**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO-EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE**

TALITA MORAIS FERNANDES

Polimorfismo e níveis solúveis de HLA-G em fisiculturistas

**RIBEIRÃO PRETO
2020**

TALITA MORAIS FERNANDES

Polimorfismo e níveis solúveis de HLA-G em fisiculturistas

Versão corrigida

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-Graduação)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física e Esporte da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - USP, para obtenção do título de mestre.

Linha de Pesquisa: Aspectos biodinâmicos da atividade física e do esporte.

Orientador: Prof. Dr. Enrico Fuini Puggina

RIBEIRÃO PRETO
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

FERNANDES, Talita Moraes

Polimorfismo e níveis solúveis de HLA-G em fisiculturistas / Talita Moraes Fernandes; Orientador: Prof. Dr. Enrico Fuini Puggina - Ribeirão Preto, 2019. 103f

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2020.

1. HLA-G. 2. Fisiculturistas. 3. Exercício físico. 4. Inflamação. 5. Polimorfismo. 6. Níveis plasmáticos. 7. Anti-inflamatório

Nome: Talita Moraes Fernandes

Título: Polimorfismo e níveis solúveis de HLA-G em fisiculturistas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
mestre.

Aprovado em ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.

Universidade:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Universidade:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Universidade:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*À minha **família**, em especial à minha **mãe**, por ser meu pilar e maior exemplo de amor, força e dedicação; e à **Na**, por todo companheirismo, carinho e apoio durante esse caminho. Amo muito vocês!*

Agradecimientos

Gostaria de agradecer primeiramente à toda minha família. Principalmente à minha mãe, por ser meu alicerce, por apoiar e dar suporte em todos os momentos e escolhas da minha vida. Além disso, é a inspiração para toda minha trajetória, por ser meu maior exemplo de vida, de força e de amor incondicional. À mulher de muita garra e determinação, eterno obrigado! Agradecer, também, à minha companheira, Nayara, por todo o amor, cuidado e companheirismo, dividindo tantos momentos comigo. Às minhas irmãs, por fazerem da minha vida melhor e dividirem comigo tantos momentos de parceria. À minha bisavó e bisavô, Maria e João, que sempre foram, e sempre serão, o maior significado de cuidado, amor e dedicação em minha vida. Agradeço a Deus e a todos vocês por fazerem parte do mesmo caminho. Amo todos vocês!!!!

Ao meu orientador Prof. Dr Enrico Fuini Puggina pela oportunidade e aprendizado, confiança e ensinamentos durante todo o processo, principalmente por ser um exemplo na profissão, o qual admiro e respeito. Além de aprender muito, ganhei de brinde um amigo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi, pelo apoio e suporte em todo o desenvolvimento do projeto, ampliando e sendo sempre solícito em relação às discussões e tomadas de decisão do projeto. Abrindo as portas de seu laboratório e disponibilizando material e Recursos Humanos para todas as análises laboratoriais. Gostaria de agradecer, também, a todos do laboratório de Clínica Médica, às meninas responsáveis pelo laboratório, Sandra e Flávia, aos alunos de pós-graduação que me ajudaram nos procedimentos, em especial ao Paulin, sem a ajuda de vocês nada disso seria possível.

Ao Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Júnior, por todo auxílio prestado nas análises estatísticas do estudo e pela disposição em ajudar na resolução dos problemas que surgiram durante o processo.

Meus agradecimentos à toda comissão que compõe a CBMFF-IFBB Brasil; todos os representantes de cada estado, que foram muito receptivos e nos ajudaram a divulgar nosso estudo. Em especial ao Bruno Coraucci e Maurício Arruda, pela disponibilidade e por abrirem as portas desse evento tão importante do esporte. São pessoas engajadas em relação à importância da pesquisa no âmbito prático.

Gostaria de agradecer a todos os envolvidos no projeto, nada seria possível sem a ajuda e auxílio de todos vocês. O coletivo constrói, sempre, alicerces mais sólidos. Meu muito obrigada a todos os envolvidos!

RESUMO

FERNANDES, T.M. **Polimorfismo e níveis solúveis de HLA-G em fisiculturistas**. 2020. 234F. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Fisiculturismo tem sido considerado uma modalidade esportiva visual, caracterizado pela hipertrofia muscular, promovida por exercício físico intenso que provoca lesões nas células musculares e induz a resposta inflamatória com elevação na produção de mediadores pró-inflamatórios e ativação de células com o objetivo de iniciar o processo de remodelamento e reparação tecidual. Diversos mediadores imunológicos têm a função anti-inflamatória e imunoinibitória, como o HLA-G. Variações nos níveis de expressão são decorrentes do polimorfismo de seu gene. Mediante a escassez de estudos da associação de polimorfismos do gene do *HLA-G* no processo inflamatório da hipertrofia muscular; adido ao conhecimento que mecanismos pró e anti-inflamatórios podem influenciar o potencial de hipertrofia muscular, este estudo teve objetivo de avaliar o polimorfismo INDEL 14 pb, na região 3'NT, do gene *HLA-G* utilizando a técnica de PCR - Polymerase Chain Reaction com subsequente análise do produto amplificado através de eletroforese em gel de poliacrilamida seguido de coloração com nitrato de prata; e os níveis plasmáticos do HLA-G solúvel (sHLA-G) através da técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA, em fisiculturistas. Foram avaliados: 1) antropometria; 2) níveis plasmáticos do sHLA-G; 3) tipificação dos polimorfismos INDEL de 14 pb do gene *HLA-G*. As análises estatísticas foram realizadas pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Comparações do Índice de Massa Corporal (IMC) mostraram que Fisiculturistas Masculinos (FM) apresentam IMC significativamente maior em relação ao grupo Controle Masculino (CM) e Fisiculturistas Feminino (FF) ($P < 0,001$ para ambas). Porcentagem de gordura corporal (%G) revelaram que FM e FF apresentam redução estatisticamente significantes da %G quando comparado ao seu grupo CM ($P < 0,001$) e controle feminino (CF) ($P < 0,001$), respectivamente. A comparação entre FM vs. FF mostrou que FM apresentam redução significativamente maior da %G em comparação às FF ($P < 0,01$). Índice de Massa Magra (IMM) mostraram que FM e FF apresentam IMM significativamente maior em comparação com os grupos CM ($P < 0,001$) e CF ($P < 0,01$), respectivamente. Os grupos CM e FM apresentaram IMM significativamente maior em relação aos grupos de CF ($P < 0,001$) e FF ($P < 0,001$), respectivamente. Índice de Massa Gorda (IMG) mostraram que FM e FF apresentam IMG significativamente menor em comparação com os grupos CM ($P < 0,001$) e CF ($P < 0,001$), respectivamente. Entre os controles, o grupo de CM apresentou IMG significativamente menor em relação ao grupo CF ($P < 0,01$). Níveis plasmáticos de HLA-G solúvel (sHLA-G) entre os grupos mostraram que FM apresentam níveis de sHLA-G significativamente maior em comparação às FF ($P < 0,001$). Especificamente entre os FM, comparações intragrupo mostraram que FF com menores %G (quartil mínimo), em comparação aos participantes com maior %G (quartil máximo), apresentaram níveis de sHLA-G significativamente maiores ($P = 0,001$). Similarmente, participantes com menores IMG (quartil mínimo), em comparação aos participantes com maior IMG (quartil máximo), apresentaram níveis de sHLA-G significativamente maiores ($P = 0,001$). Por outro lado, indivíduos com maiores IMM (quartil máximo), em comparação aos participantes com menor IMM (quartil mínimo), apresentaram níveis de sHLA-G significativamente maiores ($P = 0,05$). As análises do polimorfismo de 14 pb do gene *HLA-G* não mostraram associações significantes entre os grupos estudados. Em conclusão, nossos resultados mostram que em fisiculturistas com menos gordura corporal os níveis sistêmicos de HLA-G solúvel, molécula imunológica com reconhecida função imunossupressora, são significativamente maiores e sugerem que este mecanismo imunológico possa corroborar o estado imunossupressor em atletas submetidos a treinamentos exercícios físicos intensos e prolongados.

Palavras-chave: fisiculturismo, exercício físico, inflamação, polimorfismo, HLA-G, níveis plasmáticos, anti-inflamatório.

ABSTRACT

FERNANDES, T.M. HLA-G polymorphism and soluble levels in bodybuilders. 2020. 234F. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Bodybuilding has been considered a visual sport, characterized by muscle hypertrophy, promoted by intense physical exercise that causes muscle cell damage and induces inflammatory response with increased production of proinflammatory mediators and activation of cells in order to initiate the process of tissue remodeling and repair. Several immunological mediators have anti-inflammatory and immunoinhibitory function, such as HLA-G. Variations in expression levels are due to the polymorphism of its gene. Due to the scarcity of studies about the association of HLA-G gene polymorphisms in the inflammatory process of muscle hypertrophy; added to the knowledge that pro and anti-inflammatory mechanisms may influence the potential for muscle hypertrophy, this study aimed to evaluate the INDEL 14 base pair (bp) polymorphism in the 3'NT region of the HLA-G gene and the plasma levels of soluble HLA-G. (sHLA-G) in bodybuilders. The following were evaluated: 1) anthropometry; 2) sHLA-G plasma levels; 3) typification of the 14 bp INDEL polymorphisms of the HLA-G gene. Statistical analyzes were performed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. Comparisons of Body Mass Index (BMI) showed that Male Bodybuilders (FM) have significantly higher BMI compared to the Male Control (CM) and Female Bodybuilders (FF) group ($P < 0.001$ for both). Percentage of body fat (% G) revealed that FM and FF showed a statistically significant reduction in % G when compared to their CM ($P < 0.001$) and female control (CF) groups ($P < 0.001$), respectively. Percentage of body fat (% G) revealed that FM and FF showed a statistically significant reduction in % G when compared to their CM ($P < 0.001$) and female control (CF) groups ($P < 0.001$), respectively. The comparison between FM vs. FF showed that FM presented significantly greater reduction of % G compared to FF ($P < 0.01$). Lean Mass Index (MMI) showed that FM and FF had significantly higher MMI compared to CM ($P < 0.001$) and CF ($P < 0.01$) groups, respectively. The CM and FM groups presented significantly higher MMI in relation to the CF ($P < 0.001$) and FF ($P < 0.001$) groups, respectively. Fat Mass Index (IMG) showed that FM and FF have significantly lower IMG compared to the CM ($P < 0.001$) and CF ($P < 0.001$) groups, respectively. Among controls, the CM group had significantly lower IMG than the CF group ($P < 0.01$). Soluble HLA-G (sHLA-G) plasma levels between groups showed that FM had significantly higher sHLA-G levels compared to FF ($P < 0.001$). Specifically among FM, intragroup comparisons showed that FF with lower % G (minimum quartile) compared to individuals with higher % G (maximum quartile) had significantly higher sHLA-G levels ($P = 0.001$). Similarly, individuals with lower IMG (minimum quartile) compared to individuals with higher IMG (maximum quartile) had significantly higher sHLA-G levels ($P = 0.001$). On the other hand, individuals with higher MMI (maximum quartile), compared to individuals with lower MMI (minimum quartile), had significantly higher sHLA-G levels ($P = 0.05$). The 14 bp polymorphism analysis of the HLA-G gene showed no significant associations between the groups studied. In conclusion, our results show that in bodybuilders with less body fat the systemic levels of soluble HLA-G, the immunologically suppressing immune molecule, are significantly higher and suggest that this immune mechanism may corroborate the immunosuppressive state in athletes undergoing intense and prolonged exercise training.

Key-words: bodybuilding, exercise, inflammation, polymorphism, HLA-G, plasma levels, anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Categorias de fisiculturismo masculino e feminino, de acordo com a CBMFF–IFBB Brasil. Da esquerda para a direita: Bodyfitness, Fisiculturismo, Biquini Fitness, Fisiculturismo clássico, Women’s Physique, Men’s Physique. (Fonte: CBMFF–IFBB Brasil, 2019). 21

Figura 2. Mapa do MHC humano (Fonte: Klein & Sato, 2000)..... 28

Figura 3. Isoformas do HLA-G produzidas por splicing alternativo do RNA mensageiro (mRNA) primário (Fonte: Donadi et al., 2011)..... 30

Figura 4. Gene e transcrição do antígeno leucocitário humano G (*HLA-G*). A. localização do gene *HLA-G*. B. Estrutura do gene *HLA-G* que consiste em 7 íntrons (cor branca) e 8 éxons (cor verde). C. Promotor do gene *HLA-G* exibindo elementos reguladores da transcrição d do gene *HLA-G* e região 3'-NT do gene *HLA-G* exibindo vários elementos reguladores, incluindo motivos ricos em AU e um sinal de Poly-A para influenciar a estabilidade do mRNA, *turnover*, mobilidade e padrão de emenda. CRE significa elemento responsivo para cAMP, RRES para elementos de resposta ras, ISRE para elemento de resposta sensível ao interferon, HSE para elemento de resposta ao choque térmico, PRE para elemento de resposta a progesterona e X1 para X1 *box*. D. O transcrito primário de *HLA-G* pode ser dividido em 7 mRNAs alternativos que variam de *HLA-G1* a *-G7* (Fonte: SHANG-MIAN, 2012)..... 32

Figura 5. Gel de poliacrilamida 7% corado pela prata, ilustrando a detecção do polimorfismo de 14pb do gene *HLA-G*. Identificação da amostra e sua detecção de genótipo: II - genótipo inserção/inserção; DD - genótipo deleção/deleção; DI - genótipo deleção/inserção. 46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição de participantes fisiculturistas (porcentagem) de acordo com sexo e cor de pele autodeclarada.50

Gráfico 2. Distribuição de participantes controles (porcentagem) de acordo com sexo e cor de pele autodeclarada.51

Gráfico 3. Níveis plasmáticos de HLA-G solúvel (sHLA-G) de participantes dos grupos CF (controle feminino), CM (controle masculino), FF (fisiculturista feminino), FM (fisiculturista masculino). $P < 0,001$ sinalizado, apresenta diferença significativa nas concentrações de sHLA-G entre grupos de fisiculturistas feminino (FF) e fisiculturistas masculino (FM). As barras horizontais em negrito representam as medianas.56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis antropométricas, relacionadas à idade, estatura, massa corporal total e Índice de Massa Corporal dos grupos de participantes estudados.....	52
Tabela 2. Comparação do Índice de Massa Corporal dos grupos de participantes estudados.	52
Tabela 3. Comparação da porcentagem de gordura corporal dos grupos de participantes estudados.	53
Tabela 4. Comparação dos Índices de Massa Magra dos grupos de participantes estudados.	54
Tabela 5. Comparação dos Índices de Massa Gorda dos grupos de participantes estudados.	55
Tabela 6. Comparação dos níveis plasmáticos de sHLA-G dos grupos de participantes estudados.	56
Tabela 7. Comparação dos níveis plasmáticos de HLA-G solúvel, Índice de Massa Magra, Índice de Massa Gorda e Porcentagem de Gordura Corporal entre fisiculturistas masculino.....	57
Tabela 8. Comparação dos níveis plasmáticos de HLA-G solúvel, Índice de Massa Magra, Índice de Massa Gorda e Porcentagem de Gordura Corporal entre fisiculturistas feminino.....	58
Tabela 9. Frequência genotípica de inserção / deleção de 14 pb em participantes do grupo de fisiculturistas e controles.	59
Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas dos sítios polimórficos de inserção/deleção de 14 pb, na região 3' não traduzida (3'NT), do gene <i>HLA-G</i> em fisiculturistas e controles.....	59
Tabela 11. Comparação da frequência genotípica do polimorfismo de 14 pb do gene HLA-G e níveis plasmáticos de HLA-G solúvel entre fisiculturistas e controles.....	60
Tabela 12. Comparação da frequência genotípica do polimorfismo de 14 pb do gene HLA-G e níveis plasmáticos de HLA-G solúvel em participantes do grupo controle e em participantes do grupo de fisiculturistas.	60

LISTA DE APÊNDICE

APÊNDICE 1. Ficha de Coleta 1	91
APÊNDICE 2. Ficha de Coleta 2	92
APÊNDICE 3. Tabela de caracterização da amostra.....	93

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Parecer consubstanciado do CEP	99
ANEXO 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- %G** - Porcentagem de gordura corporal
- +14/-14pb** – Polimorfismo Inserção/Deleção 14 pares de bases
- 21B e 21a** - Enzimas 21-hidroxilase
- 3`NT** – Região 3`não traduzida
- APC**- Células Apresentadoras de Antígenos
- AU** – *Adenylate-uridylylate-rich elements*
- CD4** - Grupamento de diferenciação 4
- CD8** - Grupamento de diferenciação 8
- CF** - Controles Femininos
- CK** - Creatina Quinase
- CM** - Controles Masculinos
- CPH** – Complexo Principal de Histocompatibilidade
- CTL** – Linfócito T citotóxico idem CD8
- DD** – Genótipo Deleção/Deleção
- DI** – Genótipo Deleção/Inserção
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)
- dNTP** – Dinucleotídeo Trifosfato
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EEFERP** - Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto
- ELISA** - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
- EROs** - Espécies Reativas de O₂
- FF** - fisiculturistas femininos
- FM** - fisiculturistas masculinos
- freq.** - frequência
- H₂O** - água
- H₂SO₄ 1N** – Ácido Sulfúrico
- HG8R e HG8F** –
- HLA** - Antígeno leucocitário humano (do inglês, *human leukocyte antigen*)
- HLA-DR, DRA** - Antígeno leucocitário humano de classe II do tipo DR, DRA
- HLA-G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7** - Antígeno leucocitário humano - G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7

Hsp 70 - Proteínas de choque térmico do inglês *heat shock protein*)

ID - Genótipo inserção/deleção

CBMFF–IFBB Brasil – Confederação Brasileira de Musculação, Fisiculturismo e Fitness

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

II - Genótipo Inserção/Inserção

IL - Interleucina

ILT – *Immunoglobulin-like transcript*

IMC – Índice de Massa Corporal

IMG - Índice de Massa Gorda

IMM - Índice de Massa Magra

INDEL - inserção / deleção

INF-gama – Interferon - gamma

KCl – Cloreto de Potássio

Kg – quilos

KIR1 e 2- receptor inibitórios de NK (*natural killer*) 1e 2

KIRDL – *Killer cell immunoglobulin-like receptor*

LD – Desequilíbrio de ligação (do inglês, linkage disequilibrium)

m – metros

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, Mitogen-Activated Protein Kinase)

MCT - Massa Corporal Total

MHC II - Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II

miRNA – Micro Ácidos Ribonucléicos

mM - Milímetros

mRNA – Ácidos Ribonucléicos mensageiro

N - número de participantes

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NIS – Simportador sódio iodeto

NK - células Natural Killer

PAGE – Gel de poliacrilamida

$\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ - Domínios aminoterminais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 FISICULTURISMO	20
1.2 HIPERTROFIA MUSCULAR NO FISICULTURISMO	22
1.3 INFLAMAÇÃO NA HIPERTROFIA MUSCULAR.....	23
1.4 IMUNOMETABOLISMO NA INFLAMAÇÃO	25
1.5 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE E ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS	27
1.6 ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO – G (HLA-G)	28
1.7 POLIMORFISMO INDEL DO HLA-G (INSERÇÃO/DELEÇÃO DE 14 PB NA REGIÃO 3’NT).....	31
1.8 HLA-G E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS.....	33
1.9 HLA-G NA INFLAMAÇÃO DA HIPERTROFIA MUSCULAR	34
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVO	39
3.1 Geral:	39
3.2 Específicos:.....	39
4. AMOSTRA E MÉTODOS	41
4.1 Considerações éticas	41
4.2 Delineamento experimental	41
4.3 Amostra.....	42
4.4 Instrumento de Coleta de Dados	42
4.5 Avaliação antropométrica	42
4.6 Coleta de sangue	43
4.7 Quantificação dos níveis plasmáticos de HLA-G solúvel	43
4.8 Avaliação das variáveis genéticas da amostra	44

4.8.1 Técnica de extração de DNA	44
4.8.2 Processamento da amostra para determinação do polimorfismo de inserção/deleção dos 14 pares de bases do gene <i>HLA-G</i>	45
4.8.2.1 Análise do produto amplificado.....	45
4.8.2.2 Coloração com nitrato de prata e registro dos resultados	46
4.9 Análise estatística	47
5. RESULTADOS	49
5.1 Caracterização da Amostra	49
5.1.1 Descrição do grupo de Fisiculturista	49
5.1.2 Descrição do grupo Controle	50
5.2 Avaliação Antropométrica.....	52
5.2.1 Porcentagem de Gordura Corporal (%G)	53
5.2.2 Índice de Massa Magra (IMM).....	54
5.2.3 Índice de Massa Gorda (IMG).....	54
5.3 Níveis plasmáticos de HLA-G solúvel	55
5.4 Polimorfismo de 14 pb de inserção/deleção do gene <i>HLA-G</i>	57
5.5 Associações entre a frequência de alelos e genótipos do polimorfismo de inserção / deleção de 14 pb do gene <i>HLA-G</i> com os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel	60
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÕES	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 FISICULTURISMO

O fisiculturismo é um esporte que tem suas raízes no halterofilismo, e o interesse nesta nova modalidade esportiva surgiu no final do século XIX. A distinção entre os dois esportes se baseia por seus ideais: o halterofilismo busca um perfil corporal robusto, onde o objetivo do atleta é levantar o maior peso possível; no caso do fisiculturismo os atletas buscam representar as estátuas da Grécia antiga e suas formas harmoniosas (SCHWARZENEGGER, 2001; TURMI, 1955). Desde a antiguidade padrões de beleza têm sido idealizados, com intensificação nos séculos XX e XXI. Atualmente, a doutrina de corpo ideal objetiva um corpo delineado, com menores quantidades de gordura, bronzado e tonificação muscular. Doutrina de corpo ideal que se assemelha ao fisiculturismo, na qual os atletas buscam simetria corporal, elevada definição muscular e baixíssimo percentual de gordura. No Brasil, o fisiculturismo teve início com o profissional de Educação Física, Enéas Campello no ano de 1917. Foi um dos criadores de um espaço voltado ao treinamento de fisiculturistas e halterofilistas (NEVES, 2012).

