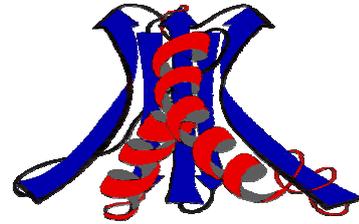




Universidade Católica de Brasília



Centro de Análises Proteômicas e
Bioquímicas de Brasília

ANÁLISES HISTOLÓGICAS E PROTEÔMICAS DO MIÓCITO CARDÍACO DE RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Brasília
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA ROCHA

ANÁLISES HISTOLÓGICAS E PROTEÔMICAS DO MIÓCITO
CARDÍACO DE RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES INTENSIDADES DE
EXERCÍCIO

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS GENÔMICAS E BIOTECNOLOGIA DA
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE NA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DE BRASÍLIA

ORIENTADOR: PROF. Dr. OCTÁVIO LUIZ FRANCO

BRASÍLIA OUTUBRO DE 2007

TERMO DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia, defendida e aprovada, em 04 de outubro de 2007, pela banca examinadora constituída por:

Prof.Dr. Octávio Luiz Franco
Orientador

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

Prof. Dr. Thales Lima Rocha

Brasília
UCB

A minha esposa, e eterna companheira, pelo apoio
incentivo e paciência em todas as horas difíceis.

A Deus, acima de tudo por sempre, em todos os momentos, iluminar meu caminho.

Meus mais sinceros agradecimentos a meu pai, Francisco de Barros Rocha por ter me ensinado que caráter é muito mais que uma palavra.

A minha mãe Maria Tereza com quem descobri a essência da palavra ternura.

A minha esposa, companheira, amiga, cúmplice, mulher Aline Candiota por ser meu alicerce.

A minha filha Júlia por seu carinho e amor.

A minha filha Maria Luiza por me fazer descobrir o verdadeiro sentido da vida.

Ao meu irmão Francisco que, mesmo distante se faz presente em todos os momentos.

Ao meu orientador e, acima de tudo, grande amigo Octávio Luiz Franco, por seus ensinamentos, dedicação, apoio e fidelidade nos momentos difíceis nesta jornada.

Ao meu eterno professor Mileno Antônio Tonissi, por ter me apresentado a academia.

A amiga e revisora Sandra Bessa, por seu carinho, e presteza e valorosos conselhos.

Aos meus brilhantes “escudeiros” Bernardo Assis e David Borges pela inestimável contribuição a este trabalho.

Aos meus amigos de todas as horas Amílcar Barreto, Ana Claudia Barreto, Raul Storino e Glauce Storino por sua querida amizade.

A Jackeline Leite por toda ajuda desde o início.

A Vanessa “Tchê” pelos momentos de descontração no *Bionumerics*

Ao sempre solicito André Melro, com quem aprendi muito sobre eletroforese.

Ao Fabio Teles por sua enorme ajuda em todos os momentos no laboratório.

A todo o pessoal do CAPB pelos momentos inesquecíveis de ciência e grandes risadas

Ao prof. Dr. Georgios Pappas com quem aprendi muito, principalmente, a ser humilde e que isso, é uma grande virtude.

Ao prof. Dr. Dário Grattapaglia, que um dia me fez entender o valor da dedicação.

Ao Dr. Gilberto Dumond da UFRJ pela valiosa colaboração na espectrometria de massa.

Ao Francisco Fábio por sua imensa cooperação e gentileza.

Ao prof. Dr Ricardo Jacó que acreditou desde o início neste projeto cedendo as instalações do LEEFS (Laboratório de Estudos em Educação Física e Saúde).

Finalmente a todos que acreditam que através do conhecimento podemos fazer um mundo melhor.

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.”

