,61	0,17	0,48
Corredores do Distrito Federal*	0,366	0,466	0,171	0,402

\*Presente estudo

Embora o alelo R esteja associado à melhora do desempenho em provas que demandam esforços repetitivos, como corridas de curta distância, e o genótipo XX às atividades de resistência (NORTH et al., 1999; DIAS et al., 2007; EYNON et al., 2009), nosso estudo não encontrou associação com este último genótipo, corroborando o estudo de MORAN e colaboradores (2007). Talvez esse resultado possa ser explicado pelo perfil dos músculos esqueléticos dos atletas envolvidos em esportes de resistência, os quais são caracterizados por uma alta proporção de fibras do tipo I (de contração lenta), bem como por altos níveis de atividade enzimática de marcadores de metabolismo oxidativo aeróbico (ZHOU et al., 2006), enquanto o gene ACTN-3 codifica a  $\alpha$ -actinina-3, proteína estrutural das fibras musculares da linha Z sarcomérica do tipo II (contração rápida), relacionadas à explosão e força muscular, com predominância no metabolismo energético do tipo anaeróbico (DIAS et al., 2007; YANG et al., 2007; MASSIDA et al., 2009).

No músculo esquelético, existem duas isoformas intimamente relacionadas de  $\alpha$ -actininas, ACTN-2 e ACTN-3, as quais são os principais componentes estruturais das linhas Z sarcoméricas que se ligam aos filamentos finos contendo actina, mantendo a relação espacial entre os miofilamentos (NORTH et al., 1999). Uma vez que o gene da ACTN-3 é expresso apenas nas fibras musculares do tipo II e o gene ACTN-2, que expressa a  $\alpha$ -actinina-2, é expresso em todas as fibras do músculo esquelético, os dados da literatura reportando elevada frequência do genótipo 577XX, associado à deficiência completa da proteína  $\alpha$ -actinina-3 e ausência de um fenótipo patológico, sugerem que a proteína  $\alpha$ -actinina-3 pode ser funcionalmente redundante em seres humanos (NORTH et al., 1999). Além disso, a elevada proporção de fibras do tipo I em atletas de resistência que expressam ACTN-2, adicionada a uma menor proporção de fibras do tipo II que expressam a mesma proteína, poderia compensar a deficiência de ACTN-3 em fibras do tipo II de indivíduos portadores do genótipo 577XX. Todos estes aspectos poderiam explicar o porquê dos nossos achados não terem encontrado diferenças significativas entre os genótipos da ACTN-3 e os parâmetros bioquímicos analisados neste estudo. Igualmente, eles indicam também que ACTN-3 não pode ser considerado um gene candidato adequado para avaliar o desempenho atlético, pelo menos em esportes de resistência. Por outro lado, o dano muscular pode comprometer o desempenho e as proteínas citosólicas CK e AST estão aumentadas na circulação após o exercício,

o que infere lesão celular e, assim, podem ser utilizadas como marcadores de dano induzido pelo exercício (MIRANDA-VILELA et al., 2012). Desta forma, as respostas significativas para o genótipo XX do gene da ACTN-3, nos resultados de CK, e para o genótipo RX, nos resultados de AST após a suplementação com o óleo de pequi, enfatizam a importância de estudos sobre os efeitos da nutrigenômica no desempenho do atleta.

## 7. CONCLUSÕES

Em resumo e atendendo às expectativas propostas nos objetivos deste trabalho, verificamos que:

- a- Todos os atletas participantes desta pesquisa apresentaram o genótipo selvagem para gene da EPOR.
- b- Os resultados obtidos no teste de EHW indicaram que, para os polimorfismos estudados nos genes da EPO e ACTN-3, a distribuição observada ajustou-se à distribuição esperada. Para o polimorfismo da ACTN-3 (SNPs rs1815739), os resultados das frequências genóticas e alélicas apresentaram padrão de distribuição semelhante ao da população controle europeia branca, conforme dados presentes na literatura, indicando uma maior influência europeia para este polimorfismo em nossa amostra de atletas. Para o gene da EPO (SNPs rs1617640), não foram encontrados, até o momento, dados na literatura relacionando esse polimorfismo à performance atlética, o que indica que nosso trabalho é precursor nesse sentido.
- c- Observou-se que embora muitos desses parâmetros examinados apresentassem diferenças significativas entre os sexos, faixa etária e distância percorrida, nenhuma correlação entre esses parâmetros e os polimorfismos analisados foi encontrada.
- d- Quanto às alterações nos parâmetros do hemograma, marcadores bioquímicos e peroxidação lipídica (teste de Tbars), de acordo com os sexos, faixa etária e distância percorrida de cada atleta, verificou-se que:
  - As diferenças entre os sexos nos resultados das dosagens bioquímicas e do eritrograma foram compatíveis com os valores de referência descritos na literatura como apresentando diferenças entre os gêneros feminino e masculino.
  - Os resultados das dosagens bioquímicas de CK e AST sugeriram que a suplementação com as cápsulas de pequi desempenhou um efeito protetor principalmente para grupos mais jovens e para a distância percorrida de 6-7 Km.

e- Quanto às alterações nos parâmetros do hemograma, marcadores bioquímicos e peroxidação lipídica (teste de Tbars), de acordo com o polimorfismo de cada atleta, verificou-se que:

- Antes do pequi, o polimorfismo da EPO influenciou os resultados do eritrograma e plaquetograma, sugerindo uma vantagem aeróbica para o genótipo TG e uma desvantagem para o genótipo GG com respeito aos possíveis eventos relacionados a complicações microvasculares, enquanto não foi encontrada associação entre o polimorfismo R577X do gene da ACTN-3 e o desempenho de resistência.
- Ambos os polimorfismos influenciaram a resposta dos corredores ao óleo de pequi, sendo que foram observadas respostas significativas para o genótipo TT do gene da EPO, para os valores dos eritrócitos, hematócrito, HCM e CHCM, e para o TG nos valores de RDW. Diferenças significativas foram igualmente observadas no plaquetograma, mas somente para os genótipos TT e TG.
- O polimorfismo da ACTN-3 influenciou principalmente os valores de AST e CK, onde os heterozigotos RX tiveram uma redução significativa nos valores de AST, e os homozigotos XX, nos valores de CK após a suplementação o óleo de pequi, enfatizando a importância de estudos sobre os efeitos da nutrigenômica no desempenho do atleta.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIMOTO, A.; MIRANDA-VILELA, A.; ALVES, P.; PEREIRA, L.; LORDELO, G.; HIRAGI, C.; SILVA, I.; GRISOLIA, C.; KLAUTAU-GUIMARAES, M. Evaluation of gene polymorphisms in exercise-induced oxidative stress and damage. **Free Radic. Res.**, vol. 44, p.322 – 331, 2010.
- ALMEIDA, SP de; SILVA, JA da. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. **Planaltina: Embrapa-CPAC**, 1994.
- ALMEIDA, SP de; SANO, S. M.; ALMEIDA, SP de. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. **SANO, SM & ALMEIDA, SP Cerrado: Ambiente e Flora. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados**, 1998.
- ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M.S.; GUIMARÃES, P.E.M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H.J.; PENA, S.D.J.; PRADO,V.F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, vol. 67, p.444-461, 2000.
- American College of Physicians. A primer on Before-After studies: evaluating a report of a “successful” intervention. **Eff. Clin. Pract.**, 2002; 5(2): 100–101. Disponível em: <[http://www.acponline.org/clinical\\_information/journals\\_publications/ecp/marapr02/primer\\_before\\_after.pdf](http://www.acponline.org/clinical_information/journals_publications/ecp/marapr02/primer_before_after.pdf)>. Acesso em 20/01/2013.
- ANDRADE JUNIOR, Dahir Ramos de; SOUZA, Rodrigo Becco de; SANTOS, Sânia Alves dos e ANDRADE, Dahir Ramos de. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. bras. pneumol.**, São Paulo, vol. 31, n. 1, fev. 2005 .
- ARAÚJO, Fernando Dantas. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae)—an economically valuable species of the central Brazilian cerrados. **Economic Botany**, vol. 49, n. 1, p. 40-48, 1995.
- ARCASOY, MURAT O.; DEGAR, BARBARA A.; HARRIS, KEVIN W.; FORGET, BERNARD G. Erythropoietin Receptor Gene. **Blood**, vol. 89, n. 12, p.4628-4635, 1997.
- ARTIOLI, G. G.; HIRATA, R. D. C.; LANCHA JUNIOR, A. H. Terapia gênica, doping genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro. **Rev. Bras. Med. Esporte**, vol. 13, n. 5, p. 349–354, 2007.

BANFI, Giuseppe; COLOMBINI, A.; LOMBARDI, G.; LUBKOWSKA, A. Metabolic markers in sports medicine. **Advances in clinical chemistry**, vol. 56, p. 2, 2012.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, vol. 29, n. 1, p. 113-123 2006.

BARBOSA, T.M.; MAGALHÃES, P.M.; LOPES, V.P.; NEUPARTH, M.; DUARTE, J.A. Comparação da Variação da Actividade Neuromuscular, da Creatina Quinase e da Força Isométrica Máxima Voluntária Entre Dois Protocolos Exaustivos e Inabituais. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, vol. 3, n. 1, 2003

BEIGUELMAN, Bernardo. **Genética de Populações Humanas**. Ribeirão Preto: SBG, 2008. 61p.

BENTO, R. M. A., DAMASCENO, L. M. P.; NETO, F.R.A. Eritropoetina humana recombinante no esporte: uma revisão. **Rev. Bras. Med. Esporte**, vol. 9, n .3, p. 169-180, 2003.

BERMAN, Y.; NORTH, K.N. A Gene for Speed: The Emerging Role of  $\alpha$ -Actinin-3 in Muscle Metabolism. **Physiology**, vol. 25, p.250–259, 2010.

BEUNEN, G.; THOMIS, M. Genetic determinants of sports participation and daily physical activity. **Int. J. Obesity.**, vol. 23, suppl. 3, S55–S63, 1999.

BHATTI, R.; SHAIKH, D.M. The effect of exercise on blood parameters. **Pak. J. Physiol.**, vol. 3, p. 42–44, 2007.

BLUM, Shany; BLUM, S.; AVIRAM, M.; BEN-AMOTZ, A.; LEVY, Y. Effect of a Mediterranean meal on postprandial carotenoids, paraoxonase activity and C-reactive protein levels. **Annals of nutrition and metabolism**, vol. 50, n. 1, p. 20-24, 2006.