Após anos em ascensão, a modalidade conquistou o reconhecimento oficial do Comitê Olímpico Internacional em 1997, incluindo-o na comunidade internacional de esporte amador. Fisiculturismo é considerado uma modalidade esportiva visual, visto que o objetivo do treinamento físico não evidencia a força, mas o tamanho, simetria e definição muscular, e a mínima retenção de fluido e gordura. Nas competições, os atletas são avaliados durante comparações em grupos, de 3 a 5 atletas, realizando suas poses/rotinas obrigatórias, e apresentação coreográfica de acordo com a categoria, para demonstração de seu físico, exaltando as posições que mais favoreçam sua definição muscular (CBMFF-IFBB Brasil, 2019). Os critérios de avaliação, na maioria das categorias são: definição, hipertrofia, proporção e simetria, e as poses obrigatórias realizadas pelos atletas (SCHWARZENEGGER, 2001).

Para atingirem a condição desejada, os fisiculturistas seguem um ciclo de dieta e treinamento especial pré-competição, com o intuito de diminuir ao máximo a porcentagem de gordura, remover toda a água subcutânea para demonstrar a qualidade de seus músculos, quanto a densidade, definição e separação muscular. Existem diversas categorias/divisões registradas na Confederação Brasileira de Musculação, Fisiculturismo e Fitness (CBMFF-IFBB Brasil,

2019), num total de 18 mil culturistas, com 2.700 atletas que participam de competições entre as 24 federações filiadas.

Várias categorias têm sido descritas, sendo diferenciadas de acordo com determinado padrão corporal. De acordo com a CBMFF–IFBB Brasil, as principais características das categorias do fisiculturismo masculino mais comuns são: 1) Fisiculturismo – extemo volume muscular de todo corpo, acompanhado de simetria e proporção; 2) Fisiculturismo clássico – músculos definidos, formas e proporções do músculo; 3) Men’s Physique - aspecto do corpo atlético e saudável, belza geral do atleta, com as devidas proporções simétricas; 4) Fitness Coreográfico (masculino e feminino) - categoria na qual os atletas apresentam uma coreografia pré-montada com música. Também é julgada a tonicidade muscular, flexibilidade, o grau de dificuldade dos movimentos coreográficos como também o baixo percentual de gordura. Em relação às categorias femininas, temos: 1) Bodyfitness - baixíssimo percentual de gordura, simetria muscular, corpo toneado e atlético; 2) Biquini Fitness – mulheres magras com a cintura fina, beleza facial, baixo volume muscular, a graciosidade no palco além da maquiagem e escolha do biquíni também fazer parte das arguições dos árbitros; 3) Women’s Physique – alta definição, extremo volume muscular, baixíssimo percentual de gordura sem perder os atributos femininos; 4) Wellness Fitness - as atletas apresentam uma leve definição corporal com direcionamento de volume nos membros inferiores, o chamado “padrão brasileiro” (CBMFF–IFBB Brasil, 2019).

Figura 1. Categorias de fisiculturismo masculino e feminino, de acordo com a CBMFF–IFBB Brasil. Da esquerda para a direita: Bodyfitness, Fisiculturismo, Biquini Fitness, Fisiculturismo clássico, Women’s Physique, Men’s Physique. (Fonte: CBMFF–IFBB Brasil, 2019).

Os Fisiculturistas são conhecidos por apresentar características físicas radicais com extremo treinamento e dieta para otimizar a massa magra e reduzir a taxa de gordura corporal. Entretanto, estudos para maiores esclarecimentos acerca dos mecanismos fisiológicos dessa modalidade esportiva são extremamente escassos (SPENDLOVE et al., 2015).

1.2 HIPERTROFIA MUSCULAR NO FISICULTURISMO

No contexto do fisiculturismo, para que ocorra o desenvolvimento e aumento da massa muscular, também chamada de hipertrofia muscular, as fibras musculares devem sofrer alterações e ajustes em resposta a sobrecarga imposta pelos exercícios físicos (GENTIL, 2005).

Para a melhora no desempenho físico, a sobrecarga progressiva de esforço é um dos princípios de treinamento necessário. Durante as sessões de treino, para que haja distúrbios na homeostasia celular com subsequente resposta a esse estresse, é aplicada sobrecargas progressivas de esforço. Essa sobrecarga é resultante da manipulação de diversas variáveis, tais como: frequência dos exercícios, sua combinação, velocidade de execução, intensidade, intervalo entre os estímulos, amplitude dos movimentos, número de exercícios e a natureza da ação muscular. Proveniente do princípio da sobrecarga são os microtraumas no tecido muscular esquelético, tecido ósseo e conjuntivo, sendo dependentes do grau do estresse recebido. Os microtraumas são considerados danos temporários em que são reparáveis provenientes de uma resposta inflamatória aguda (TOIGO E BOUTELLIER, 2006), cuja função é a limpeza, com subsequente reparo e desenvolvimento dos tecidos previamente danificados (SMITH, 2000). Lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase, mioglobina e creatina quinase (CK) são proteínas intracelulares resultantes da possível liberação para a corrente sanguínea (LAZARIM et al., 2009). Podem promover uma desorganização na estrutura miofibrilar (alargamento, rompimento ou prolongamento da linha Z com consecutiva desordem na ligação das fibras adjacentes, ancoragem dos filamentos finos), podendo, ainda, causar danos ao material contrátil e às proteínas do citoesqueleto (LAZARIM et al., 2009). Quando respeitado o tempo de descanso necessário, ocorrem adaptações positivas do tecido muscular estriado esquelético e suas estruturas adjacentes, promovendo um remodelamento metabólico e morfológicos das miofibrilas (SMITH, 2004). Portanto, através da ativação de vias de sinalização intracelulares ocorre uma ativação gênica resultando em alterações nas propriedades contráteis, nas respostas metabólicas e em alterações na massa muscular (BASSEL-DUBY e OLSON, 2006).

1.3 INFLAMAÇÃO NA HIPERTROFIA MUSCULAR

O reparo do dano é um mecanismo sincronizado constituído pela fase de degeneração, fase de regeneração e fase de remodelamento do tecido danificado (SMITH, 2004), sendo a resposta inflamatória o agente promotor tanto do dano, quanto da regeneração. Esse mecanismo é composto pela ação conjunta de hormônios e citocinas, antioxidantes enzimáticos e de baixo peso molecular, fatores de crescimento e espécies reativas de O₂ (EROs), mantendo o equilíbrio entre atividades pró e anti-inflamatórias e pró e antioxidantes (GLEESON, 2007; TIDBALL, 2005). A lesão do sarcolema dispara a primeira fase do reparo tecidual, através da liberação de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas e prostaciclina, chamados de eicosanoides (SMITH, 2004). Esses eicosanoides atuam na regulação da vasodilatação, no aumento na permeabilidade do endotélio vascular, na atividade quimiotática, inerentes à inflamação tecidual, e são derivados dos ácidos araquidônicos, constituintes dos fosfolípidios das membranas celulares, especialmente aquelas do sistema imunológico (GLEESON, 2007; TIDBALL, 2005). Esses fatores viabilizam o fenômeno chamado diapedese (influxo de células inflamatórias para o local da lesão). A primeira subpopulação a migrar são os neutrófilos, apresentando um pico de 6^o minutos após o exercício, podendo ter duração de 5 dias. Concomitante, e tendo como mediadores a ação da interleucina 6 e do cortisol, ocorre um aumento na exportação de neutrófilos da medula óssea para a corrente sanguínea. Sua principal função é a fagocitose dos elementos indesejáveis relacionados à lesão tecidual, sendo considerado o gatilho para as respostas subsequentes de reparo e crescimento do tecido (TIDBALL, 2005).

A segunda sub-população de leucócitos a apresentar-se ao local são os monócitos, chamados de macrófagos após sua migração da corrente sanguínea para os tecidos. Existem evidências de que a função dos macrófagos difere em relação à atuação quando invadem o local lesionado, entre 24-48h (principal função é a remoção do tecido danificado), sendo diferente dos que atuam mais tardeamente, entre 48-96h (mais ativos no reparo muscular) (TIDBALL e WEHLING-HENRICKS, 2007). Ainda, os macrófagos secretam várias outras moléculas, tais como EROs, prostaglandinas e quimiocinas (BUTTERFIELD et al., 2006).

De fato, estudos *in vitro* e *in vivo* confirmaram que os macrófagos exercem uma função importante no reparo e crescimento do tecido lesado, provavelmente, pela secreção de moléculas pró-regenerativas. Dentre essas, destacam-se alguns hormônios, como o fator de crescimento semelhante à insulina, e algumas citocinas reguladoras do crescimento celular,

como o fator de crescimento dos fibroblastos, e o TGF- β 10 (TIDBALL e WEHLING-HENRICKS, 2007). Essas citocinas são agentes sinalizadores da ativação, proliferação e diferenciação de células-satélites musculares que são importantes na reestruturação tecidual. Também agem no recrutamento e ativação de fibroblastos que contribuem na regeneração tecidual por sua secreção de moléculas de colágeno (PEDERSEN et al., 1998).

Não menos importantes nesse processo de regeneração tecidual, os linfócitos aumentam sua atividade durante e imediatamente após o esforço, especialmente das células Natural Killer (NK), com subsequente queda, podendo essa perdurar por várias horas induzindo perda de sua capacidade funcional, principalmente das NK e linfócitos T. Essas alterações podem gerar um quadro de imunossupressão transitória (GLEESON 2007) que apresenta indícios de um aumento na susceptibilidade a infecções do trato respiratório superior de atletas, um efeito agudo do exercício exaustivo e prolongado (PEDERSEN et al., 1998; ROWBOTTOM e GREEN, 2000). Esse quadro de imunossupressão pode, também, estar associado à menor secreção de citocinas, uma diminuição na atividade de neutrófilos e monócitos, ao *burst* respiratório atenuado, menor capacidade quimiotática dos neutrófilos e menor expressão dos receptores *Toll-like* (TL) pelos monócitos responsáveis pelo reconhecimento de tecidos danificados no organismo (PEDERSEN e ULLUM, 1994; ROWBOTTOM e GREEN, 2000). Coadjuvante desse ambiente imunossupressor, o cortisol, constitui a chamada “janela imunológica” (SMITH, 2004), fenômeno esse parece estar relacionado com um aumento na possibilidade de instalação de quadros indecisos pós-exercício (GLEESON, 2007).

As citocinas, grupo de glicoproteínas, atuam na coordenação, regulação, magnitude, amplificação e duração dos eventos inflamatórios e de seus efeitos (MOLDOVEANU et al., 2001). São produzidas e liberadas, principalmente, pelas células do sistema imune (linfocinas), além da musculatura ativa (miocinas), tecido adiposo (adipocinas) e células endoteliais (PEDERSEN 2011; IIZUKA, MACHIDA, & HIRAFUJI, 2014). As citocinas podem ter atividade pró-inflamatória (IL-1 beta, INF-gama, TNF-alfa, IL-6), anti-inflamatória (IL-6, IL-10, IL-4, IL-5), ou ainda, de moduladora da inflamação (IL-6), regulando, além da inflamação, a ativação de vias energéticas para suporte deste processo (PETERSEN e PEDERSEN, 2005). As citocinas permite que diferentes sistemas orgânicos sejam informados do trauma em um tecido específico, atuando na comunicação intracelular entre os órgãos e intersistemas. Elas viabilizam o influxo de neutrófilos, monócitos, linfócitos e outras células participantes da limpeza e regeneração do tecido, sinalizando de forma indireta a permeabilidade dos vasos sanguíneos, de modo consequente ocasionando um aumento na transição de proteínas e fluidos

entre os espaços extra e intracelular (MOLDOVEANU et al., 2001). As citocinas sinalizam os microtraumas gerados pelo exercício físico a outros tecidos, tais como fígado, endotélio, rins, cérebro, células imunes e sistema endócrino, principalmente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gônadas, promovendo uma ação necessária e integrada para o reparo da lesão (SMITH, 2000). Nesse sentido, o equilíbrio entre as ações pró e anti-inflamatórias das diferentes citocinas contribui para a regeneração completa do tecido danificado (BASSEL-DUBY e OLSON, 2006).

Desta maneira, o contexto inflamatório está associado aos componentes celulares, aumento de marcadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucinas (IL-6, IL-1 β) e proteína C-reativa (LIRA, NETO, & SEELAENDER, 2014), simultaneamente à redução nas concentrações de marcadores anti-inflamatórios como o receptor antagonista da interleucinas (IL-1ra), interleucina 10 (IL-10), adiponectina, entre outros (OHASHI, SHIBATA, MUROHARA, & OUCHI, 2014).

1.4 IMUNOMETABOLISMO NA INFLAMAÇÃO

No âmbito da saúde ou da doença, a interação entre células imunológicas, marcadores inflamatórios e metabolismo tem sido denominada imunometabolismo. A comunicação entre as células imunológicas e o metabolismo são as citocinas. A contração muscular estimula a liberação e síntetização de miocinas para a corrente sanguínea (IIZUKA, MACHIDA, & HIRAFUJI, 2014). Nessa perspectiva, o exercício físico é um importante agente regulador do imunometabolismo, sendo ele indutor de significantes alterações metabólicas; durante sua execução há um aumento na demanda energética e modificações hormonais que visam a regulação e manutenção da atividade muscular e, conseqüentemente, um aumento do aporte energético para as células musculares.

Corroborando com esse panorama, Ahlborg e Ahlborg (1970), demonstraram, como uma das pesquisas pioneiras sobre, uma interação entre o metabolismo durante o exercício e o sistema imune. Os pesquisadores associaram que durante a sessão de exercício físico houve uma elevação da quantidade de células imunes, através do aumento da resposta adrenérgica, advindo do estímulo do sistema nervoso central, resultando na síntese e liberação de catecolaminas, aptas no estímulo e disponibilização de substratos para a musculatura

esquelética durante a contração, ocasionando, também, uma modulação imunológica local e sistêmica.

Fica evidente que na prática de exercício físico, há íntima comunicação entre sistema imunológico e metabolismo celular. A prática insuficiente de exercício físico está atrelada com desenvolvimento de diversas doenças e alterações metabólicas, como alterações no metabolismo de lipídios, diminuição da massa corporal magra e perda de força muscular, diminuição da sensibilidade à insulina e aumento da adiposidade visceral, sucedendo um quadro de inflamação crônica de baixo grau (PEDERSEN, 2009; 2011). Em contrapartida, a contração muscular pode elevar a produção de miocinas (IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, miostatina e LIF) e ativar células do sistema imune (monócitos/macrófagos, neutrófilos) que atuam no direcionamento de células satélites para o local do dano muscular com o objetivo de iniciar o processo de remodelamento e reparação tecidual (TIDBALL & VILLALTA, 2010), desta forma, revertendo e equilibrando um possível quadro inflamatório, devido à sua potente ação anti-inflamatória (PEDERSEN & FEBBRAIO, 2012).

O gene da miostatina não ativado pode contribuir para a redução da gordura corporal, e também no aumento da hipertrofia muscular (RODGERS & GARIKIPATI, 2008). Assim, o sistema imunológico possui importância fundamental, na reparação de lesões, proliferação e biossíntese de células e atividade secretória, não somente para prevenir ou combater uma infecção (CALDER, DIMITRIADS, & NEWSHOLME, 2007). Neutrófilos, linfócitos e monócito/macrófagos possuem importantes papéis na resposta imune e inflamatória aguda e crônica.

Especificamente, os linfócitos T são ativados e requeridos para ativar macrófagos, enquanto linfócitos B produzem e secretam anticorpos em resposta ao estímulo antigênico. Já os neutrófilos, constituem 60% dos leucócitos circulantes e atuam na fase aguda da infecção, sendo considerados como linha de frente na defesa do organismo (fagocitose e degradação de patógenos). Os macrófagos também realizam a fagocitose de patógenos, porém apresentam antígenos por meio das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) (NEWSHOLME, 2001).

1.5 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE E ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS

Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH ou MHC - “Major Histocompatibility Complex”), incluem, na espécie humana, a denominação de sistema HLA (Human Leukocyte Antigen). Esses genes têm sido agrupados em três (03) regiões, didaticamente subdivididas em classe I, II e III, de acordo com as suas localizações no braço curto do cromossomo 6 (DONADI, 2000; FERNANDES 2003).

Na região de classe I estão os loci HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K e L. Os genes HLA-A, B e C codificam as moléculas de histocompatibilidade (HLA) presentes em praticamente todas as células nucleadas, por esse motivo são consideradas moléculas clássicas, de classe Ia. Já os genes HLA-E, F e G codificam moléculas que são restritas a alguns tipos teciduais, sendo consideradas moléculas não-clássicas, de classe Ib. As moléculas HLA de classe Ia são caracterizadas por seu alto grau de polimorfismo, e as moléculas de classe Ib são caracterizadas pelo limitado polimorfismo (DONADI, 2000; FERNANDES et al., 2003; HUNT; LANGAT, 2009; MURDACA et al., 2009).

Na região de classe II estão presentes os genes HLA-DRA, DRBI-9, DQA1,2, DQB1,3, DOA, DOB, DMA, DMB, DPA1,2, DPB1,2, TAP1,2, LMP2,7, MICA-E. Os genes de maior importância clínica nessa classe são os HLA-DR, DP e DQ. Eles codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade classe II, cuja atuação está envolvida na apresentação de peptídeos aos linfócitos T (DONADI, 2000).

A região classe III contém genes que codificam alguns componentes do sistema de complemento, dentre os quais C4A, C4B e fator B (Figura 1). Nessa classe também encontramos genes para as enzimas 21-hidroxilase (21B e 21A), para a proteína Hsp 70-relacionada ao choque térmico, bem para os fatores de necrose tumoral α e β (DONADI, 2000).

Figura 2. Mapa do MHC humano (Fonte: Klein & Sato, 2000).

As moléculas de histocompatibilidade são glicoproteínas de superfície e apresentam três porções em comum: uma citosólica, responsável pela transdução de sinais intracelulares; uma transmembranosa, que mantém a molécula acoplada à camada bilipídica; e uma extracelular, responsável pela apresentação de peptídeos às células T (DONADI, 2000).

Notadamente, as moléculas HLA de classe I são heterodímeros, compostas por uma cadeia pesada α , contendo os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$. Essa cadeia α apresenta uma associação não covalente com a $\beta 2$ -microglobulina. Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são responsáveis pelo grande polimorfismo dessas moléculas, enquanto o domínio $\alpha 3$ é basicamente não polimórfico e apresenta homologia estrutural com as cadeias pesadas das imunoglobulinas. Dentre as inúmeras funções dessa classe de moléculas, certamente a apresentação de peptídeos endógenos e virais aos linfócitos T CD8 é de extrema importância (DONADI, 2000; HUNT et al., 2005).

1.6 ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO – G (HLA-G)

Descrito pela primeira vez em 1987, a molécula HLA-G foi descoberta na interface materno-fetal, sendo sua expressão restrita à população de trofoblastos, conferindo uma tolerância imunológica materna ao feto, semialogênico (GERAGHTY, KOLLER et al, 1987; FERNANDES et al., 2003; HUNT et al., 2005; MOODLEY e BOBAT, 2011; ZHU et al., 2012). Sua expressão fisiológica tem sido detectada em tecidos imunoprivilegiados como placenta, córnea e timo. A expressão não fisiológica tem sido descrita em condições inflamatórias, infecção viral e tumores (GONZÁLEZ et al., 2012).

Assim como os genes HLA clássicos (HLA-A, -B, -C), o gene HLA-G apresenta 7 íntrons e 8 éxons que codificam uma cadeia pesada associada, de maneira não covalente, a 2-microglobulina. O éxon 1 codifica o peptídeo sinal, os éxons 2, 3 e 4 codificam os domínios extracelulares 1, 2 e 3, respectivamente. O éxon 5 codifica o domínio transmembrana, e os

outros éxons codificam o domínio citoplasmático da cadeia pesada. Contudo, a presença de um códon de parada no início do éxon 6 do gene HLA-G reduz a 6 aminoácidos o domínio citoplasmático da proteína (HUNT et al., 2005; DONADI et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2012).

A molécula HLA-G apresenta sete isoformas proteicas, HLA-G1 a HLA-G7, geradas por edição alternativa do transcrito primário (Figura 2). As quatro primeiras são isoformas de membrana: HLA-G1 é a forma completa com estrutura de molécula HLA clássica associada a 2-microglobulina, transportando um peptídeo de sequência comum; HLA-G2 é desprovida do domínio 2 codificada pelo éxon 3; HLA-G3 não possui os domínios 2 e 3 codificados pelos éxon 3 e 4; HLA-G4 perdeu o domínio 3 codificado pelo éxon 4 (HUNT et al., 2005; DONADI et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2012).

As três últimas isoformas são solúveis: HLA-G5 e HLA-G6 são gerados por transcritos que preservam o íntron 4, bloqueando a tradução do domínio transmembrana (éxon 5), eles apresentam domínios extraglobulares como o HLA-G1 e HLA-G2. Em sua afse de leitura do éxon 4, na região 5' do íntron, traduz até um códon de parada que concede às isoformas HLA-G5 e HLA-G6 causa de 21 aminoácidos específicos na sua solubilidade. O HLA-G7, outra forma solúvel, tem limitações em relação a seu domínio 1, e conserva 2 aminoácidos específicos no íntron 2. Todos os transcritos alternativos são desprovidos do éxon 7 (HUNT et al., 2005; DONADI et al., 2011).

Figura 3. Isoformas do HLA-G produzidas por splicing alternativo do RNA mensageiro (mRNA) primário (Fonte: Donadi et al., 2011).