Thomas Huxley

RESUMO

A literatura científica tem descrito de forma ampla que o exercício regular apresenta-se como um importante fator de implemento de saúde e, dentre as principais causas deste fenômeno, encontra-se o incremento da função cardiocirculatória. Esta melhoria deve-se a inúmeros fatores dentre eles a hipertrofia do miócito cardíaco, considerada como o processo adaptativo mais importante para o coração em decorrência do exercício físico por estar diretamente relacionada ao desenvolvimento da força contrátil no miócito cardíaco. Esta capacidade é gerada pela capacidade de interação entre diversas proteínas das quais a principal é a miosina um hexâmero formado por cadeias pesadas (MHC) e leves (MLC). O objetivo deste estudo foi estabelecer a relação entre diferentes níveis de carga e o aumento da expressão da cadeia pesada de miosina no miócito cardíaco de *R. norvegicus* por meio de técnicas proteômicas, no intuito de inferir sobre procedimentos de padrões de exercício físico mais adequados tanto ao desenvolvimento da performance desportiva quanto a conduta terapêutica. Para isto 40 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), isogênicos adultos, divididos em três grupos GT₁, GT₂ e GT₃ submetidos a treinamento de natação durante doze semanas em diferentes intensidades, (respectivamente 2,5%; 5,0% e 7,5% de do peso corporal em sobrecarga individualizada) os dois primeiros grupos a exercício contínuo e o último exercício intervalado e um grupo controle, que permaneceu sedentário. Nossos achados demonstraram alterações morfológicas nos grupos submetidos a treinamento físico em relação ao grupo controle. Foi evidenciado no GT₃ um grau discreto de hipertrofia nuclear o que sugere que as características contráteis intrínsecas das miofibrilas são modificadas para contribuir para um aumento da função do ventrículo esquerdo e que estas podem estar associadas ao treinamento. Foram observadas ainda diferenças significativas no padrão protéico utilizando técnicas de eletroforese uni e bidimensional seguida de espectrometria de massa, em todos os tratamentos demonstrando claramente o aumento da expressão da miosina (MHC) em relação ao GC. Além da MHC foram evidenciadas a presença de outras proteínas como a troponina, uma outra proteína sarcomérica, proteínas associadas ao metabolismo oxidativo como as oxidoredutases, translocases de membrana mitocondrial e proteínas análogas a superóxido desmutase. Nossos achados indicam uma clara correlação entre a intensidade e o aumento da expressão da cadeia pesada de miosina no miócito cardíaco indicando ainda que o treinamento intervalado de alta intensidade quando comparado ao treinamento contínuo de baixa e de moderada intensidade, apresenta-se mais eficaz, no entanto, representando também uma maior lesão estrutural celular. Este achado pode, em longo prazo, representar perda de capacidade contrátil e conseqüentemente diminuição funcional. Estes dados provêm suporte para a programação mais clara e precisa do treinamento físico visando tanto o desporto quanto a saúde além de oferecer subsídio a novas abordagens técnicas na análise por eletroforese bidimensional de proteínas de alto peso molecular.

