

AGRADECIMENTOS

Este é um trabalho grande, complexo e, como tal, inúmeras pessoas foram indispensáveis ao seu término. Agradeço a toda equipe do *Neuromuscular Research Unit, Children's Hospital at Westmead, Australia*, por toda ajuda com os experimentos executados, desde a genotipagem até a determinação da expressão de PDLIM3 em amostras dos pacientes do banco de tecidos do Hospital: Monkol Lek, Daniel McArthur, Fiona Zheng, Peter Howeling, Mimi Berman e Nan Yang. Devo um agradecimento especial à Profa. Kathy North por me aceitar em seu laboratório, e ao Prof. Nigel Clark por tantos ensinamentos sobre biologia molecular. É impossível pensar no meu estágio na Austrália sem agradecer à Cristina Alcântara, por tanta compreensão, apoio e companheirismo.

Sou igualmente grato a todos do Laboratório de Nutrição da EEFÉ-USP que, direta ou indiretamente, contribuíram para este projeto: Fabi, Aline, Vitor, Sandro, Rafael Pires, Fábio, Guaxupé (eu sei que você é de outro laboratório), Bruno, Mimi, Desiré, Gabriel, André Costa e todos os outros que eu não me lembro neste momento. Agradeço também aos meus colegas do laboratório de plasticidade muscular do ICB, em especial ao Ígu, Johnny, Graciele e ao Igor GFP (*in memoriam*).

Dedico um agradecimento especial a quem sempre me inspirou e me ajudou em minha carreira acadêmica, Prof. Lancha. Obrigado por toda confiança e por tantas oportunidades.

Dedico também um agradecimento muito mais do que especial àquela com quem tenho compartilhado todos os melhores momentos da minha vida: Marina Yázigi Solis.

Diversas pessoas e entidades foram mais do que indispensáveis neste trabalho. Elas facilitaram um trabalho que qualquer julgaria impossível: coletar material genético de um grande grupo de atletas de alto nível. A eles, devo muito mais do que simples gratidão: Federação Brasileira de Vôlei, Associação Desportiva São Caetano, Federação Paulista de Ciclismo, Confederação Brasileira de Judô, Prefeitura e Secretaria Municipal de Esportes de São Caetano, Prefeitura de Suzano, Rodrigo Augusto, Irineu Loturco, José Elias Proença, Antonio Rizola Neto e Sensei Barbosa.

Esta tese não seria possível sem o apoio do Prof. Rômulo Bertuzzi, assim como não seria possível minha carreira acadêmica sem o apoio e a inspiração do Prof. Emerson Franchini. Aos dois, meus agradecimentos e, acima de tudo, minha admiração.

Por fim, mas não por menos (Vitônio, *apud* Phillips), dedico esta tese aos meus pais, irmãos, tios, vovó, sogra, cunhadas, sobrinho e demais familiares, aos meus amigos de verdade (Heitor e Carlão), sem os quais não seria possível superar as tentações mundanas e os momentos mais obscuros de minha vida.

Muito obrigado a todos!

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Modelo teórico com algumas das principais variáveis que contribuem para o surgimento de atletas de alta-elite.....20
- FIGURA 2 - Representação esquemática do dogma central da biologia molecular.....27
- FIGURA 3 - Representação ilustrativa de um par de cromossomos homólogos.....28
- FIGURA 4 - ilustração esquemática de um nucleotídeo com seus três componentes, uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato.....30
- FIGURA 5 - Ilustração esquemática das nucleobases, ou bases nitrogenadas, que compõe os ácidos nucleicos, de acordo com sua classificação química.....30
- FIGURA 6 - Ilustração demonstrando esquematicamente e estruturalmente como os nucleotídeos ligam-se por meio de ligação fosfodiéster para formar a molécula de DNA.....31
- FIGURA 7 - Ilustração demonstrando as ligações por pontes de hidrogênio entre as bases, o que confere complementaridade às bases e permite que uma fita simples de DNA tenha uma fita complementar, formando uma dupla fita.....32