Essas características genômicas resultam na expressão mais lenta e prolongada da HLA-G na superfície da célula, e, eventualmente, numa apresentação de peptídeos exógenos ineficiente. Isso pode evidenciar que a função primária da HLA-G não é a apresentação de antígenos, mas sim a atuação como um ligante inibidor para as células do sistema imunológico, especialmente as células NK (HUNT et al., 2005).

A HLA-G é uma molécula imunossupressora que age tanto na imunidade inata quanto adaptativa, proporcionando inibição contra a citotoxicidade das células NK e linfócitos T citotóxicos. Essa característica confere a HLA-G um efeito modulador benéfico à gestação, doenças autoimunes e inflamatórias, e efeitos negativos no câncer e em infecções virais (MOODLEY; BOBAT, 2011; SVENDSEN et al., 2013). Evidências apontam para a afinidade da HLA-G em ligar-se aos receptores ILT-2 e ILT-4, que também interagem com outras moléculas HLA de classe I e com o receptor KIR2DL4, que é específico para a HLA-G (CAROSELLA et al., 1999; HUNT et al., 2005; BHALLA et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2012). O receptor ILT-2 é expresso em subconjuntos de células imunocompetentes, tais como

NK, linfócitos T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Já o receptor ILT-4 é encontrado em todos os monócitos, macrófagos e células dendríticas. Por fim o receptor KIR2DL4 é expresso por células NK e linfócitos T CD8 (CAROSELLA et al., 1999; HUNT et al., 2005; BHALLA et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2012).

Por ser uma molécula imunossupressora, o aumento da HLA-G resulta em uma diminuição da resposta imune, e o nível de sua expressão é modulado geneticamente (DONADI et al., 2011).

1.7 POLIMORFISMO INDEL DO *HLA-G* (INSERÇÃO/DELEÇÃO DE 14 PB NA REGIÃO 3'NT)

O gene *HLA-G* apresenta limitações em relação ao polimorfismo quando comparado aos demais genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe I clássicos. Localizados na região 3' não traduzida (3'NT), alguns desses sítios polimórficos, podem influenciar os níveis de expressão dessa molécula por diferentes mecanismos. Entre esses, destacam-se: a) o polimorfismo INDEL de inserção / deleção de 14 bp (pares de bases), que influencia a estabilidade do mRNA; b) a presença de guanina na posição +3142, que aumenta a afinidade de microRNAs específicos (miRNA) para o mRNA de *HLA-G*, diminuindo a expressão de HLA-G; e c) a presença de uma adenina na posição +3187, modificando um motivo rico em AU no mRNA do *HLA-G* e diminuindo sua estabilidade (DONADI, 2011).

O polimorfismo de inserção / deleção de 14 pb do *HLA-G* teve sua primeira descrição realizada por Harrison et al. (1993). Aproximadamente 45% da população caucasiana apresenta uma frequência do alelo com a inserção de 14pb (+14pb), enquanto que 55% apresenta uma frequência de deleção (-14pb) (HVIID, 2006). De acordo com Castro et al. (2000), sugere que o alelo mais antigoseja a inserção dos 14pb, sendo investigado os genes *MHC-G* de primatas. No entanto, o alelo *HLA-G* com a deleção de 14pb é o mais frequentemente encontrado, poderia haver algum significado funcional ou vantagem no que diz respeito a esse alelo específico.

Os transcritos que apresentam a inserção de 14 pb (+ 14pb) sugerem que eles podem sofrer um processamento adicional (consiste na eliminação dos primeiros 92 pb do éxon 8) tornando o mRNA mais estável do que o mRNA que contém a sequência completa (ROUSSEAU et al., 2003). O alelo + 14 pb está também associado, em alguma extensão, à níveis menores de moléculas HLA-G solúveis (sHLA-G), e à diminuição da taxa de transcritos

ao choque térmico, PRE para elemento de resposta a progesterona e X1 para X1 *box*. D. O transcrito primário de *HLA-G* pode ser dividido em 7 mRNAs alternativos que variam de *HLA-G1* a *-G7* (Fonte: SHANG-MIAN, 2012).

1.8 HLA-G E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS

As funções eminentes imuno inibitórias da molécula de HLA-G são fundamentais para a compreensão da relevância dessa molécula em condições patológicas e fisiológicas, auxiliando na projeção de estratégias terapêuticas e diagnósticas em diversas áreas da saúde (BRENOL et al., 2012).

A primeira expressão de HLA-G foi descrita nos citofoblastos e seus primeiros estudos investigaram seu papel na gestação. Mecanismos moduladores do sistema imunológico evitam a rejeição do feto, achados justificados de que o sistema imune materno mantém um estreito contato com tecidos do feto semialogênico e com suas células (WILCZYNSKI, 2005).

Esse mecanismo de tolerância pode ser justificado pela inibição da lesão celular mediada pelos linfócitos T-CD8⁺ (CTL). Esses linfócitos reconhecem apenas as células que expressam as moléculas clássicas de MHC I e inibem o reconhecimento e ataque das células *natural-killer* NK, pois se liga aos dois principais inibidores dos receptores da NK, o KIR1 e o KIR2, evitando a ação citotóxica dessas células (CAROSELLA et al., 1999).

Outras situações nas quais as moléculas de HLA-G estão envolvidas clínicos são os transplantes de órgãos, doenças autoimunes, infecção viral e tumores. Em pacientes transplantados e nas doenças autoimunes, a expressão de HLA-G pode ser benéfica e promover tolerância aos enxertos e tecidos próprios, respectivamente. A expressão de HLA-G foi amplamente estudada em pacientes após transplantes de coração (LILA et al., 2000), rim (QIU et al., 2006) e fígado (NAJI et al., 2007). Nessas populações, a expressão do HLA-G pelos indivíduos fez com que apresentassem uma aceitação significativamente melhor dos enxertos (CAROSELLA, et al., 2008b).

A expressão do HLA-G na esclerose sistêmica, através de biópsias de pele, foi associada a uma menor frequência de úlceras vasculares cutâneas, poliatrite, telangiectasias e melhor sobrevida (WASTOWSKI et al., 2009). De modo semelhante, os vírus desenvolvem estratégias para escapar do sistema imune. Sendo assim, a indução da expressão da molécula de HLA-G por células infectadas por vírus pode ser um mecanismo adicional e induzido que o ajude a

subverter as defesas do hospedeiro, como demonstraram Donaghy et al. (2007). Os autores observaram maiores níveis de HLA-G solúvel em indivíduos portadores do HIV-1. Na oncologia, desde a primeira descrição da expressão de HLA-G por células tumorais (PAUL et al. 1998), estudos sugerem que a expressão de HLA-G em lesões neoplásicas poderia promover uma ação protetora, mediadas por NK, da citólise das células malignas (BUKUR et al., 2003). Estudos *in vitro* de células neoplásicas, demonstraram que a expressão de HLA-G é capaz de proteger as células tumorais contra a lise mediadas por CTL e NK (CONTINI et al., 2003; RISTICH et al., 2005; LIN et al., 2007).

1.9 HLA-G NA INFLAMAÇÃO DA HIPERTROFIA MUSCULAR

Estudos envolvendo o polimorfismo de inserção/deleção de 14pb do HLA-G demonstraram sua associação com diferentes níveis de expressão da molécula em diversas patologias: lúpus eritematoso sistêmico (RIZZO et al., 2008), abortamento espontâneo recorrente (SHANKARKUMAR et al., 2011), rejeição à transplante de coração (TWITTO et al., 2011), carcinoma hepatocelular (JIANG et al., 2011), miopatias inflamatórias (WIENDL et al., 2003), cardiomiopatia dilatada (LIN et al., 2007), pré-eclâmpsia (LARSEN et al., 2010) entre outras.

O tecido muscular é um microambiente imunológico especial que pode se tornar o local da lesão imunológica em várias condições. As fibras musculares pertencem às poucas estruturas do organismo que não expressam antígenos do antígeno leucocitário humano (HLA) em condições fisiológicas. Sob condições patológicas, no entanto, as fibras musculares regulam positivamente a expressão dos antígenos clássicos do HLA classe I e, portanto, adquirem suscetibilidade à citólise mediada por células imunes como, por exemplo, nas miopatias inflamatórias idiopáticas. Em princípio, as células musculares cultivadas são capazes de processar e apresentar antígenos às células imunes (células T CD4 e CD8), indicando que, em condições *in vivo*, as fibras musculares podem modular as etapas de início ou perpetuação das respostas inflamatórias. As observações de que as fibras musculares nas miopatias inflamatórias *in vivo* e as células musculares cultivadas expressam a molécula não-clássica do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) HLA-G são de particular interesse neste contexto. O HLA-G interage com diferentes receptores inibitórios em vários linfócitos efetores, monócitos e células dendríticas. O reconhecimento do HLA-G influencia as funções reguladoras imunes nessas células, sugerindo que o HLA-G pode proteger as fibras musculares do ataque de certos

tipos de linfócitos efetores, como células NK e células T citotóxicas. Dados recentes de sistemas funcionais de ensaio *in vitro* usando células musculares humanas, sugerem fortemente que o HLA-G representa uma molécula inibidora imune potente que modula a resposta imune primária e secundária. A expressão ectópica de HLA-G pode, por sua vez, promover a sobrevivência de células musculares e representar um princípio anti-inflamatório aplicável em estratégias frente à agressão inflamatória muscular (WIENDL et al., 2000; 2003; MARINO et al., 2011).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O fisiculturismo tem como gênese a hipertrofia muscular, adquirida por meio de sobrecarga com exercícios físicos que promovem inflamação, reparação e remodelamento nas fibras musculares. No entanto, diferenças individuais de resultado e rendimento na hipertrofia muscular são notórios. Tais diferenças podem ser resultado dos mecanismos de resposta inflamatória associados à indução e regulação da magnitude da inflamação dos tecidos musculares, condicionado à expressão das moléculas imunomoduladoras HLA-G, instruído pelo polimorfismo de seu gene.

Mediante a escassez de estudos específicos acerca da associação de polimorfismos de mediadores do processo inflamatório da hipertrofia muscular, adido ao conhecimento que fatores intrínsecos (genéticos, imunológicos e metabólicos) e fatores extrínsecos (protocolo de treinamento, dieta, suplementação alimentar e uso de anabolizantes) podem influenciar o potencial de reparo e remodelamento celular e, conseqüentemente, a hipertrofia muscular; este estudo original pretende analisar o impacto do polimorfismo de inserção / deleção de 14 pb do *HLA-G* e os níveis solúveis do HLA-G em fisiculturistas. O presente estudo tem o potencial de oferecer conhecimentos inéditos e importantes com aplicabilidade para profissionais, atletas e preparadores físicos, que estejam inseridos na modalidade esportiva fisiculturismo.

Com a profissionalização e disseminação da modalidade esportiva fisiculturismo e o aumento do número de praticantes nas últimas décadas, a contribuição para a elucidação de processos intrínsecos, com foco na molécula imunossupressora HLA-G, que integra o processo de hipertrofia muscular, se revela importante para apoiar e direcionar os processos extrínsecos. Partindo-se do fato de que o processo inflamatório: 1) é um mecanismo importante na indução da regeneração e hipertrofia muscular; 2) é mediado pela presença de mediadores inflamatórias e anti-inflamatórios, como HLA-G; 3) é geneticamente modulado; 4) é inédito em fisiculturismo. Nesse sentido, pretende-se com esse projeto avaliar o polimorfismo de inserção / deleção de 14 pb do *HLA-G* e os níveis plasmáticos do HLA-G solúveis em fisiculturistas.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar o polimorfismo de inserção / deleção de 14 pb, na região 3' não traduzida, do gene *HLA-G* e os níveis plasmáticos do HLA-G solúvel em fisiculturistas.

3.2 Específicos:

- Caracterizar e comparar os aspectos antropométricos de fisiculturistas com controles;
- Quantificar os níveis plasmáticos do HLA-G solúvel em fisiculturistas;
- Tipificar os alelos e genótipos do polimorfismo de inserção / deleção de 14 pb do gene *HLA-G* em fisiculturistas e comparar com os praticantes;
- Identificar possíveis associações entre os alelos e genótipos do polimorfismo de inserção / deleção de 14 pb do gene *HLA-G* com os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel em fisiculturistas;
- Comparar níveis de sHLA-G entre genótipos.

AMOSTRA E MÉTODOS

4. AMOSTRA E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto - EEFERP, sob processo número 2.808.296 (ANEXO 1).

Os aspectos éticos do estudo fundamentaram-se na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996), que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Com base nesta resolução, os riscos desta pesquisa estão relacionados ao procedimento de punção venosa para coleta de sangue, em que pode haver um leve desconforto durante sua realização. Durante o desenvolvimento do estudo, foram respeitadas as exigências éticas e científicas fundamentais para pesquisa envolvendo seres humanos. Foi solicitado dos participantes o consentimento por escrito, após explicação completa e pormenorizada sobre a pesquisa. Foram esclarecidos quanto à liberdade para recusarem-se a participar do estudo, ou retirar seu consentimento, em qualquer fase do mesmo, sem penalização alguma e sem prejuízo.

4.2 Delineamento experimental

Estudo de caráter descritivo correlacional, do tipo transversal, com avaliação das características antropométricas e imunogenéticas.

Após serem informados verbalmente e por escrito, com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2), sobre os procedimentos adotados na pesquisa, os participantes foram submetidos à avaliação antropométrica para a determinação da composição corporal (% de gordura, massa magra, massa gorda e IMC – Índice de Massa Corporal), coletando-se dados como massa corporal total (peso corporal), estatura e dobras cutâneas. As coletas de sangue, para análise genética e dosagem do HLA-G solúvel.

4.3 Amostra

Para garantir a qualidade e homogeneidade, a amostra foi composta por fisiculturistas de alto rendimento, participantes do 48º Campeonato Brasileiro de Fisiculturismo e Fitness - IFBB 2018, realizado na cidade de Ribeirão Preto. A amostra controle foi composta por praticantes de musculação com, no mínimo, 1 ano de prática da modalidade, que objetivam hipertrofia. O tamanho da amostra foi determinado por conveniência, mediante disponibilidade e aceitação dos participantes em aceitar o estudo. Foram incluídos 141 participantes no estudo, sendo 77 fisiculturistas (27 atletas feminino e 50 atletas masculino). No grupo controle, totalizando de 64 praticantes de musculação, foram incluídos 24 praticantes femininas e 40 praticantes masculinos.

4.4 Instrumento de Coleta de Dados

Para coleta de dados, foi utilizado um questionário semi-estruturado, abordando perguntas relacionadas à idade, massa corporal total (peso corporal), altura, sexo e dados antropométricos (APÊNDICE 1 e 2). A coleta de dados foi realizada após a obtenção do consentimento livre e esclarecido, antes ou após o processo padrão de pesagem, de caráter eliminatório caso o participante não se adeque às exigências da categoria em que ele se inscreveu, no 48º Campeonato Brasileiro de Fisiculturismo e Fitness – IFBB.

4.5 Avaliação antropométrica

Para avaliação antropométrica foram utilizados: 1) balança eletrônica da marca *Welmy*® (Santa Barbara D'Oeste, BRA), apresentando leituras de 0,1 quilos (kg) e 0,5 centímetros (cm) para massa corporal total (peso corporal), respectivamente; 2) estadiômetro com cursor móvel da balança *Welmy*®, com escala de precisão de 0,1 cm, para altura.

A composição corporal é uma ferramenta fundamental para guiar o treinamento no fisiculturismo, pois tem como objetivo compreender o processo de rendimento do treinamento esportivo pela análise do tamanho, forma, constituição e proporcionalidade (ROSS et al. 1972).

Sua utilização, por métodos seguros, é fundamental para observar alterações provenientes da preparação física (DEMINICE e ROSA, 2009).

A mensuração das dobras cutâneas foi realizada com um adipômetro Cescorf® com capacidade de 61mm e precisão de 1mm, segundo padronização de Behnke e Wilmore (1974). Foram mensuradas as espessuras de nove dobras cutâneas (abdominal, supra-ilíaca, subescapular, tricipital, bicipital, axilar média, peitoral, perna medial, coxa), que foram medidas três vezes, sendo registrada a dobra intermediária que não diferir de 5% das outras duas dobras medidas no local (GUEDES, 1994). Após a obtenção dos valores, utilizou-se a equação para estimativa de densidade corporal de atletas homens: $DC (g/cm^2) = 1,112 - 0,00043499 (\sum 7doc) + 0,00000055 (\sum 7doc)^2 - 0,00028826 (idade)$; e, para mulheres, $DC (g/cm^2) = 1,0970 - [0,00046971 (ST) + 0,00000056 (ST)^2] - [0,00012828 (idade)]$, desenvolvida por Jackson e Pollock (1978) seguido da conversão do resultado em porcentagem de gordura através da aplicação da Equação de Siri (1961): $\%G = [(4,95/D) - 4,50] \times 100$.

4.6 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada antes ou após a pesagem oficial dos atletas, no momento da aplicação do questionário e mensuração das dobras cutâneas. No grupo controle a coleta foi realizada antes da mensuração das dobras cutâneas e aplicação do questionário. Foram colhidos 10 mL de sangue venoso periférico de cada participante em tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, USA) contendo EDTA K3 (0.054mL/tubo) para a obtenção de plasma e extração de DNA genômico. O sangue colhido foi colhido, armazenado em gelo e levado ao laboratório para separação do plasma a 1500rpm na centrífuga. O plasma sobrenadante foi separado e armazenado em eppendorf de 1,5mL. O plasma foi armazenado a uma temperatura de menos 30°C para posteriores análises; o sangue foi armazenado em uma temperatura de 20 a 24°C.

4.7 Quantificação dos níveis plasmáticos de HLA-G solúvel

A isoforma solúvel de HLA-G foi detectada pela técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). As isoformas de sHLA-G foram capturadas incubando o plasma das amostras em uma placa de monocamada de anticorpo monoclonal (MEM-G/9) imobilizado (Exbio, Praga, República Tcheca) por 18 horas a 4 ° C. A ligação não específica foi bloqueada usando albumina a 2% em solução salina tamponada de fosfato (PBS) por 30 min. Após

lavagem das placas, por 3 vezes com PBS contendo 0,05% de tween 20, as placas foram incubadas por 1h com anticorpo de detecção conjugado com a enzima HRP-anti-b2-microglobulina peroxidase e com o substrato (orto-fenil-n-diaminodi-hidroxicloreto) (DAKO, Santa Clara, Califórnia). A reação foi terminada pela adição de H₂SO₄ 1N e lida imediatamente a 490 nm no espectofotometro de ELISA (AgileReader™ ELISA Plate Readers, Avans Biotechnology, Taipei City, Taiwan). Os níveis de sHLA-G foram estimados por uma curva padrão de cinco pontos (12,5–200 ng/mL) usando o sobrenadante da cultura de linha celular que expressa o hibridoma M8-HLA-G5. Todas as amostras de plasma foram testadas em duplicado.

4.8 Avaliação das variáveis genéticas da amostra

4.8.1 Técnica de extração de DNA

O DNA foi extraído por *salting out* a partir das células do sangue periférico, adaptando o procedimento descrito por Miller et al. (1988).

Foram coletados 10 ml de sangue com EDTA como anticoagulante e transferido para um tubo de 50mL e adicionado o tampão de lise I gelado até o volume final de 50ml. Misturado por inversão delicadamente e centrifugados por 5 minutos a 2400g ou 3200 rpm à 4 graus para a lise dos glóbulos vermelhos. Em seguida foi derramado cuidadosamente o sobrenadante no lixo (hemácias lisadas) e prosseguiu-se a extração com o pelete de células que ficam retidas no fundo ou na parede do tubo. Esse pelete de células foi ressuscitado em: 4,5 mL de tampão de lise II, 125uL SDS 10% e 1,1 mL de Perclorato de sódio 5M. As amostras foram agitadas vigorosamente por 10 segundos à temperatura ambiente. Neste passo são lisados os glóbulos brancos. Em seguida foi adicionado 2mL de NaCl 6M saturado, agitados vigorosamente por 15 segundos à temperatura ambiente. Neste passo são lisadas as proteínas. Centrifugados por 5 minutos à 1500g ou 2600 rpm em temperatura ambiente. Cuidadosamente o sobrenadante foi derramado em um tubo de 50 mL limpo, pois nele estava o DNA. O pelete que restava no tubo eram proteínas e paredes celulares as quais foram desprezadas. Em seguida foi adicionado 7 mL de isopropanol absoluto à temperatura ambiente no sobrenadante do tubo limpo. Homogêinizados por inversão gentilmente até que o DNA precipitasse. Com o auxílio de uma pipeta o DNA foi retirado e colocado em um tubo eppendorf de 1,5 mL. Neste tubo acrescentou-se 1 mL de Etanol 75% gelado, levado à centrífuga por 5 minutos à 5000 rpm à 4 graus. Após

centrifugar, repetiu-se a lavagem com etanol 75% gelado. Todo o excesso de etanol foi retirado e o DNA secou à temperatura ambiente na bancada com a tampa aberta até que o mesmo foi totalmente evaporado. Em seguida, acrescentamos 200 uL de água estéril para dissolver o DNA, sendo armazenado em um freezer a -80°C.

4.8.2 Processamento da amostra para determinação do polimorfismo de inserção/deleção dos 14 pares de bases do gene *HLA-G*

A determinação dos polimorfismos inserção/deleção (D/I) dos 14pb do *HLA-G* foi feita a partir do DNA extraído conforme indicado no item anterior e descongelado no dia do processamento.