ABSTRACT

Scientific literature have been described the regular which as an important factor in the health improvement. Among several causes have been related to this phenomenon, it was observed a crucial point that included the improvement of heart potency. This enhancement could be related to several factors such as cardiac muscle cells hypertrophy, which was considered the most important hearth adaptable process in response to physical exercise, being directly related to contractile force development in cardiac cells. Muscle contractile capability could be generated by an interaction between different proteins, including myosin; the biggest muscle protein formed by heavy (MHC) and light (MLC) chains. In summary, the present study aims to establish a clear relation between different load levels and the increase of myosin heavy chain expression in cardiac contractile cells of *R. norvegicus* through proteomics techniques. Moreover, data here reported could be used to shed some light over the standard physical exercise procedures in order to give a most efficient result in sport performance and/or therapeutic procedures. To evaluate this question, 40 isogenics adult male rats Wistar (*R. norvegicus*) were divided into three groups TG1, TG3 and TG3. Groups were submitted to swimming training during twelve weeks, 2.5%; 5.0% and 7.5% of individualized overload. The animals from training groups GT1, GT2 had been submitted the continuous exercise and the animals pertaining of TG3 were submitted the interval exercise. Furthermore, our findings demonstrated clear morphologic alterations in hearth animals submitted to physical training (TGs), when compared to control group (CG). A discrete degree of nuclear hypertrophy was evidenced in GT3, suggesting that the intrinsic contractile characteristics of myofibrils could be modified in order to contribute for an increase of left ventricle activity, being this event associated to the training. Additionally, significant differences in protein maps were observed, by using one and two dimensional electrophoresis technologies, following mass spectrometry identification. All treatments clearly demonstrated the MHC expression increase in comparison to CG. Finally, the improvement of other proteins were also evaluated as troponin, a sarcomeric protein, proteins associated to oxidative metabolism as oxidorecdutases, translocases of mitochondrial membrane and proteins analogous to superoxide desmutases. This increase suggests a clear correlation with standard intensity in which each one of the individuals was submitted, demonstrating that high intensity interval training, when compared to continuous training of low and moderate intensity, was more efficient in the MHC enhancing expression in cardiac contractile cells. Furthermore, the high intensity also caused a significant degree of cellular injury, when compared with the rats submitted to low intensity. This process could, during a large period, lead to losses of contractile ability and consequently, to a functional reduction. In summary, these findings give support for more precise training programs such sports or health, also offering subsidies for the development of novel electrophoresis techniques approaches in order to carry high molecular weight proteins analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01**, página 20. Fotografia de microscopia eletrônica da estrutura do músculo estriado.
- Figura 02**, página 21. Ilustração dos miofilamentos musculares.
- Figura 03**, página 22. Ilustração da estrutura anatômica da fibra muscular estriada cardíaca.
- Figura 04**, página 24. Ilustração esquemática das pontes contráteis no músculo estriado.
- Figura 05**, página 53. Fotografia do local de manejo e manutenção dos animais.
- Figura 06**, página 56. Tanque de amianto utilizado para o treinamento de natação ao qual foram submetidos os animais.
- Figura 07A**, página 57. Aparato de sobrecarga atado ao animal para o treinamento físico.
- Figura 07B**, animal nadando com o aparato de sobrecarga .
- Figura 08**, página 58. Após a dissecação do animal, no detalhe, o coração sendo retirado.
- Figura 09**, página 59. Retirada do fragmento, ventrículo esquerdo, para a preparação da amostra.
- Figura 10**, página 59. Equipamento autotécnico, utilizado para a preparação das lâminas histológicas.
- Figura 11**, página 60. Cuba de inclusão em parafina para a preparação do corte das lâminas histológicas.
- Figura 12A**, página 60. Cubas de coramento do tecido para as lâminas histológicas. **Figura 12B**, detalhe das cubas.
- Figura 13**, página 61. Detalhe das lâminas prontas para a análise histológica.
- Figura 14**, página 62. Espectrofotômetro
- Figura 15**, página 65. Equipamento completo utilizado para o 2D-E
- Figura 16**, página 71. Fotografia da lâmina histológica em corte transversal do miócito cardíaco em aspecto normal.
- Figura 17**, página 71. Fotografia da lâmina histológica em corte transversal do miócito cardíaco em aspecto alterado pelo treinamento.
- Figura 18**, página 72. Fotografia da lâmina histológica em corte transversal do miócito cardíaco em aspecto alterado pelo treinamento.
- Figura 19**, página 75. Figura agrupada das fotografias das lâminas histológicas em corte transversal do miócito cardíaco, de todos os grupos controle e submetidos ao treinamento.
- Figura 20**, página 77. Fotografia da lâmina histológica em corte transversal do miócito cardíaco comparativa do aspecto normal e alterado pelo treinamento.
- Figura 21**, página 81. Fotografia SDS-PAGE.
- Figura 22**, página 88. Fotografia comparativa de 2D-E de todos os grupos controle e submetidos ao treinamento.
- Figura 23**, página 89. Figura gráfica dos diferentes níveis de expressão de MHC.
- Figura 24**, página 91. Figura comparativa da sobreposição de todos os grupos submetidos ao treinamento e controle.
- Figura 25**, página 92. Figura da análise tridimensional do 2D-E de todos os grupos controle e submetidos ao treinamento.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01, página 27. Classes de miosinas de diferentes organismos.

Tabela 02, página 55. Planificação do treinamento ao qual foram submetidos os animais.

Tabela 03, página 85. Proteínas identificadas por espectrometria de massa.

