



**Instituto de Biologia do Exército**

Divisão de Ensino e Pesquisa

RACHEL DE SOUSA AUGUSTO GOUVEIA

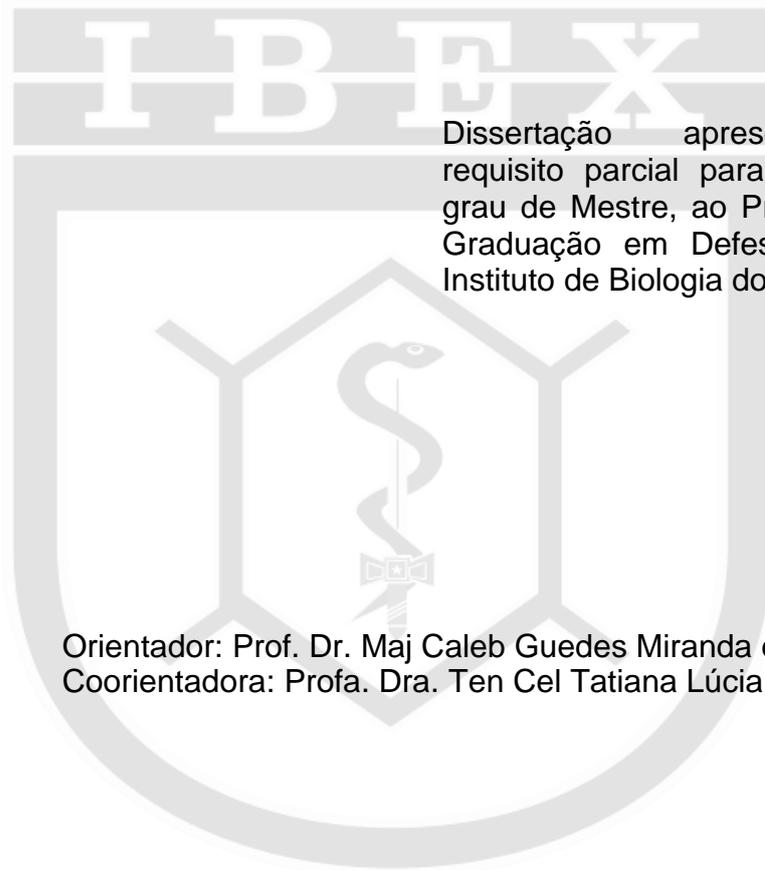
**BIOMARCADORES RELACIONADOS A LESÃO MUSCULAR INDUZIDA POR  
EXERCÍCIO E AVALIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO GENE *ACTN3*  
EM MILITARES DO EXÉRCITO**

Rio de Janeiro

2023

Maj RACHEL DE SOUSA AUGUSTO GOUVEIA

**BIOMARCADORES RELACIONADOS A LESÃO MUSCULAR INDUZIDA POR  
EXERCÍCIO E AVALIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO GENE *ACTN3*  
EM MILITARES DO EXÉRCITO**



Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Defesa Biológica, do Instituto de Biologia do Exército.

Orientador: Prof. Dr. Maj Caleb Guedes Miranda dos Santos  
Coorientadora: Profa. Dra. Ten Cel Tatiana Lúcia Santos Nogueira

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO

G719 Gouveia, Rachel de Sousa Augusto.

Biomarcadores relacionados a lesão muscular induzida por exercício e avaliação dos genótipos do gene ACTN3 em militares do Exército / Rachel de Sousa Augusto Gouveia. – Rio de Janeiro, 2023.  
71f.

Orientador (a): Prof. Dr. Caleb Guedes Miranda dos Santos - Maj  
Coorientador: Prof. Dra. Tatiana Lúcia Nogueira de Sá – Ten Cel

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia do Exército, Divisão de Ensino e Pesquisa, Pós-Graduação em Defesa Biológica, 2023.

Referências: f. 62-68.

1. LESÃO MUSCULAR. 2. EXERCÍCIO FÍSICO. 3. BIOMARCADORES. I. Prof. Dr. Caleb Guedes Miranda dos Santos - Maj (Orientador). II. Instituto de Biologia do Exército. III. Título.

CDD 611.7

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial deste trabalho.

---

Assinatura

---

Data

RACHEL DE SOUSA AUGUSTO GOUVEIA

Maj RACHEL DE SOUSA AUGUSTO GOUVEIA

**BIOMARCADORES RELACIONADOS A LESÃO MUSCULAR INDUZIDA POR  
EXERCÍCIO E AVALIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO GENE ACTN3  
EM MILITARES DO EXÉRCITO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Defesa Biológica, do Instituto de Biologia do Exército.

Data de Aprovação:

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Caleb Guedes Miranda dos Santos – Maj  
Instituto de Biologia do Exército – IBEX  
Presidente/Orientador

---

Prof. Dr. Márcio da Costa Cipitelli – 1º Ten  
Instituto de Biologia do Exército – IBEX  
Membro

---

Prof. Dr. Diego Viana Gomes  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Membro

Rio de Janeiro  
2023

## DEDICATÓRIA

A Deus, pela dádiva da vida, por me incluir em seus planos e me presentear com uma mãe de coração humilde, generoso e íntegro.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer a cada dificuldade, por renovar a minha fé e pelos suprimentos de paz e tranquilidade.

À minha mãe, Elma de Sousa, todo o meu reconhecimento e gratidão por seu amor incondicional e infinita paciência e por dedicar a sua vida em me proporcionar não apenas conhecimento e oportunidades, mas também valores e virtudes.

À minha querida avó (*in memoriam*), Genny Gomes, por todo o amor até hoje presente em minhas lembranças.

Ao meu marido, Luiz Otávio, por se manter amável mesmo em meio às tempestades e nas minhas ausências e pelo auxílio nas tarefas diárias enquanto eu me dedicava ao projeto de pesquisa.

À minha família e aos amigos, pela compreensão nos momentos de ausência, pelas palavras de carinho e incentivo nas situações difíceis.

À direção do Instituto de Biologia do Exército, pelo apoio e liberação para as atividades do mestrado.

Aos meus orientadores Maj Guedes e Ten Cel Tatiana pela abdicação de seus escassos tempos de descanso e lazer em prol da orientação, pelo entusiasmo a cada conquista e por serem modelos de inspiração da vida acadêmica.

Ao Cel Paiva Jr, Chefe da Divisão de Ensino do Centro de Instrução Paraquedista General Penha Brasil, e aos integrantes do Destacamento de Saúde Paraquedista que foram essenciais para o êxito da seleção dos voluntários e de todo o protocolo experimental, pelo pronto atendimento às nossas necessidades e pela compreensão da importância deste trabalho.

À chefia do Laboratório de Emergência do Instituto de Biologia do Exército e toda a sua equipe, pela pronta disponibilidade dos equipamentos necessários às análises bioquímicas.

À Tenente Vanessa Santos pela dedicação e esmero na revisão deste trabalho em curto espaço de tempo.

Ao Professor Rodolfo, pela inestimável ajuda nas avaliações dos exercícios aplicados e ainda compartilhar tempo e conhecimentos na discussão dos resultados.

À colega de trabalho Adrielli, pelo companheirismo e dedicação.

Aos colegas do mestrado, pela maravilhosa convivência, pela cumplicidade, trocas de experiência e pelos inesquecíveis momentos de descontração.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização de cada etapa deste projeto de pesquisa.

## EPÍGRAFE

Quanto mais me aprofundo na Ciência mais me aproximo de Deus.

Albert Einstein

## RESUMO

GOUVEIA, Rachel de Sousa Augusto. *Biomarcadores relacionados a lesão muscular induzida por exercício e avaliação dos genótipos do gene ACTN3 em militares do Exército*. 2023. 64 f. Dissertação (Mestrado em Defesa Biológica) – Divisão de Ensino e Pesquisa, Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, 2023.

A ocorrência de lesões músculo esqueléticas em militares ameaça a saúde do soldado e a prontidão mais do que qualquer outra intercorrência médica. A atividade física de alta intensidade pode provocar desde micro lesões musculares, até mesmo versões mais graves como a rabdomiólise por esforço físico. O dano muscular cursa com extravasamento do conteúdo intracelular e aumento da concentração/atividade de biomarcadores plasmáticos. Vários fatores estão associados a uma maior predisposição a lesões musculares induzidas por exercício, e os antecedentes genéticos estão cada vez mais sendo investigados. Nesse sentido, o gene *ACTN3* codifica uma importante proteína envolvida na contração muscular e a genotipagem do polimorfismo deste gene consiste em um dos polimorfismos mais estudados pela comunidade científica. O objetivo deste trabalho é determinar as alterações plasmáticas dos biomarcadores clássicos utilizados no diagnóstico da lesão induzida por exercício durante atividade física militar, a saber: creatina quinase total e cardíaca (CK e CKMB), mioglobina (MIO) e lactato desidrogenase (LDH) e investigar possíveis correlações com os diferentes genótipos para o polimorfismo do gene *ACTN3*. Trinta e dois alunos militares do Curso Básico Paraquedista foram selecionados, todos cadetes do último ano da Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN). As concentrações plasmáticas de CK, CKMB, MIO e LDH foram determinadas em 6 diferentes momentos durante 4 dias, incluindo antes e após a prova da corrida e marcação de capacete e o esforço percebido foi avaliado por meio da escala de Borg. As atividades séricas dos biomarcadores foram analisadas por fotometria (CK e LDH) e quimioluminescência (MIO e CKMB) e os genótipos do polimorfismo do gene *ACTN3* foram determinados por qPCR usando o sistema Taqman. As medianas de CK, MIO, CKMB e LDH aumentaram significativamente após o exercício e retornaram aos seus valores basais após 96h de repouso. O aumento foi consideravelmente superior após a marcação do capacete, em relação à corrida ( $p < 0,001$ ; teste de wilcoxon). A genotipagem do polimorfismo do gene *ACTN3* não constatou associação acentuada entre a expressão genotípica e/ou alélica nos militares avaliados frente aos biomarcadores estudados em seus valores absolutos. No entanto, as diferenças entre os momentos ( $\Delta$ ) foi notadamente maior em portadores do alelo R em relação à CK e MIO, principalmente na marcação de capacete. As principais conclusões deste trabalho refletem a coerência dos perfis dos biomarcadores clássicos em resposta ao exercício com a literatura científica e acredita-se que a análise da genotipagem deve ser avaliada considerando seu caráter multifatorial e estudos adicionais em amostras cada vez maiores irão permitir a ampliação da consistência dos resultados.

**Palavras-chave:** lesão muscular, exercício físico, biomarcadores, ACTN3.

## ABSTRACT

GOUVEIA, Rachel de Sousa Augusto. *Biomarcadores relacionados a lesão muscular induzida por exercício e avaliação dos genótipos do gene ACTN3 em militares do Exército*. 2023. 64 f. Dissertação (Mestrado em Defesa Biológica) – Divisão de Ensino e Pesquisa, Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, 2023.

The occurrence of skeletal muscle injuries in military personnel threatens soldier health and readiness more than any other medical event. High-intensity physical activity can cause anything from micro injuries to more serious versions such as exertional rhabdomyolysis. Muscle damage occurs with extravasation of intracellular content and increased concentration/activity of plasma biomarkers. Several factors are associated with a greater predisposition to exercise-induced muscle injuries, and the genetic antecedents are increasingly being investigated. In this sense, the ACTN3 gene encodes an important protein involved in muscle contraction and the genotyping of this polymorphism consists of one of the most studied polymorphisms by the scientific community. The objective of this study is to measure plasma changes of classic biomarkers used in the diagnosis of exercise-induced muscle injuries during military physical activity, namely: total and cardiac creatine kinase (CK and CKMB), myoglobin (MIO) and lactate dehydrogenase (LDH) and investigate possible correlations with different genotypes of ACTN3 polymorphism. Thirty-two military students from the Basic Parachutist Course were selected, all final year cadets at the Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN). Plasma concentrations of CK, CKMB, MIO and LDH were determined at 6 different times over 4 days, including before and after the race and helmet marking, and perceived exertion was assessed by using the Borg scale. The serum activities of the biomarkers were confirmed by photometric assay (CK and LDH) and chemiluminescence (MIO and CKMB) and the ACTN3 polymorphism genotypes were determined by qPCR using the Taqman system. The medians of CK, MIO, CKMB and LDH increased significantly after exercise and returned to their baseline values after 96h of rest. The increase was considerably higher after helmet marking, in relation to running ( $p < 0.001$ ; Wilcoxon test). Genotyping of the ACTN3 polymorphism did not find a marked association between genotypic and/or allelic expression in the military personnel evaluated against biomarkers studied in their absolute values. However, the differences between moments ( $\Delta$ ) were notably greater in carriers of the R allele in relation to CK and MIO, especially in helmet marking. The main conclusions of this study reflect the coherence of the classical biomarkers profiles in response to exercise with the scientific literature and it is believed that genotyping analysis should be evaluated considering its multifactorial nature and additional studies using increasingly larger samples will allow increased consistency of the results.

**Keywords:** muscle injury, physical exercise, biomarkers, ACTN3

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Localização intracelular citosólica da CK (em verde). Fonte: Adaptada do Atlas de Proteínas Humanas. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000166165-CKB/subcellular>>. Acesso em: Agosto 2023.....21
- Figura 2- Distribuição tecidual da creatina quinase e suas isoenzimas CKMM, CKMB e CKBB. Adaptado de LIPPI et al., 2018.....22
- Figura 3- Expressão tecidual da alfa-actinina-3 no músculo esquelético (em marrom). Fonte: Adaptado do Atlas de Proteínas Humanas. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000248746-ACTN3/tissue>>. Acesso em: Junho de 2023. ....28
- Figura 4- Resumo das possíveis implicações do genótipo ACTN3 relacionadas a atividade física. Fonte: Adaptado de PICKERING, KIELY, 2017.....29
- Figura 5- Representação do protocolo experimental. Referencia: o autor.....33
- Figura 6- Execução do exercício canguru. Fonte: EB, 2013.....34
- Quadro 1- Sumário de atividades realizadas pelos militares do curso .....35
- Figura 7- Valores em mediana de CK (7A), CKMB (7B), MIO (7C) e LDH (7D) nos momentos antes e após a corrida (PRE\_Corrída e POS\_Corrída), 24 horas após a corrida (24h\_PRE\_Nat), antes e após a marcação de capacete (PRE\_Capacete e POST\_Capacete) e após 96 horas da prova do capacete (96hs). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; # $p < 0,0001$ ; ns = não significativo.....43
- Figura 8- Valores em medianas de CK nos momentos pré e pós corrida (CK\_PRE\_CorrídaC1 e CK\_POS\_CorrídaC2), pré natação (CK\_24h\_PRE\_NatC3), antes e após a marcação de capacete (CK\_PRE\_CapaceteC4 e CK\_POST\_CapaceteC5) e após 96h de repouso (CK\_96hsC6). Intervalo de confiança (CI)=95%.....57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Escala de Borg (CABRAL <i>et al.</i> , 2020).....	36
Tabela 2- Resultados da avaliação do esforço percebido utilizando a escala de Borg (n = 32).....	41
Tabela 3- Distribuição dos genótipos do polimorfismo <i>ACTN3</i> . ....	44
Tabela 4- Distribuição dos genótipos/alelos do polimorfismo <i>ACTN3</i> em função das medianas do último TAF dos participantes bem como sua escala de percepção de esforço após a corrida e prova do capacete .....	44
Tabela 5- Medianas dos genótipos e alelos do gene <i>ACTN3</i> em função dos biomarcadores CK, CKMB e MIO e médias dos mesmos genótipos e alelos em função da enzima LDH.....	46
Tabela 6- Diferenças ( $\Delta$ ) das medianas dos biomarcadores CK, CKMB e MIO e das médias da enzima LDH, em diferentes momentos, categorizados em grupos pelos genótipos e alelos do gene <i>ACTN3</i> .....	49
Tabela 7- Frequência dos genótipos do polimorfismo rs1815739 no gene <i>ACTN3</i> na população do banco de dados <i>1000Genomes</i> . ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTN3	Alfa-actinina 3
AMAN	Academia Militar das Agulhas Negras
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina fosfato
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CCFEx	Centro de Capacitação Física do Exército
CK	Creatina quinase
CKMB	Creatina quinase massa
CKMM	Creatina quinase muscular
EAFD	Exame de Aptidão Física Definitiva
IPCFEX	Instituto de Pesquisa da Capacitação Física do Exército
LDH	Lactato desidrogenase
MIO	Mioglobina
MSKIS	Lesões músculo-esqueléticas dos militares que não estão em combate
PTC	Pista de treinamento em circuito
RPE	Classificação do Esforço Percebido
SERCA	Bomba cálcio do retículo sarcoplasmático
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
2.1	PATOGÊNESE DA LESÃO MUSCULAR E SUAS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS .....	17
2.2	IMPORTÂNCIA DA PREVENÇÃO DA LESÃO MUSCULAR E RABDOMIÓLISE NA FORÇA TERRESTRE.....	18
2.3	CURSO BÁSICO PARAQUEDISTA .....	19
2.4	MARCADORES BIOQUÍMICOS TRADICIONALMENTE UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DA LESÃO MUSCULAR E RABDOMIÓLISE .....	20
2.4.1	<b>Creatina quinase (CK)</b> .....	21
2.4.2	<b>Mioglobina (MIO)</b> .....	24
2.4.3	<b>Lactato desidrogenase (LDH)</b> .....	25
2.4.4	<b>Creatina quinase massa (CKMB)</b> .....	26
2.5	POLIMORFISMO DO GENE <i>ACTN3</i> .....	27
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
3.1	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	30
3.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	30
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1	POPULAÇÃO.....	31
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....	31
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	32
4.4	PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	32
4.5	ESTIMATIVA DO VOLUME DE EXERCÍCIO APLICADO .....	36
4.6	AVALIAÇÃO DO ESFORÇO PERCEBIDO .....	36
4.7	ANÁLISES LABORATORIAIS DOS BIOMARCADORES .....	37
4.8	GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO DO GENE <i>ACTN3</i> .....	37
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4.9.1	<b>Avaliação do esforço percebido – Escala de Borg ..... Erro! Indicador não definido.</b>	
4.9.2	<b>Análises laboratoriais dos biomarcadores</b> .....	38
4.9.3	<b>Genotipagem do polimorfismo do gene <i>ACTN3</i></b> .....	39
5	<b>RESULTADOS</b> .....	40
5.1	VOLUME DE EXERCÍCIO APLICADO .....	40

5.2	AVALIAÇÃO DO ESFORÇO PERCEBIDO – ESCALA DE BORG.....	40
5.3	ANÁLISES LABORATORIAIS DOS MARCADORES CK, CKMB, MIOGLOBINA E LDH.....	41
5.4	GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO DO GENE <i>ACTN3</i> .....	44
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	50
6.1	AVALIAÇÃO DO ESFORÇO PERCEBIDO – ESCALA DE BORG.....	50
6.2	ANÁLISES LABORATORIAIS DOS MARCADORES CK, CKMB, MIOGLOBINA E LDH.....	51
6.3	GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO DO GENE <i>ACTN3</i> .....	55
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	60
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

O treinamento físico regular e o bom condicionamento são necessários para atender aos requisitos militares, especialmente àqueles operacionais, que rotineiramente exigem um nível mais alto de esforço e vigor físicos do que a maioria das ocupações civis, um fato reconhecido e corroborado por regulamentos da Força Terrestre no Brasil e em outros países (MINISTÉRIO DA DEFESA EB70-MC10.375, 2021; COWAN *et al.*, 2003). A atividade física, quando executada em alta intensidade, pode provocar desde singulares lesões musculares, até mesmo versões mais graves como a rabdomiólise por esforço físico, um dano ultra estrutural ao músculo esquelético relacionado ao exercício extenuante ou atividade muscular vigorosa (DEL COSO *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2016; ATIAS-VARON *et al.*, 2017). Quando as fibras musculares esqueléticas são lesionadas, ocorre extravasamento do conteúdo intracelular, levando ao aparecimento de sinais séricos como o aumento da concentração e atividade de peptídeos como a mioglobina, creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) (NELSON *et al.*, 2016; KELTZ *et al.*, 2013).