BONILLA, J.F.; NARVÁEZ, R.; CHUAIRE, L. Sports as a cause of oxidative stress and hemolysis. **Colomb. Med.**, vol. 36, p. 281-286, 2005.

BOUCHARD, C.; LEON, A. S.; RAO, D. C.; SKINNER, J. S.; WILMORE, J. H.; GAGNON, J. The HERITAGE family study. Aims, design, and measurement protocol. **Med. Sci. Sports Exerc.**, vol. 27, n. 5, p. 721–729, 1995.

BRANCACCIO, Paola; MAFFULLI, Nicola; LIMONGELLI, Francesco Mario. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **British Medical Bulletin**, vol. 81, n. 1, p. 209-230, 2007.

BURDGE, Graham C.; HOILE, Samuel P.; LILLYCROP, Karen A. Epigenetics: are there implications for personalised nutrition?. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, vol. 15, n. 5, p. 442-447, 2012.

CALO, M. C.; VONA, Giuseppe. Gene polymorphisms and elite athletic performance. **J. Anthropol Sci**, vol. 86, p. 113-131, 2008.

CALLEGARI-JACQUES, Sidia M. **Bioestatística – Princípios e Aplicações**. Porto Alegre/RS: Artmed Editora S.A., 2003. 255 p.

CARDOSO, Leandro de Moraes; REIS, Bárbara De Lazzari; HAMACEK, Fabiana Rossi; PINHEIRO SANT'ANA, Helena Maria. Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) from the Brazilian Savannah. **Fruits**, 2013, vol. 68, p. 3–14

CARLSON, D. L.; MAWDSLEY, R. H. Sports anemia: A review of the literature. **Am. J. Sports Med.**, vol. 14, p.109-112, 1986.

CARVALHO, Graciana Souza Lordelo de. **Polimorfismo nos genes MTHFR, Glutathione S-transferase (GST) e Haptoglobina (HP) e sua relação na ocorrência da Leucemia Mielóide Crônica (LMC)**. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília. 2011.

CHEN, Chiao-nan Joyce; BROWN-BORG, H. M., RAKOCZY, S. G.; THOMPSON, L. V. . Muscle disuse: adaptation of antioxidant systems is age dependent. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, vol. 63, n. 5, p. 461-466, 2008.

CLARKSON, P.M.; DEVANEY, J.M.; GORDISH-DRESSMAN, H.; THOMPSON, P.D.; HUBAL, M.J.; URSO, M.; PRICE, T.B.; ANGELOPOULOS, T.J.; GORDON, P.M.; MOYNA, N.M.; PESCATELLO, L.S.; VISICH, P.S.; ZOELLER, R.F.; SEIP, R.L.; HOFFMAN, E.P. ACTN3 genotype is associated with increases in muscle strength in response to resistance training in women. **J. Appl. Physiol.**, vol. 99, p. 154-163, 2005.

CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; BORGES, M. C.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Rev. Bras. Med. Esp.**, vol. 13, n. 5, p. 336-342, 2007.

DE LA CHAPELLE, A.D.L.; TRASKELIN, A.L.; JUVONEN, E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol. 90, p. 4495-4499, 1993..

DE ROSE, E. H.; AQUINO NETO, F. R.; MOREAU, R. L. M.; CASTRO, R. R. T. Controle antidoping no Brasil: resultados do ano de 2003 e atividades de prevenção. **Rev. Bras. Med. Esporte**, vol. 10, ed. 4, p. 289-293, 2004.

DESGORGES F.D.; TESTA, M.; PETIBOIS, C. Training-level induced changes in blood parameters response to on-water rowing races. **J. Sports Sci. Med.**, vol. 7, p.425–430, 2008.

DIAS, R. G.; PEREIRA, A. C.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, J. E. Polimorfismos genéticos determinantes da performance física em atletas de elite. **Rev. Bras. Med. Esporte**, vol. 13, ed. 3, p. 209–216, 2007.

DOURADO, A. C. **Monitoração de adaptações antropométricas, motoras e modelação da estrutura do desempenho esportivo de atletas de voleibol durante período de preparação.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Educação Física. Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Porto Alegre, BR-RS, 2007. Disponível em <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/14411>> Acesso em 24/11/2011.

DRUZHEVSKAYA, A. M.; AHMETOV, I. I.; ASTRATENKOVA, I. V.; ROGOZKIN, V. A. Association of the ACTN3 R577X polymorphism with power athlete status in Russians. **Eur. J. Appl. Physiol.**, vol. 103, ed. 6, p.631-4, 2008.

EICHNER, E.R. Sports anemia. In: Safran, M.R.; McKeag, D.; Van Camp SP (eds). Manual of Sports Medicine. **Lippin-cott-Raven Publishers**, p. 255-259, 1998.

ELLIOTT, S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 154, p. 529-541, 2008.

EYNON, N.; DUARTE, J.A.; OLIVEIRA, J.; SAGIV, M.; YAMIN, C.; MECKEL, Y.; SAGIV, M.; GOLDHAMMER, E. ACTN3 R577X polymorphism and Israeli top-level athletes. **Int. J. Sports Med.**, vol. 30, p. 695-698, 2009.

EYNON, N.; RUIZ, J.R.; MECKEL, Y.; SANTIAGO, C.; FIUZA-LUCES, C.; GÓMEZ-GALLEGO, F.; OLIVEIRA, J.; LUCIA, A. Genes and elite athletes: a roadmap for future research. **J. Physiol.**, vol. 589, n.13, p.3063–3070, 2011.