A região 3'NT do *HLA-G* foi inicialmente amplificada, utilizando a reação de polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), usando metodologia previamente descrita (CASTELLI et al., 2010). A reação foi padronizada para a detecção de inserção ou deleção de 14bp no éxon 8 no gene *HLA-G*, usando os iniciadores *HLA*G8F: 5'TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT3' (BERMINGHAM et al., 54 2000) e *HLA*G8R: 5'GTCTTCCATTTATTTTGTCTCT3'. O meio reacional (mix) foi preparado com 1mL do DNA genômico na concentração de 30ng/mL juntamente com tampão (0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl), 1,5mM MgCl₂, 0,2M de dNTP (Invitrogen, Brasil), 5pmol de cada primer (HG8R e HG8F) (Invitrogen, Brasil), 0,5 unidades de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen, Brasil) e H₂O, completando um volume total de 25ml. Foi acrescentado um tubo correspondente ao controle negativo substituindo-se o DNA por 1mL de água. O mix com as amostras de DNA foram levadas ao termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler – Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), submetendo-se o DNA a ciclos térmicos (1 ciclo de 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 96°C por 45 segundos, 61°C por 45 segundos e 72°C por 25 segundos; 1 ciclo de 72°C por 7 minutos e finalmente o resfriamento das amostras a 4°C), com duração total de 1:30h.

4.8.2.1 Análise do produto amplificado

Os produtos amplificados (345bp ou 359bp para deleção ou inserção do polimorfismo de 14-pb, respectivamente) foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%

não-desnaturante (PAGE) corado com prata. Preparado o gel de acrilamida a 10% (acrilamida, H₂O, tampão TBE e glicerol), foi utilizado 20mL do gel acrescido de 350mL de Persulfato e 25 mL de TEMED para atingir a polimerização do mesmo. Após, foi aplicada a solução em placas de vidro e acoplado em cuba própria para eletroforese. O produto de amplificação (5mL) acrescido de 2 mL do tampão foi aplicado no referido gel já polimerizado, em poços formados por um pente de teflon. Foi realizada a corrida eletroforética (Electrophoresis Power Supply – EPS 600, Biosciences, São Francisco, EUA), contendo tampão (1x) em ambos os polos (porção inferior e superior) a 240volts por 2 horas e 30 minutos.

4.8.2.2 Coloração com nitrato de prata e registro dos resultados

Após o término da corrida eletroforética, a coloração do gel de poliacrilamida foi realizada com 100mL de solução fixadora (álcool etílico, ácido acético e água) acrescida de 1mL de solução de nitrato de prata 10% (nitrato de prata 10g em 100mL de água). Após agitação leve por 5 minutos, foi desprezado o fixador, lavado o gel em água destilada e adicionado 100mL de solução reveladora aquecida (NaOH e água) e acrescida de 1mL de formaldeído. Após novo processo de agitação por alguns minutos as bandas apareceram nitidamente. Após a coloração e revelação do gel de poliacrilamida, observamos a amplificação das bandas de interesse (Figura 5).

Figura 5. Gel de poliacrilamida 7% corado pela prata, ilustrando a detecção do polimorfismo de 14pb do gene *HLA-G*. Identificação da amostra e sua detecção de genótipo: II - genótipo inserção/inserção; DD - genótipo deleção/deleção; DI - genótipo deleção/inserção.

4.9 Análise estatística

Primeiramente foi realizada uma análise estatística descritiva com os dados. Esta metodologia teve o objetivo de sintetizar uma série de valores de mesma natureza, permitindo uma visão global da variação desses, organizando os dados por meio de medidas descritivas.

Para se comparar os dados de expressão de *HLA-G* entre os grupos, o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi inicialmente aplicado para verificar se os dados apresentam distribuição normal. Visto que foi constatado desvios da normalidade, testes não paramétricos foram empregados. Deste modo, a variação dos níveis de expressão de *HLA-G* solúvel entre os genótipos foi testada por meio dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Em todas as análises realizadas, versões bicaudais dos testes foram empregadas e nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) foi adotado. Tais análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad InStat versão 3.06, GraphPad Software (www.graphpad.com).

O teste de Mann-Whitney tem sido aplicado para avaliar se uma variável apresenta valores significantemente distintos entre duas amostras populacionais independentes, em situações nas quais os dados não apresentam distribuição normal. Porém, enquanto o teste *t* compara as médias de tais grupos, o teste de Mann-Whitney compara medianas em sua análise. No presente caso, foi utilizado em situações nas quais desejávamos comparar a expressão de *HLA-G* entre dois grupos de participantes.

Já o teste de Kruskal-Wallis tem sido considerado uma extensão do teste de Mann-Whitney para três ou mais grupos. Da mesma forma, ele compara medianas ao invés de médias, porém nele a hipótese nula é que as medianas das amostras populacionais são iguais e a hipótese alternativa é que existe diferença entre pelo menos duas delas. Já o pós-teste de Dunn tem sido utilizado para verificar quais dos pares de comparações apresentam valores significativos.

Para análises intagrupos foi utilizada a correlação de Spearman, análise utilizada para descobrir a relação entre as duas variáveis que não apresentam distribuição conjunta normal.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da Amostra

A amostra foi composta por 141 participantes para as análises de HLA-G, categorizada em 77 fisiculturistas (27 (35%) fisiculturistas femininos - FF, 50 (65%) fisiculturistas masculinos - FM) e 64 controles (24 (37,5%) controles femininos - CF e 40 (62,5%) controles masculinos - CM). O grupo de fisiculturistas, de alto rendimento, foi selecionado entre os participantes do 48º Campeonato Brasileiro de Fisiculturismo e Fitness - IFBB. O grupo de controles foi selecionado entre praticantes de musculação com, no mínimo, 1 ano de prática da modalidade (APÊNDICE 3).

5.1.1 Descrição do grupo de Fisiculturista

O grupo de fisiculturistas foi composto por 27 fisiculturistas femininos (FF), cujas idades variaram entre 24 e 45 anos ($33,32 \pm 6,27$ anos); e por 50 fisiculturistas masculino, cujas idades variaram entre 20 e 52 anos ($33,63 \pm 8,37$ anos) (Tabela 1). Os participantes foram captados antes ou após a pesagem oficial do campeonato, sendo orientados verbalmente sobre o estudo e as etapas de coleta que foram a mensuração de dobras cutâneas simultaneamente respondendo ao questionário, e coleta de sangue, seguindo na ordem da disponibilidade da equipe de coleta. No que diz respeito à auto declaração de cor da pele, 16/27 (59%) FF se declararam brancas, 1/27 (4%) negra, 7/27 (26%) se reconheciam como sendo pardas e 3 (11%) não declararam cor da pele. Entre os fisiculturistas masculinos (FM), 17/50 (34%) declararam-se brancos, 7/50 (14%) declararam ter a pele negra, 17/50 (34%) se reconheciam como pardos, 1/50 (2%) declarou-se amarelo e 8/50 (16%) não declararam cor da pele (Gráfico 1).

Considerando que a coleta de dados foi durante o campeonato brasileiro de fisiculturismo, a origem dos participantes revelou uma diversidade em relação às suas origens. De acordo com relato das fisiculturistas femininas, 2/27 (7%) vieram do Amazonas, 4/27 (15%) eram oriundas do Distrito Federal, 3/27 (11%) de Goiás, 1/27 (4%) Mato Grosso do Sul, 1/27 (4%) Pará, 3/27 (11%) Paraná, 2/27 (7%) Rio de Janeiro, 2/27 (7%) Rido Grande do Norte, 1/27 (4%) Rondônia, 2/27 (7%) Rio Grande do Sul, 4/27 (15%) São Paulo e 2/27 (7%) não declararam seu estado de origem. Entre os fisiculturistas masculinos, 1/50 (2%) relatou sua origem da Nigéria, 1/50 (2%) Amazonas, 2/50 (4%) Amapá, 3/50 (6%) Bahia, 6/50 (12%)

Distrito Federal, 2/50 (4%) Espírito Santo, 4/50 (8%) Goiás, 4/50 (8%) Minas Gerais, 1/50 (2%) Mato Grosso do Sul, 1/50 (2%) Mato Grosso, 1/50 (2%) Pará, 1/50 (2%) Piauí, 4/50 (8%) Paraná, 4/50 (8%) Rio de Janeiro, 2/50 (4%) Rio Grande do Norte, 1/50 (2%) Sergipe, 11/50 (22%) São Paulo e 1/50 (2%) Tocantins.

Gráfico 1. Distribuição de participantes fisiculturistas (porcentagem) de acordo com sexo e cor de pele autodeclarada.

5.1.2 Descrição do grupo Controle

O grupo controle foi composto por 24 participantes femininos, cujas idades variaram entre 18 e 48 anos ($28,05 \pm 8,88$ anos); e por 40 participantes masculinos, cujas idades variaram entre 18 e 44 anos ($23,57 \pm 5,6$ anos) (Tabela 1). Os participantes foram captados antes ou após o momento do treino, sendo orientados verbalmente sobre o estudo e as etapas de coleta que foram a mensuração de dobras cutâneas simultaneamente respondendo ao questionário, e coleta de sangue, seguindo na ordem da disponibilidade da equipe de coleta. O critério de seleção foi a disponibilidade e interesse em participar do estudo, além de que os praticantes recreacionais de musculação apresentassem uma prática de, pelo menos, 1 ano de treino voltado para hipertrofia com uma frequência de 4 a 6 vezes semanais.

Em relação a auto declaração de cor da pele, para o grupo controle feminino, 15/24 (63%) se declararam brancas; 1/24 (4%) negra e 5/24 (21%) se reconhecem como sendo pardas e 3/24 (12%) não declararam sua cor. Para o grupo controle masculino, 27/40 (68%) declararam-se brancos; 3/40 (7%) declararam ter a pele negra; 10/40 (25%) se reconhecem como pardos (Gráfico 2).

O grupo controle foi composto por praticantes de musculação de academias de Ribeirão Preto – SP. A maioria do grupo de participantes, tanto feminino 19/24 (79%) quanto masculino 32/40 (80%), tem origem no estado de São Paulo. Ainda, em relação às mulheres, 1/24 (4%) tem sua origem no estado do Espírito Santo, 1/24 (4%) no Pará, 1/24 (4%) Rio de Janeiro, 2/24 (8%) Rio Grande do Sul. O grupo controle masculino registrou que 1/40 (3%) tem sua origem no estado de Alagoas, 1/40 (3%) Pará, 1/40 (3%) Piauí, 1/40 (3%) Paraná, 1/40 (3%) Rio Grande do Sul e 3/40 (8%) Minas Gérias.

Gráfico 2. Distribuição de participantes controle (porcentagem) de acordo com sexo e cor de pele autodeclarada.

5.2 Avaliação Antropométrica

A massa corporal total (peso corporal) e a estatura foram avaliadas, e o peso corporal para o grupo de FM variou de 67-108 kg ($85,74 \pm 8,35$), para o grupo de FF variou de 45,5-77 kg ($58,40 \pm 7,75$), para CM variou de 59-98 kg ($78,69 \pm 10,34$) e CF de 48-74kg ($64,2 \pm 6,24$). A estatura de participantes do grupo FM variou de 160-186 cm ($175,75 \pm 5,26$), para o grupo de FF de 153-179 cm ($161,58 \pm 6,97$), para CM variou de 164-192 cm ($176,27 \pm 6,07$) e CF de 153-170 cm ($163,91 \pm 4,32$) (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis antropométricas, relacionadas à idade, estatura, massa corporal total e Índice de Massa Corporal dos grupos de participantes estudados.

Parâmetros	CF	CM	FF	FM
Idade (anos)	$28,05 \pm 8,88$	$23,57 \pm 5,6$	$33,32 \pm 6,27$	$33,63 \pm 8,37$
Estatura (m)	$163,91 \pm 4,32$	$176,27 \pm 6,07$	$161,58 \pm 6,97$	$175,75 \pm 5,26$
Massa Corporal Total (kg)	$64,2 \pm 6,24$	$78,69 \pm 10,34$	$58,40 \pm 7,75$	$85,74 \pm 8,35$
IMC	$23,89 \pm 2,17$	$25,25 \pm 2,45$	$22,33 \pm 2,26$	$27,73 \pm 2,40$

IMC= índice de massa corporal; CF= controle feminino; CM= controle masculino; FF= fisiculturista feminino; FM= fisiculturista masculino.

Comparações do Índice de Massa Corporal (IMC) entre os diferentes grupos mostraram que o grupo de Fisiculturistas Masculino apresenta IMC significativamente maior em relação ao grupo Controle Masculino e Fisiculturistas Feminino ($P < 0,001$ para ambas comparações) (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação do Índice de Massa Corporal dos grupos de participantes estudados.

Grupos	IMC (kg)	ANOVA
--------	----------	-------

	Mediana	Valor de P
CF vs CM	23,7 vs 25,32	>0,05
CF vs FF	23,7 vs 22,43	>0,05
CM vs FM	25,32 vs 28,21	<0,001
FF vs FM	22,43 vs 28,21	<0,001

IMC= índice de massa corporal; CF= controle feminino; CM= controle masculino; FF= fisiculturista feminino; FM= fisiculturista masculino; vs=versus.

5.2.1 Porcentagem de Gordura Corporal (%G)

Comparações da porcentagem de gordura corporal (%G) entre os grupos revelaram que os grupos de fisiculturistas masculino e feminino apresentam redução estatisticamente significantes da porcentagem da gordura corporal quando comparado ao seu grupo controle, masculino ($P<0,001$) e feminino ($P<0,001$), respectivamente. A comparação entre os grupos de fisiculturistas masculino e feminino mostrou que o grupo de fisiculturistas masculino apresenta redução significativamente maior da porcentagem de gordura corporal em comparação ao grupo de fisiculturistas feminino ($P<0,01$) (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação da porcentagem de gordura corporal dos grupos de participantes estudados.

%G	Média	Mediana	Valor de P
CF vs. CM	28,74 vs. 16,71	28,33 vs.16,62	< 0,05
CF vs. F	28,74 vs. 10,59	28,33 vs. 10,56	< 0,001
CM vs. M	16,71 vs. 6,45	16,62 vs. 5,05	< 0,001
F vs. M	10,59 vs. 6,45	10,56 vs. 5,05	< 0,01

%G= porcentagem de gordura corporal; CF= controle feminino; CM= controle masculino; FF= fisiculturista feminino; FM= fisiculturista masculino; vs= versus.

5.2.2 Índice de Massa Magra (IMM)

Para realçar a forma física em fisiculturistas, o IMM deve apresentar níveis elevados associados a baixos níveis de índice de massa gorda. O cálculo do IMM foi utilizado com a fórmula $IMM = MCT - IMG$, onde: IMM = Índice de Massa Magra, MCT= Massa Corporal Total, IMG = Índice de Massa Gorda. A Tabela 4 mostra as medianas e comparações entre os diversos grupos estudados.

Comparações do IMM entre os grupos mostraram que os grupos de fisiculturistas masculino e feminino apresentam IMM significativamente maior em comparação com os grupos controles masculinos ($P < 0,001$) e femininos ($P < 0,01$), respectivamente. Os grupos de controles e fisiculturistas masculinos apresentaram IMM significativamente maior em relação aos grupos de controle ($P < 0,001$) e fisiculturista ($P < 0,001$) feminino, respectivamente.

Tabela 4. Comparação dos Índices de Massa Magra dos grupos de participantes estudados.

Massa Magra (kg)	Médias	Medianas	Valor de P
CF vs. CM	44,8 vs. 65,47	45,29 vs 66,27	<0,001
CF vs F	44,8 vs. 52,25	45,29 vs 52,07	<0,01
CM vs M	65,47 vs. 80,15	66,27 vs 81,24	<0,001
F vs M	52,25 vs. 80,15	52,07 vs 81,24	<0,001

IMM= Índice de Massa Magra; CF= controle feminino; CM= controle masculino; FF= fisiculturista feminino; FM= fisiculturista masculino; vs= versus.

5.2.3 Índice de Massa Gorda (IMG)

Para o cálculo de massa gorda foi utilizada a fórmula $IMG = MCT \times \%G / 100$, onde: IMG= Índice de Massa Gorda, MCT = Massa Corporal Total, %G = Percentual de Gordura Corporal. A Tabela 5 mostra as medianas e comparações entre os diversos grupos estudados.

Comparações do IMG entre os grupos mostraram que os grupos de fisiculturistas masculino e feminino apresentam IMG significativamente menor em comparação com os grupos controles masculinos ($P<0,001$) e femininos ($P<0,001$), respectivamente. Entre os controles, o grupo de controle masculino apresentou IMG significativamente menor em relação ao grupo controle feminino ($P<0,01$).

Tabela 5. Comparação dos Índices de Massa Gorda dos grupos de participantes estudados.

Massa gorda (kg)	Médias	Medianas	Valor de P
CF vs. CM	18,36 vs. 13,59	18,19 vs 13,12	<0,01
CF vs. F	18,36 vs. 6,21	18,19 vs 6,32	<0,001
CM vs. M	13,59 vs. 5,57	13,12 vs 4,73	<0,001
F vs. M	6,21 vs. 5,57	6,32 vs 4,73	>0,05

Medianas das seguintes variáveis: IMG= Índice de Massa Gorda; CF= controle feminino; CM= controle masculino; FF= fisiculturista feminino; FM= fisiculturista masculino; vs= versus.

5.3 Níveis plasmáticos de HLA-G solúvel

Os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel foram analisados e para o grupo de FM os seus níveis variaram de 0-932,14 U/mL ($109,29 \pm 135,29$), para o grupo de FF de 8,89-330 U/mL ($67,27 \pm 31,3$), para CM de 4,58-604,58 U/mL ($88,75 \pm 105,37$) e CF de 0-355,45 U/mL ($60 \pm 87,6$) (Gráfico 3).

Comparações dos níveis plasmáticos de HLA-G solúvel (sHLA-G) entre os grupos mostraram que o grupo de fisiculturistas masculino apresenta níveis de sHLA-G significativamente maior em comparação ao grupo de fisiculturistas feminino ($P<0,001$) (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação dos níveis plasmáticos de sHLA-G dos grupos de participantes estudados.

Grupos	Médias	Medianas	Valor de P
CF vs. CM	86,54 vs. 166,42	60 vs 88,75	>0,05
CF vs. F	86,54 vs. 76,51	60 vs 67,27	>0,05
CM vs. M	166,42 vs. 129,17	88,75 vs 109,29	>0,05
F vs. M	76,51 vs. 129,14	67,27 vs 109,29	<0,001
Tcontr. vs. TFisic.	136,47 vs. 110,70	77,92 vs 99,29	>0,05

sHLA-G= HLA-G solúvel; CF= controle feminino; CM= controle masculino; FF= fisiculturista feminino; FM= fisiculturista masculino; TC = total de controles; TF= total de fisiculturistas; vs=versus.

Gráfico 3. Níveis plasmáticos de HLA-G solúvel (sHLA-G) de participantes dos grupos CF (controle feminino), CM (controle masculino), FF (fisiculturista feminino), FM (fisiculturista masculino). $P < 0,001$ sinalizado, apresenta diferença significativa nas concentrações de sHLA-G entre grupos de fisiculturistas feminino (FF) e fisiculturistas masculino (FM). As barras horizontais em negrito representam as médias.

Reconhecendo que participantes pertencentes ao grupo de fisiculturistas masculinos (FM), quando comparados aos diversos grupos, apresentaram valores significativamente maiores de sHLA-G e Índice de Massa Magra (IMM), assim como valores significativamente

menores de Índice de Massa Gorda (IMG) e Porcentagem de Gordura Corporal (%G), exploramos comparações intra grupo. Para tal, estratificamos os participantes em 4 níveis, sendo quartil mínimo (Q1), quartil 2 (Q2), quartil 3 (Q3) e quartil máximo (Q4).

Comparações intragrupo (Tabela 7), entre FM, mostraram que participantes com menores %G (quartil mínimo-Q1), em comparação aos participantes com maior %G (quartil máximo-Q4), apresentaram níveis de sHLA-G significativamente maiores ($P=0,001$). Similarmente, participantes com menores IMG (quartil mínimo-Q1), em comparação aos participantes com maior IMG (quartil máximo-Q4), apresentaram níveis de sHLA-G significativamente maiores ($P=0,001$). Por outro lado, participantes com maiores IMM (quartil máximo-Q4), em comparação aos participantes com menor IMM (quartil mínimo-Q1), apresentaram níveis de sHLA-G consideravelmente maiores ($P=0,07$).

Tabela 7. Comparação dos níveis plasmáticos de HLA-G solúvel, Índice de Massa Magra, Índice de Massa Gorda e Porcentagem de Gordura Corporal entre fisiculturistas masculinos.

	sHLA-G	Valor de P
	(mín-máx)	
%G	Mediana	
Quartil mínimo	(73,57 - 932,14)	
	119,29	< 0,0001
Quartil máximo	(12,14 - 145)	
	86,43	
IMM		
Quartil mínimo	(7,92 - 407,86)	
	103,57	= 0,07
Quartil máximo	(0 - 179,29)	
	105	
IMG		
Quartil mínimo	(73,57 - 932,14)	
	133,57	< 0,0001
Quartil máximo	(12,14 - 132,14)	
	86,43	

sHLA-G= HLA-G solúvel; %G= Porcentagem de Gordura Corporal; IMM= Índice de Massa Magra; IMG= Índice de Massa Gorda.

Comparações intragrupo (Tabela 8), entre FF, mostraram que participantes com menores %G (quartil mínimo-Q1), em comparação aos participantes com maior %G (quartil máximo-Q4), apresentaram níveis de sHLA-G significativamente menores ($P=0,02$).

Similarmente, participantes com menores IMG (quartil mínimo-Q1), em comparação aos participantes com maior IMG (quartil máximo-Q4), apresentaram níveis de sHLA-G significativamente maiores ($P=0,0254$). Por outro lado, participantes com maiores IMM (quartil máximo-Q4), em comparação aos participantes com menor IMM (quartil mínimo-Q1), apresentaram níveis de sHLA-G significativamente maiores ($P=0,0026$).