- FIGURA 8 - Representação esquemática de uma molécula dupla-fita de DNA, com sua fita complementar antiparalela.....32
- FIGURA 9 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da molécula de DNA, em sua dupla-hélice antiparalela formada pela ligação fosfodiéster de seus nucleotídeos e mantida por quatro diferentes bases que, por complementaridade, ligam-se por pontes de hidrogênio.....33
- FIGURA 10 - Ilustração esquemática que representa o processo de replicação ou cópia do DNA, com os seus principais elementos.....36
- FIGURA 11 - Ilustração esquemática da estrutura de um gene. A figura mostra um gene, que ocupa uma região pequena em relação ao total de pares de bases de um cromossomo, com suas regiões regulatórias, codificadoras (éxons) e não codificadoras (íntrons).....40
- FIGURA 12 - Representação de uma molécula de RNA recém-sintetizada com base na informação contida em uma sequência de DNA. Note que a sequência da fita de RNA é complementar à fita molde de DNA, o que a torna idêntica à fita complementar de DNA.....41
- FIGURA 13 - Ilustração esquemática da estrutura do RNA. O desenho mostra como as nucleobases se ligam para formarem as fitas de RNA, por meio de ligações fosfodiéster, a exemplo do que ocorre nas moléculas de DNA. As principais diferenças estruturais em relação ao DNA estão destacadas em vermelho41
- FIGURA 14 - Ilustração esquemática do processo de transcrição de um gene, com a síntese de uma molécula de RNA mensageiro a partir de um molde de DNA. A enzima RNA polimerase é responsável pela leitura da fita

molde e alongamento da fita de RNA. O sentido da leitura é 5'→3'. A quebra das pontes de hidrogênio é feita pela enzima helicase, o que forma a bolha de replicação. A topoisomerase, por sua vez, mantém a estrutura do DNA, evitando a formação de superespirais antes e depois da bolha de transcrição.....44

- FIGURA 15 - Ilustração da transcrição de um gene e processamento do transcrito primário. Diversas regiões do gene não são transcritas, mas apenas as sequências que estão compreendidas entre os sítios de início e fim da transcrição. Como os íntrons encontram-se nessa região, eles são transcritos, mas precisam ser removidos por meio do *splicing*. A figura também ilustra o transcrito primário com sua cauda poli-A na extremidade 3' e o 5' cap na extremidade 5', bem como regiões do transcrito maduro que não são traduzidas.....45
- FIGURA 16 - Ilustração esquemática de como o *splicing* alternativo do mesmo transcrito primário pode levar à formação de diferentes isoformas de uma proteína.....46
- FIGURA 17 - O código genético. Cada três bases na fita de mRNA correspondem a um códon, com a informação para a incorporação de um aminoácido específico à cadeia polipeptídica que está sendo sintetizada. A trinca AUG, destacada em verde, corresponde ao aminoácido metionina e é o códon de início da tradução. Já as trincas em vermelho correspondem a códons de término da tradução (*stop* códons).....47
- FIGURA 18 - Ilustração esquemática da tradução de um mRNA em sua proteína correspondente, processo que ocorre nos ribossomos. Os RNAs transportadores (tRNAs) contêm uma trinca de bases, ou anti-códon, capaz de reconhecer um códon do mRNA. Cada tRNA carrega consigo o aminoácido correspondente ao códon que ele é capaz de

reconhecer. Assim que o anti-códon do tRNA reconhece o códon do mRNA, o aminoácido que ele transporta é adicionada à cadeia polipeptídica que está sendo sintetizada.....48

- FIGURA 19 - Ilustração esquemática do mecanismo de funcionamento da reação de PCR. Na figura, estão representados apenas os dois primeiros ciclos, durante os quais uma única molécula de DNA é convertida em 4 cópias do fragmento flanqueado pelos *primers* (destacados em vermelho). Em última análise, é a sequência dos *primers* que irá determinar qual o segmento do DNA será amplificado durante a reação.....51
- FIGURA 20 - Ilustração representativa da curva que descreve o padrão de amplificação do(s) fragmento(s) de DNA durante a reação de PCR. O número de cópias do(s) fragmento(s) amplificado(s) varia em função do número inicial de fitas duplas de DNA que contêm o(s) fragmento(s) a ser(em) amplificado(s). O número de ciclos necessários até que o ponto de saturação da reação seja atingido também varia, de acordo com detalhes específicos da reação como, por exemplo, a quantidade de reagentes disponíveis no tubo de ensaio e o número inicial de fitas de DNA contendo o(s) fragmento(s) alvo.....52
- FIGURA 21 - Ilustração representativa de uma substituição sinônima, na qual um único par de bases é trocado por outro, mas não há alteração na sequência da proteína correspondente.....54
- FIGURA 22 - Ilustração representativa de uma substituição do tipo *missense*, na qual uma troca de um único par de bases resulta na troca de um aminoácido na cadeia peptídica correspondente.....55

