

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS E MARCADORES
BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS À RABDOMIÓLISE EM
MILITARES DO EXÉRCITO BRASILEIRO SUBMETIDOS À
INTENSA ATIVIDADE FÍSICA**

THIAGO DE JESUS BACHA

MANAUS

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

THIAGO DE JESUS BACHA

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS E MARCADORES
BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS À RABDOMIÓLISE EM
MILITARES DO EXÉRCITO BRASILEIRO SUBMETIDOS À
INTENSA ATIVIDADE FÍSICA**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Federal do Amazonas (UFAM),
como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

MANAUS

2016

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS E MARCADORES BIOQUÍMICOS
ASSOCIADOS À RABDOMIÓLISE EM MILITARES DO EXÉRCITO
BRASILEIRO SUBMETIDOS À INTENSA ATIVIDADE FÍSICA.**

THIAGO DE JESUS BACHA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos farmacêuticos. Linha de pesquisa: Marcadores de Diagnóstico de Doenças Prevalentes na Amazônia. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2016.

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto - Presidente

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof. Dr. Emerson Silva Lima - Membro Interno

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof. Dr. Hugo Valério Corrêa de Oliveira - Membro Externo

Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B118p Bacha, Thiago de Jesus
Polimorfismos genéticos e marcadores bioquímicos associados à rbdomiólise em militares do Exército Brasileiro submetidos à intensa atividade física. / Thiago de Jesus Bacha. 2016
XCI f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Pereira de Moura Neto
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Creatino quinase. 2. Polimorfismo genético. 3. Treinamento militar. 4. Operações na selva. 5. Rbdomiólise. I. Moura Neto, José Pereira de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico esta dissertação

Ao meu Pai por ter sido exemplo, por ter sido herói, por ter sido presente. Obrigado Pai pela viagem que fizemos nessa imensa jornada da vida, na qual fomos companheiros, aventureiros, às vezes desordeiros, mas nunca, nunca deixamos de ser Filho e Pai.

Agradecimentos

A Deus por mais esta vitória, por me amparar nos momentos difíceis, me mostrar o caminho certo nas horas incertas, por todas as bênçãos, pela vida e alegria de viver.

Aos meus pais, Luiz Carlos Bacha e Laura Oliveira de Jesus Bacha, vocês estarão sempre presente em mim, em minha vida, em meus pensamentos, em meu coração. Se hoje cheguei até aqui foi graças ao imenso amor e esforço de vocês.

Ao amigo, professor e orientador Dr. José Pereira de Moura Neto pela paciência, compreensão, companheirismo, ensinamento e apoio.

A minha irmã Camila de Jesus Bacha pelo amor, carinho e compreensão.

Aos amigos Fernanda Torlania Alves Gomes, Marco Aurélio Oliveira, Janaina Santana, Mikaela Pontes, Rebeca Valente, Tatiana Barroncas Holanda e Edilmar Bezerra Silva, por tornarem a vida mais leve e alegre, pelo incentivo, apoio, dedicação, cumplicidade, companheirismo, amizade, lealdade e consolo.

Ao Cel. Alcimar, Cel. Dias por acreditarem em mim, no futuro deste projeto e contribuir para meu crescimento profissional. Vocês foram fundamentais para a realização deste projeto.

Aos membros da banca examinadora pela contribuição no trabalho, ensinamentos e tempo desprovido.

Aos professores da Universidade Federal do Amazonas pelos ensinamentos e convívio.

Ao Exército Brasileiro pela oportunidade, crescimento profissional, crescimento pessoal, por incentivar e investir em pesquisas.

RESUMO

O treinamento e a nutrição adequada são fundamentais no alcance de altos níveis de desempenho físico militar, porém quando a atividade física é praticada em excesso, leva ao rompimento das fibras musculares, liberando componentes intracelulares para corrente sanguínea. Tais componentes são utilizados como marcadores indiretos de lesão da musculatura esquelética lisa. Diversos são os fatores que podem influenciar no dano muscular e no desempenho físico de qualquer atleta e entende-se que alguns polimorfismos também podem estar envolvidos na melhora ou no menor desgaste físico. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações bioquímicas e perfil molecular de militares do Exército Brasileiro, participantes do Curso de Operações na Selva - COS. Foram avaliados 233 militares do sexo masculino e alunos do COS no ano de 2013. Cada curso teve duração de três meses, onde foram realizadas, no decorrer do curso, doze coletas de sangue venoso de cada militar. Foram realizadas dosagens de CK-MM, CK-MB e correlacionadas com polimorfismos dos genes ACTN3 (C1747T), GDF8 (C2T), MLC (C49T), AMPD1 (C34T), FKRP (A19G), MYH9 (A22G), GSTP1 (A341G), GSTP1-1 (C16T). O SNP MLCK não foi encontrado na população estudada. Os SNPs nos genes ACTN3, GDF8, GSTP1 foram frequentes e quando correlacionados com a creatino quinase, frações-MM e MB, apresentaram significância estatística ($p < 0,001$). Todos os militares portadores do SNP R577X tiveram níveis de CK elevados, sugerindo que os portadores deste polimorfismo possuem melhor desempenho físico e degradação de CK mais rápida, diferente dos portadores dos SNPs FKRP-A19G e MYH9-A22G, que desenvolveram desempenho físico inferior. Foi demonstrado neste estudo que os genótipos para ACTN3, GSTP1 e GSTP1/1 corroboram com dados da literatura, apresentando frequências elevadas. Os portadores do SNP GDF8-C2T apresentaram níveis de CK-MM e CK-MB dentro de limites basais após exercícios físicos de alta intensidade, enquanto portadores do SNP ACTN3-R577X demonstraram níveis elevados. Durante este estudo um único caso de rabdomiólise ocorreu em um militar, mas por consumo de cocaína, com níveis séricos de creatina quinase fração MM 99.500 U/L e fração MB 6.500 U/L. Foram observados níveis de sódio 1.730 mmol/L, potássio 42.1 mmol/L, fósforo 48.3 mg/dl, cloro 1.243 mmol/L e magnésio 36.1 mg/dl; alterações renais, como uréia 302.6 mg/dl e creatinina 11.1 mg/dl. Exames qualitativos, troponina e mioglobina, apresentaram resultados positivos. Conclui-se que os polimorfismos genéticos podem influenciar no aumento ou diminuição de danos musculares e no desempenho físico de militares expostos a treinamentos físicos extenuantes.

Palavras-Chave: Creatino quinase, Polimorfismo genético, Treinamento militar, Operações na selva, Rabdomiólise.

ABSTRACT

Training and proper nutrition are important things to achieving high levels of military physical performance, but when physical activity is practiced in excess, leads to disruption of muscle fibers, releasing intracellular components to the bloodstream. Those components are used as surrogate markers of smooth skeletal muscle injury. There are several factors that may influence muscle damage and physical performance of any athlete and it is understood that some polymorphisms may also be involved in the improvement or less physical wear. The aim of this study was to evaluate the biochemical and molecular profile of military of Brazilian Army, participants of Operations Course in the Jungle - OCJ. 233 military men and OCJ students were assessed in 2013. Each course lasted three months, during this time 12 blood samples were taken from each military. Were measured levels CK-MM, CK-MB and correlated with polymorphisms of ACTN3 (C1747T), GDF8 (C2T), MLC (C49T), AMPD1 (C34T), FKRP (A19G) MYH9 (A22G), GSTP1 (A341G), GSTP1-1 (C16T). The SNP MLCK was not found in the studied population. SNPs in ACTN3, GDF8, GSTP1 were frequent and when correlated with creatine kinase, fractions and MM-MB, statistically significant ($p < 0.001$). All military carriers of R577X SNP had elevated CK levels, suggesting that carriers of this polymorphism have better physical performance and CK degradation faster, unlike the holders of the SNPs FKRP-A19G and MYH9-A22G, who developed lower physical performance. In this study was demonstrated that the genotypes for ACTN3, GSTM1 and GSTP1/1 corroborate literature data, with high frequencies. Holders of the SNP GDF8-C2T showed levels of CK-MM and CK-MB within baseline limits after high intensity exercise, while carrying the SNP ACTN3-R577X demonstrated high levels. During this study a single case of rhabdomyolysis occurred in a military, but due to cocaine use, with serum levels of creatine kinase MM fraction 99,500 U/L and MB fraction 6,500 U/L. Sodium levels were observed at 1.730 mmol/L, potassium 42.1 mmol/L, phosphorus 48.3 mg/dl, chloro 1.243 mmol/L, magnesium and 36.1 mg/dl; renal disorders, such as urea 302.6 mg/dl and creatinine 11.1 mg/dl. Quality tests, troponin and myoglobin, showed positive results. It is concluded that genetic polymorphisms may influence the increase or decrease in muscle damage and physical performance of military personnel exposed to strenuous physical training.

Keywords: Creatine kinase, Genetic polymorphism, Military training, Operations in the jungle, Rhabdomyolysis .

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenosina
A-DG	Alfa-Distroglicana
ADP	Adenosina Difosfato
APOL 1	Apolipoproteína L1
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Citosina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIGS	Centro de Instrução de Guerra na Selva
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
CK	Creatinoquinase
CK-MB	Creatinaquinase fração MB
CNS	Conselho Nacional Saúde
COS	Curso de Operações na Selva
CPK	Creatinofosfoquinase
CPK-MM	Creatinofosfoquinase fração MM
DGP	Departamento de Gestão de Pessoas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença Renal Crônica
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetraacético
EUA	Estados Unidos da América
FDA	do inglês “Food and Drug Administration”
GGT	Gama Glutamil Transferase
GST	Glutathione-S-Transferase
°C	Grau Celsius
IRA	Insuficiência Renal Aguda
HM	Hipertermia Maligna
HMAM	Hospital Militar de Área de Manaus
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus Linfotrópico de Célula Humana
LAEBM	Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular

LDH	Lactato Desidrogenase
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
Mb	Mioglobina
Na ⁺ /K ⁺	Bomba de Sódio-Potássio
NO	Óxido Nítrico
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RBM	Rabdomiólise
RLC	Cadeia Leve Reguladora de Miosina
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Teste T	teste T-Student
TGF- β	do inglês “ <i>Transforming growth factor-beta</i> ”
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacético ou Aspartato Aminotransferase
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
U/L	Unidades/Litro
μL	Microlitros
UI/L	Unidade Internacional por Litro de Sangue

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organograma do estudo

13

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Parâmetros bioquímicos em militares participantes do COS	16
Tabela 02 – Polimorfismos Genéticos em militares participantes do COS	17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1.1.1 ASPECTOS GERAIS DA RABDOMIÓLISE.....	2
1.1.2 PRINCIPAIS EXAMES LABORATORIAIS.....	6
1.1.3 DIAGNÓSTICO	7
1.1.4 FATORES GENÉTICOS.....	8
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	13
4 METODOLOGIA.....	14
4.1 TIPO DE ESTUDO	14
4.2 POPULAÇÃO REFERÊNCIA	14
4.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	15
4.4 INFORMAÇÕES ÉTICAS E FINANCIAMENTO	15
4.5 AMOSTRAS.....	15
4.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	16
4.6.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	16
4.7 ENSAIOS MOLECULARES	16
4.7.1 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	16
4.7.2 GENOTIPAGEM	17
4.8 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE DADOS.....	18
4.8.1 DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS	18
4.9 ANÁLISES DE VARIÁVEIS QUALITATIVAS OU CATEGÓRICAS	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	20
6. CONCLUSÃO.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	70
9. QUESTIONÁRIO RABDOMIÓLISE.....	76

1 INTRODUÇÃO

A Rabdomiólise - RBM (palavra originada do esloveno "*Rhábdo*", que significa bastonete, estria, "*mio*" que vem a ser músculo e "*lise*" que denota quebra ou desintegração) tem como conceito global ser a destruição das células musculares esqueléticas, liberando substâncias intracelulares para a circulação sanguínea (MONTERO *et al.*, 2009).

Historicamente, os sintomas da RBM foram descritos primeiramente no Velho Testamento, no *Livro de Números*, onde é relatado que os Israelitas ficaram doentes e morreram após comer codornizes ou codornas, as quais, provavelmente, tinham se alimentado de sementes de cicuta, durante o êxodo para o Egito, após longos dias de caminhada, apresentando fadiga, lesão muscular, infecções e inflamações (RIZZI *et al.*, 1991; SU *et al.*, 2009; AMINI *et al.*, 2010).

Após a Primeira Guerra Mundial, no ano de 1941, a RBM foi descrita pela literatura médica, como causa de insuficiência renal e lesões traumáticas decorrente da compressão pós trauma, sobretudo de lesão de reperfusão em vítimas de acidentes de aviação ou grandes catástrofes naturais como, por exemplo, os terremotos (EFSTRATIADIS *et al.*, 2007; AMINI *et al.*, 2010).

Desde então inúmeras causas da doença tem sido descritas, sendo as mais comuns acometidas pelo uso indevido do álcool, excesso de atividade física e principalmente por uso indevido de drogas ilícitas ou não (CERVELLIN *et al.*, 2010; DESJARDINS & STRANGE, 2012).

Diversas drogas como estatinas, fibratos, salicilatos, corticosteróides, antidepressivos tricíclicos, anti-histamínicos, álcool, heroína e cocaína já foram descritos como desencadeadores da RBM (FARKASH *et al.*, 2009).

Nance *et al.* (2015) relatam que exames clínicos, laboratoriais e genéticos são ferramentas importantes para diagnóstico da rabdomiólise, reassaltando que doenças hereditárias, distúrbios eletrolíticos, miopatias, infecções virais e bacteriana são causas frequentes de RBM.

Os alunos do Curso de Operações na Selva permanecem na selva por períodos de dez a quinze dias, ininterruptos, com atividade física extenuante durante o dia e a noite, dormindo em média quatro horas por dia. O cansaço, sono, fadiga, desgaste físico e temperaturas

elevadas estão sempre presentes, o que favorece o desenvolvimento de doenças decorrentes de do desgaste físico como a RBM.

Por ser uma doença grave decorrente de lesão muscular, direta ou indireta, dados bioquímicos e moleculares mais precisos podem ajudar no diagnóstico exato e rápido, uma melhor remoção dos fatores precipitantes, eficácia de tratamento e melhora das complicações causadas pela RBM (DAEJIN *et al.*, 2015).

No entanto até o momento não existe um marcador molecular que possa ser utilizado como um possível candidato envolvido na predisposição à RBM ou seus quadros mais graves, como insuficiência renal e arritmias cardíacas.

Como as variações do rendimento físico podem ser fortemente influenciadas por fatores genéticos (cerca de 20% a 80%), é de grande relevância elucidar as alterações bioquímicas e correlacionar com os polimorfismos genéticos AMPD1 (C34T), ACTN3 (C1747T), FKRP (A19G), MLCK (C49T), MYH9 (A22G), GDF-8 (C2T), GSTP1 (A34G) e GSTP1-1 (C16T) envolvidos no desempenho muscular e nas funções renais.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 ASPECTOS GERAIS DA RABDOMIÓLISE

A RBM pode ser definida como uma doença clínico-laboratorial que decorre da destruição de células musculares esqueléticas (miólise), com liberação de substâncias intracelulares para a circulação sanguínea provocando danos em alguns órgãos do corpo, principalmente nos rins. Esta doença pode ser causada por diversos fatores, principalmente por traumas, excessivo consumo de álcool e atividade física intensa em condições climáticas desfavoráveis, como no caso de treinamentos militares (AIZAWA *et al.*,1995; LAYNE *et al.*, 2004).

A RBM é uma doença comum, de etiologia multifatorial, e ocorre normalmente em indivíduos saudáveis após traumatismos, atividade física excessiva, crises convulsivas, consumo exacerbado de álcool, maconha, cocaína, ou infecções virais e bacterianas (AIZAWA *et al.*,1995; LAYNE *et al.*, 2004).

Segundo Allison (2003), a RBM se apresenta com as seguintes formas clínicas: mialgia em intensidade variável, mioglobínúria com urina escura, elevação nos níveis séricos da creatino quinase frações MM e MB, hipocalemia, hiponatremia, hipocalcemia e insuficiência renal aguda com elevações nas concentrações séricas de ureia e creatinina.

Pacientes com RBM apresentam sensibilidade ou amolecimento muscular, fraqueza, necrose aguda do músculo, mialgia que pode estar acompanhada por urina escura indicando mioglobínúria, inchaço e quadros febris (NANCE *et al.*, 2015).

Em praticantes de esportes como beisebol, futebol e lutas têm sido relatados vários casos de RBM, no entanto, seu acometimento maior é em atletas de provas de resistência (maratonistas), em que sua clínica varia amplamente, indo de elevação assintomática de enzimas musculares para complicações potencialmente mortais da insuficiência renal aguda (RONALD *et al.*, 2003; DEUSTER *et al.*, 2013).

O diagnóstico de RBM depende do reconhecimento dos sintomas de dor muscular e fraqueza, de detectar a presença ou o histórico de urina variando de vermelho a marrom (mioglobínúria) e encontrar elevações de curto prazo da CK-MM e MB que não sejam atribuíveis ao infarto do miocárdio ou à miopatias inflamatórias (GLYNE *et al.*, 2002; RONALD *et al.*, 2003; SOLTANI *et al.*, 2008). Por ser uma doença multifatorial e de difícil diagnóstico, seus sintomas se confundem com outras doenças, sendo de extrema importância que se conheçam as causas da RBM para o correto e preciso diagnóstico.

A RBM associada ao excesso de atividade física, normalmente é relatada após maratonas e frequentemente relacionada a membros inferiores. Geralmente a insuficiência renal aguda não é relatada em pacientes pós-atividade física (GUNAL *et al.*, 2004). Todavia, se o paciente concomitantemente apresentar depleção de volume de água, a de insuficiência renal aguda (IRA) passa a ser frequente. Além disso, a prática excessiva de exercícios físicos pode provocar necrose muscular e levar a RBM (UCHOA *et al.*, 2003; GUNAL *et al.*, 2004).

Defeitos Enzimáticos Hereditários também são associados à RBM, destacando-se a doença de McArdle (glicogenose tipo V), miopatia metabólica com sintomas de intolerância ao exercício, causados pela deficiência da enzima miofosforilase (ANTUNES *et al.*, 2013; TERRONE *et al.*, 2014).

As variações extremas de temperatura (hipotermia e hipertermia) são sintomas característicos da RBM, sendo que quadros de hipertermia ocorrem com maior frequência em

ambientes quentes e úmidos, devido ao corpo não ter capacidade de manter a temperatura corpórea adequada (WAPPLER *et al.*, 2001; SEVER *et al.*, 2002).

Frequentemente são relatados casos de RBM após intensa exposição ao sol ou ao calor, que levam a forte desidratação e causam hipertermia, porém casos de hipotermia também foram relatados em pacientes com RBM, afetando mecanismos celulares, como a difusão e a osmose, principalmente em temperaturas entre 4° C e 5° C, produzindo edema celular e ruptura das membranas celulares (FERNANDEZ *et al.*, 2014; GANH *et al.*, 2014).

Miopatias metabólicas são relatadas com menor frequência associadas à RBM, geralmente a causa é a deficiência das enzimas metabólicas dos glicídios, lipídeos ou nucleotídeos que impedem a produção suficiente de Trifosfato de Adenosina (ATP) para a ação dos miócitos. Normalmente estas miopatias ocorrem na infância e levam à dor, fraqueza muscular e mioglobinúria (MRKOBRADE *et al.*, 2014; MUSUMECI *et al.*, 2014).

O consumo de substâncias farmacológicas como anfetaminas, anfotericina B, antimaláricos, colchicina, corticosteróides, depressores do Sistema Nervoso Central, diuréticos, estatinas, fibratos, heroína, isoniazida, laxantes e monóxido de carbono são frequentemente associadas a RBM, sendo que as estatinas são os principais fármacos causadores (MARKING *et al.*, 2014; PANCHANGAMV, 2014; PAPASOTIRIOU *et al.*, 2014).

Diversos estudos demonstraram que o álcool inibe o acúmulo de cálcio no retículo sarcoplasmático muscular, agredindo a membrana celular, levando a inibição da bomba Na-K-ATPase. Como esta é a que mantém a integridade celular, ocorre compressão muscular prolongada por diminuição do nível de consciência, efeito miotóxico direto e alterações eletrolíticas. (CHAKRABORTI & ANTOON, 2012; SANTORO *et al.*, 2013; SU *et al.*, 2013).