SUMÁRIO

Capa	ii
Folha de rosto	iii
Folha de aprovação	iv
Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Epígrafe	viii
Resumo	ix
Abstract	x
Lista de ilustrações	xi
Lista de tabelas	xii
Sumário	
1. Introdução	13
1.1. Origem embrionária	14
1.2. Diferenciação celular	18
1.3. Estrutura do músculo estriado	21
1.4. Estrutura da miosina	26
1.5. Cadeia pesada da miosina	30
1.6. Adaptação do miócito ao exercício	36
1.7. Efeito do exercício crônico sobre o miócito cardíaco	38
1.8. Tecnologia proteômica e o estudo molecular do músculo	41
1.9. Análises genômicas e proteômicas dos efeitos do exercício	43
1.10. A utilização da proteômica no estudo de marcadores biológicos para doenças do coração	48
1.11. Objetivo geral	53
1.12. Objetivos específicos	54
2. Materiais e métodos	55
2.1. Preparação e manejo dos animais	55
2.2. Preparação das amostras	59
2.2.1. Confecção das lâminas histológicas para a análise microscópica	59
2.2.2. Extração para a quantificação protéica	63
2.2.3. Análises eletroforéticas	65
2.3. Coloração do gel	67
2.4. Identificação protéica por espectrometria de massa	68
2.5. Determinação do Limiar anaeróbio	70
3. Resultados e Discussão	71
4. Conclusão	96
5. Referências bibliográficas	98

1 INTRODUÇÃO

Todos os movimentos humanos, do piscar de olhos à corrida em uma maratona, dos batimentos cardíacos a peristalse, dependem do funcionamento adequado do tecido muscular. De um modo geral, o movimento humano através dos tempos, foi meio de sobrevivência, de manifestação religiosa ou sócio-cultural. No que diz respeito ao desporto, as primeiras manifestações organizadas datam de 1650 A.C. na região da Mesopotâmia. As mais famosas referências do passado, no entanto, são os jogos Olímpicos, em 776 A.C. (compunham a tríade formada ainda pelos jogos Jônicos e Helênicos), que representavam uma forma de agradecimento à fartura das colheitas, sendo inclusive capazes até mesmo de interromper guerras (SÁNCHEZ, 1994).

Desde esta época, o homem tem buscado o entendimento de todos os aspectos voltados a tal capacidade e, sua inteira compreensão, inicialmente baseado em explicações místicas e até mesmo de cunho religioso, e depois de modo empírico utilizando novas tecnologias.

Essa procura pode não só permitir o desenvolvimento de habilidades motoras, como por exemplo, as relacionadas ao desporto, mas também permitir a descoberta de novos aspectos, bem como do tratamento de um enorme número de doenças associadas ao tecido muscular. Sem dúvida alguma, esse caminho passa pelo completo entendimento do miócito, desde sua origem e diferenciação até sua capacidade de diferenciação e adaptação estrutural.

1.1 Origem embrionária

A origem embrionária da população de células miogênicas difere de outros tipos de células de origem mesodermal, apesar de todos os três tipos de células musculares apresentarem origem comum, provenientes do embrião, onde as células mesenquimais, chamadas de mioblastos, irão formar os somitos (ENGEL & FRANZINI-ARMSTRONG, 1994). Os somitos são considerados a origem dos músculos esqueléticos, à exceção dos músculos da cabeça e membros, além de células que migraram para a formação dos músculos liso e cardíaco (DAVIES, BAKELEY & KIDD, 2002). Ainda segundo os mesmos autores, entre a quinta e oitava semana de vida do embrião, os músculos se diferenciam em suas formas e posições que irão apresentar no indivíduo adulto.

O processo de formação do embrião inicia-se com as primeiras divisões celulares, sendo formado o blastoderma, um disco achatado, que se subdivide em duas partes: uma área opaca, que dará origem ao embrião e também contribuirá para a formação de algumas membranas extraembrionárias, e uma área central, translúcida, que dará origem ao epiblasto e ao hipoblasto (RODRIGUES, 2006). A mesma autora explica ainda que na fase conhecida como blástula, ocorre a implantação do saco embrionário. Na fase seguinte, chamada de gastrulação, surgem as três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma (CHEN & FISCHMAN, 1996 apud RODRIGUES, 2006). Nesta fase, o embrião apresenta a definição do mesoderma pré-cardíaco. As células cardíacas são recrutadas do epiblasto superficial para a área pré-cardíaca, ingressam e migram para dentro do embrião, formando um

par de tubos que se fusionam em um único tubo na posição ventral e média. Este coração primitivo contém múltiplas camadas, exibe regionalização rostro-caudal e rotação, sendo possível de ser detectado com dois dias de cultura de embriões (YELLON & DOWNEY, 2003).