- Figura 23 - Ilustração representativa de uma substituição do tipo *nonsense*, na qual a troca de um único par de bases leva à interrupção precoce da síntese da proteína correspondente devido à inclusão de um códon de parada.....55
- FIGURA 24 - Ilustração representativa de uma mudança de quadro de leitura (*frameshift*) causada pela deleção de um único par de bases. Esse tipo de alteração poderia também ser causado pela inserção de um ou mais pares de bases, bem como pela deleção de alguns pares de bases. A vasta maioria dos aminoácidos localizados depois do ponto polimórfico será diferente da sequência “original” de aminoácidos, levando à formação de uma proteína provavelmente pouco ou nada funcional.....56
- FIGURA 25 - Ilustração representativa da variação interindividual no ganho de VO_{2max} em resposta ao treinamento físico aeróbio. Cada barra cinza representa o ganho de VO_{2max} de cada indivíduo.....59
- FIGURA 26 - Ilustração representativa da ultraestrutura do sarcômero de uma célula muscular estriada esquelética. No quadro inferior está representada a linha Z com mais detalhes, sendo possível observar o papel das alfa-actininas no ancoramento dos filamentos finos de actina.....68
- FIGURA 27 - Ilustração esquemática das duas isoformas da proteína PDLIM3 (ALP) inicialmente identificadas em músculo esquelético e cardíaco de ratos (painel à esquerda). A estrutura das alfa-actininas-sarcoméricas e seus domínios estão representados no painel à direita.....76
- FIGURA 28 - Representação das três isoformas da proteína PDLIM3 (ALP) encontradas em humanos, resultantes de *splicings* alternativos do mesmo transcrito primário. As isoformas PDLIM3a e PDLIM3c são

encontradas no músculo esquelético adulto, sendo a isoforma “a” a mais predominantemente expressa. A isoforma PDLIM3b é expressa apenas durante o desenvolvimento embrionário, mas foi encontrada no músculo esquelético de um paciente adulto com distrofia muscular.....78

FIGURA 29 - Ilustração da reação de PCR desenhada especificamente para amplificar o fragmento de inserção do gene PDLIM3 e, assim, determinar o genótipo para o polimorfismo CNV do gene PDLIM3.....90

FIGURA 30 - Gel de carregamento de proteínas dos pacientes que carregavam a inserção (DI e II) e seus controles (DD). A banda superior corresponde à miosina e a banda inferior corresponde à actina. A intensidade das bandas mostra que o carregamento foi adequadamente semelhante entre as amostras.....92

FIGURA 31 - Determinação da expressão da proteína PDLIM3 em 4 pacientes carregadores do alelo I e em 5 pacientes não carregadores do alelo I pareados por gênero e idade.....97

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Relação dos elementos necessários para a replicação do DNA e suas respectivas funções durante esse processo.....34
- Tabela 2 – Enzimas e elementos necessários para a transcrição gênica.....42
- Tabela 3 – Critérios adotados neste estudo para classificação dos atletas segundo seu nível competitivo.....87
- Tabela 4 – Características gerais das coortes avaliadas neste estudo. *diferente de controles ($p < 0,05$; teste do qui-quadrado); NA=não se aplica; SI=sem informação. Dados apresentados em %(número de indivíduos).....87
- Tabela 5 – Modalidades esportivas dos participantes deste estudo.....88
- Tabela 6 – Sequências dos três *primers* utilizados neste estudo para amplificação das regiões contendo ou não a inserção.....89
- Tabela 7 – Frequências dos genótipos e dos alelos nas coortes de atletas e não atletas brasileiros e australianos.....94
- Tabela 8 – Distribuição dos genótipos e dos alelos entre atletas e controles da coorte brasileira de acordo com os três principais grupos étnicos.....95
- Tabela 9 – Distribuição dos genótipos e dos alelos entre atletas da coorte brasileira de acordo com os níveis competitivos.....96
- Tabela 10 – Distribuição dos genótipos e dos alelos entre atletas das coortes brasileiras e australianas de acordo com o predomínio das modalidades (isto é, força/potência ou resistência).....96