A literatura revela que a mioglobina (MIO) é uma proteína contida nos músculos esqueléticos e cardíacos, cuja principal função reside no transporte de oxigênio do sarcolema para a mitocôndria. O exercício físico está frequentemente associado a uma liberação significativa de mioglobina na corrente sanguínea (COSTACHE *et al.*, 2022). Embora a eficiência diagnóstica para lesão muscular seja normalmente, superada pela CK, a MIO desempenha um papel chave na previsão do risco de desenvolver lesão renal. Isto ocorre porque, dependendo da extensão da lesão muscular, a quantidade de MIO liberada na corrente sanguínea excede a capacidade de ligação do plasma, de modo que a proteína se acumula no rim, onde causa lesão direta, podendo acarretar o desenvolvimento de insuficiência renal (LIPPI, CERIOTTI, 2018).

A creatina quinase (CK), bem como a lactato desidrogenase (LDH) derivam de fragmentos da cadeia pesada da miosina (ou seja, troponina I e MIO) e são moléculas citoplasmáticas. Portanto, normalmente, não possuem a habilidade de atravessar a membrana citoplasmática. No entanto, quando o dano muscular se faz presente, o aumento das concentrações séricas dessas moléculas é usado como

indicador de danos à membrana muscular (CALLEGARI *et al.*, 2017). Ainda que a CK esteja amplamente contida em todos os tecidos com maior demanda de energia, esta enzima é especialmente abundante no músculo esquelético (aproximadamente 60%-70%, no qual 98% está representada pela isoforma CKMM) (LIPPI, CERIOTTI, 2018; BAIRD *et al.*, 2012). Dentre essas moléculas a CK representa, frequentemente, o melhor marcador indireto de dano ao tecido muscular (CALLEGARI *et al.*, 2017; TORRES *et al.* 2015).

Outra importante proteína que aparece no aparato contrátil do músculo esquelético é a alfa-actinina 3, codificada pelo gene *ACTN3*, e se apresenta como um importante personagem na geração e transmissão da força muscular, bem como na manutenção dos arranjos miofibrilares, por estar envolvida na ancoragem de filamentos finos de actina à linha Z nas fibras musculares rápidas (OGURA *et al.*, 2009, PASQUA *et al.*, 2011, VINCENT *et al.*, 2010). No final dos anos 90, North e colaboradores identificaram um polimorfismo do tipo *nonsense* no gene *ACTN3* o qual consiste na troca do nucleotídeo Citosina para Timina. Essa mutação resulta na conversão do códon no aminoácido arginina para um códon de parada no resíduo 577 (R577X) e, assim, acarreta na forma não-funcional da alfa-actinina-3 (EYNON *et al.*, 2013; MORENO *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2021). Nas últimas décadas, a comunidade científica vem se aprofundando no estudo do polimorfismo que ocorre no gene *ACTN3*, e os resultados de alguns trabalhos sugerem que a deficiência da proteína alfa-actinina-3, representada pelo genótipo XX, é desfavorável no desempenho de exercícios de potência, mas pode ser benéfica a exercícios de resistência (EYNON *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2022; PENA-VAZQUEZ *et al.*, 2023)

Diante do panorama contextual apresentado e, considerando que as lesões provocam um impacto maior na saúde e no pronto emprego dos militares do que qualquer outra condição médica (COWAN *et al.*, 2003), torna-se imperioso avaliar os principais biomarcadores envolvidos na lesão muscular em militares durante uma atividade física intensa e investigar a variabilidade de tais biomarcadores em função dos diferentes fenótipos musculares observados pela presença de alelos polimórficos no gene *ACTN3*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PATOGÊNESE DA LESÃO MUSCULAR E SUAS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Os programas de treinamento adequadamente projetados usando os princípios básicos de sobrecarga e progressão geralmente resultam em sensações de dor associadas a danos ou microlesões nas fibras musculares. Esta é considerada uma resposta normal ao exercício e faz parte do processo de adaptação (MARKUS *et al.*, 2021). Entretanto, o estresse acumulado impacta diferentes sistemas orgânicos (NIELSEN *et al.*, 2020).

A lesão muscular configura uma condição clínica complexa envolvendo a ruptura da integridade do músculo esquelético, que acarreta no extravasamento de componentes musculares, incluindo as proteínas mioglobina, creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase, bem como eletrólitos, na corrente sanguínea e no espaço extracelular (TORRES *et al.*, 2015; ATIAS-VARON *et al.*, 2017; KODADEK *et al.*, 2022). Muito comum em atividades militares, a rabdomiólise representa a complicação mais grave da lesão muscular e varia de uma condição assintomática com alguma elevação do nível de CK a uma condição de risco de morte associado a extremas elevações de CK, desequilíbrios eletrolíticos e insuficiência renal aguda. Os sintomas mais comuns são representados por fraqueza dos membros inferiores, mialgia, edema, podendo cursar com o aparecimento de urina escura decorrente da mioglobinúria (TORRES *et al.*, 2015; ATIAS-VARON *et al.*, 2017; KODADEK *et al.*, 2021).

Algumas condições clínicas adicionais podem desencadear ou exacerbar a lesão induzida por esforço, como os indivíduos portadores de traço falciforme, desordens de origem metabólica, imunológica, neurológica, endócrina, cardiovascular, musculoesquelética, renal, infecções recentes (especialmente de origem viral), bem como o uso de certos medicamentos (ácido acetil salicílico, agentes anticolinérgicos, fenotiazinas e esteroides anabólicos), ou drogas de abuso como, por exemplo, cocaína e álcool (TORRES *et al.*, 2015; LIPPI, CERIOTTI, 2018; SILVA *et al.*, 2021; MEISTER, REDDY, 2002). Ainda configuram como fatores predisponentes mais frequentes os exercícios de alta intensidade ou falta de treinamento físico específico, aclimatação insatisfatória, temperaturas e umidade

extremas (especialmente superaquecimento), altitude elevada e hidratação insuficiente durante e após o exercício (LIPPI, CERIOTTI, 2018; TORRES *et al.*, 2015).

## 2.2 IMPORTÂNCIA DA PREVENÇÃO DA LESÃO MUSCULAR E RABDOMIÓLISE NA FORÇA TERRESTRE

As lesões músculo-esqueléticas dos militares que não estão em combate (MSKIs) ameaçam a saúde do soldado e a prontidão mais do que qualquer outra intercorrência médica. A prontidão médica militar refere-se ao estado de saúde do soldado e como essa condição afeta o soldado ou a capacidade da unidade em cumprir sua missão. Dados mais recentes do Exército Americano revelam que as lesões musculares entre os soldados foram a principal causa de pacientes ambulatoriais (2,2 milhões) em 2017 (MOLLOY *et al.*, 2020; TEYHEN *et al.*, 2018). Como consequência, no ano de 2018, constam mais de oito milhões de dias de militares com limitações das atividades da caserna. Os casos de lesões musculares em militares também são responsáveis por custos médicos exorbitantes representados por um subconjunto significativo de soldados que desenvolvem dor crônica ou, em longo prazo, incapacidade após a lesão, o que pode aumentar o risco de doenças crônicas ou doenças secundárias (MOLLOY, 2020; TEYHEN, 2018). Esses fatos realçam a importância do problema, mas muitas vezes omitem detalhes cruciais, como a perda da higiene individual com limitações das atividades militares e o prejuízo decorrente dos custos de tratamento e das licenças para tratamento de saúde.

No Brasil, a Rabdomiólise acomete menos de 150.000 pessoas por ano, porém, no meio militar é extremamente comum, sendo relevante citar que 25% de todos os casos de internação (N= 944) de militares, entre 1980 e 2000, estavam associados à rabdomiólise, os quais 33% desenvolveram lesão renal aguda (OLIVEIRA, MARTÍNEZ, 2022). Neste sentido, diante do risco de ocorrer rabdomiólise no âmbito das Forças Armadas, o Comando do Exército aprovou por meio da Portaria nº 129, de 11 de março de 2010, a diretriz para a implantação do Programa de Prevenção e Controle da Rabdomiólise Induzida por Esforço Físico e pelo Calor. Ao Estado-Maior do Exército foi atribuída a missão de elaborar propostas de medidas de controle, prevenção e tratamento dessa condição clínica. Ao longo

dos últimos 10 (dez) anos, a Força Terrestre manteve-se alerta para o acometimento de militares com as lesões musculares e suas complicações por meio de Campanhas de Prevenção (2013), bem como da realização de um Programa de Prevenção e Controle da Rabdomiólise induzida pelo Esforço Físico e pelo Calor (2018) conduzido pelo Instituto de Pesquisa da Capacitação Física do Exército (IPCEx). Além disso, em 2019, o Exército aprovou a Portaria nº 325 de 23 de dezembro de 2019, que estabelece as Normas para Procedimento Assistencial em Rabdomiólise no Âmbito do Exército e em 2021 o Centro de Capacitação Física do Exército divulgou em literatura científica as Medidas de Prevenção à Rabdomiólise em militares bem como o Relatório Técnico versando sobre o Programa implementado em 2018 (BRASIL, 2019).

### 2.3 CURSO BÁSICO PARAQUEDISTA

O curso básico de paraquedista (C Bas Pqdt) habilita o militar a realizar o salto semiautomático ou enganchado, no qual a abertura do paraquedas depende apenas da ação de enganchar, ou seja, de ancorar a fita de abertura do paraquedas a um ponto fixo no interior da aeronave (VIANA, 2020; BRASIL, 2021). Quando o saltador abandona o avião, a fita é responsável por provocar uma série de distensões e arrebitamentos, extraindo o paraquedas do invólucro no qual se encontrava acondicionado e permitindo sua abertura, que reduz a velocidade da queda e estabiliza o corpo do paraquedista durante a descida até o solo (VIANA, 2020).

Desde a criação das primeiras unidades de paraquedistas militares, na década de 30, o treinamento militar de seus componentes sempre foi considerado especial. O salto de aeronave militar em voo, com 50 kg ou mais de equipamentos, é suficiente para ditar um intenso treinamento a ser executado. No Brasil, este treinamento é realizado na Área de Estágio Paraquedista do Centro de Instrução Paraquedista (NEVES, 2010; BRASIL, 2013).

As inscrições para o curso envolvem a remessa de uma documentação que abrange uma série de informações sobre sua aptidão física, estado de saúde, conceito disciplinar, dentre outras. Após uma seleção preliminar, testes físicos complementares e exames de saúde são realizados. Ultrapassadas essas fases, o

candidato aprovado poderá se dirigir ao Centro de Instrução Paraquedista General Penha Brasil, onde efetivamente realizará o curso (BRASIL, 2023).

O curso básico de paraquedista (C Bas Pqdt) é destinado a: Oficiais, Subtenentes e Sargentos do Exército Brasileiro, da Marinha do Brasil e da Força Aérea Brasileira e de Nações Amigas. O curso tem duração de 06 (seis) semanas, divididas da seguinte forma: A primeira fase do curso, com duração de três semanas, visa capacitar os alunos, através do Treinamento Físico Militar, em valências físicas necessárias à atividade do Paraquedista militar e fortalecer a estrutura muscular global do indivíduo, com ênfase nos membros inferiores e abdômen, para suportar a carga transportada durante o salto (o armamento, a mochila e o próprio paraquedas) e o impacto ao solo, por ocasião da aterragem (NEVES, 2010; BRASIL, 2023).

Durante a primeira fase do curso, o programa de condicionamento físico é dividido em trabalhos aeróbicos, visando à melhora cardiovascular do indivíduo e trabalhos neuromusculares. As atividades desenvolvidas pelos alunos do curso básico Paraquedista são: corrida, ginástica com toros, ginástica básica, pista de cordas, pista de treinamento em circuito (PTC) (NEVES, 2010; BRASIL, 2013; BRASIL, 2021).

A segunda fase, também composta por três semanas, é direcionada ao ensino das técnicas inerentes ao Paraquedista militar, onde são ministradas instruções em que o aluno treina repetidamente a aplicação das técnicas de execução do salto de aeronave militar em voo, com paraquedas semiautomático visando seu emprego operacional (NEVES, 2010; BRASIL, 2013; BRASIL, 2021).

#### 2.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS TRADICIONALMENTE UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DA LESÃO MUSCULAR E RABDOMIÓLISE

O exercício físico, por meio de suas variáveis – volume e intensidade de execução, provoca diferentes modificações de ordem estrutural ou no nível de respostas no músculo esquelético, sendo que tais respostas podem ser entendidas pela Fisiologia do Exercício (CLARKSON, HUBAL, 2002; KRAEMER, RATAMESS, 2005; PRESTES *et al.*, 2016). As modificações ou danos no tecido muscular, quando ocasionados por exercício físico, podem ser decorrentes de eventos bioquímicos e de sobrecarga mecânica e, normalmente, envolvem desordens nas estruturas das

fibras musculares - membranas, linha Z, sarcolema, túbulos T e miofibrilas. Como resultado, ocorre o aumento da permeabilidade da membrana, permitindo o extravasamento de substâncias para o meio extracelular (TEIXEIRA *et al.*, 2021).

Neste contexto, existem algumas enzimas ou proteínas que classicamente se caracterizaram como marcadores de danos musculares, as quais se destacam a Creatina quinase (CK), a Lactato desidrogenase (LDH) e a mioglobina. A creatina quinase MB (CKMB), embora considerada um marcador cardíaco, também pode aparecer em situações clínicas de lesão do músculo esquelético (NALKACAN, 2014; PARK, KWAK, 2019; COSTACHE *et al.*, 2022). Na presença de danos nas estruturas musculares, estas moléculas extravasam para o meio extracelular, alcançando a corrente sanguínea e aumentando as suas concentrações séricas. Dentre estas, a CK é descrita como o melhor marcador indireto de danos teciduais no músculo esquelético após o exercício (TEIXEIRA *et al.*, 2021).

#### 2.4.1 Creatina quinase (CK)

A creatina quinase (CK) é uma enzima dimérica, encontrada tanto no citosol quanto nas mitocôndrias da fibra muscular (Figura 1). Possui uma unidade funcional central para todas as reações e cadeias químicas que ocorrem na fibra muscular e ajuda a manter sua integridade estrutural e funcional (KUMAR *et al.*, 2019).

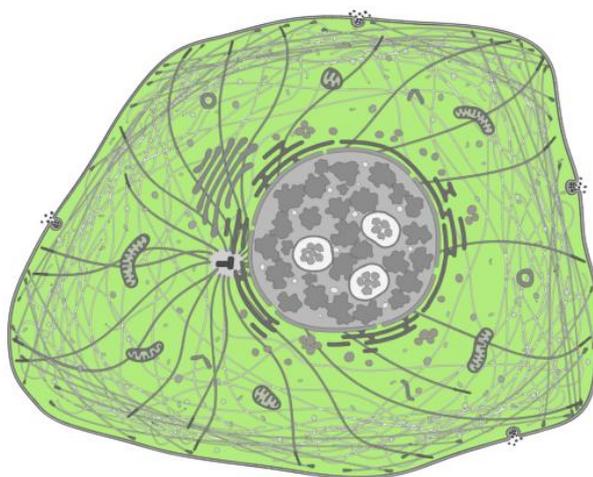


Figura 1 - Localização intracelular citosólica da CK (em verde). Fonte: Adaptada do Atlas de Proteínas Humanas. Disponível em:

< <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000166165-CKB/subcellular>>. Acesso em: Agosto 2023.

A forma citosólica da CK é composta por duas subunidades, designadas como M (tipo muscular) e B (tipo cerebral). Essas subunidades se combinam para produzir três isoenzimas: MM (predominante no músculo esquelético), MB (predominante no músculo cardíaco) e BB (majoritariamente no tecido cerebral); o padrão de distribuição dessas isoenzimas depende do tipo de tecido (KUMAR *et al.*, 2019; CALLEGARI *et al.*, 2017; BRANCACCIO *et al.*, 2010). Dessa forma, pode-se dizer que a CK encontra-se amplamente contida em todos os tecidos com altas demandas de energia, sendo especialmente abundante no músculo esquelético (aproximadamente 60%–70%, dos quais 98% são CKMM e 2% são CKMB), no músculo cardíaco (aproximadamente 20% a 30%, dos quais 70 a 80% são CKMM, 20 a 30% de CKMB) e no tecido cerebral (predominantemente CK-BB) (BAIRD *et al.*, 2011; LIPPI *et al.*, 2018). A Figura 2 ilustra a distribuição das isoenzimas CK nos diferentes tecidos.

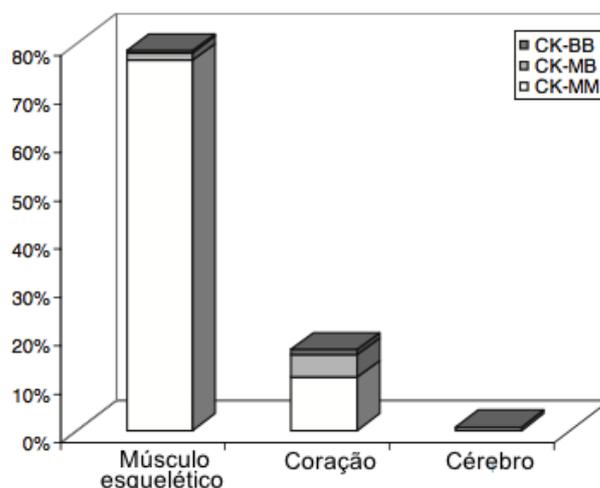


Figura 2 - Distribuição tecidual da creatina quinase e suas isoenzimas CKMM, CKMB e CKBB. Adaptado de LIPPI *et al.*, 2018.