Alterações eletrolíticas são comuns na RBM, o acúmulo de sódio no citoplasma leva a um aumento na concentração intracelular de cálcio, o qual é normalmente muito baixo em relação à concentração extracelular, interagindo com as proteínas contráteis actina e miosina, esta interação culmina na diminuição das reservas energéticas de ATP e necrose das fibras do músculo esquelético (ROSA, 2005; BOUTAUD & ROBERTS, 2011).

A mais de 40 anos as infecções já são associadas à RBM, podem ser desencadeadas por infecções virais, bacterianas, parasitárias ou fúngicas. As infecções produzidas por meio

de miotoxinas e dos vírus Influenza A e B destroem os miócitos após infecção do tecido muscular (FADILA *et al.*, 2015; HLAVÁČOVÁ *et al.*, 2015).

A patogênese da rabdomiólise associada à dengue não foi bem elucidada. Os danos do músculo podem ser causados pela invasão viral direta ou mediada por citocinas miotóxicas, como o factor de necrose tumoral (OLIVEIRA *et al.*, 2015)

As infecções por *Legionella*, *Streptococcus*, *Salmonella* e *Francisella tularensis* podem provocar necrose muscular por infecção direta, produção de toxinas ou resposta imunológica à infecção. Importante salientar que, devido ao processo infeccioso, ocorre diminuição da perfusão sanguínea, o que contribui para o desenvolvimento de lesão muscular, favorecendo a disseminação bacteriana e evolução para septicemia (AL SHAMKHANI *et al.*, 2015; RAVRY *et al.*, 2015)

Por ser uma doença multifatorial e nos últimos anos ter aumentando os relatos de RBM em militares, o Exército Brasileiro aprovou as portarias de nº.129 - 11 de março de 2010 e nº.092-DGP - de 2 de julho de 2012 (EB30N-20.001), regulamenta as diretrizes para implantação do Programa de Prevenção da RBM induzida por esforço físico e pelo calor em militares brasileiros e estrangeiros que atuem no Brasil.

A exata incidência de RBM é difícil estabelecer, pois definições diferentes são utilizadas para seu diagnóstico, as instituições de saúde utilizam critérios diferentes estabelecer o diagnóstico, não havendo dados epidemiológicos fidedignos no Brasil.

Órgãos governamentais americanos como “*National Institutes of Health*” (NIH) e “*Food and Drug Administration*” (FDA), relatam que para ser considerado quadro de RBM é necessário o individuo apresentar nível sérico de CK acima de 10.000 U/L juntamente com lesão em algum órgão.

Nos EUA foram registrados 26 mil casos de RBM nos anos 90. O risco torna-se maior se estas possuírem histórico de uso de drogas ilícitas ou consumo elevado de álcool quando comparado com doenças musculares, e é particularmente elevado se vários fatores que contribuem ocorrem em conjunto. A RBM é responsável por 7-10% de todos os casos de lesão renal aguda nos EUA (BOSCH *et al.*, 2009; ELSAYED & REILLY, 2010).

1.1.2 PRINCIPAIS EXAMES LABORATORIAIS

O teste mais confiável para o diagnóstico e acompanhamento ainda é o nível de CK sérico. Esta enzima é liberada pela célula muscular danificada e pode indicar a RBM quando apresentar níveis acima de cinco vezes o limite superior da normalidade (SAFARI *et al.*, 2016).

Danos nos miócitos fazem com que conteúdos intracelulares extravasem para a corrente sanguínea, tais como mioglobina, creatinina, ureia, potássio, CK e outras enzimas musculares, incluindo aminotransferases, aldolase, lactase desidrogenase, e hidroxibutirato desidrogenase. Muitos casos de RBM são subclínicos e detectados somente por meio do nível de CK-MM sérica (VANHOLDER *et al.*, 2000; SAFARI *et al.*, 2016).

Não existem regras definidas sobre a solicitação de exames laboratoriais devido à enorme variedade de condições clínicas que podem surgir em decorrência da RBM. Segundo Rosa (2005), devem-se levar em consideração os diversos fatores que causam RBM quando se solicita exame laboratorial.

A principal alteração bioquímica baseia-se principalmente na dosagem da enzima CK-MM sérica. A dosagem da mioglobina urinária ou sérica, quando disponível, é mais específica, sendo útil nas fases iniciais da doença e para identificar um subgrupo de pacientes com menor lesão do músculo esquelético. O acompanhamento do paciente é fundamental e deve ser focado na prevenção de consequências negativas, que muitas vezes incluem a doença renal e coagulopatia (LANDAU *et al.*, 2012).

A apresentação clínica da RBM é extremamente variável, sendo que em pacientes conscientes a queixa principal pode ser de sensibilidade muscular, dor, rigidez e câimbras acompanhadas de debilidade. Entretanto, a mialgia pode estar ausente ou em pequena intensidade. O exame físico pode revelar edemas musculares que podem melhorar depois de reidratação parenteral (LEE, 2014).

1.1.3 DIAGNÓSTICO

Na RBM, destaca Dawley (2016), que ocorre modificação da coloração da urina, esta ficando na cor avermelhada a marrom, isto ocorre devido à presença de heme acompanhada por hematúria.

Devido sua grande complexidade, o diagnóstico definitivo da RBM deve ser realizado através de diversos marcadores laboratoriais, sendo os mais importantes: CK sérica, mioglobina sérica e urinária, TGO, TGP e LDH total. Além disso, deve-se verificar presença de hipercalcemia, hiperuricemia e hiperfosfatemia (ZANINOTTO, 1999; DAWLEY, 2016).

Após a lesão extensa na muscular, o nível de mioglobina no soro aumenta nas primeiras 3 horas, alcançando seu nível máximo em até 12 horas, para depois degradar e se normalizar em 24 horas. Assim, a detecção de mioglobina no sangue ou na urina pode ser específica para diagnóstico de RBM, principalmente na sua forma precoce dentro das primeiras 24 horas (GENG *et al.*, 2015; DAWLEY, 2016).

Após as 24h a enzima creatino quinase (CK-MM) é um marcador mais confiável que a mioglobina no diagnóstico de dano muscular, permanecendo em níveis elevados por um período mais longo em comparação com a mioglobina no soro (MELLI *et al.*, 2005).

Cecil *et al.* (2008) cita que durante a ruptura das células musculares, componentes fosfóricos orgânicos e inorgânicos são dissolvidos e uma grande quantidade de fósforo inorgânico é libertada para o plasma, levando a hiperfosfatemia. As complicações precoces de RBM podem incluir níveis muito elevados de potássio no sangue, cerca de 25% desenvolvem problemas hepáticos e 15% insuficiência renal.

Testes laboratoriais adicionais são necessários para determinar os fatores precipitantes e complicações resultantes de RBM. Um painel metabólico que inclua eletrólitos como potássio, cálcio, fósforo, assim como avaliação da função renal devem ser obtidos de modo rotineiro (ZIMMERMAN *et al.*, 2013).

1.1.4 FATORES GENÉTICOS

Nos últimos anos, fatores genéticos têm sido atribuídos ao ótimo desempenho físico de atletas. A expressão das proteínas pode ser influenciada pelas sequências diferenciadas nos genes e modificar características que alteram o desempenho físico. Alguns estudos demonstraram que certos polimorfismos de DNA podem possuir relação com o rendimento físico (RUIZ *et al.*, 2009; MATSUSUE *et al.*, 2012). Dessa forma, este estudo avaliou os seguintes genes:

Miosina-quinase de cadeia leve (MLCK), gene encontrado no músculo cardíaco e esquelético, bem como em células não musculares de mamíferos. As proteínas codificadas pelo MLCK têm a função de fosforilar a Miosina Reguladora de Cadeia Leve (RLC), assim produzindo a contratilidade muscular (MARTINSEN *et al.*, 2014).

Embora a ligação de íons cálcio para a tropomiosina-troponina seja o principal regulador da contração do músculo esquelético, a cadeia leve reguladora de miosina desempenha papel modulador importante no desenvolvimento da força. No entanto, a RLC não é prontamente fosforilada em fibras tipo I e, portanto, atua predominantemente em fibras tipo 2 (MARTINSEN *et al.*, 2014).

É possível que o polimorfismo C49T do gene MLCK altere a capacidade de fosforilar RLC em fibras tipo 2, diminuindo assim a capacidade de suportar o esforço muscular. O SNP tem sido associado ao aumento de lise muscular, quadros de RBM e insuficiência renal aguda (LANDAU *et al.*, 2012; MARTINSEN *et al.*, 2014).

A Miosina de Cadeia Pesada 9 (MYH9) possui polimorfismo associado com o risco de Doença Renal. Predominante em descendentes negros, o polimorfismo do gene MYH9 poderia explicar parcialmente o excesso de risco de doenças renais associadas com ascendência africana (COLARES *et al.*, 2014; RUCHI *et al.*, 2015).

No entanto, dados recentes sugerem que o gene da APOL1 congrega com MYH9, e pode ser o gene verdadeiramente associado com o risco de doenças renais. Como pacientes portadores de RBM geralmente possuem a clínica favorável para IRA, entendemos que o estudo deste polimorfismo pode exercer papel importante, na avaliação do risco de militares portadores. (COLARES *et al.*, 2014).

Muitos tecidos do corpo humano possuem a Proteína Relacionada a Fukutina e esta é codificada pelo gene FKRP(fukutina). Esta proteína esta presente na membrana celular, no

complexo distroglicano, é particularmente abundante no músculo esquelético, cérebro e coração (MATHEWS *et al.*, 2011; LINDBERG *et al.*, 2012).

A fukutina modifica quimicamente outra proteína conhecida como alfa-distroglicana (A-DG), estando relacionada a diferentes distrofias musculares e sua característica principal é a degeneração progressiva dos músculos, em especial os esqueléticos (MATHEWS *et al.*, 2011; LINDBERG *et al.*, 2012).

Recentemente, verificou-se que mutações no gene FKRP causam duas formas clinicamente distintas de distúrbios na musculatura esquelética, a forma grave de distrofia muscular congênita, bem como a distrofia muscular das cinturas, ambos os padrões de herança autossômica recessiva (KRASNIANSKI *et al.*, 2004, YAMAMOTO *et al.*, 2008; HONG *et al.*, 2011).

Duas mutações foram descritas como risco para distúrbios na musculatura esquelética, POMT1 e POMT2, levando a mudança na glicosilação, e deficiências secundárias de diversas outras proteínas musculares (HAFNER *et al.*, 2014; STEHLÍKOVÁ *et al.*, 2014).

O gene FKRP está localizado no cromossomo 19q13.3, tem 1488 pb sendo composto por quatro éxons que codificam uma proteína de 495 aminoácidos. Este é expresso em diversos tecidos humanos com níveis elevados nos músculos esqueléticos e cardíacos (YAMAMOTO *et al.*, 2008).

O gene ACTN3 codifica a síntese de α -actinina-3, proteína sarcomérica de ligação de actina que desempenha um papel fundamental na manutenção e regulação do citoesqueleto. Junto com a α -actinina-2, a α -actinina-3 é uma proteína miofibrilar estrutural na linha Z que forma uma estrutura cristalina capaz de ancorar junto aos filamentos contendo actina. A α -actinina-3 esta presente nas fibras dos músculos que os torna mais fortes para exercícios extremos (ANTUNES *et al.*, 2013; DEUSTER *et al.*, 2013).

O genótipo α -actinina-3 deficiente apresenta frequência de 25% em populações asiáticas e menos de 1% em população Africana; a frequência nos europeus é 18%. Isto levanta a possibilidade de que *ACTN3* genótipo confere aptidão diferencial em seres humanos, sob certas condições ambientais (DEUSTER *et al.*, 2013).

A Miostatina, proteína presente no músculo esquelético e conhecida como GDF-8 (Fator 8 de crescimento e diferenciação), é um membro da família das Supercitocinas do Fator de diferenciação do crescimento beta- TGF- β (ANTUNES *et al.*, 2013; LAHORIA *et al.*, 2014).

A função da miostatina consiste em regular a proliferação dos mioblastos durante o período embrionário e ajustar o crescimento da musculatura esquelética, sendo responsável pela sua homeostasia muscular. O papel de inibidor do crescimento muscular exercido pela miostatina foi demonstrado na década de 1990, quando se verificou que mutações no gene que codifica esta proteína eram capazes de promover um ganho extraordinário de massa muscular em bovinos. (LAHORIA *et al.*, 2014; MUSUMECI *et al.*, 2014).

Haidet *et al.* (2008) relatam que o fator 8 de diferenciação e crescimento (miostatina) localiza-se no cromossomo 2q32.2 e tem o papel de limitar o crescimento da musculatura esquelética controlando o número de miofibras do músculo em desenvolvimento na fase pré-natal e regulando o processo hipertrófico em células pós-mitóticas.

O GDF na sua forma ativa induz a expressão de inibidores do ciclo celular e inibe a expressão de fatores regulatórios miogênicos, os quais codificam fatores transcricionais de regulação na diferenciação muscular (LAHORIA *et al.*, 2014; MUSUMECI *et al.*, 2014).

O Monofosfato de Adenosina Deaminase 1 (AMPD1) encontra-se nos músculos usados para movimentar-se, possui um importante papel no processo de produção de energia no interior das células do músculo e atua como catalisador no ciclo das purinas. (VAN ADEL BA & TARNOPOLSKY, 2009; DEUSTER *et al.*, 2013).

Valentina *et al.*, 2014 ressaltam a importância de estudo do SNP do gene AMPD em atletas de elite, uma vez que este gene é um regulador importante do metabolismo da energia muscular durante o exercício, atua no ciclo das purinas, na produção de ATP, convertendo AMP em monofosfato de inosina (IMP).

O gene AMPD1 auxilia na recuperação moléculas de adenosina e ajudar a regular os níveis de IMP, AMP, difosfato de adenosina (ADP) e trifosfato de adenosina (ATP) nos músculos esqueléticos durante o exercício (REBECCA *et al.* 2015).

A substituição de um nucleótido T por um C na posição 34 resulta numa mutação no qual uma glutamina é convertida para um codon de parada, resultando numa proteína truncada não funcional, e, por conseguinte, resultando em AMPD1-deficiente (REBECCA *et al.*, 2015).

A falta de enzima AMPD1 tem sido associada com um aumento da frequência das formas leves de miopatia pós-exercício, causando fadiga e dores musculares. O alelo R é, portanto, associada a uma vantagem para a performance de resistência, enquanto portadores

do alelo X podem ser prejudicados pelo acúmulo precoce AMP e fadiga (REBECCA *et al.*, 2015).

As Glutathionas S-transferase (GST) são uma superfamília de enzimas de fase II que atuam na detoxificação catalisando a conjugação de compostos hidrofóbicos e eletrofílicos à glutathiona reduzida, se concentra abundantemente no citossol podendo ser encontrada também em organelas como mitocôndrias, matriz nuclear e peroxissomo.(YE & SONG., 2005).

A GST está envolvida em diversas atividades celulares como na eliminação de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio; metabólitos fisiológicos eletrofílicos; conjugação do óxido nítrico, sendo ambos importantes para a atividade hepática, indicando seu papel na regulação de lipídios, glicose e utilização de aminoácidos. A GST apresenta função regulatória e metabólica, sendo que a sua deficiência contribui para o estresse oxidativo, apresentando papel importante na patogênese de muitas doenças (WU *et al.*, 2004).

Há diferentes genes como *Alpha* (A), *mu* (M), *pi* (P) e *theta* (T) que podem expressar diferentes isoformas da molécula de glutathiona (BOLUFER, 2007; VICARI, 2007).

A Glutathionas S-transferase *pi* (GSTP1) está localizado no cromossomo 11q13 e sua expressão tem sido descrita como de herança autossômica dominante. Este polimorfismo está envolvido na detoxificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros mutágenos, e 20% a 50% dos indivíduos não expressam a enzima, devido deleção completa (ROSSINI *et al.*, 2002).

O polimorfismo da GSTP1 foi descrito pela primeira vez no cromossomo 11q13, e constataram uma transição do nucleotídeo 313 (A → G) no éxon 5 e outra no nucleotídeo 341 (G → T) no éxon 6, envolvendo a substituição de dois aminoácidos no sítio 28 de atividade da enzima (Ile → Val). Essa variação alélica parece reduzir a atividade de GSTP1 em muitos tecidos, assim como a capacidade de inativar compostos mutagênicos, indicando o envolvimento dessa enzima na suscetibilidade para cânceres (SPURDLE *et al.*, 2001).

2 OBJETIVOS

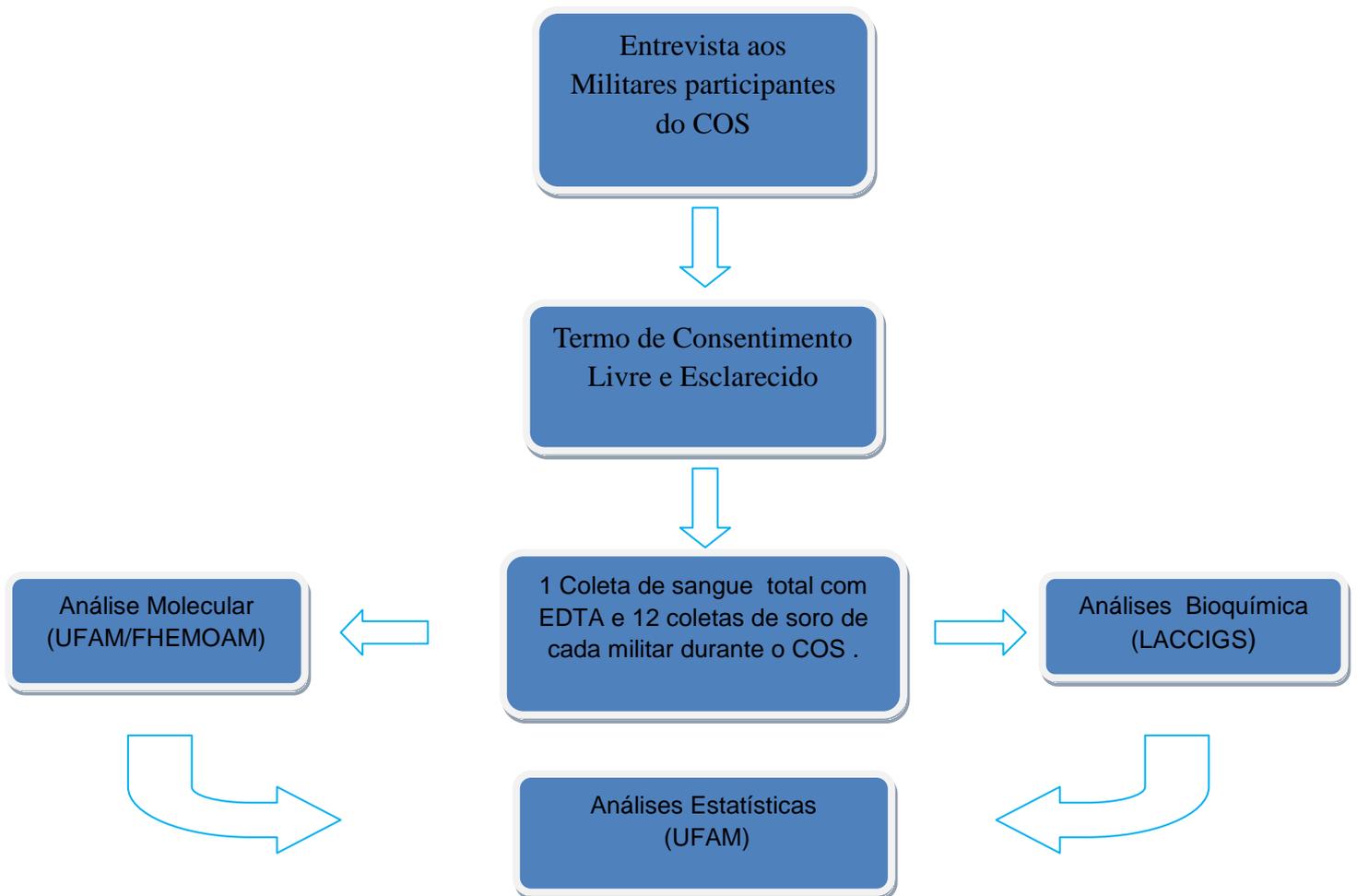
2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as alterações bioquímicas e interpretar o perfil molecular de marcadores indicativos de RBM em militares que participaram do Curso de Operações na Selva - COS ministrado pelo Centro de Instrução Guerra na Selva – CIGS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as alterações bioquímicas (CK-MM e CK MB) nos alunos durante todo o curso;
- Confirmar a frequência dos polimorfismos nos genes AMPD1 (34 C/T), ACTN3 (1747 C/T), FKR1P (19 A/G), MLCK (49 C/T), MYH9 (22 A/G), GDF-8 (2 C/T), GSTP1(341 A/G) e GSTP1-1 (16C/T) nos militares;
- Descrever associações dos polimorfismos como os dados bioquímicos (CK-MM e CK MB).