FERREIRA, Filipe; FERREIRA, Rita; DUARTE, José Alberto. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. **Revista Portuguesa de ciências do desporto**, vol. 7, n. 2, p. 257-275, 2007.

FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R. J.; Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. **Dyn Med.**, vol.8: pp.1, 2009.

FLEGAR-MEŠTRIĆ, Zlata; NAZOR, Aida; JAGARINEC, Nada. Haematological profile in healthy urban population (8 to 70 years of age). **Collegium antropologicum**, vol. 24, n. 1, p. 185-196, 2000.

FOSCHINI, D.; PRESTES, J.; LEITE, R. D.; LEITE, G. S.; DONATTO, F. F.; URTADO, C. B.; RAMALLO, B. T. Respostas hormonais, imunológicas e enzimáticas agudas a uma partida de basquetebol. **Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum.**, vol. 10, n. 4, p.341–346, 2008.

FREIRE, Livia Maria Dias; SODRÉ, Fábio Lima; OLIVEIRA, Rogério Antônio de; CASTILHO, Lucia Nassi; FARIA, Eliana Cotta de. Controle de qualidade laboratorial pré-analítico: avaliação de solicitações médicas de exames bioquímicos no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil/ Pre-analytical laboratory quality control: evaluation of medical requests for biochemical laboratory exams in the University of Campinas State University Hospital, São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. Anal. Clin.**; vol. 40, n. 2, p.143-145, 2008.

GHORAYEB, N.; BATLOUNI, M.; PINTO, I. M. F.; DIOGUARDI, G. S. Hipertrofia ventricular esquerda do atleta: resposta adaptativa fisiológica do coração. **Arq. Bras. Cardiol**, vol. 85, n. 3, p. 191–197, 2005.

GILL, Jason MR; HARDMAN, Adrienne E. Postprandial lipemia: effects of exercise and restriction of energy intake compared. **The American journal of clinical nutrition**, vol. 71, n. 2, p. 465-471, 2000.

GOEL, Himanshu; MITTAL, Balraj. ACTN3: Athlete gene prevalence in North India. **Current Science**, vol. 92, n. 1, p.10, 2007.

GÓMEZ-GALLEGO, F.; SANTIAGO, C.; GONZÁLEZ-FREIRE, M.; MUNIESA, C.A.; FERNÁNDEZ DEL VALLE, M.; PÉREZ, M.; FOSTER, C.; LUCIA, A. Endurance Performance: Genes or Gene Combinations? **Int. J. Sports Med.**, vol. 30, p. 66-72, 2009.

HERMES-LIMA, M. (2004). **Oxygen in biology and biochemistry**: Role of free radicals. In: Storey KB (ed) *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, New Jersey, pp. 319-368.

HOOGENDOORN, B.; COLEMAN, S. L.; GUY, C. A.; SMITH, K.; BOWEN, T.; BUCKLAND, P. R. O'DONOVAN MC. Functional analysis of human promoter polymorphisms. **Hum. Mol. Genet.**, vol. 12, n. 18, p. 2249-54, 2003.

JELKMANN, Wolfgang. Regulation of erythropoietin production. **The Journal of Physiology**, vol. 589 (Pt 6), p.1251–1258, 2011.

Jl, Li Li; LEICHTWEIS, Steve. Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. **Age**, vol. 20, n. 2, p. 91-106, 1997.

JUDGE, Sharon; LEEUWENBURGH, Christiaan. Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, vol. 292, n. 6, p. C1983-C1992, 2007.

JUVONEN, E.; IKKALA, E.; FYHRQUIST, F.; RUUTU, T. Autosomal dominant erythrocytosis caused by increased sensitivity to erythropoietin. **Blood**, vol.78, p. 3066-3069, 1991.

KASAPIS, Christos; THOMPSON, Paul D. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 45, n. 10, p. 1563-1569, 2005.

KARAGÖZ, B.; ALACACIOĞLU, A.; BILGI, O.; DEMIRCI, H.; ÖZGÜN, A.; ERIKÇI, A.A.; SAYAN, O.; YILMAZ, B.; KANDEMİR, E.G. Platelet count and platelet distribution width increase in lung cancer patients. **Anatol. J. Clin. Investig.**, vol. 3, p. 32-34, 2009.

KARGOTICH, S.; GOODMAN, C.; KEAST, D.; MORTON, A. R. The influence of exercise-induced plasma volume changes on the interpretation of biochemical parameters used for monitoring exercise, training and sport. **Sports Medicine**, vol. 26, n. 2, p. 101-117, 1998.

KRALOVICS, R.; INDRAK, K.; STOPKA, T.; BERMAN, B. W.; PRCHAL, J. F.; PRCHAL, J. T. Two new EPO receptor mutations: truncated EPO receptors are most frequently associated with primary familial and congenital. **Blood**, vol. 90, n. 5, p 2057-2061, 1997.

KRALOVICS, R., SOKOL, L., PRCHAL, J. T. Absence of polycythemia in a child with a unique erythropoietin receptor mutation in a family with autosomal dominant primary polycythemia. **J. Clin. Invest.**, vol. 102, p. 124-129, 1998.

LAC, G.; MASO, F. Biological markers for the follow-up of athletes throughout the training season. **Pathol. Biol.**, vol. 52, n. 1, p. 43–9, 2004.