Os níveis séricos basais de CK (provenientes de todas as isoenzimas) variam, em geral, de 35 a 175 U/L, podendo chegar a faixas de 20 a 16.000 U/L. Essa ampla faixa reflete a ocorrência inconsistente de distúrbios subclínicos e lesões menores, fatores genéticos, estado de atividade física e uso de medicamentos (KIM, LEE, 2015; CHALCHAT *et al.*, 2021; KODADEK *et al.* 2022). Tais níveis sinalizam claramente um sério comprometimento do tecido muscular estriado esquelético com vazamento concomitante de constituintes musculares intracelulares para a circulação (BAIRD *et al.*, 2012).

Atualmente, a literatura reconhece claramente que o exercício físico de intensidade baixa a moderada está associado a uma liberação modesta de CK na corrente sanguínea (CHAVEZ *et al.*, 2016; LAZARIM *et al.*, 2007; KODADEK *et al.*, 2022). Já os valores plasmáticos de CK abaixo do limite superior do intervalo de referência pode indicar uma resposta muscular adaptativa. Alguns estudos sugeriram que a atividade plasmática da CK pode surgir na ausência de lesões histológicas, como consequência de alterações na permeabilidade da membrana muscular. As mesmas alterações na membrana muscular que aumentam a atividade plasmática da CK também afetam a liberação de fatores de crescimento pelas células musculares, o que poderia ser uma forma pela qual as alterações na atividade plasmática da CK refletem a adaptação muscular. De acordo com este ponto de vista, a atividade individual da CK plasmática acima do limite superior de referência pode indicar a transição de um microtrauma adaptativo para uma lesão muscular subclínica, aumentando o potencial de dano (LAZARIM *et al.*, 2007).

O aumento fisiológico de CK relacionado ao exercício é geralmente detectável logo após o término do exercício quando o pico é atingido em torno de 24 horas após a atividade e os valores retornam aos níveis basais dentro de 3 a 6 dias (CHAVEZ *et al.*, 2016; KODADEK *et al.*, 2022). O aumento é geralmente modesto, normalmente compreendido entre 1,5 e 2,0 vezes o limite superior de referência, mas depende muito da duração, tipo e intensidade do exercício (LIPPI, CERIOTTI, 2018). Lazarim e colaboradores (2007) conduziram um trabalho com o objetivo de analisar a atividade plasmática da CK para determinar os limites superiores em jogadores de futebol profissional e os resultados obtidos indicam que os valores de referência devem ser determinados em cada caso, ou seja, os valores de referência para outras modalidades esportivas provavelmente serão diferentes daqueles estimados para jogadores de futebol.

Um estudo conduzido por Kenney e colaboradores (2012) avaliaram os valores de CK durante um treinamento básico de recrutas militares do Exército Americano e concluiu que os valores laboratoriais amplamente aceitos para o diagnóstico de rabdomiólise são rotineiramente excedidos nessa população de militares (submetidos ao curso de formação em virtude de alistamento). Este trabalho sugere em sua conclusão que, os níveis de CK relacionados ao quadro clínico de rabdomiólise, nesses militares, devem ser maiores e podem ser estabelecidos acima de 50 vezes o limite superior do valor de referência.

Os intervalos de referência referem-se à faixa de valores de um teste laboratorial observado em uma população específica, normalmente descrito por limites de referência superior e inferior (LAZARIM *et al.*, 2007). O limiar de CK para um possível diagnóstico de importante lesão muscular tem sido por muito tempo uma questão de debate. Embora estudos anteriores sugerissem níveis séricos de 3 a 5 vezes o valor de referência, esses limites são caracterizados por alta sensibilidade, mas especificidade muito baixa, especialmente em atletas submetidos a exercícios físicos de diferentes intensidade, ou características (CONNOR *et al.*, 2008; TIETZE, BORCHERS, 2014). Além disso, os próprios métodos bioquímicos empregados são muito heterogêneos entre os laboratórios clínicos. Finalmente, a variabilidade interindividual da CK após o exercício é extremamente heterogênea, com muitos indivíduos frequentemente exibindo aumentos séricos ou plasmáticos bem acima do valor de referência. Portanto, nessas situações, limites adicionais foram propostos, com valores iguais ou maiores a 10 vezes do valor de referência (TORRES *et al.*, 2015; LIPPI, CERIOTTI, 2018).

#### **2.4.2 Mioglobina (MIO)**

A MIO está presente nos músculos esqueléticos e cardíacos e sua principal função é o transporte de oxigênio do sarcolema para as mitocôndrias (CHAVEZ *et al.*, 2016; LIPPI, CERIOTTI, 2018). O exercício físico de intensidade baixa a moderada está frequentemente associado a uma liberação significativa desta enzima e, geralmente, sua detecção ocorre imediatamente após o término do exercício, atinge o pico cerca de 3 horas depois e os valores normalmente retornam à linha de base em 24 horas. O aumento é geralmente compreendido entre 3,0 e 4,0 vezes o valor de referência, mas depende muito da duração, tipo e intensidade do exercício. Por outro lado, aumentos consideráveis de MIO podem ser observados após exercícios de alta intensidade, atingindo um pico de até 50 a 100 vezes o valor de referência entre 1 e 3 dias e, então, persistindo elevado por até 2 a 4 dias após o exercício (LIPPI, CERIOTTI, 2018). Em termos de eficiência diagnóstica para lesão muscular, esse biomarcador apresenta como desvantagem a baixa sensibilidade após 24h da lesão e sua rápida depuração renal da circulação, o que realmente tornaria sua avaliação inadequada tanto para diagnosticar a extensão das

microlesões musculares quanto para monitorar sua recuperação (LIPPI, CERIOTTI, 2018). Contudo, a principal importância da MIO reside na sua capacidade de predição da lesão renal aguda (TORRES *et al.*, 2015). Quando a quantidade desta enzima liberada na corrente sanguínea supera a capacidade de ligação plasmática, a MIO se acumula no rim, podendo contribuir para a insuficiência renal aguda (LIPPI, CERIOTTI, 2018).

Durante a atividade física as lesões ou microlesões musculares, culminam com o extravasamento do fluido intracelular, que depois é sequestrado nos espaços extracelulares. Com isso, ocorre uma limitação do volume intravascular e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, diminuindo o fluxo sanguíneo renal. Adicionalmente, a liberação da mioglobina na circulação sistêmica exerce um efeito citotóxico no néfron, tanto diretamente quanto indiretamente. O ferro livre resultante da quebra da mioglobina no rim promove a formação de espécimes reativos de oxigênio, que na forma de radicais livres danificam a integridade tubular renal. Um segundo mecanismo indireto de lesão renal é a peroxidação lipídica, que ocorre quando os componentes da membrana lipídica das células renais reagem com a forma ferril da mioglobina. É importante destacar também que a presença de acidose metabólica potencializa a nefrotoxicidade da mioglobina por promover a formação de cilindros e obstrução tubular (CHAVEZ *et al.*, 2016; KODADEK *et al.*, 2022).

### 2.4.3 Lactato desidrogenase (LDH)

A aptidão muscular e a resistência à fadiga dependem fortemente da capacidade de catabolizar as reservas energéticas, incluindo ácidos graxos e glicose, para atender às demandas de ATP. O piruvato e o lactato são substratos essenciais utilizados pelo músculo esquelético particularmente durante o exercício. No metabolismo da glicólise, o piruvato serve como um substrato para o ciclo mitocondrial e cataboliza a glicose para a produção máxima de adenosina trifosfato (ATP). A lactato desidrogenase (LDH) é a enzima chave que catalisa a interconversão de piruvato e lactato, regulando assim sua homeostase celular (LIANG *et al.*, 2016; HASSAN, 2020). Portanto, a atividade da LDH pode inclusive refletir o grau de degradação do glicogênio para produzir energia, decorrente do esforço muscular ou ainda ser um indicador da capacidade anaeróbica, destinada a

atender a demanda energética do corpo durante a realização dos exercícios (HASSAN, 2020).

A LDH apresenta início de liberação na corrente sanguínea após esforços físicos de baixa a moderada intensidade, em um período de 1 a 3 horas após o término do exercício e atinge o pico entre 3 e 6 horas depois. Normalmente retorna aos níveis basais dentro de 24 horas. Embora seu aumento seja modesto, geralmente compreendido entre 1,2 e 1,3 vezes o valor de referência, a literatura revela diversos estudos que demonstram o aumento dos níveis de LDH após atividade física (LIPPI, CERIOTTI, 2018). Como exemplo, estudos realizados com atletas de diferentes modalidades esportivas, a saber: jogadores de futebol (BARRANCO *et al.*, 2017), atletas de natação (RAHMANIAN *et al.*, 2022), triatletas (PARK, KAWK, 2019) e maratonistas (SOUZA *et al.*, 2019), demonstraram um aumento significativo dos níveis de LDH nos momentos antes e após a atividade física avaliada.

#### 2.4.4 Creatina quinase massa (CKMB)

Os valores de CKMB aumentados geralmente reportam que o tecido cardíaco foi acometido a um estresse em atividade extenuante. Entretanto, a atividade da CK total possui participação de cerca de 20% da CKMB, o que sugere que níveis aumentados de CK total, podem ser acompanhados de um incremento da concentração sérica da isoenzima CKMB (SOARES *et al.*, 2019). Alguns estudos recentes propuseram que os biomarcadores de dano do músculo cardíaco aumentam após o exercício, mesmo em indivíduos saudáveis, de modo que os níveis séricos da isoenzima CKMB podem aumentar em decorrência de exercício físico intenso (SHARIFZADEH *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2019; PARK, KWAK, 2019). Como a CKMB está presente em maior concentração nas células do tecido do miocárdio, quando encontra-se aumentada após atividade física, possivelmente, tal atividade demandou um intenso trabalho do músculo cardíaco (SOARES *et al.*, 2019).

Com o intuito de auxiliar a interpretação da elevação sérica dessa isoenzima, ou seja, se o aumento da CKMB envolve o músculo cardíaco propriamente dito ou se está mais relacionado ao trabalho das fibras musculares esqueléticas, a relação

da concentração em ng/mL de CKMB e a atividade enzimática em U/L da CK total é constantemente usada, conforme descrito abaixo:

$$\% \text{ relativo} = \frac{\text{Valor CKMB (ng/mL)}}{\text{CK total (U/L)}} \times 100$$

Dados bem estabelecidos na literatura mostram que valores acima de 4,5-6% indicam comprometimento cardíaco e abaixo de 3% um dano predominantemente muscular esquelético (NALCAKAN, 2014; PANTEGHINI, 1999). No entanto cabe ressaltar que a maioria desses valores foram determinados em populações saudáveis e em indivíduos com extensas lesões musculares, mas não em militares em curso operacional.

## 2.5 POLIMORFISMO DO GENE *ACTN3*

As alfa-actininas são um grupo de proteínas do citoesqueleto localizadas nos músculos esquelético, cardíaco e liso. Nos músculos esqueléticos, a alfa-actinina está localizada nas linhas Z dos sarcômeros e forma ligações cruzadas actina-actina. Por essa razão, a alfa-actinina representa um importante componente estrutural na geração e transmissão da força contrátil muscular, bem como na manutenção dos arranjos miofibrilares. A actinina do músculo esquelético inclui duas isoformas: alfa-actinina-2 e alfa-actinina-3. A primeira é identificada em todas as fibras musculares esqueléticas, enquanto a expressão da alfa-actinina-3 é restrita às fibras musculares rápidas (tipo II) (OGURA *et al.*, 2008; OGURA *et al.*, 2009; DEL COSO *et al.*, 2016).

De acordo com o Atlas de Proteínas Humanas, em termos de expressão tecidual, a alfa-actinina-3 representa uma proteína altamente expressa e específica do músculo esquelético, conforme demonstrado na Figura 3.

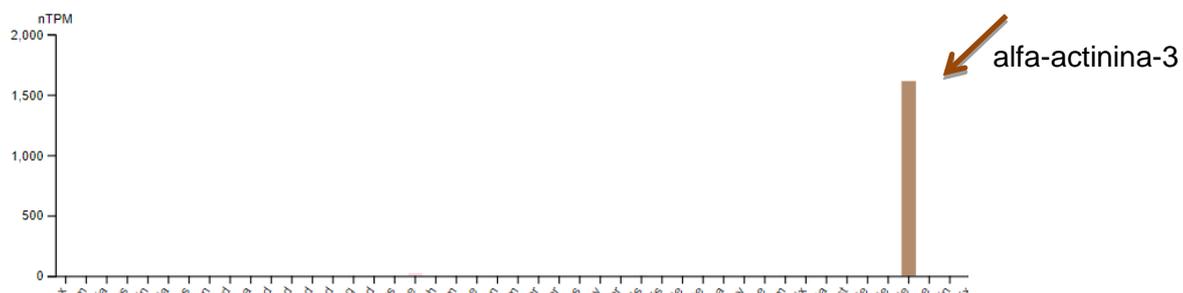


Figura 3 - Expressão tecidual da alfa-actinina-3 no músculo esquelético (em marrom). Fonte: Adaptado do Atlas de Proteínas Humanas. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000248746-ACTN3/tissue>>. Acesso em: Junho de 2023.

Recentemente, o interesse relacionado à alfa-actinina-3 centrou-se nas influências no desempenho físico decorrentes do polimorfismo do gene *ACTN3* que codifica a alfa-actinina. De fato, evidências referenciaram o gene *ACTN3* como um “gene para velocidade” (BERMAN, NORTH, 2010; HEAD *et al.*, 2015; PICKERING, KIELY, 2017). O polimorfismo do gene *ACTN3* (R577X, rs1815739) envolve uma substituição da base citosina (C) para timina (T), na posição 1.747 do éxon 16, o que resulta na transformação do aminoácido arginina (R) em um códon de parada prematuro (X) no resíduo 577 (R577). A presença do alelo X no polimorfismo de nucleotídeo único leva à produção de  $\alpha$ -actinina-3 não funcional, impactando na atividade do músculo esquelético para gerar contrações vigorosas em alta velocidade. Os homozigotos do alelo X são deficientes na proteína alfa-actinina-3, que está associada a uma porcentagem menor de fibra de contração rápida, mas não resulta em doença (PICKERING, KIELY, 2017; PASQUA *et al.*, 2011; MORENO *et al.*, 2020). Foi observado que a frequência do alelo R do *ACTN3* tende a ser maior entre atletas que participam de eventos relacionados a velocidade e de força em relação a indivíduos que participam de eventos de resistência (PIMENTA *et al.*, 2013; DEL COSO *et al.*, 2016; PICKERING, KIELY, 2017). As atividades militares possuem características mistas, o que pode fazer da alfa-actinina-3 uma proteína determinante para o desempenho físico global. Além disso, evidências emergentes sugerem que esse polimorfismo pode afetar outros importantes fenótipos como a recuperação de exercícios, o risco a lesões e a adaptação ao treinamento (MYOSOTIS *et al.*, 2017; PICKERING, KIELY, 2017; DEL COSO *et al.* 2018; RODAS *et al.* 2021). A figura 4 sumariza as possíveis implicações mais amplas do genótipo *ACTN3* relacionadas a atividade física.

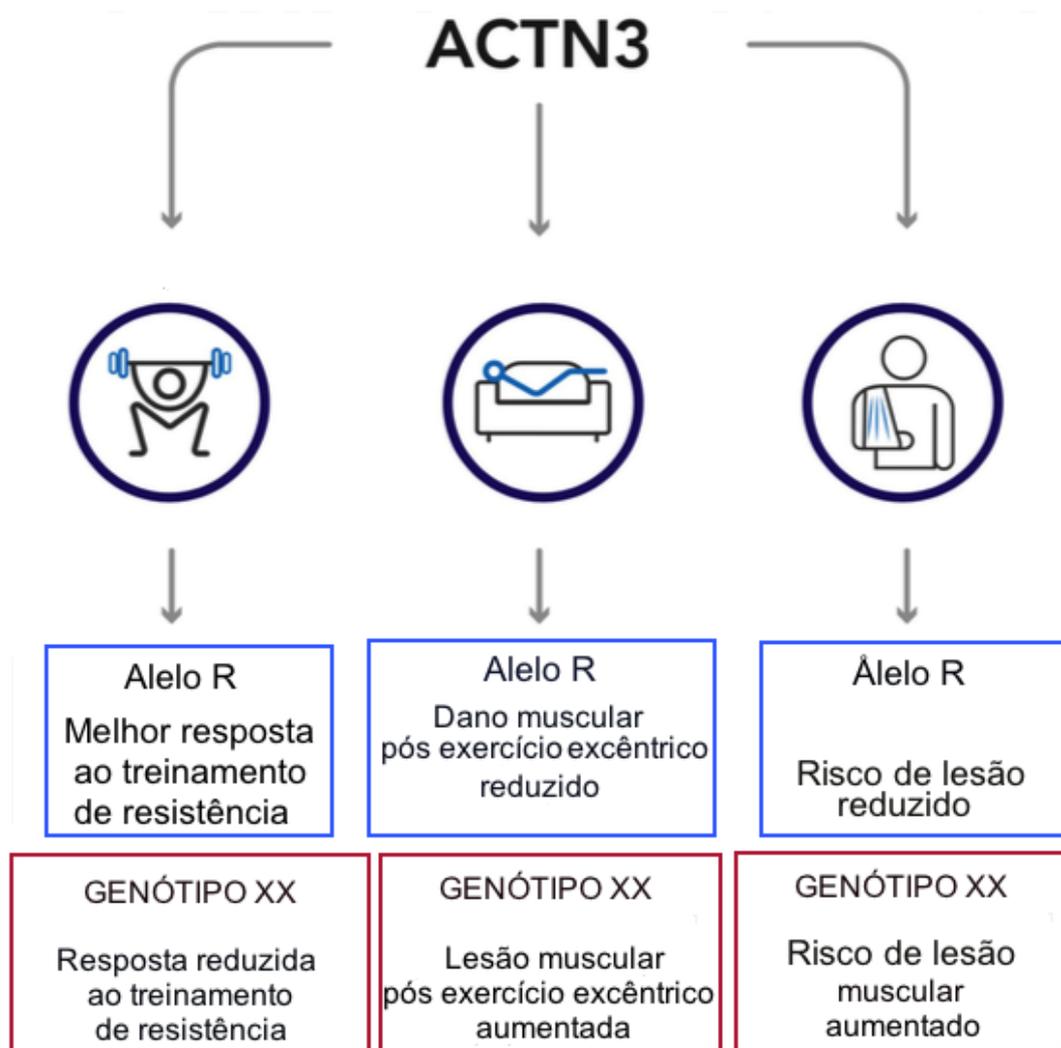


Figura 4 - Resumo das possíveis implicações do genótipo *ACTN3* relacionadas a atividade física. Fonte: Adaptado de PICKERING, KIELY, 2017.