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Legenda:

CIGS: Centro de Instrução de Guerra na Selva

COS: Curso de Operações na Selva

FHEMOAM: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

UFAM: Universidade Federal do Amazonas

LACCIQS: Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Instrução de Guerra na Selva

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo coorte prospectivo, avaliamos um grupo de militares que foram submetidos à atividade física intensa e que foram observados durante 3 meses com o intuito de analisarmos a sua evolução.

As amostras foram coletadas durante o Curso de Operações na Selva ministrado pelo Centro de Instrução de Guerra na Selva – CIGS e foram submetidos exames bioquímicos no Laboratório de Análises Clínicas do CIGS - LACCIGS.

As técnicas de extração de DNA foram realizadas no Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular (LAEBM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM e genotipagem no Laboratório de Genômica da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM).

4.2 POPULAÇÃO REFERÊNCIA

Foram incluídas no presente estudo alunos, do sexo masculino, com faixa etária entre 20 e 45 anos, que participaram do Curso de Operações na Selva ministrado pelo Centro de Instrução Guerra na Selva (CIGS) no ano de 2013, após concordarem com a participação no estudo, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Durante o ano de 2013 ocorrem três COS, totalizando 300 militares inscritos. A abordagem aos militares ocorreu durante a entrevista dos inscritos realizada no CIGS e juntamente a esta foi explicitada o projeto em questão e aplicado o Termo de Consentimento. Desta forma, o militar possuiu livre arbítrio para participar ou não do Projeto.

4.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Foram eleitos todos os militares que realizaram avaliação médica no Hospital Militar de Área de Manaus sendo considerados aptos a participarem do Curso de Operações na Selva e concordarem com a participação no estudo, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram ilegíveis militares que apresentaram qualquer tipo de doença cardíaca, renal, sorologia positiva para HTLV, Hepatites Virais B e C, HIV ou que fossem usuários de substâncias que favoreçam o desenvolvimento clínico da RBM: anabolizantes, drogas ilícitas, bebidas alcoólicas e estatinas. Totalizando assim um N amostra de 233 militares participantes deste projeto.

4.4 INFORMAÇÕES ÉTICAS E FINANCIAMENTO

As amostras utilizadas no estudo foram obtidas por meio do projeto **“RABDOMIÓLISE: CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR PARA PREVENÇÃO E ACOMPANHAMENTO DE MILITARES SUBMETIDOS À INTENSA ATIVIDADE FÍSICA.”**, e o mesmo submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas, sendo aprovado com o número de CAAE: 36325414.9.0000.5020.

Este projeto recebeu recursos do Exército Brasileiro, assim como recursos próprios e dos projetos ao qual este Programa de Pós-Graduação se inclui.

4.5 AMOSTRAS

As amostras de sangue foram coletadas por profissionais habilitados, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram coletados de cada militar, na primeira coleta, 5 ml de sangue venoso em tubo contendo EDTA (ácido etileno de aminotetracético di-sódico), na concentração de 1,5mg/mL, para as análises moleculares e 10 ml de soro, em tubo contendo gel separador, para as análises bioquímicas. Foram realizadas

mais 11 coletas de soro de cada militar, durante as principais fases do curso, totalizando 12 coletas por COS.

O tubo contendo sangue total com EDTA foi encaminhado a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas para extração de DNA, análises moleculares e armazenamento para estudos posteriores, o tubo de soro foi encaminhado ao Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Instrução de Guerra na Selva - LACCIGS para realização de exames bioquímicos.

4.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

4.6.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Foi utilizado o aparelho Vitros 250 Johnson & Johnson para dosar os parâmetros bioquímicos, tecnologia de ponta que fornece resultados precisos, usando a metodologia da bioquímica seca, com qualidade expressiva. O aparelho foi calibrado diariamente pelos profissionais do LACGIGS, conforme protocolo do fabricante.

Tabela 01 – Parâmetros bioquímicos dosados nas 12 coletas realizadas nos militares participantes do COS.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	
CK-MM (U/L)	CK-MB (U/L)

4.7 ENSAIOS MOLECULARES

4.7.1 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

O DNA genômico foi extraído a partir de 300µL de sangue, utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit, conforme instruções do fabricante.

Após a extração, o DNA foi armazenado a -70 °C para as posteriores análises moleculares.

4.7.2 GENOTIPAGEM

A determinação dos SNPs foi realizada pela técnica PCR em tempo real, sendo realizada com o sistema TaqMan® e analisadas através da plataforma StepOnePlus™ v. 2.0 (Applied Biosystems).

. A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 10uL/reação, contendo 5uL de 2x TaqMan Universal Master Mix, 0,200uL de 20x SNP Genotyping Assay, 2,800uL de água esterilizada, com 2 uL de DNA da amostra.

A tecnologia se baseia na medição da fluorescência durante as ciclagens, emitidas através de sondas específicas para cada genótipo. A quantidade de fluorescência emitida é proporcional à quantidade do produto da PCR e permite a monitorização da reação. A curva de PCR resultante é usada para definir a fase exponencial da reação, que é condição prévia para o cálculo do número de cópias produzidas (KLEIN, 2002).

Tabela 02 – Polimorfismos avaliados nos militares participantes do COS.

GENES	SNP
ACTN3 (C1747T)	rs 1815739
GDF8 (C2T)	rs 1805086
MLC (C49T)	rs 146346546
AMPD1 (C34T)	rs 17602729
FKRP (A19G)	rs 114491682
MYH9 (A22G)	rs 113698937
GSTP1 (A341G)	rs 1871042
GSTP1-1 (C16T)	rs 1695

4.8 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE DADOS

4.8.1 DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS

A análise de normalidade da distribuição das variáveis foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir desta informação utilizamos os testes paramétricos ANOVA ou não paramétrico de Kruskal-Wallis.

O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de categorias. Além disso, verificando se é provável haver uma diferença entre as médias dos valores, buscar-se-á dentre as médias apresentadas diferenças significativas conduzidas de múltiplas comparações de médias através do teste de Bonferroni (ou post-hoc). O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para as distribuições fora do normal.

4.9 ANÁLISES DE VARIÁVEIS QUALITATIVAS OU CATEGÓRICAS

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (χ^2), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Nas análises de valores inferiores a 4, estas foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis.

Os testes de Mann-Whitney e o teste T independente foram utilizados para a análise de duas variáveis numéricas, na comparação de dois grupos de valores dentro de uma mesma variável, levando-se em consideração a distribuição de cada variável.

A estatística descritiva foi aplicada para analisar as principais características clínicas e demográficas da amostra avaliada.

A partir dos resultados de genotipagem dos SNPs investigados, as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs observados foram calculadas por contagem direta e analisados pelo Teste χ^2 para análise de associação das variáveis. A razão de chances (*OR*) foi calculada para estimar o risco, e o intervalo de confiança adotado será de 95%. Valores de *OR*<1 determinarão proteção, enquanto que valores *OR*>1 determinaram risco associado. Valores de *P*<0,05 foi considerados estatisticamente significativos.

A análise de regressão logística binária múltipla foi aplicada para avaliar a associação entre a presença ou ausência de RBM (variável dependente), com as variáveis demográficas e genéticas, ajustando diferenças observadas entre pacientes e controles.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussão da presente dissertação foram compilados na forma de dois artigos intitulados:

“Polimorfismos genéticos e marcadores bioquímicos em militares do Exército Brasileiro expostos a atividade física intensa”.

A ser enviado para: ACSM | Medicine & Science in Sports & Exercise

“Rabdomiólise após consumo de cocaína - relato de caso”.

A ser enviado para: AMSUS | Military Medicine

1 Polimorfismos genéticos e marcadores bioquímicos em militares do Exército Brasileiro
2 expostos à atividade física intensa

3

4 Thiago de Jesus Bacha^{1,3},

5 Marco Aurélio Almeida de Oliveira¹,

6 Janaina Santana Carneiro²,

7 José Pereira de Moura Neto¹.

8

9 1-Universidade Federal do Amazonas – UFAM

10 2-Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM

11 3-Centro de Instrução de Guerra na Selva – CIGS

12

13 Resumo

14 Alguns treinamentos militares causam desgaste físico intenso, levando ao rompimento das
15 fibras musculares e liberando componentes intracelulares para corrente sanguínea. Diversos
16 são os fatores que influenciam no desempenho físico militar, e entendemos que alguns
17 polimorfismos também podem estar envolvidos na melhora ou no menor desgaste físico. O
18 objetivo deste trabalho foi correlacionar os níveis séricos de CK-MM, CK-MB com
19 polimorfismos nos gene ACTN3 (C1747T), GDF8 (C2T), MLC (C49T), AMPD1 (C34T),
20 FKRP (A19G), MYH9 (A22G), GSTP1 (A341G), GSTP1-1 (C16T) em 233 militares
21 participantes do Curso de Guerra na Selva (COS), Manaus, Amazonas. Durante o curso
22 foram realizadas 12 coletas de sangue venoso, utilizando-se metodologia de química seca
23 para dosagens bioquímicas e PCR em Tempo Real para genotipagem dos polimorfismos
24 (SNP). Os níveis séricos de Creatino Quinase frações MM e MB apresentaram níveis sempre

25 elevados em todos militares do curso, com alguns casos 88 vezes superior ao valor máximo
26 de referência e com média de 12 vezes superior aos limites aceitáveis. Os SNPs nos genes
27 ACTN3, GDF8, GSTP1 foram frequentes e quando correlacionados com a Creatino Quinase
28 frações MM e MB apresentaram significância estatística ($p < 0,001$). Todos militares
29 portadores do SNP ACTN3 (C1747T) apresentaram níveis de CK elevados, diferentemente
30 do SNP GDF8-C2T, no qual portadores em homozigose e heterozigose apresentaram níveis
31 de CK-MM e CK-MB menores após exercícios físicos intensos. Concluimos que os
32 polimorfismos genéticos podem influenciar no dano muscular e no desempenho físico de
33 militares expostos a treinamentos físicos extenuantes.

34

35 Palavras Chave: Creatino Quinase, polimorfismo genético, treinamento militar.

36

37 Introdução

38

39 O Centro de Instrução de Guerra na Selva - CIGS é responsável por ministrar o Curso
40 de Operações na Selva – COS, curso com alto nível de exigência física. As dificuldades são
41 constantes e durante todo o curso é exigido do aluno o extremo de suas capacidades física,
42 cognitiva e afetiva.

43 Neste sentido, o Exército Brasileiro vem realizando pesquisas, tanto para preservar a
44 higidez e melhor desempenho físico do militar, como também, para garantir que o combate
45 na selva seja feito dentro dos padrões coerentes e o mais próximo da realidade que o militar
46 irá encontrar em exercícios simulados ou no emprego real.

47 Visando atender as necessidades diárias de treinamento para manutenção do
48 desempenho físico satisfatório, os militares efetuam treinamentos moderados diários, assim
49 como participam de provas de alto desempenho a fim de obter condicionamento físico para as
50 atividades de rotina e de combate.

51 O desgaste físico dos militares participantes do COS é intenso, e para ter um bom
52 desempenho durante o curso precisam possuir condições físicas favoráveis para desempenhar
53 provas longas de resistência, visto o contínuo exercício praticado por eles.

54 Os alunos do COS permanecem na selva durante três meses, realizando atividade
55 física extenuante durante o dia e a noite, dormindo em média quatro horas por dia. O cansaço,
56 sono, fadiga, desgaste físico e temperaturas elevadas estão sempre presentes, o que podem
57 causar danos na musculatura esquelética liberando componentes intracelulares para corrente
58 sanguínea.

59 Marcadores indiretos são utilizados como indicativo de dano muscular, em função da
60 facilidade de coleta e, sobretudo, pelo baixo custo quando comparado aos métodos diretos
61 (24).

62 Concentrações plasmáticas de Creatino Quinase (CK) frações MM e MB, Lactato
63 desidrogenase (LDH), Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP), Transaminase Glutâmico
64 Oxalacética (TGO) e Gama Glutamil-Transferase (GGT) são importantes parâmetros
65 indicadores do estresse imposto à musculatura esquelética decorrente da atividade física.
66 Quanto mais intenso e duradouro for o exercício, maiores os micro traumas musculares que
67 permitem o extravasamento desta enzima para o meio extracelular (21,31,38).

68 Enzimas representativas de dano no tecido muscular, quando dosadas após intensa
69 atividade física apresentam níveis séricos extremamente elevados, níveis de CK podem
70 chegar acima de 100.000 U/L e causar insuficiência renal aguda, clínica mais grave da
71 rabdomiólise (16).

72 Nos últimos anos, fatores genéticos têm sido atribuídos ao ótimo desempenho físico
73 de atletas. A expressão de proteínas pode ser influenciada pelas sequências diferenciadas nos
74 genes e modificar características que alteram o desempenho físico (12).

75 O gene Miosina Quinase de Cadeia Leve (MLCK), possui a função de fosforilar a
76 Miosina de Cadeia Leve Reguladora, seu polimorfismo (heterozigose-RX e homizigoze-XX)
77 foi associado ao aumento dos níveis de creatino quinase após atividade física intensa e
78 diminuição da contração muscular (7,41).

79 O gene Miosina de Cadeia Pesada de 9 (MYH9), codifica a proteína de cadeia pesada
80 da miosina IIA não muscular, a qual é expressa em várias células, sendo mais expressa nos
81 tecidos renais, e seu polimorfismo esta relacionado a lesões renais oriundas de doenças
82 primarias (3,8).

83 O gene Fukutina (FKRP) fornece instruções para produção da proteína Fukutina
84 (*Fukutin-Related Protein*). Esta proteína está presente em muitos tecidos do corpo,
85 principalmente na musculatura esquelética. Mutações FKRP levam à produção de proteínas
86 deficientes não funcionais causando danos nas fibras durante a contração muscular (25,28).

87 O gene ACTN3 codifica a síntese de alfa-actinina-3, uma proteína sarcomérica de
88 ligação de actina que desempenha um papel fundamental na manutenção e regulação do
89 citoesqueleto. A capacidade de geração de força nas fibras musculares do tipo 2, a
90 velocidade, o tempo de movimentos e a capacidade do indivíduo para se adaptar ao exercício
91 físico são todos fortemente influenciados geneticamente por este gene (10,19,27).

92 A miostatina, proteína presente no músculo esquelético e conhecida como Fator 8 de
93 Diferenciação e Crescimento - GDF-8, possui ação na regulação e proliferação dos
94 mioblastos durante o período embrionário, ajustando o crescimento da musculatura
95 esquelética, sendo responsável pela sua homeostasia muscular (23,32).

96 O Monofosfato de Adenosina Deaminase 1 (AMPD1) possui importante papel de
97 catalizador da mioadenilato deaminase no ciclo das purinas, importante processo na
98 produção de energia no interior das células musculares. Deficiência de mioadenilato
99 deaminase é uma condição frequente associada com alterações no metabolismo da energia
100 muscular esquelética (10,47).

101 Lopes e Costa (2013) encontraram que a liberação das enzimas indicadoras de dano
102 tecidual pode estar relacionada com a depleção dos níveis intracelulares de Glutathione (GSH),
103 uma vez que este tripeptídeo está relacionado à metabolização de xenobióticos,
104 principalmente para excreção. Sendo necessário manter níveis estáveis para o organismo a
105 fim de atender os órgãos periféricos, visando não sobrecarregar o fígado, que é o local de
106 produção das Glutathionas.

107 A GSTP1 é expressa em grande quantidade em todos os tecidos. Este gene atua na
108 detoxicação de xenobióticos e na inativação de compostos mutagênicos, indicando o
109 envolvimento dessa enzima na suscetibilidade para cânceres (40,48). Não existe até o
110 momento envolvimento destes SNPs relacionados ao desempenho físico de atletas de elite.
111 Todavia, devido a menor detoxicação de xenobióticos, acreditamos que seja importante na
112 diminuição de força muscular e produção de ATP na musculatura esquelética.

113

114 Métodos

115

116 Modelo estudo

117 Nosso projeto baseou-se num modelo de estudo de coorte prospectivos onde militares
118 compartilham uma característica ou experiência comum, sendo acompanhado por um período
119 significativo de tempo.

120

121 Amostragem

122

123 As amostras foram coletadas durante o Curso de Operações na Selva-COS, ministrado
124 pelo Centro de Instrução de Guerra na Selva-CIGS (Manaus, Amazonas, Brasil), no qual
125 simulam situações de conflitos dentro da floresta duração de três meses. Todos militares são
126 submetidos a atividade física excessiva, temperatura média acima dos 35°C, típico da
127 Amazônia, além de alimentação e hidratação controlada.

128 Participaram do estudo, militares do sexo masculino, com faixa etária de idade entre
129 20 e 45 anos, que realizaram o curso no ano de 2013. O Curso possuiu duração de 12
130 semanas e ocorre três vezes ao ano, são inscritos 100 militares por curso, totalizando 300
131 participantes ao final do ano. Sobre os critérios de elegibilidade, foram inclusos todos os
132 militares considerados aptos após avaliação médica no Hospital Militar de Área de Manaus,
133 que concordassem em participar mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e
134 Esclarecido (TCLE).

135 Foram excluídos os militares que não passaram no teste físico inicial, que
136 apresentaram qualquer tipo de doença cardíaca, renal, sorologia positiva para HTLV,
137 Hepatites Virais B e C, HIV ou usuários de substâncias que favorecem o desenvolvimento
138 clínico da RBM, obtendo-se o tamanho total da amostra de 233 indivíduos.

139

140 Coleta de amostra sanguínea

141

142 Foram coletados dez mililitros de soro em tubo a vácuo com gel separador e ativador
143 de coágulo nas 12 coletas, para as dosagens dos parâmetros bioquímicos e cinco mililitros de
144 sangue venoso em tubo a vácuo contendo EDTA (ácido etileno de aminotetracético di-

145 sódico), na concentração de 1,5mg/mL, na primeira coleta, para a realização das análises
146 moleculares.

147

148 Análises bioquímicas

149

150 Foram dosados os níveis séricos de CK-MM (creatino quinase fração MM), CK-MB
151 (creatino quinase fração MB) de todos participantes do Curso de Operações na Selva.

152 As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de
153 Instrução de Guerra na Selva - LACCIGS em Manaus-AM, utilizando aparelho Vitros 250
154 Johnson & Johnson, com metodologia de bioquímica seca. O aparelho foi calibrado
155 diariamente conforme orientação do fabricante (Ortho Clinical Diagnostics®).

156

157 Extração DNA

158 O DNA genômico foi extraído a partir de 300µL de sangue, utilizando o kit comercial
159 Wizard® Genomic DNA Purification Kit, conforme instruções do fabricante.

160 Após a extração, o DNA foi armazenado a -70 °C para as posteriores análises
161 moleculares.

162

163 Genotipagem

164 Para realização das análises moleculares foi empregada a PCR em Tempo Real no
165 equipamento *Step One Plus* (Life Technologies, Foster City, CA) utilizando-se a tecnologia
166 *TaqMan* (1,19). Todas as análises relativas à PCR em tempo real foram realizadas no
167 Laboratório de Genômica da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do
168 Amazonas (FHMOAM). A Tabela 1 demonstra os genes escolhidos, seu respectivo SNP e
169 sua identidade genética.

170

171 Estatística

172 As análises estatísticas foram realizadas programas estatísticos GraphPad Prism 6.0

173 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) e IBM SPSS estatísticas 19,0 (CDC, Atlanta,

174 Geórgia). O p -value menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

175

176 Informações éticas

177 O estudo foi desenvolvido seguindo as normas éticas do projeto “Rabdomiólise:

178 Caracterização Hematológica, Bioquímica e Molecular para Prevenção e Acompanhamento

179 de Militares Submetidos á Intensa Atividade Física.”, aprovado pelo Comitê de Ética em

180 Pesquisa (CEP) CONEP com o número de CAAE: 36325414.9.0000.5020.

181

182 Resultados e Discussão

183 Devido ao grande desgaste físico que ocorre no curso do COS, comparamos estes

184 militares com atletas de elite de alta intensidade física como maratonistas, participantes de

185 provas de *triathlon* e *pentathlon*. Tais modalidades, onde há intenso desgaste das fibras

186 musculares, podem ocasionar lise celular e conseqüentemente liberação de seus componentes

187 (45).