LE COUEDIC, J.-P.; MITJAVILA, M.-T.; VILLEVAL, J.-L.; FEGER, F.; GOBERT, S.; MAYEUX, P.; CASADEVALL, N.; VAINCHENKER, W. Missense mutation of the erythropoietin receptor is a rare event in human erythroid malignancies. **Blood**, vol. 87, p. 1502-1511, 1996.

LEANDRO, C.; NASCIMENTO, E.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; DUARTE, J.A.; DE-CASTRO, C.M.M.B. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. **Rev. Port. Cien. Desp.**, vol. 2, p. 80–90, 2002.

Leite, G. L., Von dos S Veloso, R., Zanuncio, J. C., Fernandes, L. A., & Almeida, C. Phenology of *Caryocar brasiliense* in the Brazilian cerrado region. **Forest ecology and management**, vol. 236, n. 2, p. 286-294, 2006.

LEK, M.; NORTH, K.N. Are biological sensors modulated by their structural scaffolds? The role of the structural muscle proteins alpha-actinin-2 and alpha-actinin-3 as modulators of biological sensors. **FEBS Lett.**, vol. 584, n. 14, p. 2974-80, 2010.

LIMA, Émersom Silva; ABDALLA, Dulcinéia Saes Parra. Peroxidação Lipídica: Mecanismos e Avaliação em Amostras Biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 37, n. 3, set/dez 2001.

LIMA, Alessandro de; SILVA, Ana Mara de Oliveira; TRINDADE, Reginaldo Almeida; TORRES, Rosângela Pavan; MANCINI-FILHO, Jorge. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, vol. 29, n. 3, 2007.

LIPPI, G. Genomics and Sports: Building a Bridge Towards a Rational and Personalized Training Framework. **Int. J. Sports Med.**, vol. 29, p. 264–265, 2008.

LIPPI, G.; LONGO, U. G.; MAFFULLI, N. Genetics and sports. **Brit. Med. Bull.**, vol. 93, n. 1, p. 27-47, 2010.

LÓPEZ, S.; BERMÚDEZ, B.; PACHECO, Y. M.; LÓPEZ-LLUCH, G.; MOREDA, W.; VILLAR, J.; MURIANA, F. J. Dietary oleic and palmitic acids modulate the ratio of triacylglycerols to cholesterol in postprandial triacylglycerol-rich lipoproteins in men and cell viability and cycling in human monocytes. **The Journal of nutrition**, vol. 137, n. 9, p. 1999-2005, 2007.

LORDELO, G.,S.; MIRANDA-VILELA, A. L.; AKIMOTO, A.,K.; ALVES, P.C.,Z.; HIRAGI, C. O.; NONINO, A.; DALDEGAN, M. B.; KLAUTAU-GUIMARAES, M.N.; GRISOLIA, C.K. Association between methylene tetrahydrofolatereductase and glutathione S-transferase M1 gene polymorphisms and chronic myeloid leukemia in a Brazilian population. **Genet. Mol. Res.**, vol.11, p.1013-1026, 2012.

MA, W.; KANTARJIAN, H.; ZHANG, K.; ZHANG, X.; WANG, X.; CHEN, C.; DONAHUE, A.C.; ZHANG, Z.; YEH, C.H; O'BRIEN, S; GARCIA-MANERO, G.; CAPORASO, N.; LANDGREN, O.; ALBITAR, M. Significant association between polymorphism of the erythropoietin gene promoter and myelodysplastic syndrome. **BMC Med. Genet.**, vol. 11, p. 16, 2010.

MACARTHUR, D. G.; NORTH, K. N. A gene for speed? The evolution and function of alpha-actinin-3. **Bioassays**, vol. 26, p. 786–795, 2004.

MAC ARTHUR, D. G.; NORTH, K. N. Genes and human elite athletic performance. **Hum. Genet.**, vol. 116, p. 331-339, 2005.

MANN, H. B.; WHITNEY, D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. **Ann. Math. Statist.**, vol. 18, p. 50-60, 1947.

MARIANO, RENATA GOMES DE BRITO; COURI, SONIA; FREITAS, SUELY PEREIRA. Enzymatic Technology to Improve Oil Extraction from *Caryocar brasiliense* Camb (pequi) pulp. **Rev. Bras. Frutic.**, vol. 31, n. 3, p. 637-643, 2009.

MASSIDDA, M.; VONA, G.; CALÒ, C.M. Association between the ACTN3 R577X polymorphism and artistic gymnastic performance in Italy. **Genet. Test Mol. Biomarkers**, vol. 13, p. 377-380, 2009.

MATTUSCH, F.; DUFAUX, B.; HEINE, O.; MERTENS, I.; ROST, R. Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. *International journal of sports medicine*, vol. 21, n. 01, p. 21-24, 2000.

MEADS, C.A.; DAVENPORT, C.F. Quality assessment of diagnostic before-after studies: development of methodology in the context of a systematic review. **BMC Medical Research Methodology**, vol. 9, p. 3, 2009.

MERCER, Kelly W.; DENSMORE, John J. Hematologic disorders in the athlete. **Clin Sports Med**, vol. 24, n. 3, p. 599-621, 2005.

MILLS, M.; YANG, N.; WEINBERGER, R.; VANDER WOUDE, D.L.; BEGGS A.H., EASTEAL, S., NORTH, K. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-

actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. **Hum. Mol. Genet.**, vol. 10, n. 13, p. 1335-46, 2001.