Desse modo, pode-se inferir que o aspecto multifacetado do polimorfismo do gene *ACTN3* aliado à riqueza dos desdobramentos decorrentes do genótipo e suas influências no desempenho físico, foram os combustíveis que impulsionaram a inclusão do estudo desse polimorfismo no presente trabalho.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações plasmáticas dos biomarcadores tradicionalmente usados no diagnóstico da lesão muscular induzida por exercício, durante atividade física militar, a saber: creatina quinase total (CK), creatina quinase cardíaca (CKMB), mioglobina e lactato desidrogenase (LDH); bem como investigar possíveis correlações com os diferentes genótipos apresentados por eles para o polimorfismo do gene *ACTN3*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar um grupo homogêneo de militares voluntários, alunos do Curso Básico Paraquedista do Exército Brasileiro;
- Aplicar a escala de Borg para a avaliação subjetiva da percepção do esforço imediatamente após a atividade física militar;
- Avaliar a cinética dos biomarcadores tradicionalmente utilizados na verificação do comprometimento muscular esquelético após atividade física militar;
- Determinar o genótipo do polimorfismo rs1815739 do gene *ACTN3* e correlacionar com os dados da população brasileira.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 POPULAÇÃO

Os participantes do estudo foram alunos militares, provenientes do Curso Básico Paraquedista, conduzido pelo Centro de Instrução Paraquedista General Penha Brasil, realizado em outubro de 2022.

A apresentação do projeto de pesquisa foi realizada no auditório do referido Centro de Instrução e foi pautada na exposição dos objetivos e esclarecimentos sobre todas as etapas. Após concordarem com a participação no estudo, trinta e dois (32) militares do sexo masculino aderiram como voluntários, sendo todos eles cadetes do último ano da Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN). Nesse momento, também foram coletados os resultados do último Teste de Aptidão Física (TAF), que consiste em uma corrida de 12 minutos, percorrendo cerca de 3.200m. Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1), no qual constou que a participação é estritamente voluntária e, ainda que sejam militares, não há margem para constrangimento hierárquico. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Capacitação Física do Exército – CCFEX, conforme consta no apêndice, sendo obtido o Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 58413222.2.0000.9433.

### 4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para a seleção dos voluntários foram escolhidos os experientes cadetes militares, de forma a obter uma população mais homogênea. Desse modo, o gênero, a faixa etária e o condicionamento físico foram compatíveis com o perfil dos cadetes que cursam o último ano da AMAN, conforme descrito abaixo:

- Sexo: masculino;
- Idade: de 22 a 26 anos; e
- Último Teste de Aptidão Física como Muito Bom ou Excelente (3.213m  $\pm$  132m em 12 minutos, valores em média).

Além desses parâmetros, foram excluídos aqueles que relataram:

- a presença de lesões ortopédicas, dores musculares e/ou qualquer outra queixa de saúde que pudessem impedir o melhor desempenho na exigência física do dia a dia de atividade dos militares;
- uso de medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios nos 3 (três) dias que antecederam a atividade do curso;
- uso de suplementos destinados a otimizar o desempenho físico como, por exemplo, cafeína e termogênicos.

#### 4.3 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras biológicas foram coletadas a partir de punção de sangue periférico utilizando-se do sistema a vácuo Vacuette® realizada por profissionais qualificados para tal atividade em tubos de 4 mL contendo EDTA (para evitar a coagulação sanguínea) e de 8 mL “sem anticoagulante”.

#### 4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O estudo foi realizado durante a primeira semana do Curso Básico Paraquedista. Nesta semana, as atividades começavam por volta das 5:30h e finalizavam por volta das 16h, com intervalo de almoço das 12-13h. Dentro da programação semanal, constavam atividades administrativas, treinamentos físicos e palestras. De acordo com a Divisão de Ensino, responsável pela condução das atividades do Curso Básico Paraquedista, não houve restrição quanto à ingestão de água, privação de sono ou restrição de alimentação.

A coleta das amostras biológicas foi realizada em 4 (quatro) diferentes dias e totalizaram 6 (seis) coletas, conforme discriminado abaixo:

Dia 1 (D1): coleta antes e após atividade física (C1 e C2, respectivamente), representada pelo Exame de Aptidão Física Definitiva (EAFD) de pista de cordas em tempo livre e corrida de 5km em até 25 minutos, vestindo calça camuflada e coturno. A primeira coleta foi realizada no Destacamento de Saúde do Centro de Instrução Paraquedista General Penha Brasil e a segunda na Ponte da Amizade, localizada exatamente na linha de chegada da pista de corrida.

Dia 2 (D2): coleta (C3) 24h após C1 e antes da atividade física em D2. Realizada no Destacamento de Saúde do Centro de Instrução Paraquedista General

Penha Brasil. Neste dia, a atividade física prevista para todos os alunos do Curso Básico Paraquedista era o EAFD de natação (50 metros em 2 minutos e 30 segundos), que foi realizada após a coleta.

Dia 3 (D3): coleta antes (C4) e após (C5) a cerimônia da Marcação de Capacete, ambas realizadas no Destacamento de Saúde do Centro de Instrução Paraquedista General Penha Brasil. D3 ocorreu 24h após D2.

Dia 4 (D4): sexta e última coleta (C6) realizada após 96h após C4.

A figura 5 ilustra a linha o tempo do protocolo experimental utilizado.

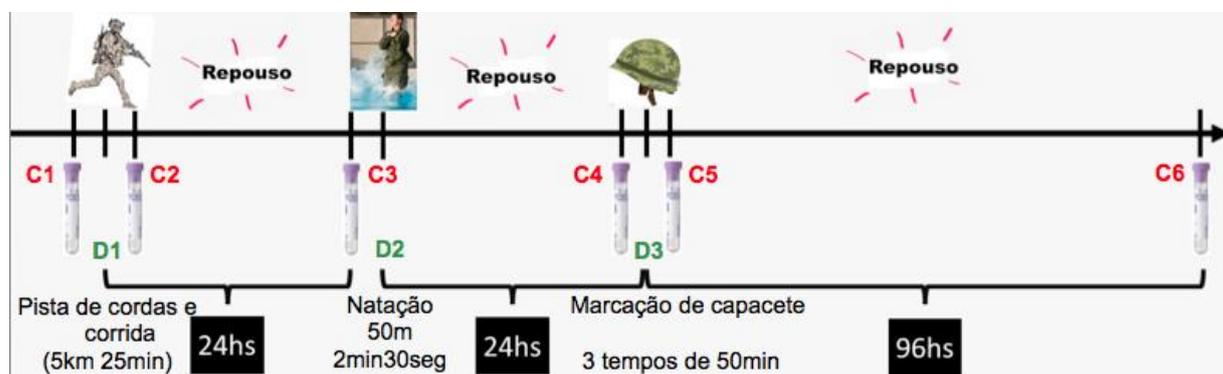


Figura 5 – Representação do protocolo experimental. Referência: *o autor*.

Os intervalos de coleta foram ajustados de forma a não comprometer as atividades previstas, mas estabelecidos conforme os dados de cinética dos marcadores já conhecidos (CK, mioglobina e LDH), até seu retorno aos valores basais (FERNANDES, J. F. T. *et. al*, 2019; YANG, Y., CHEN, Z, 2021). Todas as atividades físicas foram coordenadas por Oficial de Treinamento Físico Militar capacitado e apoiado por equipe médica de emergência.

A Marcação de Capacetes é uma atividade preliminar do curso básico de paraquedismo e esse evento acontece conforme o Cerimonial de Entrada e de Saída da Área de Estágios. O deslocamento para a área de estágios é realizado em formação, passo acelerado e os movimentos são estereotipados: joelhos exageradamente suspensos (elevação de joelhos com flexão excessiva de quadril), pés batendo firme no solo, cabeças erguidas e o tronco reto. A marcação de capacetes é dividida em 3 (três) seções de 50 (cinquenta) minutos, com intervalos de 10 (dez) minutos. Na primeira seção, os alunos realizaram 5 (cinco) entradas e saídas da área de estágios, num percurso de, aproximadamente, 400 (quatrocentos) metros. Nesta seção, entre as entradas e saídas da área de estágio, a comando do

instrutor, foi realizado o exercício vulgarmente conhecido como “canguru”, conforme ilustrado na figura 6.



Figura 6 - Execução do exercício canguru. Fonte: EB, 2013.

A segunda seção teve duas entradas e saídas da área de estágios, percorrendo o mesmo percurso, ou seja, 400 (quatrocentos) metros e foi focada em exercícios físicos, iniciando com 3 (três) minutos de execução de repetições de canguru e, em seguida, todos os alunos se apresentaram aos instrutores executando 20 (vinte) cangurus seguidos de 10 (dez) flexões. Os instrutores se revezaram para supervisionar particularmente os participantes e cada um

determinava a execução do exercício que era intercalado entre canguru, flexão de braços e polichinelo.

Por fim, a terceira e última seção foi composta basicamente por atividade física intensa onde cerca de 35 (trinta e cinco) instrutores se revezaram para supervisão e determinação dos exercícios, sendo estes majoritariamente canguru e flexão de braços, em séries de 10 (dez) exercícios. As atividades realizadas foram sumarizadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Sumário de atividades realizadas pelos militares do curso.

D2		<ul style="list-style-type: none"> <li>- corrida de 5km em 25 minutos, vestindo calça camuflada e coturno</li> <li>- 4 metros de subida em corda sem usar os pés com tempo livre</li> </ul>
D3		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 metros de natação em até 2min 30s</li> </ul>
D4	50min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 percursos de 400m – corrida com joelhos exageradamente suspensos (elevação de joelhos com flexão excessiva de quadril) e pés batendo firmes no solo</li> <li>- Entre os 5 percursos de corrida foram realizados, no total, aproximadamente 100 repetições de canguru</li> <li>- Após essa sequência de atividades foi concedido um intervalo de 10 minutos</li> </ul>
	50min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 percursos de 400m - corrida com joelhos exageradamente suspensos (elevação de joelhos com flexão excessiva de quadril) e pés batendo firmes no solo</li> <li>- Após o segundo percurso da corrida, foram realizados 3 minutos de repetições de cangurus em ritmo moderado</li> <li>- Na sequência, todos os alunos do curso executaram 20 cangurus seguidos de 10 flexões de braço</li> <li>- Por fim, durante 25 minutos, foram executados repetições de cangurus intercalados com flexões de polichinelos em séries de 10 exercícios totalizando, aproximadamente, 300 repetições.</li> <li>- Após essa sequência de atividades foi concedido um intervalo de 10 minutos</li> </ul>
	50min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Durante 50 minutos foram realizadas 200 repetições de cangurus intercaladas com 200 repetições de flexões de braço em séries de 10 exercícios</li> </ul>

#### 4.5 ESTIMATIVA DO VOLUME DE EXERCÍCIO APLICADO

O volume de exercício praticado durante a corrida de 5 km com calça e coturno, bem como o volume de atividade física realizado na cerimônia de marcação de capacete foram obtidos segundo o planejamento de atividades e quadro de trabalho semanal do curso, alvo representado pelo número de repetições e entradas e saídas da área de estágio. Tanto o EAFD de corrida como a cerimônia de marcação de capacete constituem etapas eliminatórias.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO ESFORÇO PERCEBIDO – ESCALA DE BORG

A Classificação de Esforço Percebido de Borg (RPE) constitui uma forma amplamente utilizada de medir o nível de intensidade da atividade física (BORG, 1970; DEL COSO *et al.* 2016; BARRANCO *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2021). A classificação original dessa escala varia do nível 6 ao 20, na qual o nível 6 refere-se a “nenhum esforço” e o “esforço máximo” corresponde ao nível 20. Geralmente, as classificações de esforço percebido entre 12 a 14, na Escala de Borg, sugerem que a atividade física está classificada em um nível moderado de intensidade (CDC, 2022; CABRAL *et al.*, 2017; BORG, 1970). A tabela 1 descreve cada uma das classificações da escala de Borg e o correspondente nível de esforço percebido.

Tabela 1- Escala de Borg (CABRAL *et al.*, 2020).

<b>Escala de Borg</b>	<b>Nível de Percepção de Esforço</b>
6	Nenhum esforço
7	Extremamente leve
8	Extremamente leve
9	Muito leve
10	Muito leve
11	Leve
12	Leve
13	Um pouco difícil (pesado)

14	Um pouco difícil (pesado)
15	Difícil (pesado)
16	Difícil (pesado)
17	Muito difícil (pesado)
18	Muito difícil (pesado)
19	Extremamente difícil (pesado)
20	Esforço máximo

A escala de Borg foi utilizada para avaliar o esforço percebido dos voluntários após a corrida de 5km (D1:C2) e após a cerimônia da Marcação de Capacete (D3:C5). A escala foi explanada previamente a cada militar. A equipe de coleta foi independente da equipe que controlou o volume dos exercícios e daquela que aplicou as atividades físicas. Foi garantido ao voluntário a oportunidade de uma resposta real, uma vez que o trabalho com equipes independentes permitiu que a resposta não fosse usada para ajustar ou modificar a carga de exercícios. Para a obtenção dos resultados, cada indivíduo foi abordado imediatamente após sua atividade, individualmente sem a interferência ou testemunho de outros voluntários.

#### 4.7 ANÁLISES LABORATORIAIS DOS BIOMARCADORES

As concentrações plasmáticas ou atividades enzimáticas de creatina quinase e lactato desidrogenase foram analisadas por meio do método fotométrico, enquanto que os biomarcadores mioglobina e CKMB por quimioluminescência. Todas as análises foram realizadas com amostras de soro, utilizando o equipamento *Alinity* (Abbott) do Laboratório de Análises Clínicas do Instituto de Biologia do Exército, localizado no Hospital Central do Exército.

#### 4.8 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO DO GENE *ACTN3*

Os tubos EDTA com as amostras de sangue periférico foram centrifugados a

3000 rpm por 5 minutos (Eppendorf Hamburg, Germany) e as frações celulares contendo os elementos figurados do sangue (hemácias, leucócitos e plaquetas) foram submetidas a métodos de extração de DNA genômico por *beads* magnéticas sob automatização com kit comercial para extração de DNA na plataforma de extração EXTRACTA<sup>®</sup> 32 (Loccus, Cotia, BR). A qualidade, bem como a quantificação do ácido nucleico obtido foi verificada por espectrofotometria usando Nanodrop 2000c (Thermo Scientific; Wilmington, USA). O mesmo foi armazenado a -20°C. A genotipagem do SNP no gene *ACTN3* (rs1815739) foi realizada através de ensaio de discriminação alélica usando sondas do tipo TaqMan e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com leituras no aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermofisher, Foster City, CA, USA). Os oligonucleotídeos e sondas utilizados para a fabricação dos ensaios foram obtidos comercialmente na forma já funcionalmente testada e validada pelo fabricante (Thermofisher, Foster city, CA, USA). Em cada poço da placa de qPCR foram pipetados 10-15 ng de DNA (1 µL) além de 5 µL de Master mix para genotipagem (TaqMan Genotyping Master Mix<sup>®</sup> - 2x), 0,5 µL de *primers* e sondas específicos (TaqMan Genotyping Assay mix<sup>®</sup> - 20x) e 3,5 µL de água livre de DNase e RNase, totalizando para cada amostra, um volume final de 10 µL. A determinação dos genótipos após a amplificação foi realizada no *software* StepOnePlus<sup>™</sup> *Software* v2.3 e confirmada através do *software* TaqMan<sup>®</sup> Genotyper.

## 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 4.9.1 Avaliação do esforço percebido – Escala de Borg

Foi utilizado o teste de Kolmogorov Smirnov para avaliar a distribuição dos dados referentes à escala de Borg. As medianas de Borg foram comparadas através de testes de Wilcoxon para amostras pareadas.

### 4.9.2 Análises laboratoriais dos biomarcadores

As análises estatísticas aplicadas para as concentrações plasmáticas dos marcadores CK, Mioglobina, LDH e CKMB foram realizadas utilizando o *software*

GradPad Prism. Os resultados foram avaliados quanto a normalidade utilizando o teste de Kolmogorov Smirnov. As medidas foram avaliadas intragupo em cada tempo de coleta (C1, C2, C3, C4, C5 e C6). Para os dados que apresentaram distribuição normal, foi aplicada a estatística paramétrica (teste t de Student pareado). Os dados com distribuição não normal foram tratados obedecendo a estatística não-paramétrica, representado pelo teste de Mann-Whitney. Para análises nos diversos tempos, ou seja, antes e após a corrida, antes e após a marcação de capacete e ente C1 e C6, foram usados os testes pareados de Wilcoxon.

#### 4.9.3 Genotipagem do polimorfismo do gene *ACTN3*

A distribuição dos genótipos do polimorfismo rs1815739 no gene *ACTN3* foi testada para possíveis desvios do equilíbrio de Hardy–Weinberg usando o teste de qui-quadrado. Além disso, sua análise no trabalho foi realizada considerando o modelo genético populacional de genótipos (RR, RX e XX) e o modelo recessivo (R e X) onde os indivíduos heterozigotos e homozigotos para o alelo majoritário foram agrupados na mesma classe, baseado em seu fenótipo fisiológico. Para testar os biomarcadores com distribuição não-normal (CK, CKMB e MIO) em função dos modelos de genótipos e recessivo em cada momento separadamente, foram aplicados respectivamente os testes não paramétricos de Kruskal-wallis e Mann Whitney. Para LDH e os mesmos modelos genéticos foram aplicados e os testes paramétricos de ANOVA *one-way* e teste de t para amostras independentes. A significância estatística de comparações múltiplas de fenótipos de exercício foi ajustada pela correção de Bonferroni.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 VOLUME DE EXERCÍCIO APLICADO

Todos os militares participantes do estudo foram aprovados nas avaliações físicas: pista de cordas, EAFD de corrida, natação e cerimônia de marcação de capacete. Essas atividades fazem parte do rol de avaliações eliminatórias do Curso Básico Paraquedista. Em relação à pista de cordas (4 metros de subida em corda sem usar os pés) e à natação (50m em 2min e 30s), não foi possível aplicar o teste de esforço subjetivo ou mesmo computar o tempo preciso de execução e realizar coletas sanguíneas após a atividade. Quanto ao EAFD de corrida (5km em 25min), não foi possível computar os tempos em que cada militar completou a atividade pelo alto risco de comprometimento do andamento das atividades previstas do Curso. Por fim, as atividades do Cerimonial de Marcação de Capacete, quais sejam, os percursos de entradas e saídas da área de estágio (5 percursos de 400m e 2 percursos de 400m) e execuções das repetições de cangurus, flexões de braços e de polichinelos, foram realizadas em bloco, com todos os alunos do Curso de uma só vez, sendo os exercícios realizados simultaneamente e com supervisão. Diante dos desafios aqui apresentados, optou-se por utilizar a escala de Borg como ferramenta para a avaliação subjetiva do esforço nos momentos em que foi possível obtê-la.