188 Observa-se na Tabela 2 a distribuição da frequência dos polimorfismos, divididos em

189 selvagens e portadores (RX/XX), dos alunos que iniciaram e finalizaram o curso de

190 operações na selva, a na tentativa de demonstrar possível papel dos SNPs estudados como

191 variável dependente para finalizar o curso.

192 Diversos estudos sugerem que polimorfismos e/ou mutações nestes genes tenham

193 envolvimento com o desempenho físico (11,12).

194 Destaca-se que para os genes FKRP e MYH9 nenhum aluno finalizou o curso quando
195 portador do polimorfismo em heterozigose ou homozigose. Apesar da frequência pequena
196 encontrada nos mesmos, sugere que estes podem influenciar no menor desempenho físico dos
197 portadores em homozigose e heterozigose, necessitando-se aumentar o N amostral para
198 concretizarmos este achado.

199 Todavia, a frequência relacionada aos genes ACTN3, GSTP1 e GSTP1/1 aumentou
200 significativamente, principalmente no ACTN3. Os militares portadores do polimorfismo
201 (C1747T) do ACTN3, em RX e XX, demonstram um melhor condicionamento físico em
202 práticas de alta intensidade quando comparados com os outros polimorfismos descritos neste
203 estudo.

204 Nossos resultados demonstraram um possível favorecimento aos militares portadores
205 dos polimorfismos nos genes GSTP1, GSTP1/1 e principalmente ao ACTN3. Militares
206 portadores destes polimorfismos demonstraram um excelente desempenho físico, sem
207 nenhum comprometimento físico e mental, sugerindo que tais polimorfismos podem
208 favorecer o melhor desempenho físico (12,14,33).

209 Ressaltando o polimorfismo ACTN3 (C1747T), destacamos que todos militares
210 RX/XX, mesmo àqueles que não finalizaram o curso, demonstraram que apesar de
211 apresentarem maiores níveis de CK-MM e MB após atividade física intensa, possuíam grande
212 capacidade de recuperação muscular e realizaram suas atividades físicas com maior
213 resistência do que aqueles RR. Em vista da escassez de estudos relatando grupos militares
214 com relação a este polimorfismo, foi comparado o desempenho das atividades dos
215 participantes do COS com a de atletas de elite de *endurance* e esportes que necessitam de
216 elevada resistência muscular.

217 Yang *et al.* (2003) relataram que atletas que participam de provas de resistência como
218 *endurance* com genótipo XX apresentaram melhor desempenho e uma frequência maior entre

219 os finalistas quando comparados com velocistas. No estudo de Ahmetov *et. al.* (2011) com
220 patinadores russos, foi demonstrado que o polimorfismo ACTN3 R577X estava associado
221 com a distância de corrida, e a composição da tipologia da fibra muscular, assim concluíram
222 que os patinadores que apresentaram maior proporção de fibras lentas (fibras tipo II),
223 obtiveram sucesso ao realizar provas de longas distâncias.

224 Quanto aos portadores dos polimorfismos nos genes FKRP e MYH9, é possível
225 existir uma influência dos polimorfismos sobre o desempenho físico deste militares levando-
226 os a não concluir o COS, vista a importante participação quanto a geração de energia e
227 suscetibilidade renal.

228 O SNP do gene FKRP está associado a distrofias musculares e degeneração
229 progressiva dos músculos (46). Enquanto o SNP do gene MYH9 está relacionado à
230 susceptibilidade de lesões renais, o que pode ser intensificado pela lise muscular e liberação
231 de conteúdo intracelular e desidratação durante o COS (9).

232 Os períodos com maior desligamentos ocorreram nas coletas 3, 6 e 9, devido a diversos
233 fatores, entre esses a deficiência cognitiva, afetiva, liderança e principalmente desgaste físico
234 e/ou níveis elevados de marcadores indiretos de danos musculares, destacando-se a CK-MM
235 e CK-MB.

236 Antes da coleta de número 3, os alunos do COS realizaram a prova blutuação na
237 piscina com fuzil e mochila de 30 quilos nas costas. Na coleta 6, os alunos haviam finalizados
238 uma caminhada ininterrupta de 28km em terreno argiloso, carregando um mochila com média
239 de 30 quilos cada e finalizando-a em 12hs. Já anteriormente à coleta 9, os alunos realizaram
240 atividade de sobrevivencia na selva, durante 3 dias realizando longas caminhadas e aprendendo
241 a sobreviver em ambiente de selva, sendo tais atividades extremamente exaustivas, exigindo
242 bom desempenho físico, cognitivo e afetivo.

243 A Figura 1 demonstra os níveis séricos de CK-MM e MB durante todo o curso,
244 destacando-se os níveis elevados destes nas coletas 2, 6 e 9, alcançando níveis até de 15 mil
245 U/L, nível 88 vezes acima do nível basal aceitável. Este dado confirma que o COS realiza
246 atividades com grande desgaste físico. Dentre estas, relacionamos algumas como provas de
247 resistência na natação com flutuação, caminhada de 28 km e sobrevivência na selva, onde,
248 além do esforço físico, os militares são submetidos a controle de água, alimentação e
249 elevadas temperaturas naturais da nossa região amazônica, com médias acima dos 35°C.

250 Os portadores (RX/XX) do polimorfismo GDF8 apresentaram níveis séricos menores
251 de CK-MM e MB, em comparação com os normais (Figura 2). Haidet *et al.* (2008) relatam
252 que o fator 8 de crescimento e diferenciação (miostatina) limita o crescimento da musculatura
253 esquelética e exerce diferentes funções como regular a produção miofibrilar da musculatura e
254 controlar a hipertrofia muscular.

255 Acreditamos que este evento ocorreu devido o polimorfismos do GDF8 intensificar a
256 hipertrofia muscular, diminuindo assim as lesões musculares e conseqüentemente os valores
257 séricos de CK conforme foi relatado por Dias (2011). No entanto, os portadores (RX/XX)
258 para ACTN3 apresentarem níveis séricos maiores de CK-MM e MB, em comparação com os
259 normais (Figura 3), sugerindo-nos que a alfa-actinina-2 se rompe mais facilmente quando
260 comparado com a alfa-actinina 3 (30).

261 Ao analisar os dados do gene ACTN3 verificou-se que na literatura indivíduos
262 homozigotos para o alelo 577RX não expressam a alfa-actinina-3 (27,30). Contudo, a
263 deficiência da alfa-actinina-3 não resulta em um fenótipo patológico, como distrofia muscular
264 ou miopatias (43), sugerindo que a isoforma ACTN2 (81% de homologia na sequência de
265 aminoácidos) poderia compensar a ausência da ACTN3 (30).

266 O ACTN3 é o gene que codifica a alfa-actinina-3, uma proteína pertencente ao
267 componente estrutural do músculo esquelético. Este polimorfismo é comum, estando presente

268 em cerca de 18 a 25% da população. Ele resulta na síntese de uma forma truncada e não
269 funcional de alfa-actinina-3. A deficiência de α -actinina-3 não resulta em nenhum efeito
270 fenotípico aparente, sugerindo que sua ausência é adequadamente compensada pela alfa-
271 actinina-2 expressa no músculo esquelético (19,49).

272 Porém, ainda que a deficiência da α -actinina-3 possa ser suprida pela isoforma-2 da α -
273 actinina, é provável que estas proteínas não desempenhem papéis totalmente compatíveis,
274 devido à conservação destas durante o processo evolutivo (19,49). Isto pode ser demonstrado
275 na Figura 1, já que os participantes portadores apresentaram níveis de CK-MM e MB maiores
276 que os selvagens.

277 Scott *et al.* (2010) já encontraram diferença no desempenho físico entre atletas
278 finalistas olímpicos de provas de curta distância americanos selvagens e atletas jamaicanos
279 portadores do polimorfismo ACTN3 , porém, Yang *et al.* (2007) não encontraram a mesma
280 relação entre atletas de resistência e populações africanas. Já no presente estudo a população
281 analisada apresentou diferenças significativas entre selvagens e portadores (RX/XX),
282 conforme demonstrado na Figura 3.

283 O gene ACTN3 está relacionado ao rendimento esportivo e vem sendo muito
284 estudado nos últimos tempos, mas considerando que já foram catalogados 239 genes
285 relacionados ao sucesso no esporte na atualidade (6), é preciso observar a combinação entre
286 genes para se avaliar a expressão fenotípica (37).

287 Enfatizamos que os militares que apresentam níveis mais elevados de CK-MM e MB
288 foram os portadores em heterozigose nos genes ACTN3 e GSTP1, conseguindo retornar seus
289 níveis de CK a níveis normais ou pouco acima da referência em menos de 24 horas.

290 Observa-se na Figura 4 que quando agrupados e comparados, os selvagens para os
291 genes ACTN3 e GDF8 e portadores para os mesmos, e correlacionados com CK-MM e CK-
292 MB, talvez o sinergismo exercido pela a rápida restauração muscular causada pelo

293 polimorfismo do GDF8 e o efeitos do polimorfismo do ACTN3 mantém-se a mesma média
294 dos níveis de CK-MM e MB para selvagens e portadores (RX/XX).

295 O polimorfismo AMPD1 (C34T) resulta em um códon de parada levando a
296 interrupção prematura da síntese desta proteína. Indivíduos homozigotos possuem atividade
297 enzimática inferior a 1% da encontrada nos indivíduos selvagens (12,39).

298 Nos portadores do SNP do gene AMPD1, a ressíntese de ATP muscular para o
299 perfeito desempenho das fibras musculares fica prejudicada, incluindo as envolvidas na
300 contração muscular. Uma vez que em contrações musculares, intensas e de curta duração, há
301 maior necessidade de ATP, fazendo com que exceda a capacidade da célula de ressíntese,
302 sendo um fator inibidor do processo contrátil, consequentemente componente característico
303 da fadiga muscular (34).

304 No entanto, em nosso trabalho (Figura 5) observou-se não haver diferenças
305 significativas de CK-MM e CK-MB entre portadores e normais para o gene AMPD1-C34T.
306 O mesmo ocorreu na resposta para as atividades físicas no COS. Todos militares,
307 independente da presença ou não do polimorfismo obtiveram bom desempenho na realização
308 dos exercícios.

309 Dias (2011) relata que nem todos os SNPs são reconhecidos como funcionais, logo,
310 um gene mutante pode não afetar o potencial da expressão de um gene ou a função da
311 proteína codificada. Sendo assim, dentre as quase 10 milhões de variantes genéticas
312 existentes, somente algumas delas poderiam influenciar um fenótipo específico.

313 A variante C34T do gene da AMP deaminase (AMPD1; cromossomo 1p13-p21) do
314 tipo *nonsense*, transição do nucleotídeo C/T na posição 34 do exon 2, resulta em um códon de
315 parada e, consequentemente, a interrupção prematura da síntese proteica. Indivíduos
316 homozigotos para o gene mutante (genótipo XX) apresentam atividade da enzima AMPD1
317 inferior a 1% da encontrada nos indivíduos selvagens (genótipo RR) (11).

318 Pelo fato de este gene estar envolvido na manutenção das necessidades energéticas da
319 musculatura esquelética durante atividade contrátil, a variante C34T do gene AMPD1 poderia
320 influenciar o desempenho físico em modalidades esportivas específicas (12,39).

321 No trabalho de Grealy *et al.* (2015), relatam a avaliação do perfil genético de genes
322 envolvidos com os fenótipos atléticos de *endurance* e triatletas, onde o AMPD1 foi o que
323 mais se destacou em estar presente nos atletas de elite durante a pesquisa. Isto sugere que este
324 gene pode promover um melhor desempenho esportivo.

325 Na Figura 6 observa-se a correlação do genótipo da GSTP1 (A341G no exon) com a
326 diminuição dos níveis de CK-MB, porém não apresentou a mesma correlação para CK-MM.
327 Uma vez que a CK-MB está mais correlacionada com a musculatura cardíaca, podemos
328 imaginar que este SNP possa influenciar em exercícios nos quais mantenha funcionamento
329 cardíaco intenso, principalmente de explosão física e não de longo tempo. Entendemos que
330 para esta confirmação temos que aumentar o N amostral, além de compararmos com
331 diferentes exercícios, fato que não tivemos no curso. No Figura 7 o genótipo da GSTP1-1
332 (C16T no íntrons) não apresentou correlação com CK-MM e MB.

333 Devido a pequenos traumas, níveis de algumas enzimas podem se apresentar
334 alteradas, as quais são reveladas pelo aumento de seus níveis no sangue. A CK é uma dessas
335 enzimas reveladas na injúria muscular, elevando-se nas primeiras 4 horas e permanecendo até
336 72 horas após a lesão (9,29).

337 Por outro lado, a CK-MB é uma isoforma da creatino quinase, presente especialmente
338 no infarto do miocárdio (5). Pode então apresentar aumentos discretos de CK-MB durante
339 exercícios intensos, trauma, rabdomiólise, distrofia muscular e miocítica nas 4 a 6 primeiras
340 horas após o trauma, permanecendo em níveis elevados por até 24 horas (21). Há dados que
341 demonstram que exercícios de elevada resistência contribuem mais para o aumento no nível
342 de CK-MM que outros exercícios (4,29).

343 Suzuki *et al.* (2002) demonstraram que os atletas que participaram de uma corrida de
344 resistência apresentaram níveis elevados de CK-MM após 24 horas, degradando em 48 horas,
345 enquanto os não atletas tiveram variação que refletiu em diferentes mudanças
346 histopatológicas, maiores danos musculares e apresentaram reparo e regeneração muscular
347 mais lenta. Com isso observou-se que os primeiros colocados em uma maratona mostraram
348 níveis menores antes e incrementaram menos a atividade da CK após a prova que os demais
349 participantes. Isto pode justificar os níveis encontrados de CK-MM nos participantes que não
350 concluíram o curso, indicando que talvez tais participantes não apresentassem desempenho
351 físico necessário para chegar ao termino do curso.

352 As concentrações séricas de CK, LDH, MHC, troponina-I e mioglobina são
353 comumente utilizados como indicativo de dano na membrana muscular, no entanto a CK é
354 frequentemente descrita como melhor marcador indireto, sobretudo após o exercício de força
355 ou outros exercícios que exijam ações predominantemente excêntricas (7,35).

356 Variações na atividade da CK diferem de acordo com as condições de realização do
357 exercício, carga de esforço, intensidade, duração, bem como do histórico de treinamento dos
358 atletas e de características físicas individuais. O dano muscular causado pelo exercício é
359 caracterizado pela diminuição na produção de força muscular, aumento da atividade sérica da
360 CK, rompimento de fibras musculares, inflamação e aumento na atividade de enzimas
361 proteolíticas (13).

362 Se a carga de exercício for repetida ao longo do tempo, o dano muscular é reduzido e
363 o atleta desenvolve uma adaptação dos músculos esqueléticos, caracterizada por uma redução
364 na liberação de CK para a corrente circulatória (13).

365 Além de condições como treinamento e dieta adequada, indivíduos que praticam
366 atividades profissionais de alta intensidade devem apresentar perfil genético favorável às

367 características associadas à sua modalidade, dentre estes, pode-se considerar atletas de elites,
368 maratonistas e, também, participantes militares do Curso de Operação na Selva.

369 Consequentemente, a análise de fatores genéticos, principalmente a análise de
370 polimorfismos de DNA, tem sido utilizada como uma nova abordagem para o entendimento
371 do rendimento esportivo, isto porque sequências diferenciadas nos genes podem influenciar a
372 expressão de proteínas e modificar características que alteram o desempenho esportivo
373 (36,41).

374 Alguns estudos demonstraram que certos polimorfismos de DNA podem possuir
375 relação com o rendimento esportivo, tanto em modalidades de curta duração e com elevada
376 demanda da força muscular, quanto em provas de longa duração, dependentes
377 primordialmente do metabolismo aeróbio (36,41,50).

378 Ao tratar do treinamento militar no Brasil, há escassez em trabalhos publicados
379 estudando esta população. Tais treinamentos possuem duras rotinas de exercícios associada a
380 condições desfavoráveis a praticá-los, com isso faz-se necessária a comparação do grupo
381 estudado com outros parecidos.

382 Trabalhos que relatam atletas de elite em provas de resistência e maratonas foram
383 utilizados nesta comparação, pois também possuem duras rotinas de exercício associado ao
384 bom desempenho esportivo. No entanto, quando comparado os participantes do COS como os
385 atletas de *endurance*, observa-se nos dois que em decorrência da indução do aumento da
386 densidade mitocondrial e capilar, dos níveis de mioglobina intramuscular, de enzimas e da
387 cadeia de transporte de elétrons, assim como da capacidade máxima aeróbica, existe
388 diminuição de fibras musculares, impactando negativamente na força e potência muscular
389 (15).

390

391

392 Conclusão

393 Todos os marcadores indicadores de lesão muscular aumentaram significativamente após o
394 exercício ($p < 0,01$). Os níveis de CK- MM e MB foram 88 % e 12%, respectivamente,
395 acima dos valores basais nas coletas 2,6 e 9. O polimorfismo ACTN3-R577X esteve
396 associado ao aumento dos níveis de CK-MM e CK-MB nos militares após exercícios físicos
397 de alta intensidade enquanto o polimorfismo GDF8-C2T esteve associado à diminuição dos
398 níveis de CK-MM e CK. Diferenças estatisticamente significante ($p < 0,01$) entre as
399 concentrações de CK-MB foram demonstradas em militares portadores do SNP GSTP1-
400 A341G. Não houve aumentos significativos nas enzimas ureia e creatinina, marcadores da
401 função renal.

402

403 Referências

- 404 1. Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides
405 conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.*1997; 25: 2657–60.
- 406 2. Ahmetov II, Druzhevskaya AM, Lyubaeva, EV, Popov DV, Vinogradova, OL, Williams,
407 AG. The dependence of preferred competitive racing distance on muscle fibre type
408 composition and ACTN3 genotype. *Exp. Physiol.* 2011; 96(12):1302-10.
- 409 3. Bailey JN, Wilson S, Brown-Gentry K, Goodloe R, Crawford DC. Kidney disease genetics
410 and the importance of diversity in precision medicine. *Pac Symp Biocomput.* 2016; 21: 285-
411 96.
- 412 4. Baird MF, Graham SM, Baker JS, Bickerstaff, GF. Creatine kinase and exercise related
413 muscle damage implications for muscle performance and recovery. *Journal of Nutrition and*
414 *Metabolism.* 2012; 2012:1-13.

- 415 5. Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring sport medicine. *Br*
416 *Med Bull.* 2007; 81-82(1): 209-30.
- 417 6. Bray MS, Hagberg JM, Perusse L, Rankinen T, Roth SM, Wolfarth B, Bouchard C. The in
418 Human Gene Map for Performance and Health-Related Fitness Phenotypes. *Med. Sci. Sports*
419 *Exerc.* 2009; 41(1): 34-72.
- 420 7. Clarkson PM, Hubal MJ. Exercise-induce Muscle Damage in Humans. *Am J Phys Rehabil.*
421 2002; 81: 52- 69.
- 422 8. Colares VS, Titan SM, Pereira AC, Malafronte P, Cardena MM, Santos S, Santos PC,
423 Fridman C, Barros RT, Woronik V. MYH9 and APOL1 gene polymorphisms and the risk of
424 CKD in patients with lupus nephritis from an admixture population. *Plos One.* 2014;
425 9(3):e87716.
- 426 9. Cruzat VF, Rogero MM, Borges MC, Tirapegui J. Current aspects about oxidative stress,
427 physical exercise and supplementation. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 2007;
428 13(5): 304-10.
- 429 10. Deuster PA, Contreras-Sesvold CL, O'connor, FG, Campbell WW, Kenney K,
430 Capacchione JF, Landau ME, Muldoon SM, Rushing EJ, Heled Y. Genetic polymorphisms
431 associated with exertional rhabdomyolysis. *Eur J Appl Physiol.* 2013; 113(8):1997-2004.
- 432 11. Dias RG. Genética, performance física humana e doping genético: o senso comum versus
433 a realidade científica. *Rev Bras Med Esporte.* 2011; 17(1): 62-70.
- 434 12. Dias RG, Pereira AC, Negrão CEE, Krieger JE. Polimorfismos genéticos determinantes
435 da performance física em atletas de elite. *Revista Brasileira Medicina do Esporte.* 2007;
436 13(3):209-216.
- 437 13. Echegaray M, Rivera MA. Role of creatine kinase isoenzymes on muscular and
438 cardiorespiratory endurance. *Genetic and molecular evidence. Sports Med.* 2001; 31(13):
439 919-34.