Tabela 8. Comparação dos níveis plasmáticos de HLA-G solúvel, Índice de Massa Magra, Índice de Massa Gorda e Porcentagem de Gordura Corporal entre fisiculturistas femininos.

	sHLA-G	Valor de P
	(min-máx)	
%G	Mediana	
Quartil mínimo	(32,73 - 330)	= 0,02
	57,78	
Quartil máximo	(20,91 - 145,56)	
	67,27	
IMM		
Quartil mínimo	(22,73 - 111,11)	= 0,0026
	78,89	
Quartil máximo	(28,89 - 330)	
	77,78	
IMG		
Quartil mínimo	(42,22 - 330)	= 0,0254
	82,22	
Quartil máximo	(20,91 - 145,56)	
	67,27	

sHLA-G= HLA-G solúvel; %G= Porcentagem de Gordura Corporal; IMM= Índice de Massa Magra; IMG= Índice de Massa Gorda.

5.4 Polimorfismo de 14 pb de inserção/deleção do gene *HLA-G*

Referente ao polimorfismo de inserção/deleção de 14pb do gene *HLA-G*, das 141 amostras iniciais, foi possível amplificar o DNA de 120 participantes, sendo 56 do grupo de fisiculturistas (37 masculinos e 19 femininos) e 64 do grupo controle (40 masculinos e 24 femininos).

Análises das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo de inserção/deleção de 14 pb do gene *HLA-G* são mostradas na Tabela 9. Os resultados revelam que 17/56 (30%) de participantes do grupo fisiculturista apresentaram homozigose para deleção/deleção (DD),

29/56 (52%) apresentaram heterozigose deleção/inserção (DI) e 10/56 (18%) homozigose inserção/inserção (II). No grupo de controle, 19/64 (30%) apresentaram genótipo de deleção/deleção (DD), 30/64 (47%) deleção/inserção (DI) e 15/64 (23%) inserção/inserção (II), entretanto não há associações significantes.

Análises intragrupo mostraram que participantes fisiculturistas masculinos, 12/37 (33%) apresentaram homozigose para deleção/deleção (DD), 19/37 (51%) apresentaram heterozigose deleção/inserção (DI) e 06/37 (16%) homozigose inserção/inserção (II). No grupo de fisiculturistas feminino, 05/19 (26%) apresentaram homozigose para deleção/deleção (DD), 10/19 (53%) apresentaram heterozigose deleção/inserção (DI) e 04/19 (21%) homozigose inserção/inserção (II). Para o grupo controle, participantes controles masculinos, 12/40 (30%) apresentaram homozigose para deleção/deleção (DD), 19/40 (47,5%) apresentaram heterozigose deleção/inserção (DI) e 09/40 (22,5%) homozigose inserção/inserção (II). No grupo de controle feminino, 07/24 (29%) apresentaram homozigose para deleção/deleção (DD), 11/24 (46%) apresentaram heterozigose deleção/inserção (DI) e 06/24 (25%) homozigose inserção/inserção (II) (Tabela 10).

Tabela 9. Frequência genotípica de inserção / deleção de 14 pb em participantes do grupo de fisiculturistas e controles.

Genótipos 14pb <i>HLA-G</i>	Controles n= 56 (%)	Fisiculturistas n= 64 (%)
Deleção/Deleção	17 (30%)	19 (30%)
Deleção/Inserção	29 (52%)	30 (47%)
Inserção/Inserção	10 (18%)	15 (23%)

Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas dos sítios polimórficos de inserção/deleção de 14 pb, na região 3' não traduzida (3'NT), do gene *HLA-G* em fisiculturistas e controles.

Sítios polimórficos	Grupos							
	CF		CM		F		M	
14PB	N = 24	FR	N = 40	FR	N = 19	FR	N = 37	FR
DD	7	0,291	12	0,3	5	0,263	12	0,324

ID	11	0,458	19	0,475	10	0,526	19	0,514
II	6	0,25	9	0,225	4	0,211	6	0,162
Alelo D	25	0,521	43	0,538	20	0,526	43	0,581
Alelo I	23	0,479	37	0,463	18	0,474	31	0,419

CF= controle feminino; CM= controle masculino; FF= fisiculturista feminino; FM= fisiculturista masculino; DD= deleção/deleção; ID= inserção/deleção; II=inserção/inserção; N=número de participantes; freq=frequência.

5.5 Associações entre a frequência de alelos e genótipos do polimorfismo de inserção / deleção de 14 pb do gene *HLA-G* com os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel

Comparações da frequência do genótipo de 14 pb Ins/Del e níveis plasmáticos de sHLA-G entre os grupos de fisiculturistas e controles não mostraram diferenças estatisticamente significante (Tabela 11). De maneira similar, não houve diferenças estatisticamente significante nas comparações das frequências do genótipo de 14 pb Ins/Del e níveis plasmáticos de sHLA-G entre os participantes do grupo de controles e do grupo de fisiculturistas (Tabela 12).

Tabela 11. Comparação da frequência genotípica do polimorfismo de 14 pb do gene HLA-G e níveis plasmáticos de HLA-G solúvel entre fisiculturistas e controles.

Polimorfismo 14pb <i>HLA-G</i>	sHLA-G Mediana	Valor de P
Controle vs Fisiculturistas		
DD	85,45 vs 82,14	0,6122
DI	90 vs 99,29	0,8556
II	58,75 vs 92,02	0,5671

sHLA-G= HLA-G solúvel; vs=versus; DD= deleção/deleção; ID= inserção/deleção; II=inserção/inserção.

Tabela 12. Comparação da frequência genotípica do polimorfismo de 14 pb do gene *HLA-G* e níveis plasmáticos de HLA-G solúvel em participantes do grupo controle e em participantes do grupo de fisiculturistas.

Polimorfismo	sHLA-G	Valor de P
--------------	--------	------------

	14pb <i>HLA-G</i>	Mediana	
Controles			
	DD vs. DI	98,33 vs 91,25	> 0,05
	DD vs. II	98,33 vs 65,42	> 0,05
	DI vs. II	91,25 vs 65,42	> 0,05
Fisiculturistas			
	DD vs. DI	82,14 vs 99,29	> 0,05
	DD vs. II	82,14 vs 92,02	> 0,05
	DI vs. II	99,29 vs 92,02	> 0,05

sHLA-G= HLA-G solúvel; vs=versus; DD= deleção/deleção; ID= inserção/deleção; II=inserção/inserção.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Este estudo inédito, foi o primeiro a avaliar o polimorfismo de inserção / deleção de 14 pb, na região 3' não traduzida, do gene *HLA-G* e os níveis plasmáticos do HLA-G solúvel em fisiculturistas.

Inicialmente pretendia-se incluir os 700 atletas fisiculturistas que participaram no 48º Campeonato Brasileiro de Fisiculturismo e Fitness - IFBB 2018, realizado na cidade de Ribeirão Preto – SP, entretanto, 77 atletas aquiesceram participar de maneira voluntária do estudo. Por ser um campeonato de caráter nacional, foram incluídos atletas de 21 estados brasileiros para competir em 26 diferentes categorias masculina e feminina. Houve predomínio de atletas do sexo masculino (65%), com média de idade de 33,6 anos e cor da pele autodeclarada branca (34%) ou parda (34%), seguida pela cor de pele preta (14%). Este dado não foi compatível com a distribuição de grupos étnicos no Brasil, segundo censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de 2010, o país possuía 47,5% de brancos e 43,2% de pardos (IBGE, 2010). Nossa amostra revelou que fisiculturistas masculinos apresentam número significativamente maior de participantes pretos e pardos em relação ao grupo controle masculino ($P=0,04$), dado não mostrado. O fisiculturismo tem sido considerado um esporte visual, com eterna busca pela perfeição corporal, a ser admirado, e que fascina pessoas em todo o mundo. Este esporte tem sido considerado uma forma de inclusão social, de fato, a procura do esporte por membros de classes populares, como um meio de elevação social, pode representar uma forma de auto realização, de superação e de direitos de cidadania plena (BENTO, 2006; VIANNA, 2011).

O índice de massa corporal (IMC) tem sido um método preditor de morbidades e mortalidade para avaliar o estado nutricional e riscos de saúde de grupos populacionais. Considerado não invasivo e de fácil aplicação, Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010) recomenda sua utilização, com a seguinte classificação: abaixo do peso, peso normal, sobrepeso, pré-obeso, obesidade 1, 2 e 3. Neste estudo, as atletas femininas ($22,33 \pm 2,26$ Kg/m²) se enquadram em “peso normal” ($18,5-24,9$ Kg/m²), enquanto os atletas masculinos ($27,73 \pm 2,40$ Kg/m²) como “Pré-obeso” ($25 - 29,9$ Kg/m²). Vale ressaltar que o peso utilizado para o cálculo do IMC foi no período de pesagem da competição, momento esse em que o atleta apresenta seu menor peso corporal, não representando a condição física que eles possuem na maior parte do tempo.

Em nossos resultados, as comparações do Índice de Massa Corporal (IMC) entre os diferentes grupos mostraram que o grupo de Fisiculturistas Masculino apresenta IMC significativamente maior em relação ao grupo Controle Masculino e de Fisiculturistas Feminino ($P < 0,001$ para ambas comparações). Os valores do IMC de nossa amostra foram semelhantes aos resultados de Maestá et al. (2000), na qual analisou o IMC de atletas brasileiros de elite durante um campeonato nacional. A média de IMC para fisiculturistas do sexo masculino foi de 27 kg/m^2 ; enquanto as mulheres apresentaram um IMC médio de 21 kg/m^2 . Cutilaki (2017), analisou composição corporal de fisiculturistas de elite do Paraná e seus resultados se assemelham aos apontados no estudo anterior (IMC com média de $25,69 \pm 2,36 \text{ kg/m}^2$). Assim, fisiculturistas homens podem ser considerados com sobrepeso ou pré-obesos, entretanto, esta definição pode não ser fidedigna pois, nesta condição, o peso corporal pode ser devido pela hipertrofia muscular quanto pelo tecido adiposo, não se apresentando como um indicador de avaliação ideal.

Os padrões de referência para um homem de 70 kg de peso corporal e 170 cm de altura são de 15,0% de gordura total, e o mínimo de gordura em torno de 3,0% (gordura constitucional essencial). A mulher excede, em relação ao homem, quanto a quantidade de gordura corpórea, pois existem depósitos gordurosos específicos nas regiões pélvica, nádegas e coxas. Assim, mulheres com 163 cm de altura e 57 kg de peso corporal apresenta cerca de 27,0% de gordura total, e a adiposidade feminina mínima é 12,0% (gordura constitucional essencial), 4 vezes o valor do homem (MCARDLE, 1991). Em condições especiais, a média de percentual de gordura entre atletas de alto rendimento (levantadoras de peso e fisiculturistas) é de 5 a 15,7% (FAHEY et al., 1975).

Nossos resultados apontam que as fisiculturistas femininas possuem 10,56% de gordura corporal e os fisiculturistas masculinos 5,05% de gordura corporal. Nas comparações da porcentagem de gordura corporal (%G), nossos dados revelaram que os grupos de fisiculturistas masculino e feminino apresentam redução estatisticamente significantes da porcentagem da gordura corporal quando comparado ao seu grupo controle, masculino ($P < 0,001$) e feminino ($P < 0,001$), respectivamente. Ainda, a comparação entre os grupos de fisiculturistas masculino e feminino mostrou que o grupo de fisiculturistas masculino apresenta redução significativamente maior da porcentagem de gordura corporal em comparação ao grupo de fisiculturistas feminino ($P < 0,01$). Outros estudos com atletas de fisiculturismo corroboram os valores encontrados na presente investigação. De Paula et al. (2015), avaliou 26 atletas paranaenses do sexo masculino com índice de 5,4 de %G. Bamman et al. (1993), ao estudar um

grupo composto por 6 atletas belgas, no período de pré-competição, mostrou um índice de 5,0 de %G. Fry et al. (1991), ao medir a composição corporal de 36 atletas amadores no dia da competição, apresentaram um percentual de gordura de $9,3 \pm 1,6\%$. Cyrino et al. (2008), relataram valores de $5,8 \pm 0,5\%$ em 28 atletas culturistas brasileiros no dia da pesagem oficial. Ainda, o estudo de Maestá et al. (2000), ao avaliar 36 atletas em fase de competição, de ambos os sexos, apontaram que fisiculturistas do sexo masculino apresentaram um percentual de gordura de $6,9 \pm 1,5\%$ e do sexo feminino de $8,1 \pm 0,98\%$ de gordura corporal.

Nossas comparações do Índice de Massa Gorda (IMG) entre os grupos mostraram que os grupos de fisiculturistas masculino e feminino apresentaram IMG significativamente menor em comparação com os grupos controles masculinos ($P < 0,001$) e femininos ($P < 0,001$), respectivamente; e, entre os controles, o grupo de controle masculino apresentou IMG significativamente menor em relação ao grupo controle feminino ($P < 0,01$). Ainda, as comparações do Índice de Massa Magra (IMM) entre os grupos mostraram que os grupos de fisiculturistas masculino e feminino apresentam IMM significativamente maior em comparação com os grupos controles masculinos ($P < 0,001$) e femininos ($P < 0,01$), respectivamente; e os grupos de controles e fisiculturistas masculinos apresentaram IMM significativamente maior em relação aos grupos de controle ($P < 0,001$) e fisiculturista ($P < 0,001$) feminino, respectivamente.

Nossos resultados exibiram IMM de 81,24 Kg para fisiculturistas masculino e 52,07 Kg para feminino, e IMG de 4,73 Kg para fisiculturistas masculino e 6,32 Kg para feminino. Resultados similares foram revelados pelo estudo de Cyrino et al. (2008), que avaliaram a composição corporal em atletas culturistas brasileiros durante a pesagem oficial e reportaram valores de 73,6 kg e 4,6 kg de massa magra e massa gorda, respectivamente. Em outro estudo, Silva et al. (2003), também com culturista brasileiros, observaram valores de $39,1 \pm 5,9$ kg e $7,2 \pm 1,2$ kg para massa magra e massa gorda, nesta ordem. Lugarezze et al. (2009), ao avaliar consumo nutricional de fisiculturistas brasileiros da cidade de São Paulo SP, depararam-se com valores médios de 79 kg para massa magra e 5,2 kg para massa gorda. Já Silva et al. (2003), revelaram que culturistas brasileiros apresentaram elevados valores de massa magra e baixos índices de massa gorda. De fato, os atletas fisiculturistas são os que apresentam menores IMG e maiores IMM entre todas as modalidades de esporte (SPENST et al., 1993).

Níveis extremamente baixos de percentual de gordura pode ser um alerta para a saúde do atleta (CABRAL et al., 2006). Visto que atletas adequam o treinamento e a alimentação para baixarem ao máximo os níveis de %G, para que os objetivos da modalidade esportiva sejam

alcançados, favorecendo avaliação da simetria, harmonia e definição muscular (CYRINO et al., 2008). Estudos têm descrito funções endócrinas do tecido adiposo (APOSTOLOPOULOS et al., 2016; TAM et al., 2013). Park et al. (2014), em uma coorte de 2761 participantes, mostraram fortes evidências de que o tecido adiposo secreta várias citocinas relacionadas à inflamação, com algumas citocinas regulando a diferenciação de leucócitos e aumentando seu número. O tecido adiposo é um grande órgão imunologicamente ativo que pode secretar uma variedade de adipocinas, bem como proteínas pró e anti-inflamatórias (por exemplo, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 β (IL-1 β e adiponectina e IL-10, respectivamente), e exibe características da resposta imune inata e adaptativa no controle de doenças metabólicas e doenças infecciosas.

Específico aos mecanismos imunológicos na hipertrofia muscular, as micro-lesões causadas no Treinamento Resistido (TR) iniciam a indução da resposta inflamatória com ativação de macrófagos, neutrófilos, secreção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BLOOMER & GOLDFARB, 2004; PEAKE, 2004). Corroborando isso, em amostras de músculo que foram biopsiadas antes e após a conclusão de uma sessão de TF revelaram aumento significativo de vários marcadores inflamatórios após a sessão de exercícios, como influxo de leucócitos e granulócitos (48 horas) e aumento nos níveis de mRNA de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-8 (3 horas) (STUPKA et al., 2000; BUFORD et al., 2009; LOUIS et al., 2007). Outros estudos ainda apontam que os níveis de citocinas podem estar associados com características intrínsecas ao exercício, como modo, intensidade e duração (PEAKE, 2005). Corridas prolongadas aumentam os níveis plasmáticos de IL-6 em até 120 vezes. Concentrações de IL-1ra (aumento de 90 vezes), TNF (4 vezes), IL-10 (80 vezes), IL-8 (15 vezes) e MCP-1 (3 vezes) também aumentam após atividades físicas. Protocolos de treinamento contra uma resistência também são capazes de aumentar a expressão gênica de diversas citocinas no músculo esquelético (MCP-1 e TGF- β) (WELC, 2013; CHAN et al., 2004; FEBBRAIO et al., 2003; FISCHER et al., 2004; KELLER et al., 2006; NIEMAN et al., 2003, 2005a, 2005b, 2007; PEAK 2004, 2005; SUZUKI et al., 2002, 2003; TOFT et al., 2002; TOMIYA et al., 2004). Ademais, resultados de imunohistoquímica mostraram a co-localização de macrófagos e células satélites com aumento de transcritos gênicos para marcadores inflamatórios, sugerindo que tais alterações inflamatórias possam mediar as adaptações musculares após o exercício (HUBAL et al., 2008).

O processo inflamatório consiste em uma resposta local, geralmente acompanhada por uma resposta sistêmica (fase aguda), considerado um ponto importante em relação a esse processo (GRUYS, 2005). A fase aguda tem como objetivo regular a homeostasia para o reparo

do tecido. Esse processo ocorre dentro de poucas horas e acontece após a ativação da inflamação localizada, onde o organismo pode apresentar diversas alterações sistêmicas comportamentais e fisiológicas (também conhecidas por *Sickness Behavior*), essencialmente dependentes da duração e intensidade do estímulo estressor (GRUYS, 2005).

Uma das mais relevantes respostas da fase aguda se referem ao aumento na síntese hepática, seguido de um aumento das proteínas de fase aguda na corrente sanguínea (SMITH, 2004). Dentre as proteínas de fase aguda destacam-se: a-1-glicoproteína ácida, a-2-microglobulina, fibrinogênio, amilóide sérico-A, transferrina, haptoglobina, ceruloplasmina, proteína C-reativa (PCR), dentre outras (CECILIANE et al., 2002). No contexto inflamatório, cada uma dessas proteínas exerce funções específicas. Porém, existem demais proteínas que têm sua concentração diminuída na fase aguda, disponibilizando substratos para as proteínas de fase aguda positivas. São chamadas de proteínas de fase aguda negativas, como a albumina 1 (CECILIANE et al., 2002).

O sistema imunológico tem mecanismos de regulação da resposta inflamatória. Diversos mediadores imunológicos têm a função anti-inflamatória e imunoinibitória. Um dos mais recentemente descoberto, e com intenso interesse de aplicabilidade, é o HLA-G. Vários mecanismos pelos quais o HLA-G exerce suas funções regulatórias têm sido identificados. O HLA-G é capaz de inibir a atividade citotóxica de células Natural Killer (NK) e Linfócito T citotóxico (CTL ou LT-CD8+) (ROUAS-FREISS et al., 1997). Da mesma forma, é capaz de proteger células negativas para HLA de classe I ou tumores alogênicos da imunidade por mediada NK antitumorais (ROUAS-FREISS et al., 2003). Também foi demonstrado que o HLA-G pode inibir respostas de células T CD4+ aloproliferativas (RITEAU et al., 1999), a proliferação de células T e NK (LEMAOULT et al., 2007), e também agir em células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês, *antigen presenting cells*), inibindo sua maturação e função (HORUZSKO et al., 2001). Adicionalmente, o HLA-G pode ser capaz de gerar apoptose em células endoteliais (FONS et al., 2006).

Existem argumentos convincentes de que o HLA-G desempenha papel importante na regulação do sistema imunológico: I) o HLA-G pode exercer efeitos tolerogênicos de longo prazo por meio da geração de células supressoras; II) o HLA-G é capaz de ligar-se a vários tipos de receptores, alguns dos quais são amplamente distribuídos entre as células imunes; e III) mesmo as células que não transcrevem HLA-G podem tornar-se temporariamente HLA-G-positivas, adquirindo um perfil imunossupressivo por meio de um fenômeno chamado

trogocitose (captação intercelular de HLA-G pela incorporação de fragmentos de membrana que expressam essa molécula) (VEIT et al., 2010).

Os níveis de produção do sHLA-G podem estar associados ao polimorfismo do gene *HLA-G* na região 3' NT, de 14 bp del / ins. Este polimorfismo tem sido associado à estabilidade do RNA mensageiro do HLA-G, sendo que a inserção de 14 bp está associada à níveis mais baixos de sHLA-G (BAUMANN et al., 1994). Nossos resultados indicaram que 17/56 (30%) de participantes do grupo fisiculturista tinham homozigose para deleção/deleção (DD), 29/56 (52%) tinham heterozigose deleção/inserção (DI) e 10/56 (18%) homozigose inserção/inserção (II), entretanto não houve associações significantes com os níveis de sHLA-G.

Este estudo, que é o primeiro a avaliar o polimorfismo do gene *HLA-G* ins / del e os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel (sHLA-G) em fisiculturistas, mostra que o sHLA-G entre os fisiculturistas masculinos (FM) apresenta níveis significantemente maiores em comparação ao grupo de fisiculturistas femininos ($P < 0,001$). E ainda, comparações intragrupo, entre FM, mostraram que participantes com menores percentuais de gordura corporal, em comparação aos participantes com maior percentual de gordura corporal, apresentaram níveis de sHLA-G significantemente maiores ($P = 0,001$), e participantes com menores IMG, em comparação aos participantes com maior IMG, apresentaram níveis de sHLA-G significantemente maiores ($P = 0,001$). Por outro lado, participantes com maiores IMM, em comparação aos participantes com menor IMM, apresentaram níveis de sHLA-G consideravelmente maiores ($P = 0,07$). Comparações intragrupo, agora entre FF, mostraram que participantes com menores percentuais de gordura corporal, em comparação aos participantes com maior percentual de gordura corporal, apresentaram níveis de sHLA-G significantemente maiores ($P = 0,02$), e participantes com menores IMG, em comparação aos participantes com maior IMG, apresentaram níveis de sHLA-G significantemente maiores ($P = 0,0254$). Por outro lado, participantes com maiores IMM, em comparação aos participantes com menor IMM, apresentaram níveis de sHLA-G significativamente maiores ($P = 0,0026$). Estes dados revelam uma associação inversa entre quantidade de gordura corporal e níveis de sHLA-G em fisiculturistas.