### 5.2 AVALIAÇÃO DO ESFORÇO PERCEBIDO – ESCALA DE BORG

As análises de esforço percebido por meio da escala de Borg, demonstraram que os militares tiveram diferentes percepções em relação às atividades praticadas. Após a marcação do capacete as medianas apresentadas foram bem superiores ( $p < 0,0001$ ) e inclusive se aproximaram muito dos valores máximos da escala. Tais dados apontam para o fato de que as atividades realizadas na prova da marcação do capacete foram muito mais intensas que durante a corrida. A Tabela 2 resume os resultados obtidos a partir do teste de Wilcoxon aplicado devido à distribuição não normal dos dados (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da avaliação do esforço percebido utilizando a escala de Borg (n = 32)

<b>Idade</b>	23 ± 2,0
<b>Borg após corrida</b>	11 ± 2,0
<b>Borg após Marcação de Capacete</b>	16,5 ± 3,0**

\*\* p<0,01 para o momento após corrida. Dados apresentados em mediana ± desvio interquartil médio.

### 5.3 ANÁLISES LABORATORIAIS DOS MARCADORES CK, CKMB, MIOGLOBINA E LDH

Os resultados obtidos de CK, CKMB, MIO e LDH, nos diferentes momentos de coleta, foram avaliados quanto a normalidade. Os biomarcadores CK, CKMB e MIO apresentaram uma distribuição não normal e, por esse motivo, foram calculadas suas medianas e desvios interquartil médio. Já LDH apresentou uma distribuição normal e, portanto, seus valores foram trabalhados em médias e desvios padrão.

Corroborando os resultados encontrados na medida do esforço percebido por meio da escala de Borg, os níveis de CK, mioglobina, CKMB e LDH, conforme apresentado na Figura 6, apresentaram um aumento significativo de suas concentrações plasmáticas após as provas de corrida e de marcação de capacete, ocorrendo um aumento ainda superior após a prova de marcação de capacete. Cabe destacar que as medianas no momento 96 horas após a prova do capacete, para todos os marcadores aqui apresentados, não são diferentes das medianas apresentadas antes da corrida que marcou o início das atividades, demonstrando que nesse tempo a recuperação muscular dos militares já foi satisfatória. Os níveis de CK e CKMB (Figuras 6A e 6B) foram bem semelhantes durante todos os pontos medidos na atividade exceto pelo fato de que os níveis de CKMB após a corrida foram significativamente maiores do que no momento de 96 horas após a prova do capacete. Outro ponto interessante reside nos níveis de CK e CKMB aumentados antes da prova do capacete, comparativamente ao momento 24 horas após a corrida, e antes da prova de natação (PRE\_NAT), mostrando que esse aumento pode ser consequência da prova de natação acrescida do acúmulo das atividades do dia anterior. Observa-se que as médias de LDH 96hs após a prova do capacete

foram significativamente menores que as médias encontradas antes do início do curso (Figura 6D). De modo semelhante ao ocorrido com CK e CKMB antes da prova do capacete, uma das hipóteses para esse comportamento de modesto aumento de LDH visualizado na primeira coleta, anterior ao início de qualquer atividade física do Curso Básico Paraquedista, pode ser alguma atividade física realizada pelos participantes do estudo nas 24-48h antecedentes ao início do curso, a fim de manter o preparo físico, acarretando em algum efeito decorrente de acúmulo de atividades anteriores à apresentação no Curso Básico Paraquedista.

As medianas de CK, Mioglobina e CKMB foram comparadas a partir de análises pareadas utilizando o teste de Wilcoxon, em função de sua distribuição não normal enquanto que, para a análise das médias de LDH (única variável com distribuição normal) foi utilizado o teste t de student pareado. O gráfico apresentado com os resultados da MIO foi plotado em escala de  $\log_2$ , diferente dos demais (apresentados em escala decimal), de modo a possibilitar a visualização das diferenças nas concentrações plasmáticas desse analito.

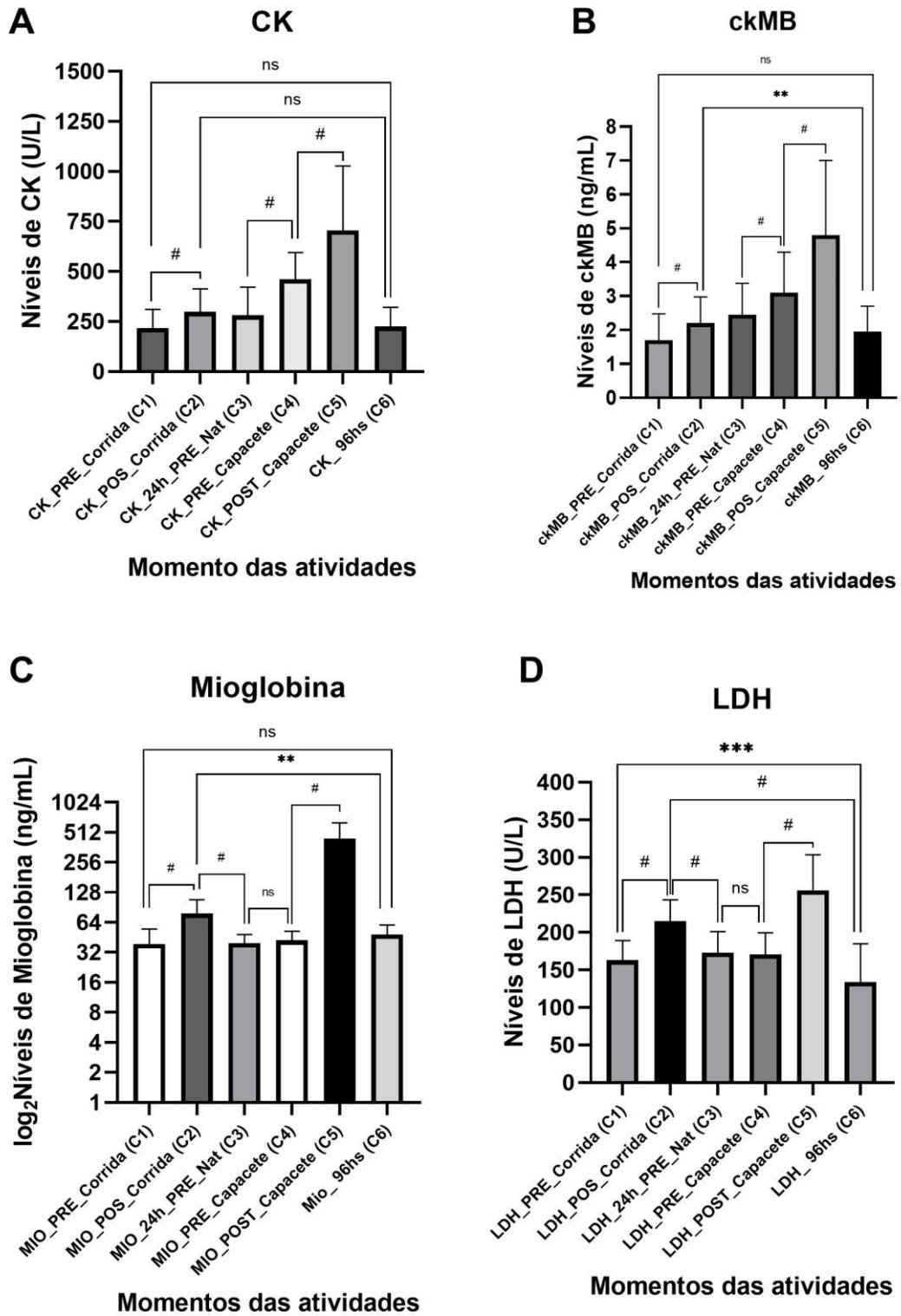


Figura 7 - Valores em medianas de CK (7A), CKMB (7B), MIO (7C) e médias de LDH (7D) nos momentos antes e após a corrida (PRE\_Corrída e POS\_Corrída), 24 horas após a corrida (24h\_PRE\_Nat), antes e após a marcação de capacete (PRE\_Capacete e POST\_Capacete) e após 96 horas da prova do capacete (96hs). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; # $p < 0,0001$ ; ns = não significativo.

#### 5.4 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO DO GENE *ACTN3*

A distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene *ACTN3* demonstrou uma frequência superior para o genótipo CT (RX), seguido do genótipo CC (RR) e, com menor frequência, o genótipo TT (XX). Os resultados das análises da genotipagem encontram-se apresentados na Tabela 3 e estão de acordo com o equilíbrio genético de Hardy Weinberg.

Tabela 3 – Distribuição dos genótipos do polimorfismo *ACTN3*.

Variável	Total	
	n	%
<b><i>ACTN3</i></b>		
TT (XX)	5	19,0
CT (RX)	15	46,5
CC (RR)	12	34,5

Os valores dos índices do último TAF dos participantes antes da entrada no curso, bem como os valores da escala de Borg após a corrida e após a prova do capacete foram analisados em função dos genótipos e dos alelos apresentados para o polimorfismo no gene *ACTN3*. Os índices alcançados dos últimos TAFs apesar de próximos de uma significância, foram semelhantes entre os genótipos e alelos. Os valores da escala de BORG também não foram diferentes.

Tabela 4 - Distribuição dos genótipos/alelos do polimorfismo *ACTN3* em função das medianas do último TAF dos participantes bem como sua escala de percepção de esforço após a corrida e prova do capacete.

Biomarcador	TT (XX)	CT (RX)	CC (RR)	p	Alelo R	Alelo X	P
Último TAF	3115±158	3262±181	3200±150	0,080	3200±150	3115±158	0,070
Borg pós corrida (C2)	11,5± 2,0	11,0± 2,0	11,0± 5,0	0,940	11,0± 3,0	11,5± 2,0	0,9352
Borg pós Capacete (C5)	15,0± 3,0	16,0± 3,0	17,0± 3,0	0,514	16,5± 3,0	15,0± 3,0	0,620

Com vistas a investigar a possível relação entre a variabilidade dos

biomarcadores avaliados no presente trabalho em função dos diferentes genótipos e alelos no gene *ACTN3*, os resultados das medianas de CK, CKMB, mioglobina e das médias de LDH foram reunidos e apresentados na Tabela 4. Como pode ser observado, as medianas aumentaram de maneira similar em todos os biomarcadores em uma análise intramarcadores com os maiores incrementos aparecendo no quinto ponto, que coincide com o ápice do exercício físico do curso em todos os genótipos observados, seguido pela redução dos níveis séricos a valores comparáveis aos iniciais 96h após a marcação de capacete.

A análise das medianas dos níveis de CK, MIO e CKMB nos 6 momentos (antes e após a corrida, antes da natação, antes e após a marcação de capacete e após 96h) demonstrou que tais biomarcadores não foram profundamente influenciados pelos diferentes genótipos de *ACTN3* ou ainda pela presença de pelo menos um de seus alelos R (Tabela 5). As médias dos níveis séricos de LDH também não foram diferentes entre os genótipos/alelos do *ACTN3*, em todos os 6 momentos avaliados.

TABELA 5 - Medianas dos genótipos e alelos do gene ACTN3 em função dos biomarcadores CK, CKMB e MIO e médias dos mesmos genótipos e alelos em função da enzima LDH.

Biomarcador	TT (XX)	CT (RX)	CC (RR)	p	Alelo R	Alelo X	P
CK pré corrida (C1)	175,0±62,0	217,0±117,0	244,5±112,0	0,284	228,0±141,0	175,0±62,0	0,166
CK pós corrida (C2)	257,0±76,0	298,0±195,0	324,5±192,0	0,249	324,0±177,0	257,0±76,0	0,109
CK pré natação (C3)	243,0±114,0	277,0±214,0	349,5±242,0	0,310	283,0±202,0	243,0±114,0	0,263
CK pré marcação de capacete (C4)	422,0±206,0	442,0±172,0	498,0±312,0	0,164	465,0±211,0	422,0±206,0	0,310
CK pós marcação de capacete (C5)	598,0±299,0	708,0±290,0	848,5±445,0	0,090	711,0±451,0	598,0±299,0	0,077
CK pós 96h (C6)	208,0±1315,0	229,0±175,0	235,0±139,0	0,681	229,0±145,0	208,0±1315,0	0,999
CKMB pré corrida (C1)	2,2±1,1	1,7±0,7	1,6±1,2	0,694	1,6±1,0	2,2±1,0	0,448
CKMB pós corrida (C2)	2,9±1,1	2,0±1,0	2,1±1,9	0,771	2,0±1,0	2,9±1,0	0,545
CKMB pré natação (C3)	3,0±2,2	2,3±1,5	2,4±2,1	0,558	2,3±2,0	3,0±2,0	0,545
CKMB pré marcação de capacete (C4)	4,3±3,5	3,0±2,0	3,1±1,8	0,274	3,0±2,0	4,3±3,0	0,285
CKMB pós marcação de capacete (C5)	5,9±3,7	4,5±2,8	4,5±6,7	0,893	4,5±4,0	5,9±4,0	0,658
CKMB pós 96h (C6)	2,3±1,9	1,6±0,9	2,1±1,5	0,171	1,6±1,0	2,3±2,0	0,999
MIO pré corrida (C1)	28,6±26,6	39,6±25,6	39,5±31,8	0,220	39,6±22,0	28,6±27,0	0,087

MIO pós corrida (C2)	66,1±22,8	79,4±42,0	94,4±57,8	0,170	79,7±56,0	66,1±23,0	0,068
MIO pré natação (C3)	34,7±18,2	40,0±9,2	39,8±18,8	0,473	40,5±15,0	34,7±18,0	0,241
MIO pré marcação de capacete (C4)	40,9±10,2	45,6±15,5	40,7±13,4	0,627	44,9±16,0	40,9±10,0	0,650

Biomarcador	TT (XX)	CT (RX)	CC (RR)	p	Alelo R	Alelo X	P
MIO pós marcação de capacete (C5)	228,3±215,1	457,8±351,5	497,3±379,2	0,057	489,1±345,0	228,3±215,0	0,019
MIO pós 96h (C6)	41,4±99,5	46,5±19,6	50,9±36,8	0,910	49,9±21,0	41,4±100,0	0,880
LDH pré corrida (C1)	164,2±73,0	157,4±24,0	170,5±37,0	0,421	163,2±33,0	164,2±73,0	0,954
LDH pós corrida (C2)	222,6±78,0	202,5±31,0	225,7±47,0	0,126	211,4±33,0	222,6±78,0	0,676
LDH pré natação (C3)	179,4±78,0	169,0±41,0	177,2±26,0	0,600	172,4±37,0	179,4±78,0	0,713
LDH pré marcação de capacete (C4)	177,8±73,0	162,4±38,0	178,6±36,0	0,297	169,6±34,0	177,8±73,0	0,669
LDH pós marcação de capacete (C5)	243,0±95,0	242,5±51,0	278,9±82,0	0,109	258,1±83,0	243,0±95,0	0,590
LDH pós 96h (C6)	152,6±140,0	115,3±66,0	148,0±41,0	0,248	130,5±41,0	152,6±150,0	0,796

Nota: Os dados em azul representam os momentos em que os marcadores apresentaram valores próximos de serem considerados estatisticamente diferentes em função dos genótipos/alelos do *ACTN3*. Em laranja está destacado o único momento/biomarcador em que foram verificados valores estatisticamente diferentes em função da presença do alelo R.

No entanto, ainda na Tabela 5, é possível identificar que na mensuração de CK pós marcação de capacete, que coincide com a atividade física de maior intensidade, tanto quando se investiga a influência dos diferentes genótipos de *ACTN3* como pela presença de pelo menos um de seus alelos R, suas medianas apresentaram valores próximos de serem considerados diferentes ( $p=0,090$  e  $p=0,077$ , respectivamente). Nesse mesmo momento (pós marcação de capacete), a diferença entre os níveis séricos de MIO foi significativa entre a presença/ausência de alelos R ( $p=0,019$ ) e próxima de uma significância entre os genótipos ( $p=0,057$ ), proximidade essa também encontrada antes e após a corrida (C1:  $p=0,087$  e C2:  $p=0,068$ , respectivamente).

Os resultados obtidos também foram avaliados quanto às possíveis diferenças entre os momentos ( $\Delta$ ), antes e após a corrida, antes e após a marcação de capacete e após 96h categorizados em grupos de acordo com os genótipos e alelos do gene *ACTN3* (Tabela 6). Novamente, depreende-se que a diferença dos momentos antes e após a corrida bem como antes e após a marcação de capacete, no que tange ao biomarcador CK, para aqueles militares portadores do alelo R, apresentou apenas uma proximidade de diferença ( $p=0,077$  e  $p=0,098$ , respectivamente), mas não foi estatisticamente significativa. De modo semelhante, as diferenças das médias do LDH e medianas de MIO no mesmo momento do exercício físico mais extenuante, representado pela marcação de capacete (C5-C4), também apresentaram apenas uma tendência à diferença quando esses valores são comparados nos diferentes genótipos do *ACTN3* ( $p=0,089$  e  $p=0,056$ ). No entanto, ainda permanece a ausência de significância estatística dessas diferenças. Por fim, foram estatisticamente diferentes os valores das medianas de  $\Delta$ CK após 96h (C6-C5) nos diferentes genótipos de *ACTN3* ( $p=0,042$ ) bem como na avaliação da presença do alelo R ( $p=0,009$ ); assim como foram também significativas as diferenças das medianas da mioglobina no momento antes e após a marcação de capacete (C5-C4) e após 96h (C6-C5) ( $p=0,019$  e  $p=0,016$ , respectivamente), quando foi analisada a influência do alelo R.

TABELA 6 - Diferenças ( $\Delta$ ) das medianas dos biomarcadores CK, CKMB e MIO e das médias da enzima LDH, em diferentes momentos, categorizados em grupos pelos genótipos e alelos do gene ACTN3.