- 440 14. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International*
441 *Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005; 37: 1974-84.
- 442 15. Glowacki SP, Martin SE, Maurer A, Baek W, Green JS. Effects of resistance, endurance,
443 and concurrent exercise on training outcomes in men. *Med Sci Sports Exerc*. 2004; 36(12):
444 2119-27.
- 445 16. Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS) Web Site [Internet]. Gonçalves
446 EAPE, Goldoni F. Rabdomiólise: Rotinas Clínicas em Urgência e Emergência no HRMS;
447 [cited 2015 Nov 2]. Available from:
448 <http://www.hrms.ms.gov.br/control/ShowFile.php?id=83067>.
- 449 17. Grealy R, Herruer J, Smith CLE, Hiller D, Haseler LJ, Griffiths LR. Evaluation of a 7-
450 Gene Genetic Profile for Athletic Endurance Phenotype in Ironman Championship
451 Triathletes. *Plos One*. 2015; 10(12): e0145171.
- 452 18. Haidet AM, Rizo L, Handy C, Umapathi P, Eagle A, Shilling C. Long-term enhancement
453 of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors.
454 *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105: 4318-22.
- 455 19. Heffernan SM, Kilduff LP, Erskine RM, Day SH, McPhee JS, McMahon GE, Stebbings
456 GK, Neale JP, Lockey SJ, Ribbans WJ, Cook CJ, Vance B, Raleigh SM, Roberts C, Bennett
457 MA, Wang G, Collins M, Pitsiladis YP, Williams AG. Association of ACTN3 R577X but not
458 ACE I/D gene variants with elite rugby union player status and playing position. *Physiol*
459 *Genomics*. 2016, 48(3):196-201.
- 460 20. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time
461 monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993; 11(8):1026-30.
- 462 21. Ispirlidis I, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Michailidis I, Douroudos I,
463 Margonis K, Chatzinikolaou A, Kalistratos E, Katrabasas I, Alexiou V, Taxildaris K. Time-

- 464 course of changes in inflammatory and performance responses following a soccer game. *Clin*
465 *J Sport Med.* 2008, 18(5): 423-31.
- 466 22. Jois-Bilowich P, Tyndall JA. Cardiacbiomarkers: how to use them wisely. *Emergency*
467 *Medicine Reports.* 2010; 31(3): 25-36.
- 468 23. Lahoria R, Winder TL, Lui J, Al-Owain MA, Milone M. Novel ANO 5 homozygous
469 microdeletion causing myalgia and unprovoked rhabdomyolysis in an Arabic man. *Muscle*
470 *Nerve.* 2014; 50(4):610-3.
- 471 24. Lazarim FL, Antunes-Neto JM, Da Silva FO, Nunes LA, Bassini-Cameron A, Cameron
472 LC. The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the
473 Brazilian National Championship. *J Sci Med Sport.* 2009; 12: 85-90.
- 474 25. Lindberg C, Sixt C, Oldfors A. Episodes of exercise-induced dark urine and myalgia in
475 LGMD 2I. *Acta Neurol Scand.* 2012; 125(4):285-7.
- 476 26. Lopes GC, Costa LPDA. Rabdomiólise induzida pelo exercício: biomarcadores,
477 mecanismos fisiopatológicos e possibilidades terapêuticas. *Revista HUPE.* 2013; 12(4): 59-
478 65.
- 479 27. Macarthur DG, North KN. ACTN3: A genetic influence on muscle function and athletic
480 performance. *Exerc. Sport. Sci. Rev.* 2007; 35(1): 30-34.
- 481 28. Mathews KD, Stephan CM, Laubenthal K, Winder TL, Michele DE, Moore SA,
482 Campbell KP. Myoglobinuria and muscle pain are common in patients with limb-girdle
483 muscular dystrophy 2I. *Neurology.* 2011; 76(2):194-195.
- 484 29. Mckune AJ, Semple SJ, Peters-Future EM. Acute exercise-induced muscle injury. *Biol.*
485 *Sport.* 2012; 29: 3-10.
- 486 30. Mills M, Yang N, Weinberger R, Vander Woude DL, Beggs AH, Eastal S, North K.
487 Differential expression of the actin-binding proteins, alphaactinin-2 and-3, in different

- 488 species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10
489 1335-46.
- 490 31. Montero J, Lovesio C, Godoy Mv, Ruiz G. Rabdomiólise por spinning en nueve
491 pacientes. *Medicina.* 2009, 9(1):153-6.
- 492 32. Musumeci O, Brady S, Rodolico C, Ciranni A, Montagnese F, Aguenouz M, Kirk R,
493 Allen E, Godfrey R, Romeo S, Murphy E, Rahman, S, Quinlivan R, Toscano A. Recurrent
494 rhabdomyolysis due to muscle β -enolase deficiency: very rare or underestimated? *J Neurol.*
495 2014; 261(12): 2424-8.
- 496 33. Nader GA. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together.
497 *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 37(10): 1985-96.
- 498 34. Norman B, Sabina RL, Jansson E. Regulation of skeletal muscle ATP catabolism by
499 AMPD1 genotype during sprint exercise in asymptomatic subjects. *J Appl Physiol.* 2001; 91:
500 258-64.
- 501 35. Nosaka K, Newton M, Sacco P, Chapman D, Lavender A. Partial protection against
502 muscle damage by eccentric actions at short muscle lengths. *Med Sci Sports Exerc.* 2005; 37:
503 746-753.
- 504 36. Ostrander EA, Huson HJ, Ostrander GK. Genetics of athletic performance. *Annu Rev*
505 *Genomics Hum Genet.* 2009; 10: 407-29.
- 506 37. Pimenta EM, Coelho DB, Cruz IR, Morandi RF, Veneroso CE, De Azambuja Pussieldi
507 G, Carvalho MR, Silami-Garcia E, De Paz Fernández JA. The ACTN3 genotype in soccer
508 players in response to acute eccentric training. *Eur J Appl Physiol.* 2011; 112(4): 1495-503.
- 509 38. Plebani M. Skeletal muscle biomarkers: not new but still interesting diagnostic tools. *Clin*
510 *Chem Lab Med.* 2010; 48(6): 745-6.
- 511 39. Rebbeck TR, Spitz M, Wu X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene
512 association studies. *Nat Rev Genet.* 2014; 5: 589-97.

- 513 40. Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM, Macedo JM, Medina R, Neto JF. Frequencies of
514 GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res.*
515 2002; 1(3): 233-40.
- 516 41. Ruiz Jr, Buxens A, Artieda M, Arteta D, Santiago C, Rodríguez-Romo G. The 174 G/C
517 polymorphism of the IL6 gene is associated with elite Power performance. *J Sci Med Sport.*
518 2009; 13(5): 549-53.
- 519 42. Scott RA, Irving R, Irwin L, Morrison E, Charlton V, Austin K, Tladi D, Deason M,
520 Headley SA, Kolkhorst FW, Yang N, North K, Pitsiladis YP. ACTN3 and ACE genotypes in
521 elite Jamaican and US sprinters. *Med Sci Sports Exerc.* 2010; 42(1): 107-12.
- 522 43. Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. Human skeletal muscle fiber type
523 classifications. *Phys. Ther.* 2001; 81: 1810-6.
- 524 44. Suzuki IM, Tairyoku KAG, Varlet-Marie MASO, Lac G. Exercise and serum enzymes:
525 Hemorheological disturbances in the overtraining syndrome. *Clinical hemorheology and*
526 *microcirculation. Amsterdam.* 2004; 30(3-4): 211-218.
- 527 45. Tsianos GI, Evangelou E, Boot A, Zillikens MC, Van Meurs JBJ, Uitterlinden AG,
528 Ioannidis JPA. Associations of polymorphisms of eight muscle- or metabolism-related genes
529 with performance in Mount Olympus marathon runners. *Appl Physiol.* 2010; 108: 567-574.
- 530 46. Vainzof M. Estudos moleculares e protéicos nas miopatia congênitas e distrofias
531 musculares progressivas (Thesis). Instituto de Biociências: Universidade de São Paulo; 2006.
- 532 47. Van Adel BA, Tarnopolsky MA. Metabolic myopathies: update 2009. *J Clin*
533 *Neuromuscul Dis.* 2009; 10(3):97-121.
- 534 48. Vicari P, Duch CR, Shimmoto MMA, Noguti MAE, Figueiredo MS. Genetic
535 polymorphisms of glutathione S-transferase mu1 and theta 1 in patients with acquired aplastic
536 anemia: A Brazilian experience. *Rev. Bras. Hematol Hemoter.* 2007; 29(4): 344-345.

- 537 49. Virel A, Backman L. Molecular evolution and structure of alpha-actinin. *Mol Biol Evol.*
 538 2004; 21(6): 1024-31.
- 539 50. Wolfarth B, Bouchard C. The in Human Gene Map for Performance and Health-Related
 540 Fitness Phenotypes: The 2006-2007 Update. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 2009; 41(1):34-72.
- 541 51. Yang N, Bailey ME. Association analysis of the ACTN3 R577X polymorphism and
 542 complex quantitative body composition and performance phenotypes in adolescent Greeks.
 543 *Eur J Hum Genet.* 2007; 15: 88–93.
- 544 52. Yang N, Macarthur DG, Gulbin JP. ACTN3 genotype is associated with human elite
 545 athletic performance. *Am J Hum Genet.* 2003; 73: 627–31.

546

547 Tabelas e Figuras

548

549 Tabela 1: Polimorfismos avaliados em militares participantes do COS.

GENES	SNP
ACTN3	rs 1815739 (C1747T)
GDF8	rs 1805086 (C2T)
MLC	rs 146346546 (C49T)
AMPD1	rs 17602729 (C34T)
FKRP	rs 114491682 (A19G)
MYH9	rs 113698937 (A22G)
GSTP1	rs 1871042(A341G)
GSTP1-1	rs 1695 (C16T)

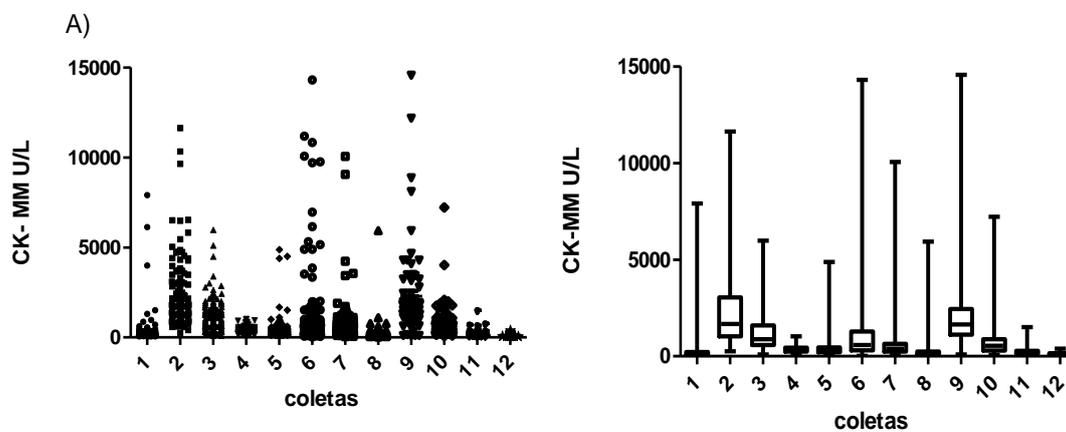
550

551 Tabela 2: Frequência dos polimorfismos, divididos em selvagens e portadores
 552 (heterozigose/homozigose), dos alunos que iniciaram e finalizaram o Curso de Operações na
 553 Selva.

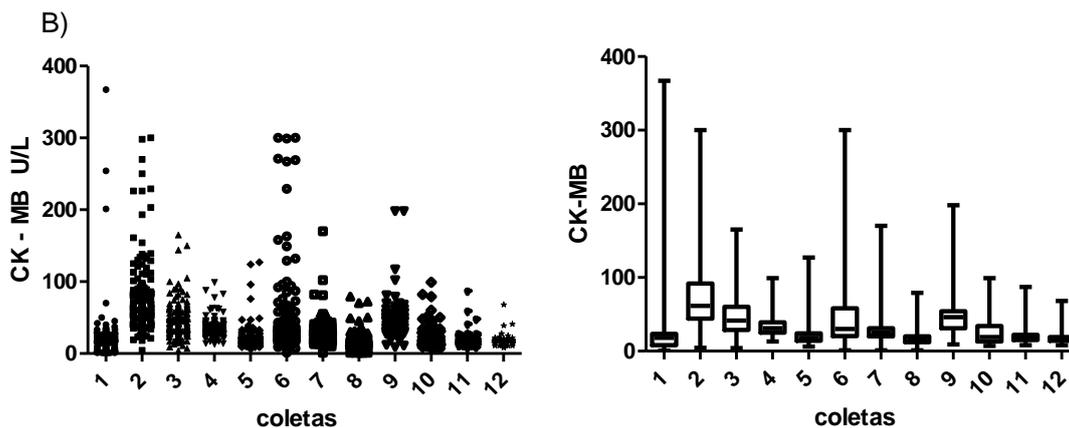
POLIMORFISMO	INICIANTES		FINALISTAS	
	SELVAGEM (%)	PORTADOR (%)	SELVAGEM (%)	PORTADOR (%)
MLCK - C49T	233 (100)	0(0)	99 (100)	-
ACTN3 - C1747T	46 (19,7)	187(80,2)	5(5,06)	94 (94,94)
GDF8 - C2T	201 (86,3)	32(13,7)	86 (86,87)	13 (13,13)
FKRP - A19G	230 (98,7)	3(1,3)	99 (100)	-
AMPD1- C34T	191 (82)	42(18)	83 (83,84)	16 (16,16)
MYH9 - A22G	228 (97,9)	5(2,1)	99 (100)	-
GSTP1- A341G	91 (39,1)	142(60,9)	31 (31,31)	68 (68,69)
GSTP1/1- C16T	127 (54,5)	106 (45,5)	48 (48,48)	51 (51,52)

554

555



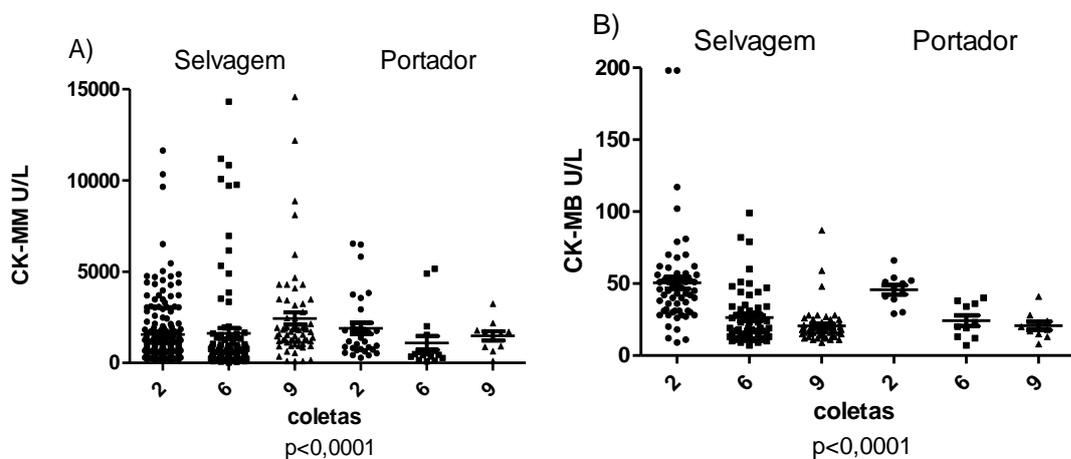
556



557
 558 Figura 1: A) Médias \pm Desvio Padrão, por coleta, dos níveis de CK-MM dos alunos
 559 participantes do Curso de Operações na Selva. B) Médias \pm Desvio Padrão, por coleta, dos
 560 níveis de CK-MB dos alunos participantes do Curso de Operações na Selva.

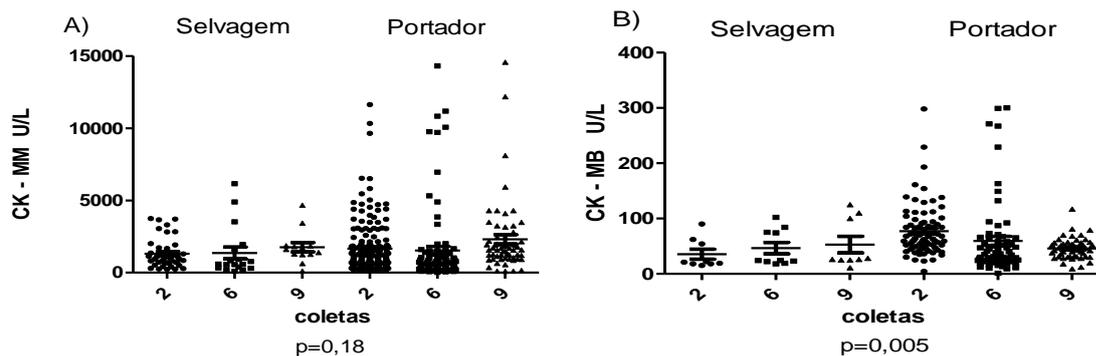
561

562



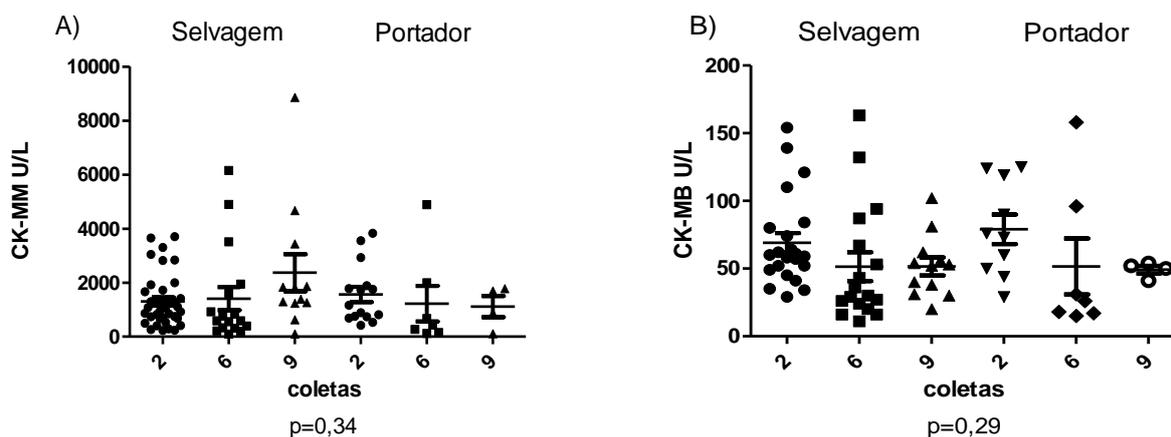
563
 564 Figura 2: A) Correlação dos militares selvagens e portadores (heterozigose / homozigose) do
 565 SNP do gene GDF8(C2T) com os níveis de CK-MM nas coletas 2,6,9. B) Correlação dos
 566 militares selvagens e portadores (heterozigose / homozigose) do SNP do gene GDF8(C2T)
 567 com os níveis de CK-MB nas coletas 2,6,9.

568



569

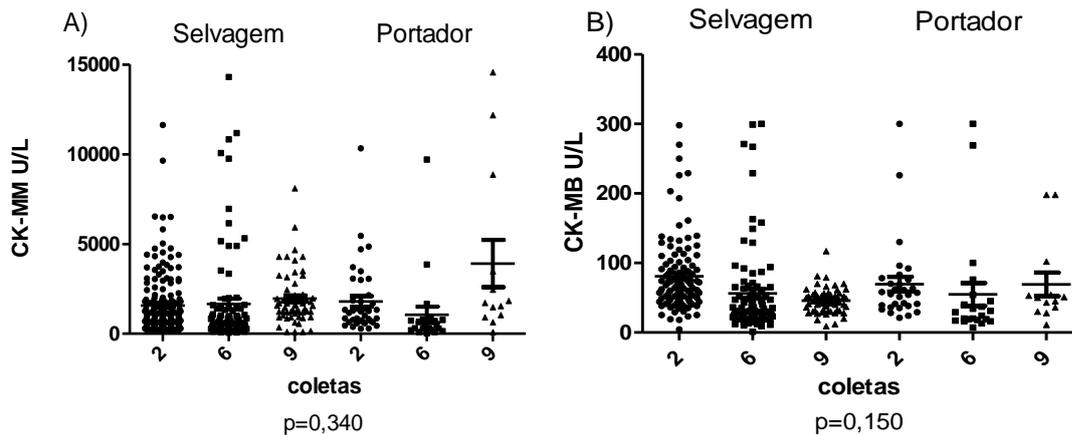
570 Figura 3: A) Correlação dos militares selvagens e portadores (heterozigose / homozigose) do
 571 SNP do gene ACTN3(C1747T) com os níveis de CK-MM nas coletas 2,6,9.B) Correlação
 572 dos militares selvagens e portadores (heterozigose / homozigose) do SNP do gene
 573 ACTN3(C1747T) com os níveis de CK-MB nas coletas 2,6,9.