MIOT, H.A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **J. Vasc. Bras.**, 2011; vol. 10, n. 4, p. 275–278, 2011.

MIRANDA-VILELA, A.L.; RESCK, I.S.; GRISOLIA, C.K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genet. Mol. Biol.**, vol. 31, no. 4, 2008.

MIRANDA-VILELA, A.L. **Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília/Brasil, 2009. Disponível em: <<http://repositorio.bce.unb.br/handle/10482/3900>> Acesso em 29/04/2010.

MIRANDA-VILELA, A.L.; RESCK, I.S.; MENDONÇA, M.A.; GRISOLIA, C.K. Characterization of the major nutritional components of *Caryocar brasiliense* fruit pulp by NMR spectroscopy. **Quím. Nova**, vol. 39, p. 2310-2313, 2009a.

MIRANDA-VILELA, A.L.; AKIMOTO, A.K.; ALVES, P.C.; PEREIRA, L.C.; GONCALVES, C.A.; KLAUTAU-GUIMARAES, M.N.; GRISOLIA, C.K. Dietary carotenoid-rich pequi oil reduces plasma lipid peroxidation and DNA damage in runners and evidence for an association with MnSOD genetic variant -Val9Ala. **Genet. Mol. Res.**, vol. 8, p. 1481-1495, dez. 2009b.

MIRANDA-VILELA, AL.; PEREIRA, L.C.; GONCALVES, C.A.; GRISOLIA, C.K. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. **Nutr. Res.**, vol. 29; p. 850–858, out. 2009c.

MIRANDA-VILELA, A.L.; LORDELO, G.S.; AKIMOTO, A.K.; ALVES, P.C.; PEREIRA, L.C.; KLAUTAU-GUIMARAES MDE, N.; GRISOLIA, C.K. Genetic polymorphisms influence runners' responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.): a before-after study. **Genes Nutr.**, vol. 6, p. 369-395, abr. 2011a.

MIRANDA-VILELA, ANA LUISA; ZAIDAN-ALVES, PENHA CRISTINA; AKIMOTO, ARTHUR K.; LORDELO, GRACIANA S.; KLAUTAU-GUIMARÃES, MARIA DE NAZARÉ; GRISOLIA, CESAR K. Under Increased Hydrogen Peroxide Conditions, the Antioxidant Effects of Pequi Oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) to Decrease DNA Damage in Runners are Influenced by

Sex, Age and Oxidative Stress-related Genetic Polymorphisms. **Free Radic. Antiox.**, vol. 1, p. 27-39, 2011b.

MIRANDA-VILELA, Ana Luisa. Exercise, Injuries and Athlete Performance. In: João H. Bastos and Andreia C. Silva. (Org.). **Athlete Performance and Injuries**, vol. 1, p. 1-50, 2012.

MIRANDA-VILELA, A.L.; AKIMOTO, A.K.; LORDELO, G.S.; PEREIRA, L.C.; GRISOLIA, C.K.; KLAUTAU-GUIMARAES MDE, N. Creatine kinase MM TaqI and methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene polymorphisms influence exercise-induced C-reactive protein levels. **Eur. J. Appl. Physiol.**, vol. 112, p. 941-950, 2012.

MORAN, C. N.; YANG, N.; BAILEY, M.E.S.; TSIOKANOS, A.; JAMURTAS, A.; MACARTHUR, D.; NORTH, KN; PITSILADIS, Y.P.; WILSON, R.H. Association analysis of the ACTN3 R577X polymorphism and complex quantitative body composition and performance phenotypes in adolescent Greeks. **Eur. J. Human. Genet.**, vol.15, p. 88 –93, 2007.

MOUGIOS, Vassilis. Reference intervals for serum creatine kinase in athletes. **Br. J. Sports Med.**, vol. 41, p.674-678, 2007.

National Center for Biotechnology Information. **Online Mendelian Inheritance in Man: OMIM \*133170 Erythropoietin**; National Library of Medicine, USA, 2012. Disponível em: <[http://www. http://omim.org/entry/133170](http://www.omim.org/entry/133170)>. Acesso em 9 de dezembro de 2012.

NIEMI, A-K; MAJAMAA, K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite enduranceandsprintathletes.**Eur. J. Hum. Genet.**, vol.13, p. 965-969, 2005.

NORTH, KN; YANG, N.; WATTANASIRICHAIGOON, D.; MILLS, M.; EASTEAL, S.;Beggs, A.H. A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population. **Nat. Genet.**, vol. 21, n. 4, p. 353-4, 1999.

OGUNSHOLA, O. O.; DJONOV, V.; STAUDT, R.; VOGEL, J.; GASSMANN, M. Chronic excessive erythrocytosis induces endothelial activation and damage in mouse brain. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, vol. 290, n. 3, p. R678-R684, 2006.

OLIVEIRA, Maria Neudes Sousa de; GUSMÃO, Eduardo; LOPES, Paulo Sérgio Nascimento; SIMÕES, Maria Olívia Mercadante; RIBEIRO, Leonardo Monteiro; DIAS, Bruna

Anair Souto. Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, vol. 28, n. 3, Dec. 2006 .

OSTRANDER, E.A.; HUSON, H.J.; OSTRANDER, G.K. Genetics of Athletic Performance Genetics of Athletic. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, vol. 10: 407-429.