Biomarcador	TT (XX)	CT (RX)	CC (RR)	p	Alelo R	Alelo X	P
$\Delta$ CK corrida (C2-C1)	59,0 $\pm$ 25,0	76,0 $\pm$ 78,0	73,0 $\pm$ 49,0	0,205	73,0 $\pm$ 58,0	59,0 $\pm$ 25,0	0,077
$\Delta$ CK marcação de capacete (C5-C4)	235,0 $\pm$ 162,0	330,0 $\pm$ 214,0	261,0 $\pm$ 380,0	0,241	306,0 $\pm$ 314,0	235,0 $\pm$ 162,0	0,098
$\Delta$ CK após 96h (C6-C5)	371,0 $\pm$ 1026,0	525,0 $\pm$ 224,0	483,0 $\pm$ 439,0	0,042	505,0 $\pm$ 348,0	371,0 $\pm$ 1026,0	0,009
$\Delta$ CKMB corrida (C2-C1)	0,6 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 1,0	0,951	0,5 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,960
$\Delta$ CKMB marcação de capacete (C5-C4)	1,5 $\pm$ 2,0	1,9 $\pm$ 1,0	1,4 $\pm$ 3,0	0,648	1,7 $\pm$ 2,0	1,5 $\pm$ 2,0	0,696
$\Delta$ CKMB após 96h (C6-C5)	3,6 $\pm$ 2,0	3,0 $\pm$ 2,0	3,2 $\pm$ 4,0	0,915	3,2 $\pm$ 3,0	3,6 $\pm$ 2,0	0,793
$\Delta$ MIO corrida (C2-C1)	30,1 $\pm$ 34,0	38,4 $\pm$ 27,0	39,4 $\pm$ 56,0	0,397	39,4 $\pm$ 40,0	30,1 $\pm$ 34,0	0,241
$\Delta$ MIO marcação de capacete (C5-C4)	187,8 $\pm$ 205,0	412,6 $\pm$ 322,0	492,2 $\pm$ 410,0	0,056	436,8 $\pm$ 339,0	187,8 $\pm$ 205,0	0,019
$\Delta$ MIO após 96h (C6-C5)	191,0 $\pm$ 186,0	417,5 $\pm$ 327,0	391,0 $\pm$ 408,0	0,057	402,6 $\pm$ 341,0	191,0 $\pm$ 186,0	0,016
$\Delta$ LDH corrida (C2-C1)	58,4 $\pm$ 27,0	45,1 $\pm$ 27,0	52,0 $\pm$ 37,0	0,504	50,9 $\pm$ 20,0	58,4 $\pm$ 27,0	0,380
$\Delta$ LDH marcação de capacete (C5-C4)	65,2 $\pm$ 64,0	80,0 $\pm$ 33,0	99,2 $\pm$ 63,0	0,089	89,1 $\pm$ 48,0	65,2 $\pm$ 64,0	0,218
$\Delta$ LDH após 96h (C6-C5)	102,5 $\pm$ 83,0	127,2 $\pm$ 93,0	127,9 $\pm$ 57,0	0,499	128,9 $\pm$ 85,0	102,5 $\pm$ 83,0	0,271

Nota: Os dados em azul representam os momentos em que os marcadores apresentaram valores de  $\Delta$  próximos de serem considerados estatisticamente diferentes em função dos genótipos/alelos do ACTN3. Em laranja estão destacados os momentos em que o único biomarcador (MIO) apresentou valores estatisticamente diferentes em função da presença do alelo R.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 AVALIAÇÃO DO ESFORÇO PERCEBIDO – ESCALA DE BORG

O esforço percebido representa o quanto o indivíduo sente que seu corpo está trabalhando, baseado na percepção de suas sensações que ocorrem durante a atividade física, incluindo aumento da frequência cardíaca, aumento da respiração ou frequência respiratória, aumento da sudorese e fadiga muscular. Embora seja uma medida subjetiva, sua classificação de esforço pode fornecer uma estimativa razoavelmente boa da frequência cardíaca real durante a atividade física (CDC, 2022; CABRAL *et al.*, 2017; BORG, 1998). Neste estudo, 32 militares apresentaram a mediana dos valores de BORG muito próxima a 17, na prova de marcação de capacete, que configura um esforço muito intenso, próximo ao esforço máximo que justifica a apresentação de altos níveis sanguíneos de marcadores de lesão muscular.

Os protocolos de exercícios escolhidos no presente trabalho não são representativos de nenhum esporte, modalidade, tipo de exercício ou valência física específicos, fato que dificultou em parte a correlação dos resultados com a literatura, uma vez que é bem conhecido que tarefas específicas para militares envolvem a necessidade de resistência aeróbia e anaeróbia e força muscular para preencher as exigências ocupacionais (OJANEN *et al.*, 2020). Ainda assim, vale pontuar que alguns estudos utilizaram a escala de Borg para avaliar o esforço percebido em diferentes atividades físicas, que demandam níveis elevados de resistência muscular. Del Coso e colaboradores (2016), utilizando o teste de Borg em triatletas descreveram após a competição uma média de esforço percebido de 17, exatamente como aquela mediana apresentada nesse estudo no momento da marcação de capacete. Outro estudo avaliou o esforço percebido em uma atividade de 30 minutos de corrida na esteira, com inclinação de 15%, e foi verificada uma média de nível 11 da escala de Borg (LIMA *et al.*, 2021). Semelhantemente ao encontrado nesse estudo quando foi aplicado o teste de Borg no momento pós corrida de 5 km, com duração média de 25 minutos, também foi encontrado uma mediana de nível 11 da mesma escala de Borg.

## 6.2 ANÁLISES LABORATORIAIS DOS MARCADORES CK, CKMB, MIOGLOBINA E LDH

Os níveis séricos de CK e MIO são considerados os principais marcadores da funcionalidade do tecido muscular e, muito frequentemente, apresentam valores elevados após atividade física extenuante (BRANCACIO *et al.*, 2007; LIPPI, CERIOTTI, 2018; CHALCHAT *et al.*, 2021). Além das dosagens de CK e mioglobina, a verificação das medidas plasmáticas da LDH fornecem informações adicionais não apenas sobre o estado do músculo, mas também sobre sua adaptação bioquímica à carga física, uma vez que indivíduos com atividade de CK persistentemente elevada podem também apresentar perfis de LDH alterados (BANFI *et al.*, 2012). Em exercícios de alta intensidade também é conhecido o aumento de CKMB que, embora seja classicamente um marcador preditivo de lesão cardíaca, pode encontrar-se aumentado em decorrência do aumento do número de células satélites que participam do reparo do músculo esquelético lesionado (NALCAKAN, 2014; SHARIFZADEH *et al.*, 2019). Em concordância com a literatura, os resultados preliminares encontrados nesse trabalho revelaram um aumento significativo dos valores de CK, mioglobina, LDH e CKMB após as atividades físicas realizadas, representadas pela corrida de 5 km e prova do capacete, sendo ainda mais evidente nesta última.

Um trabalho conduzido em 2019 com recrutas americanos (KENNEY *et al.*, 2019) avaliou os níveis sérios de CK antes e após 3 dias de treinamento básico militar, realizado diariamente, envolvendo corrida, agachamento, flexão de braços, abdominais e flexão na barra. A média das determinações de CK basal e após 3 dias, quando comparadas com as obtidas no presente trabalho nos momentos antes do início do curso e após a prova do capacete, foram extremamente semelhantes, com valores próximos a 220 U/L e 700 U/L, respectivamente. Evidências adicionais mostraram as medianas dos níveis de CK antes e após uma corrida realizada no asfalto, num percurso de 6 km em cerca de 33 minutos, com valores de 211 U/L e 295 U/L (MORALES *et al.*, 2012). Novamente, observou-se similaridade ao comparar as medianas dos resultados obtidos com os militares avaliados, 217 U/L (antes da corrida de 5 km em 25 min) e 298 U/L (após a corrida).

Avaliando os biomarcadores CK, CKMB, LDH e MIO antes e depois de uma prova de triatlon, Park e colaboradores (2014) mostraram um aumento significativo

de todos os marcadores, assim como os resultados aqui apresentados. A maior amplitude de aumento, quando se analisou as médias dos atletas amadores antes e após a prova, foi verificado com a MIO, equivalente a cerca de 13 vezes acima dos valores basais, um pouco superior à diferença encontrada deste mesmo marcador antes e após a prova do capacete, cujo aumento foi de, aproximadamente, 10 vezes acima do valor da mediana no momento mensurado antes dessa atividade. O aumento da enzima LDH também pode ser considerado semelhante, sendo de 30% no estudo com triatletas e 40% nos militares avaliados nos mesmos momentos mencionados anteriormente (antes e após a prova do capacete). Quanto às enzimas CK e CKMB, estas apresentaram um aumento consideravelmente maior nos triatletas do que os valores das medianas obtidas nos militares ao terminada a marcação de capacete.

De modo geral, não se pode negligenciar que os níveis dos biomarcadores avaliados podem se manter aumentados por um tempo um pouco mais longo devido ao somatório dos efeitos das atividades realizadas propriamente ditas e o acúmulo daquelas praticadas anteriormente. Em relação a cinética da CK, CKMB, mioglobina e LDH, a velocidade de liberação e eliminação destas enzimas e proteínas no plasma depende do nível de treinamento, do preparo físico, do tipo, da intensidade, da duração do exercício e do preparo físico do indivíduo. Baseado nessas informações os intervalos de coleta deste trabalho foram ajustados de forma a não comprometer as atividades previstas e, ao mesmo tempo, atender à cinética dos marcadores já conhecidos (CK, MIO e LDH), até seu retorno aos valores basais (FERNANDES, J. F. T. *et al.*, 2019; YANG, Y., CHEN, Z, 2021).

Após exercícios prolongados por exemplo, a atividade sérica de CK é acentuadamente elevada após 24 horas e pode permanecer aumentada por 48 a 72 horas quando os indivíduos não realizam repouso adequado de atividade física (BRANCACCIO *et al.*, 2007; KODADEK *et al.*, 2019). Após cerca de 6 a 10 dias seus níveis retornam aos valores basais (BRANCACCIO *et al.*, 2007; CHAVEZ *et al.*, 2016). Neste estudo, os maiores valores de CK foram obtidos no momento após a marcação de capacete, que coincide com o maior estresse físico e ocorreu 48 horas após o início do curso. Após 96 horas da marcação e, destacando que não houve atividade física proposta nesse intervalo, o que representou um período separado para repouso e recuperação, os valores de CK retornaram aos seus níveis basais.

Se por um lado a CK tem uma meia-vida de 1,5 dias, a MIO tem uma meia-

vida de 2 a 4 horas. Como consequência, a MIO plasmática não é tão sensível quanto a CK para o diagnóstico por causa de sua reduzida meia-vida. As concentrações séricas de MIO tendem a normalizar dentro de 6 a 8 horas após a lesão muscular (TORRES *et al.*, 2015). Corroborando os dados extraídos da literatura, os resultados das medianas de MIO obtidas nesse trabalho também não permaneceram aumentadas nas 24 horas subsequentes à corrida e tampouco após 96 horas da prova do capacete; mas retornaram a valores basais, certamente por já ter sido depurada da circulação sanguínea. Nota-se que foi verificado um aumento bastante significativo quando se comparou a mediana no momento pré (C4) e pós (C5) prova do capacete, inclusive bem superior à diferença obtida entre os momentos pré e pós corrida, o que retrata a maior intensidade dos exercícios executados no dia da cerimônia de marcação de capacete. Nesse ponto, é interessante resgatar os resultados das medianas encontradas na escala de esforço percebido de Borg na qual, do mesmo modo, foi atingido um nível bem superior no momento pós marcação de capacete (nível 16,5 – difícil) do que quando se compara a mediana do nível da escala de Borg obtida no momento pós corrida (nível 11 – leve).

Em relação à isoenzima CKMB, é importante mencionar que sua distribuição encontra-se amplamente presente no músculo cardíaco (mais de 75% do conteúdo total) e, sendo assim, os valores de CKMB aumentados podem inclusive reportar um acometimento cardíaco decorrente de atividade física extenuante. Não menos importante, os níveis de CKMB também podem indicar dano no músculo esquelético. De qualquer forma, sua determinação para diagnosticar especificamente a lesão muscular deve ser interpretada com cuidado e em conjunto com outros marcadores de lesão muscular. A literatura apresenta uma certa relação entre a CK total e sua isoenzima CKMB, pois sabe-se que a atividade da CK total possui participação de cerca de 20% da CKMB e, dessa forma, não é surpreendente que a cinética deste biomarcador após esforços físicos seja semelhante à da CK total (SOARES *et al.*, 2012; LIPPI, CERIOTTI, 2018). Após exercícios físicos de intensidade baixa a moderada, o aumento dos níveis séricos de CKMB ocorre de modo menos pronunciado do que aquele observado na CK, normalmente compreendido entre 10 a 50% acima dos valores basais. No entanto, a variação de CKMB após exercícios extenuantes está bastante relacionada àquela observada na CK total (LIPPI, CERIOTTI, 2018). Os resultados das medianas obtidas no presente trabalho são

concordantes com os dados da literatura, já que foi observado um aumento na relação das medianas de CK e CKMB pré e pós corrida de 37% e 30%, respectivamente. Já as medianas obtidas antes e após a marcação de capacete apresentaram um aumento de 55% tanto para CK como para CKMB. Por outro lado, os níveis de CKMB após a corrida foram significativamente maiores do que os níveis após 96 horas da prova do capacete e, apesar da coerência desse dado, a mesma diferença não foi observada pela atividade da enzima CK. Como a isoenzima CKMB está presente em maior concentração nas células do tecido do miocárdio, pode-se inferir que o intenso trabalho do músculo cardíaco durante a corrida pode ter interferido nessa diferença, além das claramente descritas variabilidades interindividuais. Por fim, não se pode negligenciar que o método de avaliação da CK ocorre por meio da medida de sua atividade enzimática (U/L), enquanto que a determinação dos níveis de CKMB é medida em outra unidade (ng/mL), utilizando a metodologia de imunoensaio por quimioluminescência. Apesar de profundamente relacionadas, as grandezas são distintas e pode haver uma limitação importante na avaliação comparativa, de forma simples e direta, entre CK e CKMB em resposta ao exercício.

A lactato desidrogenase pode ser detectada na corrente sanguínea após esforços físicos de baixa a moderada intensidade, cerca de 1 a 3 horas após o término do exercício e atinge o pico entre 3 e 6 horas depois. Na grande maioria das vezes, retorna aos níveis basais dentro de 24 horas. O aumento é discreto e geralmente compreende entre 20 a 30% dos valores basais (LIPPI, CERIOTTI, 2018). Neste trabalho, a análise das médias obtidas de LDH nos momentos antes e após a corrida e antes e após a marcação de capacete, revelaram uma diferença de 30% e 50%, respectivamente. Também foi observado o retorno para os níveis basais após 24 horas da corrida e após 96 horas da prova do capacete. Park e Kwak (2019) avaliaram as médias das concentrações plasmáticas de LDH, CKMB, MIO e CK, em triatletas após um circuito percorrendo 1,5 km de natação, 40 km de ciclismo e 10 km de corrida. Curiosamente, a magnitude do aumento da enzima LDH antes e após da prova de triatlon foi a mesma encontrada nos militares avaliados após a corrida. A mesma correlação não pode ser realizada com os outros marcadores. Adicionalmente, Sousa e colaboradores (2021) avaliaram os mesmos biomarcadores em atletas amadores participantes da Maratona Internacional de São Paulo (42 km) antes da partida, imediatamente após a chegada e nos seguintes momentos: 24, 48

e 72 horas após a prova. Em relação à MIO foi verificado um aumento significativo dos seus níveis antes e após a maratona. Nessa modalidade esportiva, os resultados de CK, MIO e LDH, nos momentos antes e imediatamente após a prova, foram mais acentuados quando comparados aqueles encontrados no presente trabalho. Essas diferenças podem ser explicadas tendo em vista que a resposta da atividade desses marcadores ao exercício depende de muitas variáveis e também sofre influência do nível de treinamento e o desempenho físico (BRANCACCIO et al., 2008).

Por via de regra, a interpretação desses biomarcadores é altamente afetada pela variabilidade interindividual e não necessariamente reflete a completa magnitude da perda da função muscular. A literatura apresenta diversos trabalhos que descrevem os vários fatores capazes de influenciar a atividade dessas enzimas e proteínas, como o gênero, a idade, a etnia, as condições ambientais, o preparo físico, a massa muscular e a predisposição genética (BAIRD *et al.*, 2012; KENNEY *et al.*, 2012; SHARIFZADEH *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2016; BECKER *et al.*, 2020; CHALCHAT *et al.*, 2021). Além disso, atualmente não estão disponíveis marcadores considerados “padrão ouro” para a avaliação do grau de lesão induzida por esforço ou até mesmo sua consequência mais grave, a rabdomiólise induzida por exercício (CHALCHAT *et al.*, 2021). Portanto, é necessário buscar novos conjuntos de biomarcadores mais sensíveis, específicos e ainda capazes de prever a magnitude do dano muscular.

### 6.3 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO DO GENE *ACTN3*

A homogeneidade da amostra dos participantes do estudo, todos cadetes do sexo masculino do último ano da AMAN, foi essencial para minimizar o viés dos diferentes preparos físicos apresentados pelos militares, assim como dos efeitos do dimorfismo sexual e da diferença de idade. Os cadetes da AMAN possuem um preparo físico semelhante e estão expostos a dieta e treinamento físico militar bastante similares. Desta forma, ancorou-se a expectativa de que as diferenças genotípicas tivessem seus efeitos mais aparentes diante da redução destes vieses.

Numa primeira análise, a distribuição do polimorfismo R577X do gene *ACTN3* está de acordo com o equilíbrio genético de Hardy-Weinberg, e que a frequência alélica/genotípica é compatível com a encontrada em estudos feitos com a

população europeia (YANG *et al.*, 2003; RUIZ *et al.*, 2013; NORMAN *et al.* 2014). Ao se comparar com os genótipos disponíveis no banco de dados mundial *1000genomes*, entende-se que a população desse trabalho é compatível com uma população miscigenada à partir dos europeus com um pouco mais de genótipos RR provavelmente provenientes de alelos africanos (Tabela 7). Levando-se em consideração populações brasileiras, a frequência genotípica foi compatível com atletas de futebol: RR-40-45%, RX – 35 a 46%, XX-11 a 24% (PIMENTA *et al.*, 2011; PIMENTA *et al.*, 2013, ALMEIDA *et al.*, 2022).

Tabela 7 – Frequência dos genótipos do polimorfismo rs1815739 no gene *ACTN3* na população do banco de dados *1000Genomes*.