574

575 Figura 4: A) Correlação dos militares selvagens e portadores (heterozigose / homozigose) do
 576 SNP dos genes GDF8(C2T)/ACTN3(C1747T) concomitantemente, com os níveis de CK-
 577 MM nas coletas 2,6,9.B) Correlação dos militares selvagens e portadores (heterozigose /
 578 homozigose) do SNP dos genes GDF8(C2T) / ACTN3(C1747T), concomitantemente, com os
 579 níveis de CK-MB nas coletas 2,6,9.

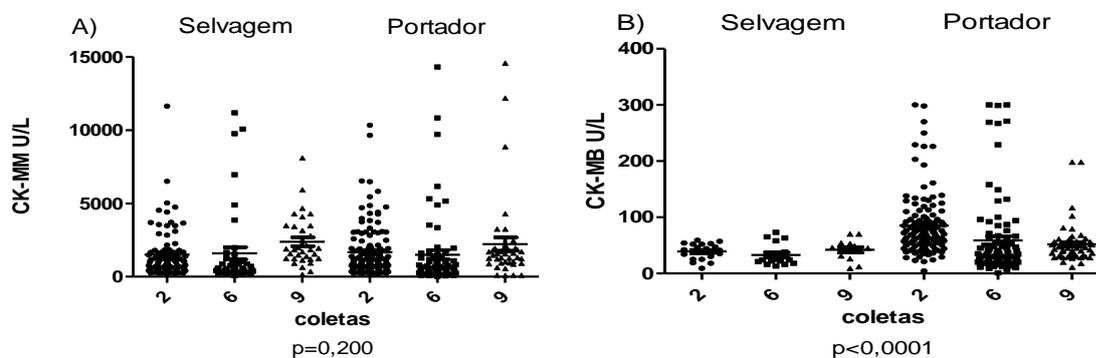
580



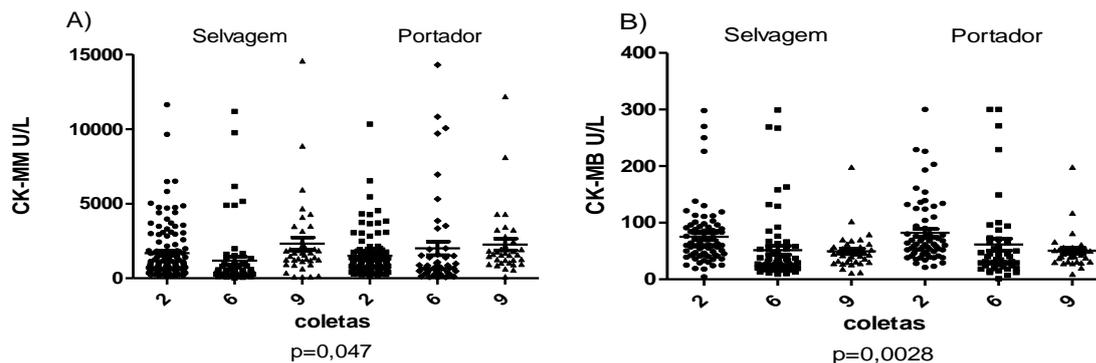
581
 582 Figura 5: A) Correlação dos militares selvagens e portadores (heterozigose / homozigose) do
 583 SNP do gene AMPD1(C34T) com os níveis de CK-MM nas coletas 2,6,9.B) Correlação dos
 584 militares selvagens e portadores (heterozigose / homozigose) do SNP do gene
 585 AMPD1(C34T) com os níveis de CK-MB nas coletas 2,6,9.

586

587



588
 589 Figura 6: A) Correlação dos militares selvagens e portadores (heterozigose / homozigose) do
 590 SNP do gene GSTP1(A341G) com os níveis de CK-MM nas coletas 2,6,9.B) Correlação dos
 591 militares selvagens e portadores (heterozigose / homozigose) do SNP do gene
 592 GSTP1(A341G) com os níveis de CK-MB nas coletas 2,6,9.



593

594 Figura 7: A) Correlação dos militares selvagens e portadores (heterozigose / homozigose) do
595 SNP do gene GSTP1-1(C16T) com os níveis de CK-MM nas coletas 2,6,9.B) Correlação dos
596 militares selvagens e portadores (heterozigose / homozigose) do SNP do gene GSTP1(C16T)
597 com os níveis de CK-MB nas coletas 2,6,9.

598

599

600

RABDOMIÓLISE APÓS CONSUMO DE COCAÍNA - RELATO DE CASO

Resumo

Avaliação clínica e dosagens bioquímicas foram realizadas em um soldado do Exército Brasileiro após ter sido atendido no setor de emergência do Hospital Militar de Área de Manaus – HMAM. O referido militar havia consumido aproximadamente seis gramas de cocaína. Quando dosados no soro, marcadores indiretos de lise muscular apresentaram aumento significativo, o nível sérico de creatina quinase fração MM (CK) elevou-se a 99.500 U/L e o de creatina quinase fração MB (CK-MB) a 6.500 U/L. Foram observadas, também, alterações eletrolíticas, como aumento de sódio (1.730 mmol/L), potássio (42.1 mmol/L), fósforo (48.3 mg/dl), cloro (1.243 mmol/L) e magnésio (36.1 mg/dl); alterações nas funções renais, como aumento da ureia (302.6 mg/dl) e creatinina (11.1 mg/dl); e ainda apresentou aumento das dosagens de albumina (33.4 g/dl) e lactato desidrogenase-LDH (22.545 U/L). Exames qualitativos, troponina e mioglobina, apresentaram resultados positivos. O soldado permaneceu cinco dias internado na Unidade de Terapia Intensiva - UTI. O consumo de cocaína causou desequilíbrio eletrolítico e lise muscular levando a síndrome Rabdomiólise, após tratamento adequado o militar apresentou ótima melhora clínica obtendo alta no quinto dia.

Palavras Chave: rabdomiólise, cocaína, militar.

Abstract

Clinical and biochemical measurements were performed on a Brazilian Army soldier after being treated at the emergency department of the Military Hospital of Manaus Area - Hmam, the military said had consumed about six grams of cocaine. When measured in serum, indirect markers of muscle lysis showed a significant increase, the level of serum creatine kinase fraction MM (CK) amounted to 99,500 U / L and creatine kinase MB fraction (CK-MB) to 6,500 U / L . Were observed, also, electrolyte changes, such as increasing sodium (1.730 mmol / L), potassium (42.1 mmol / l), phosphorus (48.3 mg / dl), chlorine (1.243 mmol / L) and magnesium (36.1 mg / dl) ; changes in kidney function such as increased urea (302.6 mg / dl) and creatinine (11.1 mg / dL); and also presented higher dosages of albumin (33.4 g / dl) and lactate dehydrogenase LDH (22,545 U / l). Quality tests, troponin and myoglobin, showed positive results. The soldier remained five days hospitalized in the Intensive Care Unit - ICU. Cocaine use has caused electrolyte imbalance and muscle leading to lysis Rhabdomyolysis, after adequate military treatment showed excellent clinical improvement was discharged on the fifth day.

Keywords: rhabdomyolysis, cocaine, military.

Introdução

A rabdomiólise é uma síndrome clínica decorrente da lesão do músculo esquelético e da liberação de substâncias potencialmente tóxicas na circulação sanguínea. A gravidade da rabdomiólise varia amplamente, podendo causar alterações eletrolíticas, elevação assintomática de enzimas musculares e até complicações potencialmente mortais, como a insuficiência renal aguda (Montero, Lovesio, Godoy & Ruiz, 2009).

A etiologia da rabdomiólise é multifatorial, podendo ser causada por substâncias tóxicas; trauma ou lesão direta; atividade muscular excessiva; defeitos de enzimas musculares hereditárias ou por outras causas médicas menos óbvias (Cervellin, Comelli & Lippi et al., 2010; Desjardins & Strange, 2012).

Apesar do fato da etiologia da rabdomiólise ser numerosa, a via patogênica final é comum, caracterizada por um aumento de eletrólitos livre no citoplasma. O aumento destes eletrólitos inicia uma reação em cadeia, que leva à destruição das células musculares. O principal objetivo terapêutico é reconhecer e tratar as complicações o mais rápido possível, resguardando as funções renais (Giannoglou et al., 2007; Ronald, Allison, & Bedsole, 2003;).

O diagnóstico de rabdomiólise depende do reconhecimento de sintomas, como dor muscular, fraqueza, presença ou o histórico de urina vermelho a marrom (mioglobínúria), elevações de curto prazo da creatinoquinase, que não sejam atribuíveis ao infarto do miocárdio, ou à miopatias inflamatórias (Mrkobrada, & Gnanakumar, 2014; Musumeci et al., 2014).

Relato Clínico

Homem, soldado, 19 anos de idade, atendido no setor de emergência do Hospital Militar de Área de Manaus - HMAM, Manaus, Amazonas, no mês de agosto de 2014. O militar relatou sintomas de confusão mental, náuseas, taquicardia, sudorese, fadiga, anúria e dormência nos membros inferiores; ao ser indagado pelo médico, informou que havia consumido aproximadamente 6 gramas de cocaína nas últimas 12 horas.

O médico solicitou a realização dos seguintes exames: creatinoquinase fração MM, creatinoquinase fração MB, lactato desidrogenase, uréia, creatinina, sódio, potássio, magnésio, fósforo, cloro, albumina, troponina, mioglobina e eletrocardiograma.

Como medida preventiva foi administrado 500ml de soro fisiológico 0,9% enquanto eram realizados os exames, após aproximadamente 20 minutos do atendimento médico, o soldado desmaiou e então foi encaminhado à Unidade Intensiva de Tratamento (UTI), onde permaneceu durante 5 dias.

O resultado do eletrocardiograma apresentou parâmetros dentro da normalidade, descartando qualquer problema cardíaco. Após o soldado recuperar os sentidos, o médico intensivista aferiu sua pressão arterial que estava 160/12 mmHg, o pulso 103/mn, observou palidez na pele e mucosas, língua seca e na auscultação cardíaca apresentou arritmia. Ao avaliar o resultado dos exames (Figura 1 e Tabela 1), prescreveu os seguintes medicamentos:

Iniciou-se o tratamento (tabela 2) com soro fisiológico a 0,9% para hidratação e Manitol para aumentar a diurese, o que conseqüentemente aumentou o fluxo sanguíneo renal da filtração glomerular e diminuiu a formação de cilindros oclusivos.

Logo após administrou-se Diazepam 0,5mg para deprimir o sistema nervoso central, aliviando condições musculoesqueléticas agudas e dolorosas e diminuindo espasmos musculares. Cloridrato de Verapamil foi administrado para diminuir a pressão arterial e melhorar a oxigenação e relaxamento do músculo cardíaco.

A Metoclopramida foi utilizada para diminuir náuseas e evitar vômitos. Com o intuito de amenizar a dor foi administrada dipirona sódica, por ser um potente analgésico e antipirético que possui propriedade antiespasmódica.

O soldado negou atividade física intensa nos últimos dias, traumas e uso de medicamentos. Apesar de ter utilizado drogas anteriormente, negou ter sentido estes sintomas relatados.

Discussão

A nomenclatura cocaína refere-se aos sais de cocaína que são pertencentes à classe dos alcaloides, obtidos a partir das folhas da planta *Erythroxylum coca* (Lyra, 2014). Dentre seus produtos o cloridrato de cocaína e o sulfato de cocaína são os dois produtos mais puros do processo de refinação da coca. Os sais de cocaína são termorresistentes, pouco voláteis e seu ponto de fusão é de 190°C. São conhecidos popularmente como “pó”, “talco”, “neve”, “farinha”, “branquinha” (Martins-Costa et al., 2013; Siqueira, Fabri & Fabri, 2011).

Dependendo da forma como se encontra a cocaína processada, esta pode ser utilizada de acordo suas propriedades físicas. Características como seu baixo ponto de combustão e alta solubilidade em água indica alta taxa de absorção em áreas de mucosa a exemplo pelas vias intranasal e endovenosa, estas se referem à forma de sais de cocaína, já a substância de base livre, que corresponde ao crack, possui alto ponto de combustão e baixa solubilidade em água, assim sendo utilizado geralmente pela via inalatória (Martins-Costa et al., 2013).

As maiorias das vias de administração absorvem bem a cocaína, logo, essas vias determinam a velocidade com que se produz o começo de sua ação, sua concentração sanguínea e a duração do efeito de euforia da droga. Os efeitos psicoativos têm início mais rápido quando esta é administrada por via intravenosa e inalatória, comparado à administração oral e intranasal. Os sais de cocaína são muito difusíveis em água e termolábeis, permitindo sua fácil absorção pela mucosa nasal (Conceição, et al., 2014; Crespo-Fernández & Rodríguez, 2007).

O início dos efeitos psicoativos produzidos pela cocaína demora entre oito segundos e 30 minutos e permanecem por cinco a 90 minutos, a duração do efeito da cocaína via intravenosa e fumada é menor, o que implica que o consumidor tem que administrar várias doses para alcançar um estado intenso de euforia. A injeção intravenosa e a inalação de cocaína produzem níveis máximos de concentração no plasma depois de três

a cinco e um a três minutos da administração, respectivamente (Crespo-Fernández & Rodríguez, 2007; Brasil, 2012).

A meia vida de seus metabólitos duram entre 4 e 6 horas e é maior do que a da cocaína livre, que é de aproximadamente 60 minutos (Corrêa *et al.*, 2014). A concentração encontrada no sangue corresponde fielmente à quantidade exposta aos receptores. Exames de sangue, cabelo e urina podem ser realizados para verificar o uso de cocaína. O teste toxicológico urinário detecta de 4 a 48 horas após a o consumo da cocaína (Corrêa, Oliveira, Assis, & Barros, 2014; Guollo, Narciso-Schiavon, Barotto, Zannin & Schiavon, 2015).

Conforme demonstrado neste relato o consumo de cocaína provoca necrose das células do músculo esquelético, liberando constituintes celulares na circulação podendo causar rabdomiólise. As alterações laboratoriais e manifestações clínicas vão desde casos assintomáticos ou elevações das enzimas musculares, sem repercussões clínicas significativas, até episódios complicados de insuficiência renal grave ou, mesmo, de arritmias ventriculares devido a alterações metabólicas e hidroeletrólíticas (Carvalho, Raposo, João, & Namora, 2002; Clark, Manini, Can, 2016).

Amaral (2015) descreve que o estiramento muscular ou o esforço excessivo levam à entrada de sódio para o interior da célula e, secundariamente, tem-se o edema e à morte desta. Por outro lado, dá-se um influxo de cálcio para o seu interior, devido a troca com o sódio, o que provoca uma contração muscular persistente com conseqüente perda de energia e morte celular.

O excessivo edema celular, sobretudo durante a reperfusão de zonas traumatizadas, condiciona grandes aumentos de volume muscular de desidrogenase láctica (DHL) e creatino quinase (CK). O aparecimento de mioglobina elevada e de mioglobinúria, conjugado com a acidose metabólica, que surge em conseqüência da liberação de ácidos orgânicos das células necrosadas e de ácido láctico durante a hipoxia celular, vai determinar a precipitação dos cristais de ácido úrico e de mioglobina nos túbulos renais (Carvalho *et al.*, 2002; Amaral, 2015).

Para o diagnóstico da rabdomiólise, são dosados marcadores indiretos de danos musculares devido ao baixo custo. As enzimas creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), troponina e mioglobina são frequentemente utilizadas como marcadores de dano muscular, isso porque essas moléculas são citoplasmáticas e não têm a capacidade de atravessar a barreira da membrana sarcoplasmática (Bulle *et al.*, 2015).

Dentre essas enzimas, a CK é frequentemente descrita como melhor marcador indireto de dano ao tecido muscular, sobretudo para diagnóstico tardio da rabdomiólise. Além disso, deve-se verificar a presença de hipercalcemia, hiperuricemia e hiperfosfatemia. (Scalco *et al.*, 2015). O principal objetivo terapêutico é reconhecer e tratar as complicações o mais rápido possível, especialmente em distúrbios eletrolíticos e na insuficiência renal aguda (Bulle *et al.*, 2015).

Conforme descrito neste caso clínico, o paciente apresentou um quadro de rabdomiólise após consumo de grande quantidade de cocaína. Ao ser avaliado pelo médico

plantonista, o mesmo relatou sintomas característicos de Rabdomiólise e para que pudesse confirmar e avaliar o quadro clínico, o médico solicitou diversos exames. Conforme apresentado acima, níveis extremamente altos de CK, CK-MB e LDH são estabelecidos como marcadores de lise muscular, que em um quadro de rabdomiólise podem ser detectados no sangue. (Bulle, et al., 2015; Pompermayer, 2015; Scalco, et al., 2015).

O paciente obteve alta médica no quinto dia, mas muitos casos acabam em óbito, por ser uma síndrome multifatorial, pela ausência de um marcador específico para lise muscular e por vezes ser confundindo com doenças cardiológicas, fazendo com que o diagnóstico seja mais difícil.

Devido à sua grande complexidade, ainda são utilizados marcadores indiretos para diagnóstico não havendo marcador genético ou bioquímico específico que caracterize a rabdomiólise. Com o avanço da ciência, pesquisas estão sendo realizadas para identificar marcadores diretos de lise muscular, a fim de se ter um recurso mais eficaz na sua identificação.

Referências Bibliográficas

Amaral, M. D. da C. S. (2015) *Utilização terapêutica das estatinas: indicações, novas perspectivas e efeitos laterais a curto e longo prazo*. Porto: Portugal.

Bulle, D. J., Vitalis, R., Paza, L., Silva, R. da., Santos, C.E. dos, & Renner, J. D. (2015). Estudo caso controle de alterações de creatinofosfoquinase em usuários de um laboratório do interior do rio grande do sul. *Revista Cinergis*, 16, (2). doi.org/10.17058/cinergis.v16i2.6104 .

Carvalho, A., Raposo, J. N., João, A., & Namora, J. (2002). Rabdomiólise – breve revisão, a propósito de um caso. *Medicina Interna*, 9, (2).

Cervellin, G., Comelli, I., & Lippi, G. (2010). Rhabdomyolysis: historical background, clinical, diagnostic and therapeutic features. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48, (6), 749-756, doi 10.1515/CCLM.2010.151.

Clark, B.C. & Manini, T. M. (2016). Can KAATSU exercise cause Rhabdomyolysis?. *Clinical Journal of Sport Medicine*.