Estudos têm mostrado que o tecido adiposo secreta várias citocinas relacionadas à inflamação, como leptina e IL - 6, que podem induzir inflamação crônica de baixo grau, em indivíduos obesos, com uma estimulação concomitante da produção de sHLA-G, que possui atividades anti-inflamatórias (GONZÁLEZ et al., 2012; GONEN-GROSS et al., 2003), e que este mecanismo possivelmente seja para compensar o estado pró - inflamatório crônico da

obesidade. Outros estudos apontam que a presença de níveis mais altos de sHLA-G em pacientes com doenças crônicas poderia, provisoriamente, representar uma maneira de combater e compensar a condição inflamatória (ZIDI et al., 2015).

De forma geral, o exercício físico agudo está relacionado à leucocitose transitória (decorrentes, especialmente, da monocitose, linfocitose e neutrofilia), com subsequente supressão parcial da imunidade celular, através da redução da função e/ou número de linfócitos e células Natural Killer (NK) (COSTA ROSA e VAISBERG, 2002), possível redução na atividade dos neutrófilos e monócitos, e diminuição na secreção de anticorpos como a IgA salivar (PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000). Têm sido evidenciados aumentos significantes na concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-10, IL-1ra, IL-8, IL-15) no sangue e no tecido muscular estriado esquelético (VIRU et al., 2007), detacando o aumento na expressão gênica muscular, como também na secreção de cortisol, nas moléculas de adesão celular e nas concentrações séricas da PCR (HUBAL et al., 2008).

Se por um lado estudos que mensuraram os efeitos crônicos do exercício físico apontam uma redução do quadro pró-inflamatório local e sistêmico, com atenuação na produção e secreção das proteínas de fase aguda, especialmente a PCR (KASAPIS e THOMPSON, 2005), melhora do poder antioxidante das células (JI, 1999) e maior produção e secreção de citocinas com função anti-inflamatória (destaque para a IL-6 no sangue e no tecido muscular estriado esquelético). Contudo, a produção das citocinas IL-1b e TNF- α mostram-se inalteradas, transientes ou muitas vezes, não identificadas, apresentando dependência em relação à intensidade, tipo de exercício e duração do mesmo (PETERSEN e PEDERSEN, 2005). O tecido adiposo também tem sido investigado em protocolos crônicos e tem mostrado o mesmo padrão anti-inflamatório (LIRA et al., 2009). Estudos relacionados às adaptações inerentes ao controle inflamatório específicos ao treinamento físico sistematizado e regular ainda necessitam de maiores esclarecimentos, embora algumas revisões propõem que essa prática produza um ambiente anti-inflamatório protetor (DAS, 2004; BRUUNSGAARD, 2005). Ou seja, o aumento na condição orgânica pró-inflamatória, induzido pelo exercício agudo pode ser contrabalançado pelo ambiente anti-inflamatório crônico, restringindo a magnitude e duração da inflamação, proporcionando uma adaptação e regeneração tecidual (SMITH, 2004).

A modulação da inflamação depende da quantidade e da qualidade dos estímulos do treinamento físico, diretamente relacionados ao tempo de descanso ente eles, com o objetivo de evitar uma condição de estresse. Com um papel fundamental na proteção do organismo e na

manutenção da homeostase corpora, o sistema imune compõe uma linha de defesa amplamente mobilizada frente a alterações metabólicas como situações de doenças e realização de exercício, esses agindo como um agente estressor (dependente de intensidade, volume e duração). Neste contexto, em meados dos anos 90 foi observado que o exercício físico, realizado de forma intensa, contribuía no aumento da incidência de infecção do trato respiratório superior, enquanto que o exercício de intensidade moderada teria um efeito protetor ao risco de infecções (NIEMAN, 1994).

Mediante a suscetibilidade às infecções e processos inflamatórios associado com a prática de exercício físico, segundo Costa Rosa e Vaisberge (2002), visando compreender quais possíveis mecanismos modulavam a resposta imunológica, evidenciaram que são mobilizadas do sistema imunológico componentes hormonais e celulares em resposta as alterações metabólicas (glutamina), mecânicas (lesão muscular, hipertermia e hipóxia) e hormonais (adrenalina, cortisol, entre outros) impostas pelo exercício. Assim, o sistema imunológico possui importância fundamental na reparação de lesões musculares e não somente para prevenir ou combater uma infecção (CALDER, DIMITRIADS, & NEWSHOLME, 2007).

No músculo normal, o HLA-G é indetectável. No entanto, no contexto de inflamação, as fibras musculares expressam o HLA-G em uma distribuição semelhante ao HLA de classe I clássico, sob estimulação de citocinas inflamatórias, como IFN-gamma (YANG et al., 1996). Na miopatia inflamatória, as células T CD8 destroem as fibras musculares não necróticas, evidenciando uma resposta mediada por células T citotóxicas restritas ao HLA classe I contra antígenos de superfície expressos nas fibras musculares. Marzuillo et al. (2018) mostraram que as fibras musculares, em ambiente inflamado, coexpressam o HLA-G e levanta a intrigante possibilidade de que o HLA-G protege as fibras musculares da lesão mediada por células NK (BRAUD et al., 1999; LE BOUTELLER et al., 1999). As células inflamatórias acumuladas localmente produzem uma infinidade de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-alfa e IFN-gama. Como essas citocinas são conhecidas por induzirem a expressão de HLA em muitos tipos de células, parece provável que a expressão de HLA-G, observada nas miopatias inflamatórias, pelo menos em parte, resulte da estimulação por citocinas produzidas localmente (WIENDL et al., 2000; HOHLFELD et al., 1994).

A detecção da expressão de HLA-G no músculo esquelético levanta várias possibilidades quanto ao seu potencial papel fisiopatológico nas condições inflamatórias e na imunobiologia do músculo em geral. As células inflamatórias que se acumulam localmente produzem uma infinidade de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF-alfa e INF-gama.

Como se sabe, essas citocinas induzem a expressão aberrante de HLA em muitos tipos de células, e parece provável que a expressão de HLA-G observada nas miopatias inflamatórias, pelo menos em parte, resulte da estimulação por citocinas produzidas localmente, após lesão (PETERSEN et al., 2005).

O papel funcional da expressão de HLA-G no músculo humano foi investigado e revelaram efeitos inibitórios do HLA-G direcionados contra todas as células efetoras do sistema imunológico, porque inibiram a lise pelas células NK e impediram a morte pelas células TCD8 e TCD4 (ROWBOTTOM et al., 2000). Além disso, o HLA-G expresso induzivelmente em mioblastos humanos, de cultura primária, inibiu a lise por células mononucleares. Assim, o HLA-G é capaz de modular respostas de células T citotóxicas específicas para o antígeno e não específicas para o antígeno durante as respostas imunes primárias e secundárias contra o músculo. Experimentos de mistura realizados *in vitro* indicaram que mesmo um número surpreendentemente baixo de células musculares, portadoras de HLA-G, em uma população de mioblastos negativos para HLA-G, é capaz de suprimir suficientemente todas as respostas primárias *in vivo*, ressaltando a alta relevância biológica imune, mesmo com baixos níveis de antígeno HLA-G, como observado *in vivo* e *in vitro* (WIENDL et al., 2003; ROWBOTTOM et al., 2000).

Em termo, se por um lado o aumento da adiposidade visceral, diminuição da sensibilidade à insulina, alterações no metabolismo de lipídios, diminuição da massa corporal magra e perda de força muscular, relacionados a uma prática insuficiente de exercício físico, resultando em um quadro de inflamação crônica de baixo grau (PERDERSEN, 2009; 2011). Por outro lado, o dano muscular, advinda do exercício físico, pode inicialmente resultar num quadro de inflamação aguda com elevação na produção de miocinas e ativação células do sistema imunológico para o local do dano muscular com o objetivo de iniciar o processo de remodelamento e reparação tecidual (TIDBALL & VILLALTA, 2010). Em contrapartida, tem sido demonstrado que o treinamento físico sistematizado pode levar a um estado anti-inflamatório local e sistêmico viabilizando a regeneração tecidual e adaptação e, simultaneamente, protegendo o organismo contra o desenvolvimento de patologias inflamatórias crônicas (PEDERSEN & FEBBRAIO, 2012). Ou seja, os efeitos benéficos do treinamento físico sobre a modulação da inflamação são dependentes da qualidade e quantidade de estímulos, diretamente relacionadas ao tempo de descanso entre eles, pois um aumento na condição orgânica pró-inflamatória (estímulo do exercício agudo), seria contrabalançado pelo ambiente anti-inflamatório crônico (exercício sistematizado), que restringiria a magnitude e duração da inflamação (SILVA & MACEDO, 2011). Assim, dados transversais e longitudinais

sugerem que pessoas que realizam exercícios regulares de intensidade moderada mantêm um estado de protetor (KOSTKA et al., 2000; MATTHEWS et al., 2002; NIEMAN et al., 1989; WONG et al., 2008). No entanto, o exercício intenso e prolongado tem sido associado a maior morbimortalidade (EKBLÖM et al., 2006; HEATH et al., 1991; NIEMAN et al., 1990). Esses achados deram origem à hipótese em "J", relacionando a dose do exercício com o risco de infecção (WILLIAMSON et al.; MARTIN et al., 2009).

Finalmente, nossos resultados apresentam importantes evidências, que ajudam na elucidação de mecanismos imunológicos. Nossos dados mostram que em fisiculturistas com menos gordura corporal os níveis sistêmicos de HLA-G solúvel, molécula imunológica com reconhecida função imunossupressora, são significativamente maiores e sugerem que este mecanismo imunológico possa corroborar o estado imunossupressor em atletas submetidos a treinamentos exercícios físicos intensos e prolongado. Com efeito, o fisiculturismo, com extremo treinamento para otimizar a massa magra e reduzir a taxa de gordura corporal (SPENDLOVE et al., 2015), pode estar associado as alterações de imunossupressão (GLEESON 2007), um efeito do exercício exaustivo e prolongado (PEDERSEN e ULLUM, 1994; PEDERSEN et al., 1998; ROWBOTTOM e GREEN, 2000).

Mais estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos celulares e moleculares através dos quais o exercício físico modula a função imune. Estudos que explorem os mecanismos envolvidos no treinamento físico com respostas da imunobiologia do músculo são fundamentais para o entendimento desta área do conhecimento científico.

Limitações do estudo foram identificadas. A coleta de dados e sangue de fisiculturistas foi realizada durante a pesagem e registro do 48º Campeonato Brasileiro de Fisiculturismo e Fitness - IFBB 2018, realizado na cidade de Ribeirão Preto. O registro e a pesagem para participação no campeonato é a fase mais intensa de preparação do atleta, na qual são submetidos a intensa dieta alimentar, com redução máxima de ingestão de carboidratos e desidratação. Tais fatores estressantes afetam o humor, o temperamento e a disposição, deixando os atletas menos colaborativos. Assim as recusas em participar do estudo foram grandes. De fato, dos 700 atletas inscritos, apenas 77 aceitaram participar deste estudo. A maioria das recusas era pelo fato de estarem exaustos e com pressa para se alimentar e se hidratar. O questionário, relativamente longo, as medidas antropométricas, realizadas três vezes, e a coleta de mostras sanguíneas, tornou o processo cansativo e desanimador. Outra limitação foi a perda de DNA. Durante a coleta de sangue periférico, identificamos atletas

desidratados e foi difícil conseguir quantidade suficiente da amostra de sangue. Alguns necessitaram ser puncionados mais de uma vez, e durante o processo de extração de DNA perdemos algumas amostras. A falta de financiamento também foi um fator desafiante para a realização deste estudo, atualmente já se dispõe de metodologias que utilizam a reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, de grande avanço nos métodos moleculares, entretanto utilizamos o método mais acessível para detecção do polimorfismo de 14pb (INDEL) do gene *HLA-G*.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

- Fisiculturistas Masculinos apresentam Índice de Massa Corporal (IMC) significativamente maior em relação aos praticantes de musculação masculino e Fisiculturistas Feminino.
- Fisiculturistas masculinos e femininos apresentam redução estatisticamente significantes da porcentagem da gordura corporal (%G) quando comparado aos praticantes de musculação masculino e feminino, respectivamente.
- Fisiculturistas masculinos apresentam redução significativamente maior da porcentagem de gordura corporal em comparação às fisiculturistas femininos.
- Fisiculturistas masculinos e femininos apresentam Índice de Massa Magra (IMM) significativamente maior em comparação aos praticantes de musculação masculino e feminino, respectivamente.
- Praticantes de musculação e fisiculturistas masculinos apresentaram IMM significativamente maior em relação aos grupos de praticantes de musculação e fisiculturistas femininos, respectivamente.
- Fisiculturistas masculinos e femininos apresentam Índice de Massa Gorda (IMG) significativamente menor em comparação aos praticantes de musculação masculinos e femininos, respectivamente. Os praticantes de musculação masculinos apresentaram IMG significativamente menor em relação aos praticantes de musculação feminino
- Fisiculturistas masculinos apresentam níveis de sHLA-G significativamente maior em comparação às fisiculturistas femininos.
- Fisiculturistas masculinos com menores %G (quartil mínimo-Q1), em comparação aos participantes com maior %G (quartil máximo-Q4), apresentaram níveis de sHLA-G significativamente maiores.
- Fisiculturistas masculinos com menores IMG (quartil mínimo-Q1), em comparação aos participantes com maior IMG (quartil máximo-Q4), apresentaram níveis de sHLA-G significativamente maiores.
- Fisiculturistas masculinos com maiores IMM (quartil máximo-Q4), em comparação aos participantes com menor IMM (quartil mínimo-Q1), apresentaram níveis de sHLA-G consideravelmente maiores.

- Não houve diferenças significantes entre alelos e genótipos do polimorfismo de inserção / deleção de 14 pb do gene *HLA-G* nos grupos estudados.
- Não houve diferenças significantes entre alelos e genótipos do polimorfismo de inserção / deleção de 14 pb do gene *HLA-G* com os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel nos grupos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCOUWER, S.F.; BODE, B.P.; SOUBA, W.W. **Glucocorticoids regulate rat glutamine synthetase expression in a tissue-specific manner**. J. Surg. Res., 1995, 59:59-65.
- ADAMS, G.R. **Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy**. Appl. Physiol. Nutr. Metab., 2006, v. 31, p. 782-790.
- AHLBORG, B.; AHLBORG, G. **Exercise leukocytosis with and without beta-adrenergic blockade**. Acta medica scandinavica, 1970, 187(4), 241-246.
- ALVES, Cinthia Caroline. **Sítios polimórficos do HLA-G na asma brônquica**. 2016. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, 2016.
- APOSTOLOPOULOS, V. et al. **The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity**. Mol Nutr Food Res. 2016 Jan; 60(1):43-57. Epub 2015 Sep 22.
- ARACTINGI, S. et al. **HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells?** Am. J. Pathol., 2001, 159(1):71-7.
- BAMMAN, M.M. et al. **Changes in body composition, diet, and strength of bodybuilders during the 12 weeks prior to competition**. J Sports Med Phys Fitness. 1993; 33(4): 383-391.
- BARBULESCU, K. et al. **Cutting Edge: IL-12 and IL-18 Differentially Regulate the Transcriptional Activity of the Human IFN- γ Promoter in Primary CD4⁺ T Lymphocytes** The Journal of Immunology, 1998, v. 160(8), p. 3642-3647.
- BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E.N. **Signaling pathways in skeletal muscle remodeling**. Annu Rev Biochem., 2006, 75:19-37.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. **The acute phase response**. Immunol. Today, 1994, 15:74-80.
- BEHNKE, A.; WILMORE, J. **Evaluation and regulation of body build and composition**. Prentice Hall, 1974.
- BENTO, J. O. **Pedagogia do esporte: definições, conceitos e orientações**. In: TANI, G.; BENTO, J. O.; PETERSEN, R. D. S. (Orgs.). Pedagogia do Esporto. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H. **Anaerobic exercise and oxidative stress: a review**. Canadian Journal of Applied Physiology, 2004, v. 29, n.3, p. 245-263.
- BOTTINELLI, R. & REGGIANI, C. **Human skeletal muscle fibers: molecular and functional diversity**. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 2000, v. 73, p. 195-262.
- BRAUD, V.M.; ALLAN, D.S.J.; MCMICHAEL, A.J. **Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules**. Curr Opin Immunol, 1999; 11:100-108.
- BRENOL, C.V. et al. **O papel do gene e da molécula HLA-G na expressão clínica das doenças reumatológicas**. Rev. Bras. Reumatol., São Paulo, v. 52, n. 1, p. 82-91, Feb. 2012.

- BRUUNSGAARD, H. **Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation.** J. Leukoc. Biol., 2005, 78:819-35.
- BUFORD, T.; COOKE, M.; WILLOUGHBY, D. **Resistance exercise-induced changes of inflammatory gene expression within human skeletal muscle.** Eur. J. Appl. Physiol., 2009, v.107, p. 463.
- BUTTERFIELD, T.A.; BEST, T.M.; MERRICK, M.A. **The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair.** J Athl Train., 2006, 41:457-65.
- CABRAL, C.A.C. et al. **Diagnóstico do estado nutricional dos atletas da Equipe Olímpica Permanente de Levantamento de Peso do Comitê Olímpico Brasileiro (COB).** Rev. Bras. Med. Esporte. 2006; 12(6): 345-350.
- CALDER, P. C.; DIMITRIADIS, G.; NEWSHOLME, P. **Glucose metabolism in lymphoid and inflammatory cells and tissues.** Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolism Care, 2007, 10(4), 531-40.
- CAROSELLA, E.D. et al. **Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule.** Blood, 2008, 111(10):4862-70.
- CAROSELLA, E.D. et al. **HLA-G: a shield against inflammatory aggression.** Trends Immunol., 2001, 22(10):553-5.
- CECILIANE, F.; GIORDANO, A.; SPAGNOLO, V. **The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins.** Protein Pept. Lett., 2002, 9:211-23.
- CHAN, M. et al. **Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability.** Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2004, v.287, R322-R327.
- COSTA ROSA, L.F.P.B.; VAISBERG, M.W. **Influências do exercício na resposta imune.** Rev. Bras. Med. Esporte, 2002, 8:167-72.
- CUTILAKI, V.B. et al. **Body roundness index: relação com métodos tradicionais de predição de gordura corporal em fisiculturistas.** Rev. Bras. Prescrição e Fisiologia do Exercício, São Paulo. v.11. n.71. p.905-911. Jan./Dez. 2017.
- CYRINO, E.S. et al. **Perfil morfológico de culturistas brasileiros de elite em período competitivo.** Rev. Bras. Med. Esporte. 2008; 14(5): 460-465.
- DANNA, N. et al. **Therapeutic approaches to skeletal muscle repair and healing.** Sports Health, 2014, v.6(4), p. 348-55.
- DANTONA, G. et al. **Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibers in male body builders.** The Journal of Physiology, 2006, v. 570, p. 611-627.
- DAS, U.N. **Anti-inflammatory nature of exercise.** Nutrition, 2004, 20:323-6.
- DE PAULA, A.G. et al. **Perfil Antropométrico e Somatotipológico de Fisiculturistas Paranaenses em Período Competitivo.** Rev Uniandrade, v16.n3.p129-135. 2015.

- DONIS-KELLER, H. et al. **A genetic linkage map of the human genome.** Cell, 1987(P), v. 51, 319-337.
- EKBLOM, B.; EKBLOM, O.; MALM, C. **Infectious episodes before and after a marathon race.** Scand J Med Sci Sports. 2006; 16(4):287–93.
- EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. **Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population.** Mol. Biol. Evol., 1995, v. 12, p. 921-927.
- FAHEY T.D., AKKA, L., ROL, R.D. **Body composition and VO₂max of exceptional weight-trained athletes.** Journal of Applied Physiology, Bethesda, v.39, n.4, p.559-561, 1975.
- FEBBRAIO, M. et al. **Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans.** J. Physiol, 2003, v.549, p. 607-612.
- FEBBRAIO, M.A. et al. **IL-6 activates HSP72 gene expression in human skeletal muscle.** Biochem. Biophys. Res. Com., 2002, 296:1264-6.
- FENTON, M. et al. **Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by Mycobacterium tuberculosis.** Infect. Immun, 1997, v. 65(12), p. 5149-5156.
- FISCHER, C. et al. **Vitamin C and E supplementation inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle.** J. Physiol., 2004, v.558, p. 633-645.
- FONS, P. et al. **Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells.** Blood, 2006, 108(8):2608-15.
- FRIDEN, J.; SJOSTROM, M.; EKBLOM, B. **Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man.** Int. J. Sports Med., 1983, v.04(3), p. 170-176.
- FRY, A.C. et al. **Anthropometric characteristics as discriminators of body-building success.** J Sports Sci. 1991; 9:23-32.
- FRY, A.C. **The role of the resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations.** Sports Med., 2004, v. 34, p. 663-679.
- GENTIL, P. **A nutrition and conditioning intervention for natural bodybuilding contest preparation: observations and suggestions.** Journal of the International Society of Sports Nutrition, v. 12, n. 1, p. 1, 2015.
- GENTIL, P. **Bases científicas do treinamento de hipertrofia.** Rio de Janeiro: Sprint, 2005, 192 pgs.
- GIEDRAITIS, V. et al. **Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation.** J. Neuroimmunol, 2001, v. 112, n. 1-2, p. 146-152.
- GLEESON, M. **Immune function in sport and exercise.** J Appl Physiol., 2007, 103:693-9.