Variável	Total		
	CC (RR)	CT (RX)	TT (XX)
<b>Europeus</b>	31,0%	51,1%	17,9%
<b>Africanos</b>	77,5%	22,1%	0,4%
<b>Ameríndios</b>	16,1%	53,3%	30,5%
<b>Leste Asiáticos</b>	30,8%	49,8%	19,4%
<b>Sul Asiáticos</b>	15,7%	51,1%	33,1%

A escolha da genotipagem do polimorfismo do gene *ACTN3* foi baseada no fato de ser um dos polimorfismos mais estudados de acordo com a literatura, quanto a variabilidade interindividual relacionada ao desempenho físico. Além disso, o fato de ele configurar uma variante não sinônima do tipo *non-sense*, faz com que portadores do alelo X em homozigose tenham um códon de parada com a completa ausência da proteína em sua estrutura muscular. (PENA-VAZQUEZ *et al.*, 2023; THARABENJASIN *et al.*, 2019; PICKERING, KIELY, 2017; EYNON *et al.*, 2012). Essa dicotomia relacionada à presença/ausência de uma proteína que constitui um componente direto da contração muscular, torna-se uma hipótese fisiológica lógica e factível de uma variabilidade interindividual a ser investigada e difícil de se desprezar.

Em função das propriedades mecânicas da alfa-actinina-3 no processo de ancoramento dos filamentos de actina na linha Z, tem sido postulado que esta proteína pode conferir maior capacidade de absorção e transmissão de força

principalmente em fibras tipo II, promovendo um fator de proteção maior contra lesões musculares induzidas por exercício (VICENT *et al.*, 2010; PASQUA *et al.*, 2017; BALTAZAR-MARTINS *et al.*, 2020). Desse modo, hipoteticamente esperava-se que portadores do genótipo XX, não possuidores da proteína alfa-actinina-3 apresentassem concentrações ou cinéticas de marcadores de microlesões musculares, no mínimo diferentes dos possuidores da proteína.

Após a análise estatística dos resultados obtidos, verificou-se que as concentrações plasmáticas de CK, MIO, CKMB e LDH não apresentaram diferenças marcadamente acentuadas em função dos diferentes genótipos/alelos de *ACTN3*. Mas ainda sim, após o momento de maior percepção de esforço, níveis de MIO foram maiores em portadores do alelo R ( $p=0,019$ ). Cabe ressaltar que a mioglobina é uma proteína muito abundante e funcional no músculo esquelético e durante as microlesões induzidas pelo exercício certamente estará mais disponível no sangue (BRANCACIO *et al.*, 2007; LIPPI, CERIOTTI, 2018; CHALCHAT *et al.*, 2021). A relação entre *ACTN3* e biomarcadores (Figura 8) foi mais estudada em relação à CK.

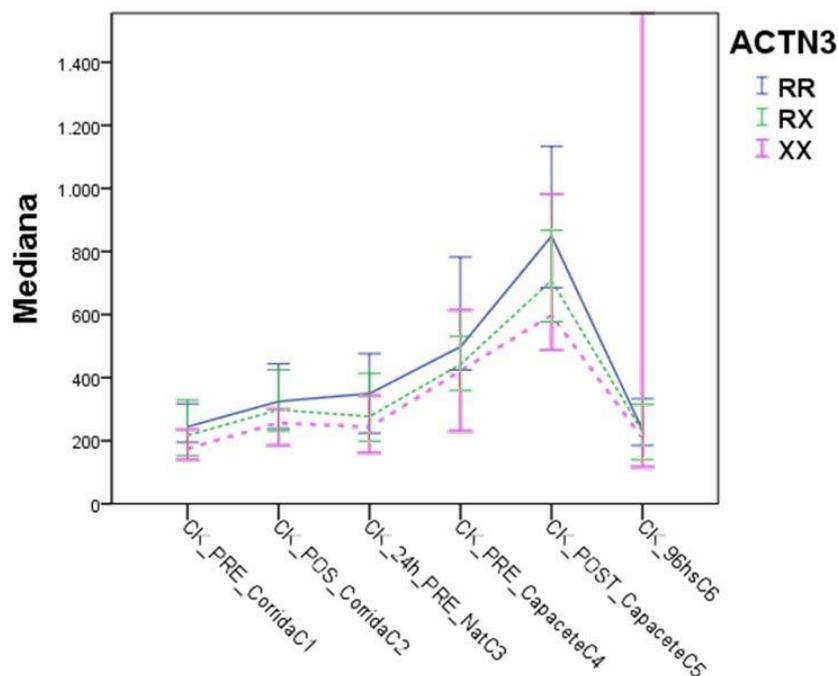


Figura 8 – Valores em medianas de CK nos momentos pré e pós corrida (CK\_PRE\_CorrídaC1 e CK\_POS\_CorrídaC2), pré natação (CK\_24h\_PRE\_NatC3), antes e após a marcação de capacete (CK\_PRE\_CapaceteC4 e CK\_POST\_CapaceteC5) e após 96h de repouso (CK\_96hsC6). Intervalo de confiança (CI)=95%.

Curiosamente, Coelho e colaboradores (2011) analisaram a relação da expressão dos diferentes genótipos do *ACTN3* na resposta a alguns biomarcadores da lesão muscular induzida por exercício em jovens jogadores de futebol e encontrou valores maiores da concentração sérica de CK para o grupo RR/RX em comparação ao grupo XX. Lima e colaboradores (2017) conduziram um trabalho com o objetivo de avaliar o impacto do polimorfismo do gene *ACTN3* na suscetibilidade a lesões musculares induzidas pelo exercício após corrida em declive. Novamente, a atividade sérica de CK foi maior para RR em comparação aos portadores do genótipo XX.

Por outro lado, Vincent e colaboradores (2010), sugeriram que a presença de alfa-actinina-3 poderia exercer um papel protetor da lesão muscular induzida por exercícios excêntricos, visto que os indivíduos XX apresentaram maiores concentrações plasmáticas de CK e índice de percepção do esforço mais elevado quando comparados com indivíduos RR. Cabe ressaltar que em nossa análise a percepção de esforço em nenhum momento foi diferente entre os genótipos/alelos (Tabela 4). De modo semelhante, jogadores de futebol com genótipo XX apresentaram níveis mais elevados de CK em comparação com RX e RR (PIMENTA *et al.*, 2011). Del Coso e colaboradores (2016) conduziram um estudo com triatletas, com características antropométricas, físicas e de treinamento semelhantes, e verificaram que os portadores do alelo X apresentaram maior concentração sérica de CK e tendência a valores mais elevados de dor muscular do que triatletas portadores de alelos R após uma prova de ironman.

Em relação à variação nos níveis dos biomarcadores ( $\Delta$ ), entende-se que essa abordagem favorece o entendimento de sua cinética porque leva em consideração o nível inicial do biomarcador que possui por si só uma considerável variação interindividual. Além disso, ela consegue avaliar a resposta funcional dos militares em função da atividade realizada e a sua capacidade de recuperação em função do tempo. A cinética de pico dos biomarcadores bem como de sua recuperação após exercício e tempo de repouso tem sido muito utilizada como um controle indireto de lesão e carga em modalidades esportivas (LIMA *et al.*, 2021). Tal análise em nossos dados evidenciou a importância dos níveis de CK e MIO nos momentos de maior exigência física dos voluntários e mostrou níveis significativamente maiores em portadores do alelo R ou genótipos RR/RX em

relação à presença de alelos X e ao genótipo XX.

Apesar de algumas associações e tendências encontradas quanto ao comportamento cinético dos biomarcadores em estudo em função dos genótipos analisados, entende-se que a lesão muscular induzida por exercício ou mesmo a capacidade de recuperação é um trato complexo multifatorial onde múltiplos polimorfismos em múltiplos genes irão desempenhar um papel mensurável no fenótipo final. Polimorfismos em tratos multifatoriais individualmente, explicam o efeito de maneira limitada. Apesar do rs1815739 ser um gene candidato bem estudado, análises em múltiplos genes importantes estrutural e metabolicamente poderão trazer mais segurança, consistência e robustez aos resultados obtidos (THARABENJASIN *et al.*, 2017; DEL COSO *et al.*, 2017).

Um outro ponto que merece atenção reside na hipótese de que a elevação da atividade plasmática da CK pode não ser um parâmetro suficientemente sensível e robusto para detectar pequenas diferenças no grau de lesão muscular local induzido pelo exercício entre grupos genotípicos ou de alelos (VINCENT *et al.*, 2010). Apesar da robusta análise pareada longitudinal em relação aos biomarcadores, quando se realizou a comparação categorizada geneticamente, a amostragem reduzida, particularmente quanto ao genótipo XX (n=5), dificultou o estudo de associações entre as categorias analisadas e pode ter sido a causa da aparência sistemática de valores limítrofes de significância  $p$ . Nessa mesma linha, a categorização desse *locus* bialélico em 3 genótipos ou o isolamento do homozigoto menos frequente faz com que um dos grupos (XX ou alelo X) tenham apenas 5 indivíduos o que diminuiu o poder estatístico da análise.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com os biomarcadores tradicionais, ainda que com algumas limitações devido à imperativa necessidade de não comprometer o andamento das atividades previstas do Curso Básico Paraquedista, são coerentes e, mais ainda, os comportamentos observados demonstram similaridade com os dados encontrados na literatura, apesar da diversidade dos exercícios praticados por militares. Ainda assim, cada um deles – CK, CKMB, MIO e LDH possuem limitações quanto à sensibilidade e especificidade quando utilizados no diagnóstico da lesão muscular induzida por exercício e ainda não há um consenso a respeito de um biomarcador padrão ouro para tal diagnóstico.

A distribuição genotípica do *ACTN3* na população avaliada é coerente com uma população miscigenada com grande influência africana e caucasiana. A genotipagem do polimorfismo do gene *ACTN3* não constatou associação marcadamente relevante entre a expressão genotípica e/ou alélica nos militares avaliados frente aos biomarcadores envolvidos na lesão muscular induzida por exercício em seus valores absolutos. No entanto, as diferenças entre os momentos ( $\Delta$ ) foi notadamente maior em portadores do alelo R em relação à CK e MIO, principalmente nos momentos de maior exigência física, apontando para a importância da cinética ao invés do valor absoluto dos biomarcadores.

Seguramente, tal informação deve ser observada com cuidado, pois o sucesso e desempenho em atividades físicas militares, especialmente nos cursos de formação operacionais, não depende somente da genética e da capacidade física, mas constituem um caráter multifatorial que certamente abrange inclusive aspectos emocionais e psicológicos. Além disso, a amostragem geneticamente categorizada se mostrou reduzida, especialmente quanto ao genótipo XX, o que comprometeu, em parte, a análise de associações entre as categorias analisadas.

Diante dessas observações, acredita-se que estudos longitudinais controlados são poderosos para testar biomarcadores relacionados à lesão induzida por exercício. Testes adicionais em amostras cada vez maiores irão permitir a ampliação da consistência dos resultados encontrados principalmente quando se avalia caracteres genéticos. Além disso, um controle melhor da carga, intensidade e volume do exercício praticado permitiria o entendimento mais fidedigno da variação dos biomarcadores em função dos momentos avaliados. Por fim, o uso de

biomarcadores mais específicos e de sua cinética relacionada à do exercício e o acréscimo de mais regiões genômicas importantes para a fisiologia muscular permitirá a obtenção de mais respostas quanto à variabilidade interindividual e o seu impacto no surgimento e recuperação de lesões musculares induzidas por exercício físico militar.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, K. Y.; CETOLIN, T.; MARRERO, A. R.; AGUIAR JUNIOR, A. S.; MOHR, P.; KIKUCHI, N. A Pilot Study on the Prediction of Non-Contact Muscle Injuries Based on *ACTN3* R577X and *ACE* I/D Polymorphisms in Professional Soccer Athletes. **Genes**, v. 13, n. 2009, 2022.

ATIAS-VARON, D.; SHERMAN, H. YANOVICH, R.; HELED, Y. Rhabdomyolysis After Crawling Military Training. **Military Medicine**, v. 182, n. 7/8, p. e1948-e19522017.

BAIRD, M. F. et al. Creatine-Kinase and Exercise-Related Muscle Damage Implications for Muscle Performance and Recovery. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

BANFI, G. et al. Metabolic markers in sports medicine. **Advances in clinical Chemistry**, v. 56, p. 1-53, 2012.

BARRANCO, T. et al. Changes in creatine kinase, lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in saliva samples after an intense exercise: a pilot study. **The Journal of Sports Medicine and physical fitness**, v. 58, p. 1-7, 2018.

BECKER, M et al. Intra-individual and seasonal variation of selected biomarkers for internal load monitoring in U-19 soccer players. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 1-13, agosto, 2020.

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

BORG, G. Perceived exertion as an indicator of somatic stress. **Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 2, n. 2, p. 92-98, 1970.

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

BRANCACCIO, P; MAFULLI, N; LIMONGELLI, F. M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **British Medical Bulletin**, v. 81 e 82, p. 209–230, 2007.

BRASIL. Aeronáutica. Comando de Preparo. **Unidades Didáticas do Curso de Paraquedista Militar da Aeronáutica**. Brasília, DF, 2021.

BRASIL. Exército. Comando de Operações Terrestres. **Caderno de Instrução de Treinamento e Técnica Básica do Paraquedista Militar**. Brasília, DF, 2013.

BRASIL. Exército. **Curso Básico Paraquedista – Orientações ao Candidato 2023**. Rio de Janeiro, RJ, 2023.

- CABRAL, L. L. et al. A systematic review of cross-cultural adaptation and validation of Borg's rating of perceived exertion scale. **Journal of Physical Education**, v. 28, P. 1-13, 2017.
- CALLEGARI, G. A.; NOVAES, J. S.; NETO, G. R.; DIAS, I.; GARRIDO, N. D.; DANI, C. Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase Responses after Different Resistance and Aerobic Exercise Protocols. **Journal of Human Kinetics** v. 58, p. 65-72, 2017.
- CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Perceived Exertion (Borg Rating of Perceived Exertion Scale)**, 2022. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/physicalactivity/basics/measuring/exertion.htm>>. Acesso em: 23 jun. 2023.
- CHALCHAT, E. et al. Circulating microRNAs after a 24-h ultramarathon run in relation to muscle damage markers in elite athletes. **Scandinavian Journal of Medicine & Science Sports**, v. 1, n.00, p. 01–14, 2021.
- CHAVEZ, L. O. et al. Beyond muscle destruction: a systematic review of rhabdomyolysis for clinical practice. **Critical Care**, v. 20, n. 135, p. 1-11, 2016.
- CLARKSON, P.M.; HUBAL, M.J. Exercise-induced muscle damage in humans. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation / Association of Academic Physiatrists**, v. 81, n. 11, S52-69, 2002.
- COSTACHE et al. Cardiac Biomarkers in Sports Cardiology **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v. 9, n. 453, p. 1-16, 2022.
- COWAN, D. N.; JONES, B. H.; SHAFFER, R. A. **Musculoskeletal injuries in the military training environment**. v. 1, cap. 10, p. 197-198. 2003.
- DEL COSO, J.; SALINERO, J. J.; LARA, B.; GALLO-SALAZAR, C.; ARECES, F.; PUENTE, C.; HERRERO, D. ACTN3 X-allele carriers had greater levels of muscle damage during a half-ironman. **European Journal of Applied Physiology**, 2016.
- DEL COSO, J.; HIAM, D.; HOUWELING, P.J., PÉREZ, L.M., EYNON, NIR. AND LUCÍA, A. More than a 'speed gene': ACTN3 R577X genotype, trainability, muscle damage, and the risk for injuries. **European Journal of Applied Physiology**, 2018.
- DEL COSO, J.; VALERO, M.; SALINERO, J.J.; LARA, B.; GALLO-SALAZAR, C.; ARECES, F. Optimum polygenic profile to resist exertional rhabdomyolysis during a marathon. **PLoS One**, v. 12, n. 3, 2017.
- EYNON, N.; RUIZ, J. R.; FEMIA, P.; PUSHKAREV, V. P.; CIESZCZYK, P.; MACIEJEWSKA-KARLOWSKA, A.; SAWCZUK, M.; DYATLOV, D. A.; LEKONTSEV, E. V.; KULIKOV, L. M.; BIRK, R.; BISHOP, D. J.; LUCIA, A. The ACTN3 R577X Polymorphism across Three Groups of Elite Male European Athletes. **PLoS ONE**, v. 7, n.8. 2012.

FARINATTI, P. T. V. Apresentação de uma Versão em Português do Compêndio de Atividades Físicas: uma contribuição aos pesquisadores e profissionais em Fisiologia do Exercício. **Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício**, v. 2, p. 177-208, 2003.

FERNANDES, J. F. T.; LAMB, K. L.; TWIST, C. Exercise-Induced Muscle Damage and Recovery in Young and Middle-Aged Males with Different Resistance Training Experience. **Sports**, v. 7, n. 132, p. 1-13, 2019.

FLECK, S. J.; KRAEMER, W. J. **Fundamentos do Treinamento de Força Muscular**. 4 Ed., 2017.

GRØNFELDT, B. M.; NIELSEN, J. L.; MIERITZ, R. M.; LUND, H.; AAGAARD, P. Effect of blood-flow restricted vs heavy-load strength training on muscle strength: Systematic review and meta-analysis. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 30, p. 837–848, 2020.

HASSAN, Wessam sihab. The Effect Of Specific Exercises In Stimulating The Enzyme Lactate Dehydrogenase, Level Of Achievement In A 100m Freestyle Swimming For Applicants. **European Journal of Molecular & Clinical Medicine**, v. 7, n. 3, p. 5925-5931, 2020.

HEAD, S. I. et al. Altered Ca<sup>2+</sup> Kinetics Associated with  $\alpha$ - Actinin-3 Deficiency May Explain Positive Selection for ACTN3 Null Allele in Human Evolution. **PLOS Genetic**, p. 1-18, janeiro, 2015.

JOANNE, P. et al. Absence of Desmin Results in Impaired Adaptive Response to Mechanical Overloading of Skeletal Muscle. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 1-14, julho, 2021.

KELTZ, E.; KHAN, F. Y.; MANN, G. R. Rhabdomyolysis. The role of diagnostic and prognostic factors. **Muscles Ligaments Tendons Journal**, v. 3, n. 4, p. 303–312, 2013.

KENNEY, K. et al. Serum creatine kinase after exercise: drawing the line between physiological response and exertional rhabdomyolysis. **Muscle & Nerve**, março, 2012.