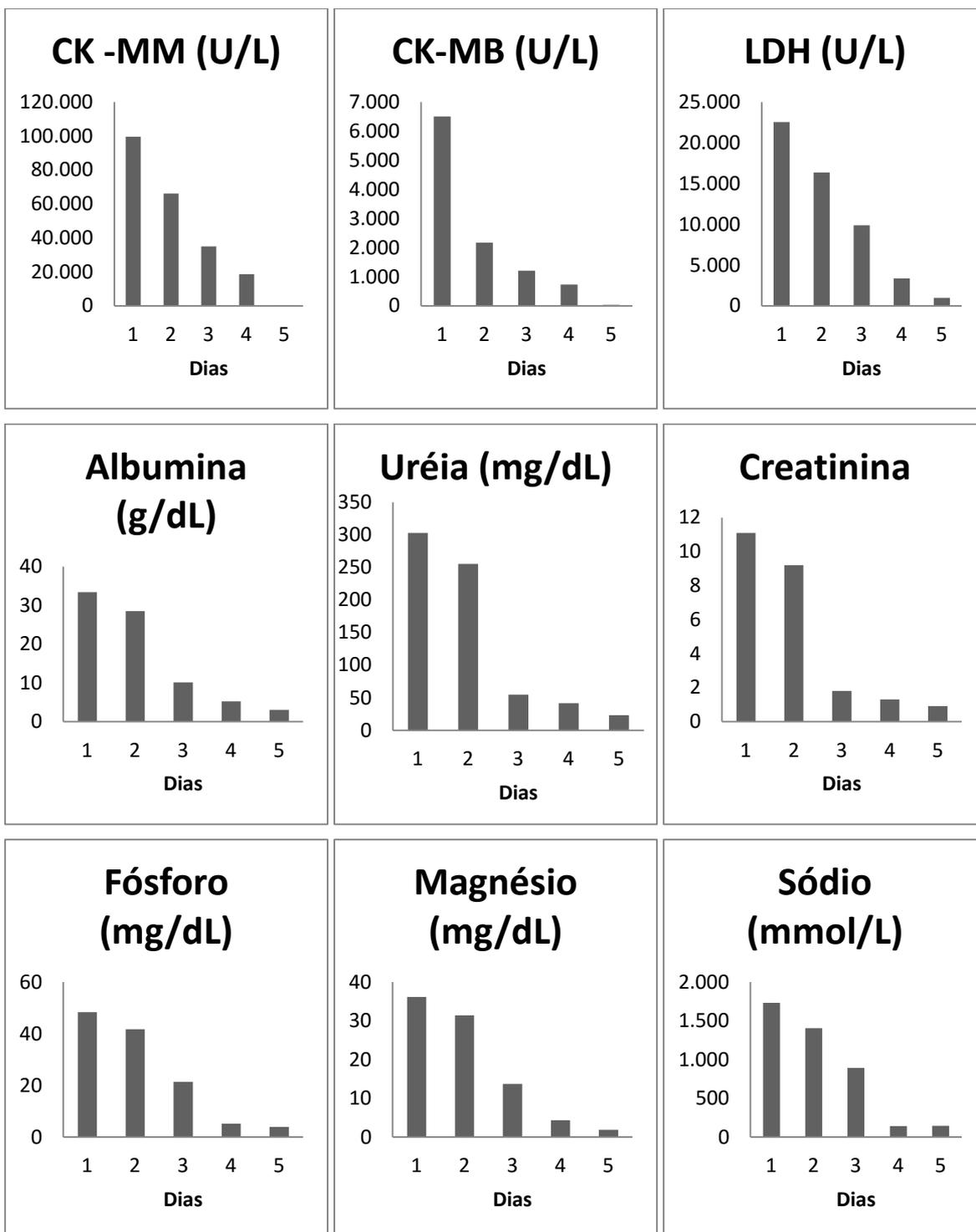
- Conceição, V. N., Souza, L. M., Merlo, B. B., Filgueiras, P. R., Poppi, R. J., & Romão, W. (2014). Estudo do teste de Scott via técnicas espectroscópicas: um método alternativo para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes. *Quimica Nova*, 37,1538–1544. doi.org/10.5935/0100-4042.20140240.
- Corrêa, C. H., Oliveira, LSG de., Assis, J. E. A. de., & Barros, R. T. C de. (2014). Anestesia no paciente usuário de crack e cocaína. *Revista Medica Minas Gerais*, 24 (3) doi: 10.5935/2238-3182.2014S012.
- Crespo-Fernández, J. A., & Rodríguez, C. A. (2007). Bases neuroanatómicas, neurobiológicas y del aprendizaje de la conducta de adicción a la cocaína. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 39,(1), 83-107.
- Desjardins, M., & Strange, B. (2013). Pre-hospital treatment of traumatic rhabdomyolysis. *Emergency Nurse*, 21(8), 28-33.
- Giannoglou G.D., Chatzizisis Y. S., Misirli G. (2007). The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis. *European Journal of Internal Medicine*, 18, (2).
- Guollo, F.,Narciso-Schiavon, J. L., Barotto, A. M., Zannin, M., & Schiavon, L. L. (2015). Significance of alanine aminotransferase levels in patients admitted for cocaine intoxication. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 49(3), 250-5. doi: 10.1097/MCG.0000000000000056.
- Lyra, L. (2014). *Concentração de proteínas totais, uréia, cálcio e fósforo em saliva total estimulada de dependentes químicos em desintoxicação*. UFPR. Curitiba: PR.

- Martins-Costa, S. H., Vettorazzi, J., Cecin, G. K. G., Maluf, J. M. R. A., Stumpf, C. C., & Ramos, J. G. L. (2013.) Crack: a nova epidemia obstétrica. *Revista HCPA*, 33, (1),55-65.
- Montero, J., Lovesio, C., Godoy, M. V., & Ruiz, G. (2009). Rbdomiólise por spinning en nueve pacientes. *Medicina*. Buenos Aires, 69, (1).
- Mrkobrada, S., & Gnanakumar, V. (2014). The correlation of dystonia severity and serum transaminases in a child with a brain injury. *Pediatric Neurology*, 51, (4), 573-575. doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.06.012.
- Musumeci, O., Brady, S., Rodolico, C., Ciranni, A., Montagnese, F., Aguenouz, M., Kirk, R., Allen, E., Godfrey, R., Romeo, S., Murphy, E., Rahman, S., Quinlivan, R., & Toscano, A. (2014). Recurrent rhabdomyolysis due to muscle β -enolase deficiency: very rare or underestimated?. *Journal of Neurology*. 261, (12), 2424-8. doi: 10.1007/s00415-014-7512-7.
- Pérez, A. O. (2003). Estaba intoxicado por cocaína este individuo (I): estimaciones basadas em la farmacocinética de la droga. *Cuadernos de Medicina Forense*. (33) 5-12.
- Pompermayer, M. G. (2015). *Comparação entre dano muscular induzido por exercícios de força: multiarticular versus monoarticular*. UFRGS, Porto Alegre: RS.
- Brasil. (2012). *Crack é possível vencer*. Retirado de <http://www.brasil.gov.br/crackepossivelvencer/a-droga/composicao-e-acao-no-organismo>.
- Ronald, C., Allison, R. C.,& Bedsole, D. L. (2003). The Other Medical Causes of Rhabdomyolysis. *The American Journal Of The Medical Sciences*, 326, (2), 79-88. doi: 10.1097/00000441-200308000-00005.

Scalco, R. S., Gardiner, A. R., Pitceathly, R. D. S., Zanuteli, E., Becker, J., Holton, J. L., Houlden, H., Jungbluth, H. E., & Quinlivan, R. (2015). Rhabdomyolysis: a genetic perspective. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. doi 10.1186/s13023-015-0264-3.

Siqueira, L. P., Fabri, A. C. O. C., & Fabri, R. L. (2011). Aspectos gerais, farmacológicos e toxicológicos da cocaína e seus efeitos na gestação. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 8(2), 75-87.

Figuras



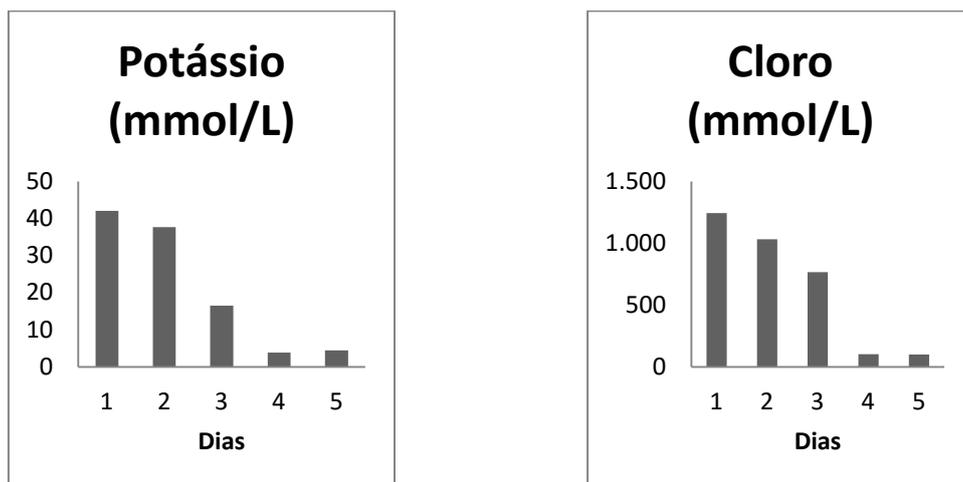


Figura 1. Resultados das dosagens bioquímicas realizadas no militar durante os 5 dias de internação no HMAM.

Tabelas

Tabela 1: Exames qualitativos de troponina, mioglobina realizados no militar durante os 5 dias de internação.

<i>Exames</i>	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	5° dia	Valores de Referências
Troponina	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
Mioglobina	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa

Tabela 2: Medicamentos ministrados ao soldado durante os 5 dias de permanência na UTI.

	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	5° dia
MEDICAMENTOS	Diazepam 5mg (via oral)	Diazepam 5mg (via oral)	-	-	-
	Verapamil 5mg/2ml (intravenoso)	-	-	-	-
	Metroclorpramida 10mg/2ml (intravenoso)	Metroclorpramida 10mg/2ml (intravenoso)	-	-	-
	Dipirona Sódica 500mg/ml (intravenoso)	Dipirona Sódica 500mg/ml (intravenoso)	Dipirona Sódica 500mg/ml (intravenoso)	Dipirona Sódica 500mg/ml (intravenoso)	Dipirona Sódica 500mg/ml (intravenoso)
	Manitol 10% (intravenoso)	Manitol 10% (intravenoso)	Manitol 10% (intravenoso)	-	-
	Soro fisiológico 0,9%	Soro fisiológico 0,9%	Soro fisiológico 0,9%	Soro fisiológico 0,9%	Soro fisiológico 0,9%

6. CONCLUSÃO

- Todos militares do COS apresentaram níveis de CK-MM e CK-MB acima dos valores basais de normalidade, sendo a principal alteração bioquímica;
- Nosso estudo demonstrou que não há significância estatística entre alterações hematológicas e polimorfismos estudados.
- Não foi detectada portadores do polimorfismo do gene MLCK - C49T;
- As frequências genotípicas 80,2%, 60,9% e 45,5% para os SNPs ACTN3 R577X, GSTP1-ala105val e GSTP1/1-C16T, respectivamente, corroboram com dados da literatura, onde apresentam frequências elevadas em atletas de elite e na população Brasileira;
- As frequências para os SNPs GDF8-C2T, FKRP-A19G, AMPD1-C34T e MYH9-A22G foram demonstradas pela primeira vez em Militares do Exército Brasileiro, corroborando com a literatura Mundial;
- O SNP GDF8-C2T esteve associado à diminuição dos níveis de CK-MM e CK-MB nos militares após exercícios físicos de alta intensidade;
- O ACTN3-R577X esteve associado ao aumento dos níveis de CK-MM e CK-MB nos militares após exercícios físicos de alta intensidade;
- Nosso estudo não encontrou diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações de CK-MM e CK-MB em militares portadores SNPs ACTN3-C1747T e GDF8-C2T quando concomitantemente;
- Diferenças estatisticamente significante entre as concentrações de CK-MB foram demonstradas em militares portadores do SNP GSTP1-A341G;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA, H.; MORITA, K.; MINAMI, H.; SASAKI, N.; TOBISE, K. Exertional rhabdomyolysis as a result of strenuous military training. **Neurolog. Scienc. J.**, Japão, v.132, p. 239-240, 1995.

AL SHAMKHANI, W.; AJAZ, Y.; SAEED JAFAR, N.; ROY NARAYANAN, S. Myocarditis and Rhabdomyolysis in a Healthy Young Man Caused by *Salmonella gastroenteritis*. **Case Rep. Infect. Dis.**, Dubai, v.2015, p.1-4, 2015. doi: 10.1155/2015/954905.

ALLISON, R.; BEDSOLE, L. The other medical causes of Rhabdomyolysis. **Americ. Journ. Medic. Scien.**, Alabama, v. 326, n.2, p.79-88, 2003.

AMINI, M.; SHARIFI, A.; NAJAFI, I.; EGHTESADI-ARAGHI, P.; RASOULI, M. R Role of dipstick in detection of haeme pigment due to rhabdomyolysis in victims of Bam earthquake. **East Medit. Health J.**, Tehron, v. 16, n. 9, p. 977-81, 2010

ANTUNES, A.P.; NOGUEIRA, C.; ROCHA, H.; VILARINHO, L.; EVANGELISTA, T. Intermittent rhabdomyolysis with adult onset associated with a mutation in the ACADVL gene. **J. Clin. Neuromuscul Dis.**, Lisboa, v. 15, n. 2, p. 72-69, 2013.

BOLUFER, P.; COLLADO, M.; BARRAGÁN, E.; CERVERA, J.; CALASANZ, M. J.; COLOMER, D.; ROMAN-GÓMEZ, J.; SANZ, M. A. The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. **Haematologica/The Hematology Journal**, Valência, v.92, n.3, p. 208-14, 2007.

BOSCH, X.; POCH, E.; GRAU, J. M. "Rhabdomyolysis and acute kidney injury". **N. Engd. J. Med.**, Barcelona, v.361, n.1, p.62-72, 2009. doi: 10.1056/NEJMra0801327

BOUTAUD, O.; ROBERTS, L. J. Mechanism-based therapeutic approaches to rhabdomyolysis-induced renal failure. **Free Radic. Biol. Med.**, Nashville, v. 51, n. 5, p. 1062-7, 2011.

CECIL, K. M.; BRUBAKER, C. J.; ADLER, C. M.; DIETRICH, K. N.; ALTAYE, M. EGELHOFF, J. C.; WESSEL, S.; ELANGOVAN, I.; HORNUNG, R.; JARVIS, K.;

LANPHEAR, B. P. Decreased brain volume in adults with childhood lead exposure. **Plos Med.**, Ohio, v.5, n.5, 2008. doi:10.1371/journal.pmed.0050112.

CERVELLIN, G. COMELLI, I.; LIPPI, G. Rhabdomyolysis: historical background, clinical, diagnostic and therapeutic features. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Parma, v.48, n.6, p.749-56, 2010.

CHAKRABORTI C, ANTOON JW. Incomplete reporting in a case report of corticosteroids in the treatment of alcohol-induced rhabdomyolysis. **Mayo Clin. Proc.**, Nova Orleans, v.87, n.8, p.810, 2012. doi:10.1016/j.mayocp.2012.06.009.

COLARES, V. S.; TITAN, S. M.; PEREIRA ADA C, MALAFRONTA P, CARDENA MM,SANTOS S, SANTOS PC, FRIDMAN C, BARROS RT, WORONIK V. MYH9 and APOL1 gene polymorphisms and the risk of CKD in patients with lupus nephritis from an admixture population. **Plos One.**, Londres, v.9, n.3, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0087716.

DAEJIN KIM, M. D.; EUN-JUNG KO, M. D.; HYEJEONG CHO, M. D.; SU HYUNG PARK, M. D.; SANG HWAN LEE, M. D.; NAM-GIL CHO, M. D.; SO-YOUNG LEE, M. D.; HYE YUN JEONG, M. D.; DONG HO YANG. Spinning-induced Rhabdomyolysis: Eleven Case Reports and Review of the Literature. **Electrol. Blood Press.**, Gyeonggi-do, v.13, n.2, p.58–61, 2015. doi:10.5049/EBP.2015.13.2.58.

DAWLEY, C. Myalgias and Myopathies: Rhabdomyolysis. **FP Essent.**, Califórnia, v.440, p.28-36, 2016.

DESJARDINS,M.; STRANGE, B. Pre-hospital treatment of traumatic rhabdomyolysis. **Emerg. Nurse.**, Leicester, v.21, n.8, p.33-28, 2013. doi: 10.7748/en2013.12.21.8.28.e1221.

DEUSTER, P. A.; CONTRERAS-SESVOLD, C. L.; O'CONNOR, F. G.; CAMPBELL, W. W.; KENNEY, K.; CAPACCHIONE, J.F.; LANDAU, M. E.; MULDOON, S. M.; RUSHING, E. J.; HELED, Y. Genetic polymorphisms associated with exertional rhabdomyolysis. **Eur. J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v.113, n.8, 2013. doi: 10.1007/s00421-013-2622-y

EFSTRATIADIS, G.; VOULGARIDOU, A.; NIKIFOROU, D.; KYVENTIDIS, A.; KOURKOUNI, E.; VERGOULAS, G. Rhabdomyolysis updated. **Hippokratia**, Grécia, v.11, n. 6, p.129-37, 2007.

ELSAYED, E. F.; REILLY, R. F. Rhabdomyolysis: a review, with emphasis on the pediatric population. **Pediatric Nephrology.**, Dalas, v.25, n. 1, p.18-7, 2010. doi: 10.1007/s00467-009-1223-9.

FADILA, M. F.; WOOL, K. J. Rhabdomyolysis secondary to influenza A infection: a case report and review of the literature. **N. Am. J. Med. Sci.**, Estados Unidos, v.7, n.3, p.122-4, 2015. doi: 10.4103/1947-2714.153926.

FARKASH, U.; SHABSHIN, N.; PRITSCH-PERRY, M. Rhabdomyolysis of the deltoid muscle in a bodybuilder using anabolic-androgenic steroids: a case report. **J. Athl. Train.**, Israel, v. 44, n. 1, p. 100-98, 2009. doi: 10.4085/1062-6050-44.1.98.

FERNANDEZ-FUENTE, M.; TERRACCIANO, C. M.; MARTIN-DUQUE, P.; BROWN, S. C.; VASSAUX, G.; PIERCY, R. J. Calcium Homeostasis in Myogenic Differentiation Factor 1 (MyoD)-Transformed, Virally-Transduced, Skin-Derived Equine Myotubes. **Plos One.** Londres, v.9, n.8, 2014.

GENG, X.; WANG, Y.; HONG, Q.; YANG, J.; ZHENG, W.; ZHANG, G.; CAI, G.; CHEN, X.; WU, D. Differences in gene expression profiles and signaling pathways in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, Beijing, v.8, n.11, p.14087-98, 2015.

GLYNE, P.; ALLEN, A.; PUSEY, C. Acute renal failure in practice. **Imperial College Press. Chapter**, London, v.12, p.296-306, 2002.

GUNAL AI.; CELIKER H.; DOGUKAN A.; OZALP G.; KIRCIMAN E.; SIMSEKLI H.; GUNAY I.; DEMIRCIN M.; BELHAN O.; YILDIRIM MA.; SEVER MS.. Early and vigorous fluid resuscitation prevents acute renal failure in the crush victims of catastrophic earthquakes. **J. Am. Soc. Nephro.**, Istanbul, v.15, n.7, p.1862-7, 2004.

HAFNER P, BONATI U, FISCHMANN A, SCHNEIDER J, FRANK S, MORRIS-ROSENDAHL DJ, DUMEA A, HEINIMANN K, FISCHER D. Skeletal muscle MRI of the lower limbs in congenital muscular dystrophy patients with novel POMT1 and POMT2 mutations. **Neuromuscul. Disord.**, Suíça, v.24, n.4. p.321-4, 2014. doi: 10.1016/j.nmd.2014.01.009.

HAIDET, A. M.; RIZO, L.; HANDY, C.; UMAPATHI, P.; EAGLE, A.; SHILLING, C. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Estados Unidos, v.105, n.11, p.4318-22, 2008. doi: 10.1073/pnas.0709144105

HLAVÁČOVÁ, A.; KRBKOVÁ, L.; ČAPOVOVÁ, I.; KLAPAČOVÁ, L.; JIRSENSKÁ, Z.; RYZÍ, M.; BEDNÁŘOVÁ, J. Benign acute childhood myositis as a complication of influenza B and its differential diagnosis. **Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.** República Checa, v.64, n.4, p.236-41. 2015.

HONG, D.; ZHANG, W.; WANG, W.; WANG, Z.; YUAN, Y. Asian patients with limb girdle muscular dystrophy 2I (LGMD2I). **J. Clin. Neurosci**, Austrália, v.18, n.4, p.494-9, 2011.

KRASNIANSKI, M.; NEUDECKER, S.; DESCHAUER, M.; ZIERZ, S. The clinical spectrum of limb-girdle muscular dystrophies type 2I in cases of a mutation in the "fukutin-related- protein"-gene. **Nervenarzt**, Berlim, v.61, n.2, p.189-99, 2004.

LAHORIA, R.; WINDER, T. L.; LUI, J.; AL-OWAIN, M. A.; MILONE, M. Novel ANO 5 homozygous microdeletion causing myalgia and unprovoked rhabdomyolysis in an Arabic man. **Muscle Nerve.**, Estados Unidos, v.50, n.4, p.610-3, 2014.

LANDAU, M. E.; KENNEY, K.; DEUSTE, P. Investigation of the Relationship Between Serum Creatine Kinase and Genetic Polymorphisms in Military Recruits. **Military Medicine**, Estados Unidos, v. 177, n.11, p.1359. 2012.

LAYNE, R. D.; SEHBAY, A. S.; STARK, L. J. Rhabdomyolysis and renal failure associated with gemfibrozil monotherapy. **Ann. Pharmacotherapy**, Estados Unidos, v.38, n.2, p.232-4, 2004.

LEE, G. Exercise-induced rhabdomyolysis. **RI Med. J.** Rhode Island (Estados Unidos). v.97, n.11, p.22-4, Nov .2014.