PAPARINI, A.; RIPANI, M.; GIORDANO, G.D.; SANTONI, D.; PIGOZZI, F.; ROMANO-SPICA V. ACTN3 genotyping by real-time PCR in the Italian population and athletes. **Med. Sci. Sports Exerc.**, vol. 39, n. 5, p .810-5, 2007.

PARDOS, C. L.; GALLEGO, V. P.; MAYOR, M. J. R.; MARTÍN, A. V. Doping sanguíneo e eritropoetina. **Rev. Bras. Med. Esporte**, vol. 5, n. 1, p. 27–30, 1999.

PERCY, M. J.; MCMULLIN, M. F.; ROQUES, A. W. W.; WESTWOOD, N. B.; ACHARYA, J.; HUGHES, A. E.; LAPPIN, T. R. J.; PEARSON, T. C. Erythrocytosis due to a mutation in the erythropoietin receptor gene. **British journal of haematology**, vol. 100, n. 2, p. 407-410, 1998.

PETIBOIS, C.; DÉLÉRIS, G. Erythrocyte adaptation to oxidative stress in endurance training. **Arch. Med. Res.**, vol. 36, p.524-531, 2005.

PLUNKETT BA, CALLISTER R, WATSON TA, GARG ML. Dietary antioxidantrestriction affects the inflammatory response in athletes. **British Journal of Nutrition**, vol.103, p.1179–1184, 2010.

POPOV, AF; SCHULZ, E.G.; SCHMITTO, J.D.; COSKUN, K.O.; TZVETKOV, M.V.; KAZMAIER, S.; ZIMMERMANN, J.; SCHÖNDUBE, F.A.; QUINTEL, M.; HINZ, J. Relation between renal dysfunction requiring renal replacement therapy and promoter polymorphism of the erythropoietin gene in cardiac surgery. **Artif. Organs.**, vol. 34, p. 961-8, 2010.

PRCHAL, J. T., CRIST, W. M., GOLDWASSER, E., PERRINE, G., PRCHAL, J. F. Autosomaldominantpolycythemia. **Blood**, vol. 66, p. 1208-1214, 1985.

RADAK, Zsolt; KUMAGAI, S., NAKAMOTO, H.; GOTO, S. 8-Oxoguanosine and uracil repair of nuclear and mitochondrial DNA in red and white skeletal muscle of exercise-trained old rats. *Journal of applied physiology*, vol. 102, n. 4, p. 1696-1701, 2007.

RAMALHO, V.C., JORGE, N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Quim. Nova**, vol. 29, n. 4, p.755-760, 2006.

REY, A.I.; KERRY, J.P.; LYNCH, P.B.; LÓPEZ-BOTE, C.J.; BUCKLEY, D.J.; MORRISSEY, P.A. Effect of dietary oils and alpha-tocopheryl acetate supplementation on lipid (TBARS) and cholesterol oxidation in cooked pork. **J. Anim.Sci.**, vol. 79, n. 5, p. 1201-8, 2001.

RIFAI, Nader; RIDKER, Paul M. Population Distributions of C-reactive Protein in Apparently Healthy Men and Women in the United States: Implication for Clinical Interpretation. **Clinical Chemistry**, vol. 49, n. 4, 2003.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of Caryocarbrasiliense (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, vol. 110, p.711–717, 2008.

SCHOENFELDER, M. Genetics-based performance talent research: polymorphisms as predictors of endurance performance. **J. Appl. Physiol.**, vol. 108, p. 1454-1455, 2010.

SCHUMANN, G.; KLAUKE, R. New IFCC reference procedures for the determination of catalytic activity concentrations of five enzymes in serum: preliminary upper reference limits obtained in hospitalized subjects. **Clin. Chim. Acta.**, vol. 327, n. 1-2, p. 69-79, 2003.

SEMENZA, G. L.; NEJFELT, M. K.; CHI, S. M.; ANTONARAKIS, S. E. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol.88, p. 5680–5684, 1991.

SHASKEY, D.J.; GREEN, G.A. Sports haematology. **Sports Med.**, vol. 29, ed. 1, p. 27-38, 2000.

SIES, Helmut. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, vol. 215, n. 2, p. 213-219, 2005.

SILVA, D. B; JUNQUEIRA, N. T. V.; SILVA, J. A.; PEREIRA, A. V.; SALVIANO, A.; JUNQUEIRA, G. D. Avaliação do potencial de produção do "pequizeiro-anão" sob condições naturais na região sul do estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 23, n. 3, p. 726-729, 2001.

SKINNER, J. S. **Será que a genética determina o campeão? Gatorade Sports Science Institute Sports Science.** Exchange, 34. 2002. Disponível em <<http://www.gssi.com.br/artigo/77/sse-34-sera-que-a-genetica-determina-o-campeao>> Acesso em 29 de abril de 2010.

SMITH, D. J. A framework for understanding the training process leading TO ELITE PERFORMANCE. **Sports Med.**, vol.33, n. 15, p. 1103–26, 2003.

SOKOL, L., LUHOVY, M., GUAN, Y., PRCHAL, J. F., SEMENZA, G. L., PRCHAL, J. T. Primary familial polycythemia: a frameshift mutation in the erythropoietin receptor gene and increased sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin. **Blood**, vol. 86, p. 15-22, 1995.