KIM, L.; LEE, J.<sup>[L]</sup><sub>[SEP]</sub> The relationship of creatine kinase variability with body composition and muscle damage markers following eccentric muscle contractions. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 123-129, 2015.<sup>[L]</sup><sub>[SEP]</sub>

KIM, J.; LEE, J.; KIM, S.; RYU, H. Y.; CHA, K. S; SUNG, D. J. Exercise-induced rhabdomyolysis mechanisms and prevention: A literature review. **Journal sport and health science**, v. 5, n. 3, p: 324-333, 2016.

KODADEK, L.; CARMICHAEL, S. P.; SESHADRI, A.; PATHAK, A.; HOTH, J.; APPELBAUM, R.; MICHETTI, C. P.; GONZALEZ, R. P. Rhabdomyolysis: an American Association for the Surgery of Trauma Critical Care Committee Clinical Consensus Document. **Trauma Surg Acute Care Open**, v. 7, p. e000836, 2022.

KRAEMER, J. RATAMESS, N. A. Hormonal Responses and Adaptations to Resistance Exercise and Training. **Sports Medicine**, v. 35, n. 4, p. 339-361, 2005.

KUMAR, V. et al. Can We Use Creatine Kinase Muscle Type as a Potential Marker for Muscle Viability in Mangled Extremities? A Preliminary Evaluation of its Applicability and a Literature Review. **Journal of Musculoskeletal Surgery and Research**, v. 3, n. 3, 2019.

LANGER, H. T. et al. A mutation in desmin makes skeletal muscle less vulnerable to acute muscle damage after eccentric loading in rats. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 35, 2021.

LAZARIM, F. L.; ANTUNES-NETO, J. M. F; SILVA, F. O. C; NUNES, L. A.S.; BASSINI-CAMERON, A.; CAMERON, L. C; ALVES, A. A.; BREZIKOFER, R; MACEDO, D. V. The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 12, n. 12, p. 85-90, 2009.

LI, Y.; YAN, G.; ZHANG, J. et al. LncRNA HOXA11-AS regulates calcium oxalate crystal-induced renal inflammation via miR-124-3p/MCP-1. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** v. 00, p. 1-12, 2019.

LIANG, X. et al. Exercise Inducible Lactate Dehydrogenase B Regulates Mitochondrial Function in Skeletal Muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n.49, p. 25306–25318, 2016.

LIPPI, G.; SCHENA, F.; CERIOTTI, F. Diagnostic biomarkers of muscle injury and exertional rhabdomyolysis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 2018.

LIMA, L. C. R. et al. The Impact of ACTN3 Gene Polymorphisms on Susceptibility to Exercise-Induced Muscle Damage and Changes in Running Economy Following Downhill Running. **Frontiers in Phycology**, v. 12, p. 1-12, novembro 2021.

LIU, A. Y. et al. Functional Role of an Unusual Transmembrane Acidic Residue in the Calcium Pump Regulator Myoregulin. **Biochemistry**, v. 62, p. 1331–1336, 2023.

MARKUS, I.; CONSTANTINI, K.; HOFFMAN, J. R.; BARTOLOMEI, S.; GEPNER, Y. Exercise induced muscle damage: mechanism, assessment and nutritional factors to accelerate recovery. **European Journal of Applied Physiology**, v. 121, p. 969-992, 2021.

MEISTER, J.; REDDY, K. Rhabdomyolysis: an overview. **American Journal of Nursing**, v. 102, n. 2, p. 75-79, 2002.

MHS. Military Health System and Defense Health Agency. **Exertional Rhabdomyolysis, Active Component, U.S. Armed Forces, 2017–2021**. Disponível em: < <https://health.mil/News/Articles/2022/04/01/EX-RHAB-MSMR>>. Acesso em 23 jun. 2023.

MINISTÉRIO DA DEFESA. EXÉRCITO BRASILEIRO, Manual de Campanha EB70-MC10.375 Treinamento Físico Militar, Portaria – COTER/C Ex Nº 117, de 28 de outubro de 2021.

MOLLOY, J. M.; PENDERGRASS, T. L.; LEE, I. E.; CHERVAK, M. C.; HAURET, K. G., RHON, D. I. Musculoskeletal Injuries and United States Army Readiness Part I: Overview of Injuries and their Strategic Impact. **Military Medicine**, n. 185, v. 9/10, p. e1461-e1471, 2020.

MORALES, A. P. et al. Changes in serum creatinine, uric acid, creatine kinase and glomerular filtration in street runners. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2013.

MORENO, V.; ARECES, F.; RUIZ-VICENTE, D.; ORDOVÁS, J. M.; DEL COSO, J. Influence of the ACTN3 R577X genotype on the injury epidemiology of marathon runners. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, p.1-11, 2020.

MYOSOTIS, M. et al. ACTN3 R577X Polymorphism Is Associated With the Incidence and Severity of Injuries in Professional Football Players. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 0, n. 0, 2017.

NALCAKAN, G. R. The Effects of Sprint Interval vs. Continuous Endurance Training on Physiological And Metabolic Adaptations in Young Healthy Adults **Journal of Human Kinetics**, v. 44, p. 97-109, 2014.

NELSON, D. A.; DEUSTER, P. A.; CARTER, R.; HILL, O. T.; WOLCOTT, V. L.; KURINA, L. M. Sickle Cell Trait, Rhabdomyolysis, and Mortality among U.S. Army Soldiers. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, p. 435-442, 2016.

NEVES, E. B.; OLIVEIRA, A. G. V.; MACEDO, A. R. M.; SOUZA, M. N.; ALMEIDA, R. M. V. R. A incidência de lesões no curso de formação de pára-quedistas militares brasileiros. **Revista Uniandrade**, v. 11, n. 1, p. 53-64, 2010.

NOROUZI, A.; MOTAGHI, M.; HASSANSHAHI, G.; NAZARI-ROBATI, M. Exploring the expression profile of vitamin D receptor and its related long non-coding RNAs in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 67, n. 8, p. 1113-1117, 2021.

O'CONNOR, F. G. et al. Return to Physical Activity After Exertional Rhabdomyolysis. **American College of Sports Medicine**, v. 7, n. 6, p. 328-331, 2008.

OGURA, Y. et al. Alpha-actinin-3 levels increase concomitantly with fast fibers in rat soleus muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 584–588, 2008.

OGURA, Y. et al. Different adaptations of alpha-actinin isoforms to exercise training in rat skeletal muscles. **Acta Physiologica**, v. 196, 341–349, 2009.

OJANEN, T.; HÄKKINEN, K; HANHIKOSKI, J.; KYRÖLÄINEN, H. Effects of task-specific and strength training on simulated military task performance in soldiers.

**International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 8000, p. 1-17, 2020.

OLIVEIRA, J. A.; MARTÍNEZ, B. B. Manual educativo para prevenção e controle da rabdomiólise em exercícios físicos militares. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. 01-11, 2022.

PANTEGHINI M. Diagnostic application of CK-MB mass determination. **Clinica Chimica Acta**, v. 6, n. 272, s. 1, p. 23-31, 1998.

PARK, C. H. et al. Cardiac Damage Biomarkers Following a Triathlon in Elite and Non-elite Triathletes. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 18, p. 419-423, outubro, 2014.

PARK, C. H.; KWAK, Y-S. Changes of cardiac biomarkers after ultradistance and standard-distance triathlon. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 15, n. 2, p. 254-257, 2019.

PASQUA, L. A.; ARTIOLI, G. G.; PIRES, F. O.; BERTUZZI, R. ACTN3 e desempenho esportivo: um gene candidato ao sucesso em provas de curta e longa duração. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 13, n. 6, p. 477-483, 2011.

PEÑA-VÁZQUEZ, O.; ENRIQUEZ-DEL-CASTILLO, L. A.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S. A.; GÜERECARVIZUO, J.; LUJAN, R. C.; LEGLEU, C. E. C.; HERNÁNDEZ, N. C.; PACHECO-TENA, C. Prevalence of Polymorphism and Post-Training Expression of ACTN3 (R/X) and ACE (I/D) Genes in CrossFit Athletes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 4404, p. 1-13, 2023.

PICKERING, C.; KIELY, J ACTN3: More than Just a Gene for Speed. **Frontiers in Phycology**, v. 8, dezembro, 2017.

PIMENTA, E. M., COELHO, D. B.; VENEROSO, C. E.; COELHO, E. J. B; CRUZ, I. R.; MORANDI, R. F.; PUSSIELDI, G. A.; CARVALHO, M. R. S.; SILAMI-GARCIA, E.; FERNÁNDEZ, J. A. P. Effect of ACTN3 gene on strength and endurance in soccer players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, p. 3286-3292, 2013.

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

RAHMANIAN, K. et al. Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase Enzymes Response to Lactate Tolerance Exercise Test. **Exercise Science**, v. 31, n. 2, p 168-171, 2022.

RODAS, G. et al. Alpha-Actinin-3 Deficiency Might Affect Recovery from Non-Contact Muscle Injuries: Preliminary Findings in a Top-Level Soccer Team. **Genes**, 12, 769, p. 1-7, 2021.

RODRIGUES, P. et al. Time-course of changes in indirect markers of muscle damage responses following a 130-km cycling race. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 18, n. 3, p. 322-331, 2016.

SHARIFZADEH, H. et al. Effects of Acute Resistance Training on Biochemical Markers of Myocardial Injury (cTnT, cTnl, CK-MB) in Non-Athlete Women. **Journal of Kermanshah**, v. 23, n. 2, p.1-6, 2019.

SILVA, A. C.; GUIMARÃES, T. T.; SILVA, J. M.; GOMES, D. V.; MENDONÇA, C. F.; PESQUERO, J. B.; PALMISANO, G.; MOREIRA, J. C.; PEREIRA, M. D. Rabdomiólise em militares: uma missão de reconhecimento para prevenção. **Journal de Investigação Médica**, v. 2, n. 1, p. 39-56, 2021.

SOUSA, C. A. Z. et al. Time Course and Role of Exercise-Induced Cytokines in Muscle Damage and Repair After a Marathon Race. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 1-13, 2021.

TEIXEIRA, J. A. A.; TEIXEIRA, K. K.L.; OISHI, J. C.; SANTOS JÚNIOR, V. M.; SOUZA, J. C. A.; FIGUEIRA, T. G.; ROBERT-PIRES, C. M.; MAGOSSO, R. F. Resposta da creatina quinase em diferentes volumes de treinamento resistido em circuito com indivíduos treinados e destreinados. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, e56510414563, 2021.

TEYHEN, D. S.; GOFFAR, S. L.; SHAFFER, S. W.; KIESEL, K.; BUTLER, R. J.; TEDALDI, A. M.; PRYE, J. C.; RHON, D. I.; PLISKY, P. J. Incidence of Musculoskeletal Injury in US Army Unit Types: A Prospective Cohort Study. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 48, n. 10, p. 749-, 757, 2018.

THARABENJASIN, P.; PABALAN, N.; JARJANAZI, H. Association of the *ACTN3* R577X (rs1815739) polymorphism with elite power sports: A meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, p. 1-20, 2019.

TIETZE, D. C.; BORCHERS, B. Exertional Rhabdomyolysis in the Athlete: A Clinical Review. **Sports Health**, v. 8, n. 4, 2014.

TORRES, P. A.; HELMSTETTER, J. A.; KAYE, A. M.; KAYE, A. D. Rhabdomyolysis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. **The Ochsner Journal**, v. 15, p. 58-69, 2015.

VIANA, Claudius Gomes de Aragão. A Brigada de Infantaria Paraquedista. 2020. 375f. Dissertação (Doutorado em História, Políticas e Bens) – Fundação Getúlio Vargas, Rio de Janeiro, 2020.

VINCENT, B.; WINDELINCKX, A.; NIELENS, H.; RAMAEKERS, M.; LEEMPUTTE, M. V.; HESPEL, P.; THOMIS, M. A. Protective role of -actinin-3 in the response to an acute eccentric exercise bout. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, p. 564–573, 2010.

YANG, Y.; CHEN, Z. Neuromuscular injury method in different strength sports damage. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 27, n. 8, p. 767-769, 2021.

## ANEXO i



---

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do projeto de pesquisa:** Você está sendo convidado a participar de um estudo chamado “Biomarcadores ômicos relacionados ao desempenho físico e rabdomiólise em militares do Exército”.

**Objetivo do estudo:** Propor novos exames que possam verificar se há algo errado no seu sangue após o exercício físico. Comparar os resultados obtidos com outros exames que tradicionalmente já são usados para verificar seu sangue antes e após o exercício físico.

**Justificativa e Benefícios aos participantes e para a sociedade:** Os resultados dos exames poderão ser utilizados para a avaliação de sua saúde (avaliações do funcionamento de seu fígado, sangue, músculo, produção de energia e material genético) e melhoria de seu desempenho individual. Além disso, o ganho de conhecimento poderá orientar equipes de várias áreas a promover a saúde, melhorar treinamentos, selecionar e ajudar novos talentos e principalmente aumentar o rendimento individual do atleta ou militar.

**Procedimentos para coleta de dados:** Primeiramente serão realizadas perguntas sobre sua saúde, preparo físico, hábitos alimentares e idade. Serão realizadas medidas corporais como peso, estatura, Índice de Massa Corporal (IMC), dentre outras. A partir daí será realizada a coleta de tubos de sangue. Todas as coletas serão realizadas por pessoal treinado utilizando material descartável de qualidade reconhecida. Alternativamente, caso não haja tempo hábil ou a coleta de sangue no braço não seja possível devido às atividades de sua rotina, poderá ser coletada uma gota de sangue da ponta do seu dedo em um papel específico ou ainda coleta com cotonete esfregado por dentro de sua boca ou tubo com saliva. A partir daí você continuará a realizar suas atividades rotineiras previstas por sua equipe de treinadores e profissionais. Serão necessárias novas coletas de sangue após o exercício e depois de 24h e 48h. As amostras serão processadas e armazenadas para a realização de exames.

**Exames laboratoriais realizados:** serão avaliados exames de proteínas de seu músculo para comparação, como a creatina quinase, mioglobina e lactato desidrogenase (substâncias encontradas no sangue que se relacionam à lesão do seu músculo). Além disso, serão desenvolvidos novos exames para avaliação de seu músculo como a desmina, mioregulina, exames para avaliar sua produção de “energia e para avaliar sua genética.

**Exames Genéticos realizados:** A análise de sua “genética” vai envolver uma lista de genes (pedaços de seu DNA, RNA **que contribuem para sermos do modo que somos**) envolvidos com o desempenho físico, de suas mitocôndrias e cromossomos.

**Possíveis desconfortos e riscos:** Para a coleta de sangue haverá somente o desconforto de uma coleta comum, como quando se vai a um laboratório de Análises Clínicas, podendo no máximo e raramente apresentar um pequeno roxo local. Apesar disso, haverá apoio médico de emergência, sendo garantida ao participante, assistência imediata, integral e gratuita pelo tempo necessário para o restabelecimento de sua saúde.

**Garantia de liberdade:** Sua participação é totalmente **voluntária**. Você pode escolher não participar ou desistir, não havendo qualquer problema ou comprometimento na assistência recebida pela sua equipe técnica, médica ou multidisciplinar. Além disso, nenhum membro da pesquisa ou mesmo superior hierárquico o constrangerá ou ordenará a participar do estudo, estando a participação, subordinada à sua escolha individual.

**Direito de confidencialidade, sigilo, privacidade e acessibilidade:** Você **receberá uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**. Além disso, poderá ter acesso gratuito, a qualquer momento aos próprios resultados, bem como quaisquer informações associadas ao seu material biológico. As informações relacionadas ao estudo são tratadas como confidenciais e servirão para a elaboração de literatura científica. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob a forma codificada, sem aparecer nenhum nome, para que o sigilo seja mantido. Com exceção do próprio participante, somente os pesquisadores poderão ter acesso aos resultados da pesquisa, a não ser que você indique alguma pessoa que possa ter acesso a sua informação, inclusive genética, em caso de você não ter condições de acessá-la futuramente.

**Particularidades de estudos com genética:** Quanto aos resultados de sua “genética”, declaramos que seus resultados são confidenciais e não serão divulgados a seus superiores hierárquicos. Assim como em todas as etapas da pesquisa, você terá acesso a quaisquer resultados a qualquer momento sobre sua “genética”. No entanto você pode escolher por não saber desses resultados, apesar de que não há riscos à sua saúde decorrentes do resultado dos exames. Além disso, todo material biológico utilizado na pesquisa será descartado ao final da mesma, não sendo possível utilizá-lo em pesquisas futuras.

**Compromisso de Divulgação:** Os pesquisadores se comprometem divulgar os resultados para os participantes da pesquisa e para as instituições onde os dados foram obtidos.

**Despesas, Compensações, Ressarcimentos e Indenizações:** A sua participação no estudo **não** terá custo algum. As quaisquer despesas (como, por exemplo, transporte e alimentação, entre outros) porventura existentes serão de responsabilidade dos próprios pesquisadores. Em caso de danos diretos decorrentes do estudo resguarda-se o direito indenizatório ao participante. Pela sua participação no estudo, você também não receberá nenhum valor financeiro.

**Garantia de acesso aos pesquisadores:** Para maiores esclarecimentos, você está convidado a contactar os pesquisadores. Em qualquer fase do estudo você terá pleno acesso aos responsáveis ou até mesmo ao Comitê de Ética correspondente ao estudo.

Caleb Guedes Miranda dos Santos, D.Sc. Farmacêutico, Instituto de Biologia do Exército, tel. 98283-1584, email: calebguedes@gmail.com

Rachel de Sousa Augusto, M.Sc. Farmacêutica, Instituto de Biologia do Exército. tel: 21-99963-9030, email: racheldesousa@gmail.com

Marcos Dornelas Ribeiro, D.Sc. Pró-Reitor de Pesquisa, Instituto de Biologia do Exército, tel. 997006050, e-mail:dornelas-ribeiro@hotmail.com

**O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):** é um conjunto formado por profissionais de várias áreas e sem influência de outros órgãos ou pessoas que deve atuar em instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil. Ele foi criado para defender os interesses dos participantes de pesquisas e para contribuir para o desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões corretos (éticos). Comitê de Ética em Pesquisa - Centro de Capacitação Física do Exército (CEP-CCFex) , tel (21) 2586 – 2297 , e-mail: cep@ccfex.eb.mil.br

**Consentimento**

Rio de Janeiro, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_. Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação e recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão, e sei que qualquer problema relacionado será livre de custos para mim. Eu autorizo a coleta, o depósito, armazenamento e a utilização do meu material biológico somente para esse projeto. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo e **receberei uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)** assinada por mim ou meu representante legal e pelo pesquisador. Outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa.

Assinatura do participante de pesquisa \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

Observação: "todas as páginas devem estar rubricadas"