LINDBERG, C.; SIXT, C.; OLDFORS, A. Episodes of exercise-induced dark urine and myalgia in LGMD 2I. **Acta Neurol. Scand.**, Escândinávia, v.125, n.4, p.285-7, 2012.

MARKING U, DEN BOER M, DAS AK, AHMED EM, ROLLASON V, AHMED BN, DAVIDSON RN, RITMEIJER K. Hypokalaemia-induced rhabdomyolysis after treatment of post-Kala-azar dermal Leishmaniasis (PKDL) with high-dose AmBisome in Bangladesh-a case report. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, California (Estados Unidos), v.8, n.6, p.e2864, 2014.

MARTINSEN, A DESSY C, MOREL N. Regulation of calcium channels in smooth muscle: new insights into the role of myosin light chain kinase. **Channels (Austin)**, Canadá, v.8, n.5, p.402-13. 2014. doi: 10.4161/19336950.2014.950537.

MATHEWS, K. D.; STEPHAN, C. M.; LAUBENTHAL, K.; WINDER, T. L.; MICHELE, D. E.; MOORE, S. A.; CAMPBELL, K. P. Myoglobinuria and muscle pain are common in patients with limb-girdle muscular dystrophy 2I. **Neurology**, Estados Unidos, v.76, n.2, p.194–95, 2011.

MATSUSUE, A. An autopsy case of rhabdomyolysis related to vegetamin and genetic analysis of the rhabdomyolysis-associated genes. Elsevier Ltd and Faculty of Forensic and Legal Medicine. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, Reino Unido, v. 17, p. 46-49. 2010.

MELLI, G.; CHAUDHRY, V.; CORNBLATH, D.R. Rhabdomyolysis: an evaluation of 475 hospitalized patients. **Medicine**, Estados Unidos, v.84, n.6, p.377-85. 2005

MONTERO, J.; LOVESIO, C.; GODOY, M. V.; RUIZ, G. Rabdomiólisis por spinning en nueve pacientes. **Medicina**. Argentina. v. 9, n1. 2009

MRKOBRADE, S.; GNANAKUMAR, V. The correlation of dystonia severity and serum transaminases in a child with a brain injury. **Pediatr. Neurol.**, Estados Unidos, v.51, n.4, p.573–575, 2014

MUSUMECCI, O.; BRADY, S.; RODOLICO, C.; CIRANNI, A.; MONTAGNESE, F.; AGUENNOUZ, M.; KIRK, R.; ALLEN, E.; GODFREY, R.; ROMEO, S.; MURPHY, E.; RAHMAN, S.; QUINLIVAN, R.; TOSCANO, A. Recurrent rhabdomyolysis due to muscle β -enolase deficiency: very rare or underestimated? **J. Neurol.**, Alemanha, v.261, n.12, p.2424-8, 2014.

NANCE, JR; MAMMEN, A. L. Diagnostic evaluation of rhabdomyolysis. **Muscle Nerve.**, Estados Unidos, v.51, n.6, p.793-810, Jun. 2015. doi: 10.1002/mus.24606.

OLIVEIRA, J. F.; BURDMANN, E. A. Dengue-associated acute kidney injury. **Clin. Kidney J.**, Itália, v.8, n.6, p.681-5, Dec. 2015. doi: 10.1093/ckj/sfv106. Epub 2015 Oct 16

PANCHANGAMV. Statin-associated acute interstitial nephritis and rhabdomyolysis. **Saudi J. Kidney Dis. Transpl.**, Arábia Saudita, v.25, n.3, p.659-60, 2014

PAPASOTIRIOU, M.; BETSI, G.; TSIRONI, M.; ASSIMAKOPOULOS, G. Rhabdomyolysis and acute kidney injury after acupuncture sessions. **Saudi J. Kidney Dis. Transpl.**, Arábia Saudita, v.25, n.3, p.643-6, 2014.

RAVRY, C.; FEDOU, A. L.; DUBOS, M.; DENES, É.; ETCHECOPAR, C.; BARRAUD, O.; VIGNON, P.; FRANÇOIS, B. Severe Rhabdomyolysis Associated with *Staphylococcus aureus* Acute Endocarditis Requiring Surgery. **Surg. Infect. (Larchmt)**., Nova Iorque, v.16, n.6, p.840-2, Dec. 2015. doi: 10.1089/sur.2015.038. Epub 2015 Aug 12

REBECCA, G.; JASPER, H.; CARL, L. E. S.; DOUG, H.; LUKE, J. H.; LYN, R. G. Evaluation of a 7-Gene Genetic Profile for Athletic Endurance Phenotype in Ironman Championship Triathletes. **PloS One**, Londres, v.10, n.12, p. e0145171, 2015.

RIZZI, D.; BASILE, C.; DI MAGGIO, A.; SEBASTIO, A.; INTRONA, F. J. R.; RIZZI, R.; SCATIZZI, A. DE MARCO, S.; SMIALEK, J. E. Clinical spectrum of accidental hemlock poisoning: neurotoxic manifestations, rhabdomyolysis and acute tubular necrosis. **Nephrol. Dial Transplant**, Oxford, v.6. n.12., p.939-43, 1991.

RONALD, C. ALLISON, R. C.; BEDSOLE, D. L. The Other Medical Causes of Rhabdomyolysis. **The American Journal Of The Medical Sciences**., Estados Unidos, v.326. n.2, p.79-88, 2003.

ROSA, N. G. Rabdomiólise. **Acta. Méd. Port.**, Portugal, p.271-282. 2005.

ROSSINI, A.; RAPOZO, D. C.; AMORIM, L. M.; MACEDO, J. M.; MEDINA, R.; NETO, J. F. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. **Genet. Mol. Res.**, Rio de Janeiro, v.1, n.3, p.233-40, Sep. 2002.

RUIZ, JR.; BUXENS, A.; ARTIEDA, M.; ARTETA, D.; SANTIAGO, C.; RODRÍGUEZ-ROMO, G. The 174 G/C polymorphism of the IL6 gene is associated with elite Power performance. **J. Sci. Med. Sport**, Estocolmo, v.13,n.5, p.549-53. 2009.

SAFARI, S.; YOUSEFIFARD, M.; HASHEMI, B.; BARATLOO, A.; FOROUZANFAR, M. M.; RAHMATI, F.; MOTAMEDI, M.; NAJAFI, I. The value of serum creatine kinase in predicting the risk of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **Clin. Exp Nephrol.**, Teerã, 2016.

SANTORO, J. D.; BLACK, J. M.; HAMM, L. L. A case of rhabdomyolysis in the presence of multiple risk factors and dextroamphetamine use. **Am. J. Med. Sci.**, Louisiana, v.345, n.6, p. 494-6. 2013. doi: 10.1097/MAJ.0b013e3182798040.

SEVER, M. S.; EREK, E.; VANHOLDER, R.; AKOGLU, E.; YAVUZ, M.; ERGIN, H.; TURKMEN, F.; KORULAR, D.; YENICESU, M.; ERBILGIN, D.; HOEBEN, H.; LAMEIRE, N. Clinical findings in the renal victims of a catastrophic disaster: the Marmara earthquake. **Nephrol. Dial Transplant.**, Estantul, v.17, n.11, p.1942-9. 2002.

SOLTANI, P.; REZVANFAR, M. R.; PIRASTEH, S. Acute Renal Failure in a Patient With Sheehan Syndrome and Rhabdomyolysis. **Kidney diseases. Iranian Journ. Kidney Diseases.** Iran, v.2, n.1, p. 50-2. 2008.

SPURDLE, A.B.; WEBB, P. M.; PURDIE, D. M.; CHEN, X.; GREEN, A.; CHENEVIX-TRENCH, G. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. **Carcinogenesis**, Queensland , v.22, p.67–72. 2001.

STEHLÍKOVÁ, K.; SKÁLOVÁ, D.; ZÍDKOVÁ, J.; MRÁZOVÁ, L.; VONDRÁČEK, P.; MAZANEC, R.; VOHÁŇKA, S.; HABERLOVÁ, J.; HERMANOVÁ, M.; ZÁMEČNÍK, J.; SOUČEK, O.; OŠLEJŠKOVÁ, H.; DVOŘÁČKOVÁ, N.; SOLAŘOVÁ, P.; FAJKUSOVÁ, L. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Czech Republic. **BMC Neurol.**, República Checa, v.14, p. 154. 2014. doi: 10.1186/s12883-014-0154-7.

SU, B. H.; QIU, L.; FU, P.; LUO, Y.; TAO, Y.; PENG, Y. L. Ultrasonic appearance of rhabdomyolysis in patients with crush injury in the Wenchuan earthquake. **Chin. Med. Journ.** Sichuan, v. 122, n, 16, p. 1872-6. 2009.

SU, M. S.; JIANG, Y.; YAN, X. Y.; ZHAO, Q. H.; LIU, Z. W.; ZHANG, W. Z.; HE, L. Alcohol abuse-related severe acute pancreatitis with rhabdomyolysis complications. **Exp. Ther. Med.**, Beijing, v. 5, n. 1, p. 192-189. 2013. doi:10.3892/etm.2012.735.

TERRONE, G.; RUOPPOLO, M.; BRUNETTI-PIERRI, N.; COZZOLINO, C.; SCOLAMIERO, E.; PARENTI, G.; ROMANO, A.; ANDRIA, G.; SALVATORE, F.; FRISSE, G. Recurrent rhabdomyolysis due to a fatty acid oxidation disorder. **J. Chilg. Neurology.**, Nápoles, v.82, n.1. 2014. doi: 10.1212/01.wnl.0000438217.31437.72.

UCHOA, R. B.; FERNANDES, C. R. Rabdomiólise induzida por exercícios e risco de hipertemia maligna. Relato de caso. **Revista Brasileira de Anestesiologia**; Campinas, v.53, p.63-68. 2003.

VALENTINA, G.; AUDRONÉ, J.; AIDAS, P.; KAZYS, M.; LINAS, T., *AMPD1* rs17602729 is associated with physical performance of sprint and power in elite Lithuanian athletes. **BMC Genet.**, Lituânia, v.15, p.58. 2014. doi: 10.1186/1471-2156-15-58

VAN ADEL ,B. A.; TARNOPOLSKY, M. A. Metabolic myopathies: a guide and update for clinicians. **J. Clin. Neuromuscul. Dis.**, Manchester, v. 20, n. 6, p. 639-47. 2009.

VANHOLDER, R.; SEVER, M. S.; EREK, E.; LAMEIRE, N. Rhabdomyolysis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Portugal, v. 11, n. 8, p. 1553-61. 2000.

VICARI, P.; DUCH, C. R.; SHIMMOTO, M. M. A; NOGUTI, M. A. E.; FIGUEIREDO, M. S. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase mu1 and theta 1 in patients with acquired aplastic anemia: A Brazilian experience. **Rev. Bras. Hematol. hemoter**, São Jose do Rio Preto, v.29, n.4, p.344-345. 2007. doi.10.1590/S1516-84842007000400005.

WAPPLER, F.; FIEGE, M.; STEINFATH, M.; AGARWAL, K.; SCHOLZ, J.; SINGH, S.; MATSCHKE, J.; SCHULTE, A. M.; ESCH, J. Evidence for susceptibility to malignant hyperthermia in patients with exercise-induced rhabdomyolysis. **Anesthesiology.**, Hamburgo, v. 94, n. 1, p. 100-95. 2001.

WU, G.; FANG, Y.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. **The Journal of Nutrition**, Estados Unidos, v. 134, n. 3, p.489-492. 2004

YAMAMOTO, L. U.; VELLOSO, F. J.; LIMA, B. L.; FOGAÇA, L. L.; DE PAULA, F.; VIEIRA, N. M.; ZATZ, M.; VAINZOF, M. Muscle protein alterations in LGMD2I patients with different mutations in the Fukutin-related protein gene. **J. Histochem. Cytochem.**, São Paulo, v. 56, n. 11, p. 1001-995. 2008. doi: 10.1369/jhc.2008.951772.

Ye, Z.; SONG, H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. **Eur. J. Cancer.**, Cambridge, v.41, p.980–9. 2004. doi:10.1016/j.ejca.2005.01.014.

ZANINOTTO, M. CK-MB: dalla misura dell'attività catalitica a quella della concentrazione proteica. **Biochimica clinica**, Itália. n.6. 1999.

ZIMMERMAN, J. L.; SHEN, M. C. **Rhabdomyolysis**. <www.journal.publications.chestnet.org> Acesso em: 30 maio 2014.

8. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“RABDOMIÓLISE: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, HEMATOLÓGICAS E PERFIL MOLECULAR DE MILITARES SUBMETIDOS À INTENSA ATIVIDADE FÍSICA.”**

Estamos realizando uma pesquisa com o objetivo de conhecer melhor o diagnóstico hematológico, bioquímico e molecular da síndrome RBM.

O termo RBM refere-se a desintegração do músculo estriado resultando na liberação de componentes celulares musculares para o fluido extracelular e circulação, sendo esta uma condição potencialmente ameaçadora para a vida. A síndrome RBM é comum e muitas vezes causada por diversos fatores, o que chamamos de etiologia multifatorial. Há muitas causas possíveis para RBM, incluindo lesões por esmagamento, atividade muscular excessiva, medicamentos e infecções.

Caso você concorde em participar deste estudo é necessário que você responda um questionário com dados clínico-epidemiológicos e forneça uma amostra de seu sangue (10mL), que será realizado por uma equipe Farmacêutica e Médica profissional e capacitada do Curso de Operações na Selva pelo Centro de Instrução Guerra na Selva – CIGS.

É de grande importância que você entenda os princípios gerais que se seguem e que serão aplicados a todos os participantes do nosso estudo:

- A) Sua participação é totalmente voluntária;
- B) Você poderá interromper sua participação antes ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa em participar não envolverá punições ou perda de seus direitos constituídos;
- C) Depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária ao seu entendimento.

EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

Se você quiser participar, será colhida uma amostra de sangue da veia do braço (mais ou menos uma colher de chá) com seringa e agulha. Durante a coleta de sangue

você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado.

O tempo previsto para a realização do nosso estudo será de aproximadamente dois (02) anos. Se o resultado for positivo, talvez seja necessária uma nova coleta de sangue para confirmar o resultado.

BENEFÍCIOS

A participação neste projeto proporcionará benefícios aos indivíduos portadores de marcadores de dano muscular, uma vez que possibilitará a realização do acompanhamento clínico, laboratorial e aconselhamento genético. Além disso, sua participação neste estudo será uma importante contribuição para o conhecimento científico na área da saúde de militares em fase de exercícios extremos.

Polegar
Direito ou
Rubrica

Rubrica

QUESTIONÁRIO E DURAÇÃO DA SUA PARTICIPAÇÃO

O questionário contém perguntas de caráter pessoal, o que pode lhe causar algum constrangimento ao respondê-las, portanto estas perguntas serão feitas de modo particular. Mesmo participando do estudo, você poderá recusar fornecer algumas informações solicitadas. Ou seja, você responderá apenas às questões que se sentir à vontade. Você levará em torno de 15 minutos para responder as perguntas do questionário.

O tempo previsto para a realização do nosso estudo será de aproximadamente 02 (dois) anos. Entretanto, caso diagnostique nos exames relacionados acima possíveis fatores que levem a dano muscular, você será assistido pela equipe médica do CIGS e dos Farmacêuticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM para acompanhamento clínico e aconselhamento genético.

COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos somente se o Sr(a) autorizar. Sua amostra poderá ser utilizada em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores.

- () Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.
- () Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores. Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:
- () Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.
- () Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

- () Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados
- () Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Polegar
Direito ou
Rubrica

Rubrica

O pesquisador responsável por este estudo, Prof. Dr. **JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO**, está à sua disposição e com ele você pode esclarecer qualquer dúvida

que surja sobre o referido estudo, mantendo contato pessoal, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, rua Alexandre Amorim, 330, Aparecida ou pelo telefone (92)3305-5000. Também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEPUFAM) Rua Teresina, 4950, Adrianópolis, Fone: 3305-5130, CEP: 69057-070. Manaus-AM.

Você receberá uma cópia deste TCLE, que será assinada pela pesquisadora e pelo Sr(a) em todas as páginas.

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos.

- **Dr. José Pereira de Moura Neto** - Coordenador do projeto - Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular - Contato: (92) 3305-000 – (92) 98187-0920
- **Dr. Thiago de Jesus Bacha** - Farmacêutico – Mestrando em Ciências Farmacêuticas - Laboratório do CIGS Centro de Instrução de Guerra na Selva. Contato: (92) 98128-6860

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Eu _____ aceito participar da pesquisa **“RABDOMIÓLISE: CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR PARA PREVENÇÃO, ACOMPANHAMENTO E TRATAMENTO”**.

Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

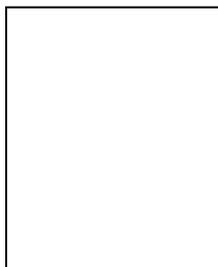
Li este termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa Assinei duas vias, uma que vai ficar comigo e outra que será guardada pelo pesquisador.

Local, Data (dia/mês/ano)

Assinatura do participante do Estudo

Assinatura do pesquisador(a)

Impressão Datiloscópica:



Nome do Coordenador da pesquisa: **José Pereira de Moura Neto**

Assinatura do Coordenador da pesquisa:

9. QUESTIONÁRIO RABDOMIÓLISE

1 - Nome: _____
 _____ Idade: _____ Nasc.: ____/____/____

2 - Numero Exército: _____ Telefone:() _____ Registro: _____

3 - Filiação: Pai: _____
 Mae: _____

4 - Endereço: _____

5 - Raça: () Branca () Negra () Parda () Mulata

6 - Escolaridade: () Alfabetizado () 2º Grau completo () Graduação
 () Mestrado () Doutorado

7 - Número de irmãos: () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5
 ou +

8 - Familiares com alguma alteração: () Sim () Não

Se sim, quem? () Pai () Mãe () Irmão

Qual alteração? () Coração () Rim () Fígado () Anemia

() Outro: _____

9 - Um médico já disse que você tinha alguns dos problemas que se seguem? (S/N)

() Doença cardíaca coronariana () Ataque cardíaco () Doença cardíaca reumática

() Derrame cerebral () Doença cardíaca congênita () Batimentos cardíacos irregulares

() Diabetes () Epilepsia () Câncer () Problemas nas válvulas cardíacas () Hipertensão () Murmúrios cardíacos () Angina (

) Rabdomiólise

Por favor, explique: _____

10 - Você tem algum dos sintomas abaixo? (S/N)

() Dor nas costas () Dor nas articulações, tendões ou músculo

() Doença pulmonar (asma, enfisema, outra)

Por favor, explique: _____

11 - Já teve Infecções: () Sim () Não

Quais? () Rinite () Sinusite () Otite () Faringite () Amigdalite

() Outros: _____

12 - Faz uso de alguma medicação? () Sim () Não

13 - Se Sim, fez uso de profilaxia antibiótica? () Sim () Não

14 - Liste os medicamentos que você está tomando (nome e motivo)

15 - Manipula alguma substância química? () Sim () Não

Qual? _____ Frequência? _____

Manipula diretamente esta substância? () Sim () Não

16 - Pratica esportes? () Sim () Não

17 - Faz uso de bebida alcoólica? () Sim () Não

Se Sim, que frequência? _____

18 - Você fuma? () Sim () Não.

Se sim: _____ cigarros por dia

_____ charutos por dia

_____ cachimbos por dia

19 - Faz uso de alguma droga? () Sim () Não

Em caso de SIM, que frequência? _____

20 - Você tem sorologia positiva para algum vírus? () Sim () Não

Sim, qual? _____

21 - Qual seu Grupo Sanguíneo: _____ RH: _____

22 - Atualmente você tem se exercitado pelo menos 2 vezes por semana, por pelo menos 20 minutos?

() Sim () Não

Se sim, por favor, especifique: () corrida () esporte de raquete () caminhada vigorosa

() pilates () bicicleta () levantamento de peso () aeróbica () natação

() outro (especifique) _____

23 - Você mediu sua taxa de colesterol no ano passado?

não sim – acima de 200 (Níveis perigosos) sim – abaixo de 200 (Níveis desejáveis)

sim – não sabe o valor

24 - Verifique a descrição que melhor representa a quantidade de estresse que você tem durante um dia normal:

sem estresse estresse leve ocasional estresse moderado frequente

estresse elevado frequente estresse elevado constante

25 - Você conhece a síndrome Rabdomiólise? Sim Não

26 - Alguém na família já desenvolveu Rabdomiólise? Sim Não