Tabela 11 – Distribuição dos genótipos e dos alelos entre atletas das coortes brasileira e australiana de acordo com modalidades esportivas específicas.....	97
--	----

RESUMO

ARTIOLI, G. G. **Polimorfismo de variação de número de cópias do gene PDLIM3 como candidato para associação com o desempenho esportivo: um estudo exploratório de associação**. 2012. Tese (doutorado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a associação do polimorfismo de variação do número de cópias (CNV) do gene PDLIM3 (ALP) com o desempenho esportivo. Também foi objetivo desta investigação avaliar o impacto dessa variação genética sobre o padrão de expressão da proteína PDLIM3 no músculo esquelético. Mil e setenta e quatro indivíduos fizeram parte deste estudo, sendo 617 brasileiros (328 atletas + 289 não atletas) e 417 australianos (307 atletas + 150 não atletas). O polimorfismo foi determinado por meio de reação PCR convencional utilizando-se 3 *primers*, os quais permitiam a amplificação da região contendo ou não a inserção. Foi observada maior frequência do alelo I em atletas brasileiros em relação a seus controles (33,7% vs. 26,1%; $\chi^2=8,34$; $p=0,0044$). A frequência do alelo I também foi significativamente maior em negros e pardos do que em brancos e, mesmo quando contrastados com grupo controle de mesma etnia, a diferença se mantém. Entretanto, a frequência do alelo I não foi diferente entre atletas de diferentes níveis competitivos. Ainda, o alelo I tendeu a ser mais frequente em atletas de força/potência em comparação com os de resistência em ambas as coortes estudadas. Nenhuma diferença foi observada na expressão da proteína ALP em função da presença do polimorfismo CNV do gene PDLIM3. Em conclusão, o polimorfismo CNV do gene ALP está associado com a condição atlética geral, muito embora não esteja associado com modalidades de força/potência ou resistência. O polimorfismo parece não influenciar o padrão de expressão da proteína PDLIM3 e, portanto, as associações observadas neste estudo devem ser explicadas por um mecanismo não avaliado.

Palavras-chave: Genética. Atleta. Associação. PDLIM3

ABSTRACT

ARTIOLI, G. G. **Copy number variation polymorphism in gene PDLIM3 as a candidate for association with athlete status: an exploratory association study.** 2012. Tese (doutorado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The aim of this study was to investigate the association between the copy number variation (CNV) polymorphism in gene PDLIM3 and the athletic status. Another objective was to determine the impact of CNV polymorphism in PDLIM3 gene upon skeletal muscle PDLIM3 expression. One thousand and seventy four subjects took part in this study (617 Brazilians, athletes=328, non-athletes=289; 417 Australians, athletes=307, non-athletes=150). Genotypes were determined through the use of conventional 3-primer PCR reaction, which was designed to amplify the region with/without the insertion. It was observed a higher I-allele frequency in the Brazilian athletes (33,7% vs. 26,1%; $\chi^2=8,34$; $p=0,0044$) in comparison to non-athletes controls. Also, the frequency of the I-allele was significantly higher in black and half-black Brazilians as compared to their white counterparts. Despite the higher percentage of black and half-black in the athletes' group, the statistical difference was still observed when ethnicity-matched controls were compared to the athletes. No effect of the polymorphism on muscle PDLIM3 protein expression was observed in the present study. In conclusion, CNV polymorphism in PDLIM3 gene is associated with general athlete status, although it is not associated with specific sprint or endurance performance. This polymorphic variant seems to not influence PDLIM3 protein expression at the muscle level and, therefore, all associations observed in this study are due to any other mechanism that does not involve altered PDLIM3 protein expression in skeletal muscle.

Key-words: Genetics. Athlete. Association. PDLIM3