- GLEESON, M. **Immune system adaptation in elite athletes.** Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 2006, 9:659-65.
- GONEN-GROSS, T. et al. **Complexes of HLA-G protein on the cell surface are important for leukocyte Ig-like receptor-1 function.** J. Immunol. 2003. 171:1343.
- GONZÁLEZ, U.M.A. et al. **The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications.** Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2012. 49.:63.
- GRUYS, E. et al. **Acute phase reaction and acute phase proteins.** J. Zhejiang Univ. Sci. B., 2005, 6:1045-56.
- GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. **Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles.** Biometrics, 1992, v. 48, n. 2, p. 361-372.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiología médica.** 11^a ed: CAMPUS ed, 2006.
- GUZEL, N.A.; HAZAR, S.; ERBAS, D. **Effects of different exercise protocols on nitric oxide, lipid peroxidation and creatine kinase activity in sedentary males.** Journal of Sports Science and Medicine, 2007, v. 6, p.417-422.
- HAJEER, A.; HUTCHINSON, I. **Influence of TNF α gene polymorphisms on TNF α production and disease.** Human Immunology, 2001, v. 62 (11), p. 1191-1199.
- HARRISON, G.A.; HUMPHREY, K.E.; JAKOBSEN, L.B.; COOPER, D.W. **A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene.** Hum. Mol. Genet. 1993. 2, 2200.
- HEATH, G.W. et al. **Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections.** Med Sci Sports Exerc. 1991; 23(2):152–7.
- HEINRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. **Interleukin-6 and the acute phase response.** Biochem. J., 1990, 265:621-36.
- HILL, M.; GOLDSPINK, G. **Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage.** Journal of Physiology, 2003, v. 549, n. 2, p. 409-418.
- HOHL, R. et al. **Development and characterization of an overtraining animal model.** Med. Sci. Sports Exerc., 2009, ;41:1155-63.
- HOHLFELD, R.; ENGEL, A.G. **The immunobiology of muscle.** Immunol Today, 1994; 15:269–274.
- HORUZSKO, A. et al. **Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice.** Int. Immunol., 2001, 13(3):385-94.
- HOWATSON, G.; VAN SOMEREN, K. **The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage.** Sports Medicine, 2008, v. 38(6), p. 483-503.
- HUBAL, M. et al. **Muscle Function in Men and Women During Maximal Eccentric Exercise.** Journal of Strength & Conditioning Research, 2008, v.22(4), p.1332-1338.

HUBAL, M.J et al. **Inflammatory gene changes associated with the repeated-bout effect.** Am. J. Physiol., 2008, 294:R1628-R37.

IFBB Brasil, Introdução às modalidades da IFBB. Disponível em: <https://ifbbbrasil.com.br/modalidades/>. Acesso em 28 de novembro de 2019.

IIZUKA, K.; MACHIDA, T.; HIRAFUJI, M. **Skeletal muscle is an endocrine organ.** Journal of Pharmacological Science, 2014, 125(2), 125-131.

JACKSON, A. S. et al. **Reliability and validity of bioelectrical impedance in determining body composition.** Journal of Applied Physiology, 1988, v. 64, n. 2, p. 529-534.

JL, L.L. **Antioxidants and oxidative stress in exercise.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1999, 222:283-92.

JOANNIDES, R. et al. **Nitric Oxide Is Responsible for Flow-Dependent Dilatation of Human Peripheral Conduit Arteries In Vivo.** Circulation, 1995, v. 91, p. 1314-1319.

JORDE, L. et al. **The Distribution of Human Genetic Diversity: A Comparison of Mitochondrial, Autosomal, and Y-Chromosome Data.** Cell press, 2000, v.66(3), p. 979-988.

KASAHARA, T. et al. **Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets.** The Journal of Immunology, 1983, v.130(4), p. 1784-1789, 1983.

KASAPIS, C.; THOMPSON, P.D.; **The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review.** J. Am. Coll. Cardiol., 2005, 45:1563-9.

KELLER, C. et al. **Differential regulation of IL-6 and TNF- α via calcineurin in human skeletal muscle cells.** Cytokine, 2006, v. 36, p. 141-147.

KERKSICK, C.M. et al. **Gender-Related Differences in Muscle Injury, Oxidative Stress, and Apoptosis.** Official Journal of the American College of Sports Medicine, 2008.

KERKSICK, C.M., KREIDER, R.B. & WILLOUGHBY, D.S. **Intramuscular adaptations to eccentric exercise and antioxidant supplementation.** Amino Acids, 2010, 39: 219.

KHOSROTEHRANI, K. et al. **HLA-G expression in atopic dermatitis.** J. Invest. Dermatol., 2001, 117(3):750-2.

KOSTKA, T.; BERTHOUBE, S.E.; LACOUR, J.; BONNEFOY, M. **The symptomatology of upper respiratory tract infections and exercise in elderly people.** Med Sci Sports Exerc. 2000; 32(1):46-51.

KRAEMER, W.J.; RATAMESS, N.A. **Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription.** Medicine and Science in Sports and Exercise, 2004, v.36, n.4, p. 674-688.

KROEGER, K.; CARVILLE, K.; ABRAHAM, L. **The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription.** Molecular Immunology, 1997, v.34 (5), p. 391-399.

KYOUNG-MIN, LEE. **Cortical Areas Differentially Involved in Multiplication and Subtraction: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study and Correlation with a Case of Selective Acalculia.** Ann Neurol 2000; 48:657– 661.

LAZARIM, F.L. et al. **The upvalues of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship.** J Sci Med Sport., 2009, 12:85-90.

LE BOUTEILLER, P.; BLASCHITZ, A. **The functionality of HLA-G is emerging.** Immunol Ver, 1999; 167:233–244.

LEMAOULT, J. et al. **Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells.** Blood, 2007, 109(5):2040-8.

LIRA, F.S. et al. **Endurance training induces depot--specific changes in IL-10/TNF- α ratio in rat adipose tissue.** Cytokine, 2009, 45:80-5.

LOUIS, D. et al. **The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.** Acta Neuropathologica, 2007, v.114, p. 97-109.

LUGAREZZE, A.C. et al. **Avaliação nutricional de fisiculturistas de academias da cidade de São Paulo.** Rev. Bras. de Fis. do Exer. 2009; 8(1): 9 – 13.

MAESTÁ, N. et al. **Antropometria de atletas culturistas em relação à referência populacional.** Rev. Nutr., Campinas, 13(2): 135-141, maio/ago., 2000.

MARGARSON MP, SONI N. **Serum albumin: touchstone or totem?** Anaesthesia, 1998, 53:789-803.

MARIE, C. et al. **IL-10 and IL-4 synergize with TNF- α to induce IL-1 α production by human neutrophils.** Cytokine. v.8, 1996, p. 147-151.

MARINO, M. et al. **Skeletal muscle cells: from local inflammatory response to active immunity.** Gene Therapy, 2011, Vol.18, pages109–116.

MARZUILLO, P. et al. **Association between 14 bp insertion/deletion HLA-G functional polymorphism and insulin resistance in a cohort of Italian children with obesity.** Pediatr Diabetes. 2018 Dec;19(8):1357-1361. Epub 2018. Sep 25.

MATTHEWS, C.E. et al. **Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection.** Med Sci Sports Exerc. 2002; 34(8):1242–8.

McARDLE, W.D. **Avaliação da composição corporal.** In: McARDLE, W.D., KATCH, F.I., KATCH, V.L. *Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano.* 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1991. p.387-409.

MEEUSEN, R. et al. **Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome.** Eur. J. Spo. Sci., 2006, 6:1-14.

- MILLER, A. S.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. **A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells.** Nucleic Acids Res., 1988, v. 16, p. 1215.
- MOLDOVEANU, A.I.; SHEPHARD, R.J.; SHEK, P.N. **The cytokine response to physical activity and training.** Sports Med, 2001, 31:115-44.
- MOOREN, F.C. et al. **Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise.** J. Appl. Physiol., 2002, 93:147-53.
- MOSHAGE, H. **Cytokines and the hepatic acute phaseresponse.** J. Pathol., 1997, 181:257-66.
- NADER, G.A. **Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together.** Int. J. Biochem. Cell Biol., 2005, v. 37(10), p. 1985-96.
- NEVES, T. G. **Os primórdios do halterofilismo e fisiculturismo no Brasil.** Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Educação Física, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 63pgs, 2012.
- NEWSHOLME, P. **Why is l-glutamine metabolism important to cells of immune system in health, post injury, surgery or infection?** The Journal of Nutrition, 2001, 131(Suppl.9), 2515S-2522S.
- NIEMAN, D. et al. **Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run.** J. Appl. Physiol., 2003, v.94, p. 1917-1925.
- NIEMAN, D. et al. **Muscle cytokine mRNA changes after 2.5 h of cycling: influence of carbohydrate.** Med. Sci. Sports Exerc., 2005a, v.37, p.1283-1290.
- NIEMAN, D. et al. **Muscle damage is linked to cytokine changes following a 160-km race.** Brain Behav. Immun., 2005b, v.19, p. 398-403.
- NIEMAN, D. et al. **Quercetin's influence on exercise-induced changes in plasma cytokines and muscle and leukocyte cytokine mRNA.** J. Appl. Physiol., 2007, v.103, p.1728-1735.
- NIEMAN, D.C. et al. **Cytokine changes after a marathon race.** J. Appl. Physiol., 2001, 91:109-14.
- NIEMAN, D.C. et al. **Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon.** J Sports Med Phys Fitness. 1990; 30(3):316–28.
- NIEMAN, D.C. **Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system.** Med Sci Sports Exerc. 1994; 26(2):128–39.
- NIEMAN, D.C.; JOHANSEN, L.M.; LEE, J.W. **Infectious episodes in runners before and after a roadrace.** J Sports Med Phys Fitness. 1989; 29(3):289–96.
- PARK, K.H. et al. **Diet quality is associated with circulating Creactive protein but not irisin levels in humans.** Metabolism. 2014;63(2):233-41.

- PEAKE, J. et al. **Changes in neutrophil receptor expression, degranulation and respiratory burst activity after moderate and high intensity exercise.** *J. Appl. Physiol.*, 2004, v.97, p. 612-618.
- PEAKE, J. et al. **Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage.** *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2005, v.95, p.514-521.
- PEDERSEN, B. K. **The diseasome of physical inactivity – and the role of myokines in muscle–fat cross talk.** *The Journal of Physiology*, 2009, 587(Pt23), 5559–5568.
- PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. **Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ.** *Nature Reviews. Endocrinology*, 2012, 8(8), 457-465.
- PEDERSEN, B. **Muscles and their myokines.** *J. Exp. Biol.*, 2011, v.214, p. 337-346.
- PEDERSEN, B.; FEBBRAIO, M. **Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6.** *Physiol. Ver.*, 2008, v.88, p. 1379-1406.
- PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. **Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation.** *Physiol. Rev.*, 2000, 80:1055-81.
- PEDERSEN, B.K.; ROHDE, T.; OSTROWSKI, K. **Recovery of the immune system after exercise.** *Acta. Physiol. Scand.*, 1998, 162:325-32.
- PEDERSEN, B.K.; ULLUM, H. **NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action.** *Med. Sci. Sports Exerc.*, 1994, 26:140-6.
- PETERSEN, A.M.W.; PEDERSEN, B.K. **The anti-inflammatory effect of exercise.** *J. Appl. Physiol.*, 2005, 98:1154-62.
- POLLOCK, M.L. et al. **Physical Activity and Public Health: A Recommendation From the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine.** *JAMA*. 1993; 273(5):402–407.
- PRAVICA, V. et al. **A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production.** *Hum. Immunol.*, v. 61, n. 9, p. 863-866, 2000.
- RAJAGOPALAN, S. **Endosomal signaling and a novel pathway defined by the natural killer receptor KIR2DL4 (CD158d).** *Traffic*, 2010, 11(11):1381-90.
- RASCHKE, S.; ECKEL, J. **Adipo-myokines: two sides of the same coin--mediators of inflammation and mediators of exercise.** *Mediators Inflamm.*, v.2013, p. 320724, 2013.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. **An exact test for population differentiation.** *Evolution*, v. 49, p. 1280-1283, 1995b.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. **GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism.** *J. Hered.*, v. 86, p. 248-249, 1995a.
- REIHMANE, D. et al. **Increase in IL-6, TNF- α , and MMP-9, but not sICAM-1, concentrations depends on exercise duration.** *Eur J Appl Physiol.*, v.113, p. 851-858, 2013.

RITEAU, B. et al. **HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response.** J. Reprod. Immunol., 1999, 43(2):203-11.

RITEAU, B. et al. **HLA-G2, -G3 and -G4 isoforms expressed as nonmature cell-surface glycoproteins inhibit NK and antigenspecific CTLcytolysis.** J. Immunol., 2001, 166: 5018–5026.

RODGERS, B. D.; GARIKIPATI, D. K. **Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review.** Endocrinoly Review, 2008, 29(5), 513–534.

ROUAS-FREISS, N. et al. **Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94(21):11520-5.

ROUAS-FREISS, N. et al. **HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system.** Semin. Cancer Biol., 2003, 13(5):325-36.

ROWBOTTOM, D.G.; GREEN, K.J. **Acute exercise effects on the immune system.** Med Sci. Sports Exerc., 2000, 32:S396-S405.

SALTIN, B., RADEGRAN, G., KOSKOLOU, M., ROACH, R. **Skeletal muscle blood flow in humans and its regulation during exercise.** Acta physiologica, v.162 (3), p. 421-436, 1998.

SANTOS, P.J.M. **Fisiologia do Músculo Esquelético.** Faculdade de Educação Física da Universidade do Porto, v. 1, p. 1-32, 2004.

SANTOS, Renata Rodrigues. **Análise comparativa entre as práticas de treinamento para hipertrofia adotadas por fisiculturistas e as evidências científicas.** 2016. Dissertação de Conclusão de Curso - Faculdade de Educação Física e Dança da Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2016.

SERRANO, A.L. et al. **Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy.** Cell Metab., 2008, 7:33-44.

SILVA, F.O.C.; MACEDO, D.V. **Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral.** Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum. 2011, vol.13, n.4, pp.320-328.

SILVA, P.R.P. DA.; TRINDADE, R DE S.; DE ROSE, E.H. **Composição corporal, somatotipo e proporcionalidade de culturistas de elite do Brasil.** Rev. Bras. Med. Esporte. 2003; 9(6): 403- 407.

SIRI, W. E. **Body Composition from fluid spaces and density: analisys of methods.** In: BROZEK, J.; HENSCHER, A. (Ed.). **Techniques for measuring body composition.** Washington: National Academy of Science, 1961. p. 223-224.

SMITH, L.L. **Cytokine hypothesis of overtraining: aphysiological adaptation to excessive stress?** Med.Sci.Sports Exerc., 2000, 32:317-31.

SMITH, L.L. **Tissue trauma: the underlying causeof overtraining syndrome?** J Strength Cond Res., 2004, 18:185-193.

SPENDLOVE, J. et al. **Dietary Intake of Competitive Bodybuilders.** Sports Med, v.45(7), p. 1041-63, 2015.

SPENST, L.F., MARTIN, A.D., DRINKWATER, D.T. **Muscle mass of competitive male athletes.** Journal Sports Sciences, London, v.11, n.1, p.3-8, 1993.

STEPHEN, A. et al. **Exercise and Respiratory Tract Viral Infections.** Exerc Sport Sci Rev. 2009 Oct; 37(4): 157–164.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. **A new statistical method for haplotype reconstruction from population data.** Am. J. Hum. Genet., v. 68: p. 978-989, 2001.

STEWART, C.E. & RITTWEGGER, J. **Adaptative processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences.** Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, v. 6, p. 73-86, 2006.

STUPKA, N. et al. **Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise.** Journal of Applied Physiology, v. 89(6), p. 2325-2332, 2000.

SUZUKI, K. et al. **Systemic inflammatory response to exhaustive exercise.** Cytokine kinetics. Exerc Immunol Ver., v.8, p. 6-48, 2002.

SUZUKI, N. et al. **Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses.** Med Sci Sports Exerc., v.35, p. 348-355, 2003.

TAM, C.S.; REDMAN, L.M. **Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction: a clinical perspective.** Horm Mol Biol Clin Investig. 2013 Sep; 15(1):19-24.

TATCHUM-TALOM, R. et al. **Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training.** American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology Published, v. 279 no. 4, 2000.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. **Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration.** American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2010, 298(5), R1173–R1187.

TIDBALL, J.G. **Inflammatory processes in muscle injury and repair.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 2005, 288:R345-R353.

TIDBALL, J.G.; WEHLING-HENRICKS, M. **Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo.** J. Physiol., 2007, 578:327-36.

TOFT, A. et al. **Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans.** Am J Physiol Cell Physiol., v.283, C289-C295, 2002.

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

TOMIYA, A. et al. **Myofibers express IL-6 after eccentric exercise.** Am J Sports Med, v.32, p. 503-508, 2004.

TRENT, J.; OLSON, S.; LAWN, R. **Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of *in situ* hybridization.** Proceedings of the national academy of sciences, v.79 (24), 1982.

TRIPP, C.; WOLF, S.; UNANUE, E. **Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist.** Proceedings of the national academy of sciences, v.90(8), p. 3725-3729, 1993.

VEIT, T.D.; VIANNA, V.; CHIES, J.A. **HLA-G - From fetal tolerance to a regulatory molecule in inflammatory diseases.** Curr. Immunol. Rev., 2010, 6(1):1-15.

VIANNA, J.A.; LOVISOLO, H.R. **A inclusão social através do esporte: a percepção dos educadores.** Rev. bras. educ. fís. esporte (Impr.) vol.25 no.2 São Paulo Apr./June 2011.

VIRU, A. et al. **Adrenergic effects on adrenocortical cortisol response to incremental exercise to exhaustion.** Eur. J. Appl. Physiol., 2007, 100:241-5.

WASTOWSKI, I.J. et al. **HLA-G expression in the skin of patients with systemic sclerosis.** J. Rheumatol., 2009, 36(6):1230-4.

WELC, S.; CLANTON, T. **The regulation of interleukin-6 implicates skeletal muscle as an integrative stress sensor and endocrine organ.** Exp Physiol, v.98, p. 359-371, 2013.

WIENDL, H. et al. **Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G.** Ann Neurol. 2000 Oct; 48(4):679-84.

WIENDL, H.; MITSDOERFFER, M.; WELLER, M. **Express and protect yourself: the potential role of HLA-G on muscle cells and in inflammatory myopathies.** Hum. Immunol. 2003. Nov;64(11):1050-6

WILLIAMSON, D.L.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. **Acute treatment with TNF-alpha attenuates insulin-stimulated protein synthesis in cultures of C2C12 myotubes through a MEK1-sensitive mechanism.** Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2005, 289:E95-E104.

WONG, C.M. et al. **Is exercise protective against influenza-associated mortality?** PLoS ONE. 2008;3(5):e2108.

YAMADA, A.K.; SOUZA, T.P.; PEREIRA, B. **Treinamento de força, hipertrofia muscular e inflamação.** Rev. Arquivos em Mov., Rio de Janeiro, 2010. V.6, n.1, p.141-160 jan./jun.

YANG, Y. et al. **Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by interferon-g.** J Immunol, 1996; 156:4224-4231.

YIE, S.M. **HLA-G histocompatibility antigen, class I, G. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.** Atlas Genet Cytogenet Oncol Hematol. 2012; 16 (6): 403-411.

ZALDIVAR, F. et al. **Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes.** J Appl Physiol., 2006, 100:1124-33.

ZIDI, I. et al. **Association between sHLA-G and HLA-G 14-bp deletion/insertion polymorphism in Crohn's disease.** International Immunology. Vol. 27, Issue 6, June 2015, Pages 289–296.

DONADI, E.A. et al. **Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association.** Cell. Mol. Life Sci. 2011, 68(3):369-95.

MOODLEY, S.; BOBAT, R. **Expression of HLA-G1 at the placental interface of HIV-1 infected pregnant women and vertical transmission of HIV.** Placenta. 2011, 32(10):778-82.

SVENDSEN, S.G. et al. **The expression and functional activity of membrane-bound human leukocyte antigen-G1 are influenced by the 3'-untranslated region.** Hum. Immun. 2013, Vol.74 (7), pg.818-827.

MARINO, F.E.; GARD, M.; DRINKWATER, E.J. **The limits to exercise performance and the future of fatigue research.** Br. J. Sports Med. 2011; 45(1):65-7.

ROSS, W.D., HEBBELINCK, M., VAN GHELUWE, B., LEMMENS, M.L. **Kinanthropométrie et l'appréciation de l'erreur de mesure.** Kinanthropologie 1972; 4:23-4.

DEMINICE, R., ROSA, R.T. **Pregas cutâneas vs impedância bioelétrica na avaliação da composição corporal de atletas: uma revisão crítica.** Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum. 2009, 11 (3), 334-340.

GUEDES, D.P. **Composição corporal: princípios, técnicas e aplicações.** 2ª edição. Londrina: APEF. 1994.

DE PAULA, A.G. et al. **Perfil Antropométrico e Somatotípico de Fisiculturistas Paranaenses em Período Competitivo.** Revista UNIANDRADE. 2015, 16(3): 129-135.

LE BOUTEILLER, P.; BLASCHITZ, A. **The functionality of HLA-G is emerging.** Immunological Reviews. 1999, 167: 233-244.

ROUAS-FREISS, N. et al. **The $\alpha 1$ domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: Is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?** Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997, 94 (10) 5249-5254.

ROUAS-FREISS, N. et al. **HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system.** Seminars in Cancer Biology. 2003, Vol.13, Is.5, 325-336.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 FICHA COLETA-1

Caracterização

Identificação:

Evento:

Data: / / **Hora:**

1 - Nome:.....

2 - Apelido:.....

3 - Data de nascimento: / /

4 - Idade(anos):.....

5 - Sexo: (1) Masc (2) Fem 6 – Cor pele: (1) Bra (2) Preta (3) Pard (4) Amar

7 - Cidade de residência atual:.....

8 - Telefone: (.....).....

9 - E-mail:.....

10 - Ocupação:.....