SUREDA, A.; TAULER, P.; AGUILÓ, A.; CASES, N.; FUENTESPINA, E.; CÓRDOVA, A.; TUR, J.A.; PONS, A. Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. **Free Radic. Res.**, vol 39, p. 1317-1324, 2005.

SZKANDERA, J.; ABSENGER, G.; STOTZ, M.; WEISSMUELLER, M.; WINDER, T.; LANGSENLEHN, T.; SAMONIGG, H.; RENNER, W.; SCHIPPINGER, W.; GERGER, A. The functional polymorphism of erythropoietin gene rs1617640 G>T is not associated with susceptibility and clinical outcome of early-stage breast cancer. **Anticancer Res.**, vol. 32, n. 8, p. 3473-8, 2012.

TONG, Z.; YANG, Z.; PATEL, S.; CHEN, H.; GIBBS, D.; YANG, X.; HAU, V. S.; KAMINOH, Y.; HARMON, J.; PEARSON, E.; BUEHLER, J.; CHEN, Y.; YU, B.; TINKHAM, N. H.; ZABRISKIE, N. A.; ZENG, J.; LUO, L.; SUN, J. K.; PRAKASH, M.; HAMAM, R. N.; TONNA, S.; CONSTANTINE, R.; RONQUILLO, C. C.; SADDA, S.; AVERY, R. L.; BRAND, J. M.; LONDON, N.; ANDUZE, A. L.; KING, G. L.; BERNSTEIN, P. S.; WATKINS, S.; GENETICS OF DIABETES AND DIABETIC COMPLICATION STUDY GROUP; JORDE, L. B.; LI, D. Y.; AIELLO, L. P.; POLLAK, M. R.; ZHANG K. Promoter polymorphism of the erythropoietin gene in severe diabetic eye and kidney complications. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, vol. 105, p. 6998-7003, 2008.

TRABER, Maret G. Relationship of vitamin E metabolism and oxidation in exercising human subjects. **Br. J. Nutr.**, vol. 96, n. Suppl 1, p. S34-S37, 2006.

URSO, Maria L.; CLARKSON, Priscilla M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, vol. 189, n. 1, p. 41-54, 2003.

VAGDATLI, E.; GOUNARI, E.; LAZARIDOU, E.; KATSIBOURLIA, E.; TSIKOPOULOU, F.; LABRIANOU, I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. **Hippokratia**, v. 14, n. 1, p. 28, 2010.

VALE, Ailton Teixeira do; FELFILI, Jeanine Maria. Dry biomass distribution in a cerradosensustricto site in Brazil central. **Rev. Árvore**, Viçosa, vol. 29, n. 5, 2005.

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima; GOULART, Marília Oliveira Fonseca; MOURA, José Benedito de França; MANFREDINI, Vanusa, BENFATO, Mara da Silveira, KUBOTA, Lauro

Tatsuo. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, São Paulo, vol. 30, n. 5, 2007.

VATANSEV, H.; ÇAKMAKÇI, E. The effects of 8-week aerobic exercises on the blood lipid and body composition of the overweight and obese females. **Science, Movement and Health**, Issue 2; p. 814–820, 2010.

WATOWICH, S. S., XIE, X., KLINGMULLER, U., KERE, J., LINDLOF, M., BERGLUND, S., DE LA CHAPELLE, A. Erythropoietin receptor mutations associated with familial erythrocytosis cause hypersensitivity to erythropoietin in the heterozygous state. **Blood**, vol. 94, p. 2530-2532, 1999.

WATSON TA, CALLISTER R, TAYLOR RD, SIBBRITT DW, MACDONALD-WICKS LK, GARG ML. Antioxidant Restriction and Oxidative Stress in Short-Duration Exhaustive Exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, vol. 37, n. 1, p. 63–71, 2005.

YANG, N.; MACARTHUR, D.G.; WOLDE, B.; ONYWERA, V.O.; BOIT, M.K.; LAU, S.Y.; WILSON, R.H.; SCOTT, R.A.; PITSILADIS, Y.P.; NORTH, K. The ACTN3 R577X polymorphism in East and West African athletes. **Med. Sci. Sports Exerc.**, vol. 39, p.1985-1988, 2007.

YANG, Nan ; MACARTHUR, Daniel G. ; GULBIN, Jason P. ;HAHN, AllanG. ;BEGGS, Alan H.;EASTEAL, Simon ;NORTH, Kathryn.*ACTN3* Genotype Is Associated with Human Elite Athletic Performance. **Am. J. Hum. Genet.**, vol. 73, n.3, p. 627–631, 2003.

YNGVADOTTIR, B.; XUE, Y.; SEARLE, S.; HUNT, S.; DELGADO, M.; MORRISON, J.; WHITTAKER, P.; DELOUKAS, P.; TYLER-SMITH, C. A genome-wide survey of the prevalence and evolutionary forces acting on human nonsense SNPs. **Am. J. Hum. Genet.**, Feb; vol. 84, ed. 2, p. 224-34, 2009.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia** - Fundamentos e Prática; Athene: São Paulo, Brasil, 2004; p. 1081.

ZHOU, D. Q.; HU, Y.; LIU, G.; GONG, L.; XI, Y.; WEN, L. Muscle-specific creatine kinase gene polymorphism and running economy responses to an 18-week 5000-m training programme. **Br. J. Sports Med.**, vol. 40, p.988-991, 2006.