APÊNDICE 2

FICHA COLETA-2

Evento:

Data: / / **Hora:**

1– Nome:.....

2 – Apelido:.....

3 - Peso:

4 - Altura:

20 - Perímetros (Circunferência):

(1) Ombro	1º _____	2º _____	3º _____	média _____
(2) Tórax	1º _____	2º _____	3º _____	média _____
(3) Cintura	1º _____	2º _____	3º _____	média _____
(4) Abdômen	1º _____	2º _____	3º _____	média _____

(5) Quadril	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(6) Braços	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(7) Antebraços	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(8) Coxa	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(9) Pernas	1° _____	2° _____	3° _____	média _____

21 - Dobras cutâneas

(1) Tricipital	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(2) Bicipital	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(3) Peitoral	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(4) Subescapular	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(5) Axilar média	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(6) Supra – ilíaca	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(7) Supra - espinhal	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(8) Abdominal	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(9) Coxa	1° _____	2° _____	3° _____	média _____
(10) Perna	1° _____	2° _____	3° _____	média _____

APÊNDICE 3

ID	Cor da pele	Idade	Peso (Kg)	Altura (cm)	%G	Massa gorda (MG)	Massa magra (MM)	IMC	HLA-G (14-bp)	HLA-G solúvel
CF1	nd	39	64,2	164,6	26,52	17,03	47,17	23,70	ID	193,64
CF2	Branco	34	64,2	164,6	42,61	27,36	36,84	23,70	ID	127,27
CF3	Branco	26	61,9	159	33,84	20,94	40,96	24,48	ID	0,00
CF4	Pardo	38	64,2	164,6	37,23	23,90	40,30	23,70	DD	85,45
CF5	Branco	23	66,4	168	25,49	16,93	49,47	23,53	ID	53,64
CF6	Pardo	29	54,5	167	25,52	13,91	40,59	19,54	DD	22,73
CF7	Pardo	28	74	167	31,74	23,49	50,51	26,53	II	56,36
CF8	Branco	21	64,2	164,6	37,56	24,12	40,08	23,70	ID	63,64

CF9	Branco	19	67,55	166	29,98	20,25	47,30	24,51	II	35,45
CF10	Branco	19	68,45	167	31,55	21,60	46,85	24,54	ID	0,00
CF11	Branco	19	52,7	159	21,84	11,51	41,19	20,85	DD	57,27
CF12	Branco	37	70	153	34,10	23,87	46,13	29,90	ID	9,09
CF13	Branco	41	67	167	32,56	21,81	45,19	24,02	II	355,45
CF14	Pardo	24	68	164	41,78	28,41	39,59	25,28	ID	262,73
CF15	Branco	27	64,2	164,6	23,91	15,35	48,85	23,70	ID	195,45
CF16	nd	16	64,2	164,6	27,37	17,57	46,63	23,70	ID	62,73
CF17	Negro	48	64,2	164,6	41,57	26,69	37,51	23,70	ID	100
CF18	Branco	31	72	170	24,10	17,35	54,65	24,91	DD	92,73
CF19	Branco	22	64,2	164,6	29,30	18,81	45,39	23,70	DD	113,64
CF20	Branco	20	48	154,5	24,44	11,73	36,27	20,11	II	21,82
CF21	Branco	48	51	156	20,16	10,28	40,72	20,96	DD	34,44
CF22	Pardo	25	52,5	153	17,75	9,32	43,18	22,43	DD	23,64
CF23	Branco	29	64,2	163,5	25,83	16,58	47,62	24,02	II	17,78
CF24	nd	34	64,2	163,5	3,03	1,95	62,25	24,02	II	92,22
CM1	Branco	23	74	183	11,87	8,79	65,21	22,10	ID	169,58
CM2	Negro	18	85	174	19,19	16,31	68,69	28,08	ID	116,25
CM3	Branco	28	75,5	173	17,63	13,31	62,19	25,23	DD	44,58
CM4	Branco	23	98	187	31,79	31,15	66,85	28,02	II	43,75
CM5	Branco	21	66	174	16,59	10,95	55,05	21,80	DD	118,75
CM6	Branco	20	67	170	12,89	8,64	58,36	23,18	ID	88,75
CM7	Branco	24	76	171	18,15	13,79	62,21	25,99	DD	121,25
CM8	Branco	20	74	178	11,63	8,61	65,39	23,36	DD	62,08
CM9	Branco	34	78,7	176,3	19,24	15,14	63,56	25,32	ID	42,92
CM10	Branco	20	67,3	164	22,25	14,97	52,33	25,02	II	58,75
CM11	Branco	22	88,1	182	21,44	18,89	69,21	26,60	II	17,08
CM12	Pardo	18	77,15	177	10,18	7,86	69,29	24,63	DD	98,75
CM13	Pardo	18	83,3	179,7	9,92	8,27	75,03	25,80	ID	4,58
CM14	Pardo	19	78,7	176,3	14,53	11,44	67,26	25,32	DD	77,92
CM15	Branco	24	88	176	6,65	5,85	82,15	28,41	ID	116,25
CM16	Branco	28	98	183	31,43	30,80	67,20	29,26	II	65,42
CM17	Pardo	27	77,6	174,5	16,24	12,61	64,99	25,48	ID	51,25
CM18	Negro	25	59	168,5	7,73	4,56	54,44	20,78	ID	73,75
CM19	Negro	20	91,6	181	22,91	20,98	70,62	27,96	DD	604,58
CM20	Branco	25	73	175	21,16	15,45	57,55	23,84	ID	162,08
CM21	Branco	18	94	182	25,34	23,82	70,18	28,38	II	158,75
CM22	Branco	31	94	172	29,72	27,93	66,07	31,77	ID	119,58
CM23	Branco	24	78,7	176,3	15,54	12,23	66,47	25,32	DD	78,75
CM24	Branco	18	78,7	176,3	11,93	9,39	69,31	25,32	II	65,42
CM25	Pardo	34	87	190	15,70	13,66	73,34	24,10	ID	117,92
CM26	Branco	44	78,7	176,3	19,58	15,41	63,29	25,32	DD	125,42
CM27	Branco	32	75	175	20,48	15,36	59,64	24,49	II	113,75

CM28	Pardo	19	78,7	176,3	13,20	10,39	68,31	25,32	II	224,58
CM29	Pardo	19	78,7	176,3	11,89	9,36	69,34	25,32	ID	91,25
CM30	Branco	21	62	173	10,47	6,49	55,51	20,72	DD	97,92
CM31	Pardo	20	63,6	168,1	6,20	3,94	59,66	22,51	ID	2266,36
CM32	Branco	22	85	192	21,15	17,98	67,02	23,06	ID	180,00
CM33	Pardo	18	67	169	10,31	6,91	60,09	23,46	ID	52,73
CM34	Branco	22	82	176	17,04	13,97	68,03	26,47	DD	60,91
CM35	Branco	21	59	164	16,45	9,70	49,30	21,94	ID	49,09
CM36	Branco	26	78,7	176,3	16,71	13,15	65,55	25,32	ID	72,73
CM37	Branco	24	95	180	23,25	22,09	72,91	29,32	ID	200,00
CM38	Branco	26	78,7	176,3	16,65	13,10	65,60	25,32	ID	56,36
CM39	Pardo	39	85	171	5,56	4,73	80,27	29,07	II	13,57
CM40	Branco	38	87,2	176,3	18,01	15,70	71,50	28,06	DD	373,57
FF1	Branco	32	58,5	155,5	7,40	4,33	54,17	24,19	ID	42,22
FF2	Branco	35	64	170	4,22	2,70	61,30	22,15	Erro extração	127,78
FF3	Pardo	37	46	157	10,51	4,83	41,17	18,66	DD	82,22
FF4	Branco	28	48	160	10,18	4,89	43,11	18,75	DD	56,67
FF5	Branco	33	58,5	155,5	12,01	7,03	51,47	24,19	DD	72,22
FF6	Branco	35	58,5	155,5	10,81	6,32	52,18	24,19	Erro extração	8,89
FF7	Pardo	33	58,5	155,5	12,92	7,56	50,94	24,19	II	20,91
FF8	Branco	45	58,5	155,5	11,00	6,43	52,07	24,19	DD	43,64
FF9	nd	28	45,5	159	7,31	3,33	42,17	18,00	II	83,33
FF10	Branco	45	53,4	157	13,99	7,47	45,93	21,66	ID	78,89
FF11	nd	42	77	173	8,20	6,32	70,68	25,73	Erro extração	45,56
FF12	Pardo	30	64	172	6,58	4,21	59,79	21,63	ID	330,00
FF13	Branco	26	54,5	171	9,53	5,20	49,30	18,64	Erro extração	57,78
FF14	Branco	40	50	161	9,90	4,95	45,05	19,29	Erro extração	111,11
FF15	Branco	33	56	160	11,53	6,46	49,54	21,88	ID	66,67
FF16	Branco	33	53	164	10,19	5,40	47,60	19,71	ID	117,78
FF17	Branco	39	71	176	11,65	8,27	62,73	22,92	ID	28,89
FF18	Branco	37	58,5	155,5	10,56	6,18	52,32	24,19	ID	27,78
FF19	Pardo	25	58,5	155,5	9,63	5,63	52,87	24,19	II	32,73
FF20	Branco	35	60	164	10,70	6,42	53,58	22,31	ID	100,00
FF21	nd	31	58,5	155,5	17,81	10,42	48,08	24,19	DD	50,91
FF22	Branco	24	60,7	165	9,70	5,89	54,81	22,30	Erro extração	98,89
FF23	Pardo	35	72	176	14,87	10,71	61,29	23,24	Erro extração	67,27
FF24	Branco	32	50,5	153	13,17	6,65	43,85	21,57	ID	22,73

FF25	Pardo	27	65	158	11,05	7,18	57,82	26,04	ID	77,78
FF26	Pardo	24	50	163	7,31	3,66	46,34	18,82	Erro extração	67,78
FF27	Negro	33	70	170	13,29	9,30	60,70	24,22	II	145,56
MM1	Negro	34	90	186	4,75	4,28	85,72	26,01	Erro extração	101,11
MM2	Pardo	34	87,2	175,8	4,69	4,09	83,11	28,21	Erro extração	194,44
MM3	Pardo	29	87,2	175,8	4,93	4,30	82,90	28,21	Erro extração	111,11
MM4	Branco	32	87,2	175,8	3,79	3,31	83,89	28,21	Erro extração	143,33
MM5	Branco	25	87,2	175,8	7,12	6,21	80,99	28,21	ID	87,78
MM6	Pardo	28	87,2	175,8	3,52	3,07	84,13	28,21	Erro extração	133,57
MM7	Branco	29	67	167	4,93	3,30	63,70	24,02	II	179,29
MM8	nd	27	75,6	171,5	7,28	5,51	70,09	25,70	ID	127,86
MM9	Pardo	24	70	177	8,39	5,87	64,13	22,34	II	12,14
MM10	Negro	46	87,2	175,8	2,50	2,18	85,02	28,21	ID	99,29
MM11	nd	28	81	169	29,95	24,26	56,74	28,36	DD	86,43
MM12	Pardo	32	87,2	175,8	1,76	1,54	85,66	28,21	DD	109,29
MM13	Branco	35	87,2	175,8	5,32	4,64	82,56	28,21	ID	135,00
MM14	Pardo	26	87,2	175,8	1,87	1,63	85,57	28,21	DD	407,86
MM15	Branco	22	94,3	186	5,31	5,01	89,29	27,26	ID	66,43
MM16	Branco	52	87,2	175,8	4,72	4,12	83,08	28,21	ID	105,00
MM17	Negro	32	89,4	179	7,12	6,36	83,04	27,90	ID	56,43
MM18	Branco	40	79,9	170	3,09	2,47	77,43	27,65	ID	119,29
MM19	Pardo	36	87,2	175,8	0,45	0,39	86,81	28,21	II	73,57
MM20	Branco	30	87,2	175,8	5,53	4,82	82,38	28,21	DD	143,57
MM21	Pardo	51	81	178	5,95	4,82	76,18	25,56	Erro extração	77,86
MM22	nd	33	68	160	3,26	2,22	65,78	26,56	DD	109,29
MM23	nd	57	80	168	4,22	3,37	76,63	28,34	ID	932,14
MM24	Branco	33	87,2	175,8	7,18	6,26	80,94	28,21	Erro extração	83,57
MM25	Pardo	47	84,75	181	4,64	3,93	80,82	25,87	DD	82,14
MM26	Branco	39	103,6	177	7,28	7,54	96,06	33,07	ID	132,14
MM27	Negro	49	103	173	3,25	3,35	99,65	34,41	Erro extração	103,57
MM28	nd	31	108	175	4,75	5,13	102,87	35,27	Erro extração	152,14
MM29	Pardo	46	103	181	26,22	27,01	75,99	31,44	Erro extração	123,57
MM30	Pardo	40	85	165	4,93	4,19	80,81	31,22	Erro extração	110,71

MM31	Negro	29	79	176,3	4,99	3,94	75,06	25,42	Erro extração	166,43
MM32	Pardo	35	94	176	3,70	3,48	90,52	30,35	Erro extração	153,57
MM33	Amarelo	33	88	180	18,16	15,98	72,02	27,16	ID	77,86
MM34	Pardo	26	85	185	4,88	4,15	80,85	24,84	ID	139,29
MM35	Branco	30	96	176	5,08	4,88	91,12	30,99	ID	107,86
MM36	Pardo	25	76	174	6,71	5,10	70,90	25,10	DD	145,00
MM37	Pardo	31	87,2	175,8	6,86	5,99	81,21	28,21	II	100,71
MM38	Negro	22	87,2	175,8	6,80	5,93	81,27	28,21	DD	119,29
MM39	Pardo	20	75	168	6,55	4,91	70,09	26,57	ID	157,86
MM40	Branco	44	83	176	4,18	3,47	79,53	26,79	ID	335,00
MM41	Branco	35	78	174,8	10,84	8,45	69,55	25,53	II	105,00
MM42	Branco	29	73	171	5,03	3,67	69,33	24,96	II	130,71
MM43	nd	28	87,2	175,8	4,72	4,11	83,09	28,21	ID	126,43
MM44	Pardo	31	88	180,5	5,57	4,90	83,10	27,01	ID	74,58
MM45	Negro	23	79	173,5	6,43	5,08	73,92	26,24	ID	0,00
MM46	Branco	40	82	177	7,49	6,14	75,86	26,17	DD	26,25
MM47	Branco	23	79,5	175,3	6,55	5,21	74,29	25,87	DD	22,08
MM48	nd	27	87,2	175,8	4,98	4,34	82,86	28,21	DD	32,08
MM49	Branco	46	90	186	5,50	4,95	85,05	26,01	ID	7,92
MM50	nd	27	95	183	9,26	8,80	86,20	28,37	DD	30,42

ANEXOS

ANEXO 1

USP - ESCOLA DE EDUCAÇÃO
FÍSICA E ESPORTE DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismo do INF-GAMMA e TNF-ALFA em fisiculturistas

Pesquisador: Enrico Fulini Puggina

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 82426017.0.0000.5659

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.808.296

Apresentação do Projeto:

vide anterior

Objetivo da Pesquisa:

vide anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

vide anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

vide anterior

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

vide anterior

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a realização de todos os ajustes solicitados nos pareceres anteriores, chegamos a conclusão de que o projeto cumpre as exigências deste Comitê.

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto encontra-se APROVADO para execução. Pedimos atenção aos seguintes itens:

1) De acordo com a Resolução CNS n.º 466/2012, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais (parciais e final, em função da duração da pesquisa);

Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900

Bairro: VILA MONTE ALEGRE

CEP: 14.040-907

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0494

E-mail: cep60@usp.br

Continuação do Parecer 2.606.295

2) Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada. Neste caso, o pesquisador deve aguardar nova aprovação do CEP para realizar os procedimentos de acordo com as mudanças solicitadas;

3) Sobre o TCLE: caso o termo tenha DUAS páginas ou mais, lembramos que no momento da sua assinatura, tanto o participante da pesquisa (ou seu representante legal) quanto o pesquisador responsável deverão RUBRICAR todas as folhas, colocando as assinaturas na última página;

4) Caso haja Instituição(ões) coparticipante(s) no projeto, atender a solicitação da carta n.º 0212/CONEP/CNS, de 21 de outubro de 2010;

5) GARANTIR QUE NOS MOMENTOS DE ATIVIDADE FÍSICA SEMPRE HAJA PELO MENOS UM MEMBRO DA EQUIPE DE PESQUISA APTO A PRESTAR OS SOCORROS DE URGÊNCIA, INCLUSIVE MASSAGEM CARDÍACA E USO DO DEA, CASO NECESSÁRIO.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMações BÁSICAS DO PROJETO 906387.pdf	18/06/2018 22:08:21		Acelto
Outros	CartaResposta.docx	18/06/2018 22:06:36	TALITA MORAIS FERNANDES	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoP.docx	18/06/2018 22:04:34	TALITA MORAIS FERNANDES	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo de Consentimento_Livre_e_Escarecido.docx	18/06/2018 21:48:21	TALITA MORAIS FERNANDES	Acelto
Cronograma	Cronograma.docx	18/06/2018 21:48:01	TALITA MORAIS FERNANDES	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infra.pdf	12/05/2017 13:42:46	TALITA MORAIS FERNANDES	Acelto
Orçamento	Orçamento_Talita.docx	12/05/2017 13:41:23	TALITA MORAIS FERNANDES	Acelto

Endereço: Avenida Bandeirantes, 3000

Bairro: VILA MONTE ALEGRE

CEP: 14.040-907

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0404

E-mail: cep00@usp.br

Continuação do Parecer: 2.808.298

Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	12/05/2017 13:13:35	TALITA MORAIS FERNANDES	Acelto
----------------	--------------------	------------------------	----------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 08 de Agosto de 2018

Assinado por:

Carlos Roberto Bueno Júnior
(Coordenador)

Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900

Bairro: VILA MONTE ALEGRE

CEP: 14.040-907

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0404

E-mail: cep00@usp.br

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Resolução CNS 466, de 12 de outubro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde

O(a) a Sr.(a)_____ está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Polimorfismo e níveis solúveis de HLA-G em fisiculturistas”, que tem por objetivo avaliar o perfil genético de produção e níveis solúveis de HLA-G. A realização desta pesquisa se justifica pela escassez de estudos específicos da associação de polimorfismos de citocinas no processo inflamatório da hipertrofia muscular relacionados ao fisiculturismo.

O(a) a Sr.(a) será selecionado para compor um dos 2 grupos experimentais que se diferenciam em Fisiculturistas de alto rendimento e praticantes de musculação que objetivam hipertrofia. Os dois grupos passarão por uma coleta de sangue (10ml) e avaliação antropométrica para a caracterização da amostra.

Para participar deste trabalho, como integrante de um grupo experimental, o senhor terá que estar e/ou ter participado de competição(ões) de fisiculturismo ou ser praticante de musculação, com objetivo de hipertrofia, por, no mínimo, 1 ano. Os atletas serão submetidos à avaliação antropométrica para a determinação da composição corporal (% de gordura e massa magra), coletando-se dados como peso, estatura e dobras cutâneas. As coletas de sangue serão realizadas em repouso por alunos da enfermagem nas instalações da EEFERP. Durante a coleta de sangue haverá o desconforto da picada da lanceta, podendo levar a algum tipo de dor leve e, em alguns casos, à formação de hematoma local.

Os dados obtidos serão tratados de forma anônima e confidencial, isto é, sua identidade será mantida em TOTAL sigilo durante e após todas as fases da pesquisa. Quando for necessário exemplificar determinada situação, a privacidade será assegurada, uma vez que o nome será substituído de forma aleatória.

Os dados coletados serão utilizados apenas nesta pesquisa e os resultados, divulgados em eventos e/ou revistas científicas.

Sua participação é totalmente voluntária, e não terá nenhuma despesa ao participar desse estudo, mas caso seja necessário terá o reembolso para eventuais despesas, assim como haverá indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa de acordo com as leis vigentes. A qualquer momento no decorrer do estudo, o Sr. pode desistir de participar da pesquisa, bem como se recusar a participar de qualquer atividade proposta pelos pesquisadores. A recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador e com a instituição que forneceu o local para realização da pesquisa. Os resultados dos testes serão guardados por 05 (cinco) anos e destruídos após esse período, de forma que o Sr. poderá a qualquer momento ter acesso aos resultados.

Os benefícios relacionados à sua participação estão associados com o acesso aos resultados individuais, além de colaboração para o estudo que tem o potencial de oferecer conhecimentos importantes com aplicabilidade para profissionais, atletas e preparadores físicos, que estejam inseridos em rotinas sistemáticas de treinamento e competições oficiais de fisiculturismo.

O Sr. receberá uma via deste Termo, assinado e rubricado em todas as páginas pelo Sr. e pelos pesquisadores responsáveis, onde constam os contatos diretos dos pesquisadores e do

Comitê de Ética da Faculdade de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Em caso de eventuais dúvidas, sugestão e/ou problemas, não hesite em entrar em contato com qualquer um destes supracitados.

Desde já agradecemos!

Pesquisador responsável
Talita Morais Fernandes

Pesquisador responsável
Enrico Fuini Puggina

Pesquisadores responsáveis:

Prof. Dr. Enrico Fuini Puggina e Talita Morais Fernandes

Contatos:

E-mail: enrico@usp.br / telefone: (16) 3602-0342 – Prof. Dr. Enrico Fuini Puggina;

E-mail: talitafernandes@usp.br / telefone (16) 99218-7744 – Talita Morais Fernandes.

Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto – Pós-graduação:

(16) 3315-0336

Comitê de Ética da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto:

(16) 3315-0494

E-mail: cep90@usp.br

Declaro estar ciente do teor deste TERMO DE CONSENTIMENTO e estou de acordo em participar da pesquisa proposta, sabendo que posso desistir a qualquer momento, sem sofrer qualquer punição ou constrangimento.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do voluntário

RG do voluntário