O formato tubular do coração é originário da participação da camada endodérmica, que contribui ainda para a diferenciação do coração, sendo esta primordial para a diversidade dos cardiomiócitos. Neste estágio da organogênese, o coração possui duas camadas uma interna, o endocárdio, e uma externa, o miocárdio. Juntas formam o coração tubular que inicia suas dobraduras sobre si e, posteriormente, as contrações sincrônicas (RODRIGUES, 2006). É neste estágio que acontece a formação das quatro câmaras cardíacas, passo anterior à modulação da espessura das paredes das câmaras e das camadas musculares (LINASK, 2003).

Os cardiomiócitos desenvolvem-se muito precocemente, devido à necessidade de ação do sistema circulatório, antes da terceira semana de vida, atendendo à necessidade de nutrição do embrião (DAVIES, BAKELEY & KIDD, 2002). Com o desenvolvimento do corpo embrionário, os cardiomiócitos se encontram localizados entre a lâmina epitelial e a lâmina basal das células mesenquimais. O tubo do endocárdio é recoberto por miocárdio muscular, e torcido em forma de S e, na quarta semana, pode ser visto se dividindo em segmentos funcionais (HESCHELER *et al.*, 1997; DAVIES, BAKELEY & KIDD, 2002).

Os cardiomiócitos são facilmente identificáveis, pois a partir da implantação do blastócito entre o primeiro e o quarto dia espontaneamente passam a apresentar contração. Com a continuação da diferenciação, o

número de células contráteis aumenta e passa a apresentar-se de forma regionalizada no corpo embrionário. Esta área aumenta rapidamente acompanhada de um decréscimo no número de contrações (batimentos) com a maturação embrionária (BOHELER *et al.*, 2002). Dependendo do número de células agregadas nesta etapa, a presença desta contração espontânea pode ser mantida até *in vitro* durante semanas (HESCHELER *et al.*, 1997; DAVIES, BAKELEY & KIDD, 2002).

Cardiomiócitos em cultura podem ser classificados segundo três estágios de diferenciação: primário (surgimento das células marcapasso e células miocárdicas primárias); intermediário e terminal (organização atrial, ventricular, células nodais e células do sistema His-Purkinge) (HESCHELER *et al.*, 1997). Durante o primeiro estágio de diferenciação no corpo embrionário, os cardiomiócitos são tipicamente pequenos e arredondados. As miofibrilas, que estão sendo formadas, encontram-se esparsas e irregularmente organizadas, apresentando, no entanto, sinais de sua caracterização estriada (presença de bandas A e I) (WESTFALL *et al.*, 1997).

Os mesmos autores citam ainda que os cardiomiócitos adjacentes apresentam estágios diferentes de organização miofibrilar. Com a maturação, os cardiomiócitos começam a se alongar e a desenvolver miofibrilas e sarcômeros. As células contráteis primariamente são mononucleadas e arredondadas, no entanto, durante a etapa final do desenvolvimento do coração (terminal), as mesmas apresentam densas e organizadas bandas miofibrilares, bem como um sarcômero organizado (bandas A, I e linhas Z) claramente observados (WESTFALL *et al.*, 1997; FASSLER *et al.*, 1996) Os nascentes discos intercalados, desmossomos e as áreas de junção também já

podem ser vistos (DOETSCHMAN *et al.*, 1985; WESTFALL *et al.*, 1997; ROBBINS *et al.*, 1990; KLUG *et al.*, 1996).

A imensa maioria dos estudos que descrevem a expressão embrionária da miosina foram realizados em aves, e demonstraram que a cadeia pesada da miosina (MHC) já podia ser detectada com aproximadamente um dia de vida no ventrículo e com dois dias no átrio (ZHANG *et al* 1997 e SWEENEY *et al*, 1995 citados por LEE *et al*, 1997). Gupta *et al*, 2003, no único estudo realizado com ratos, demonstrou que ambas as isoformas da Miosina de cadeia pesada (MHC), o motor primário da contração muscular, eram coexpressas no tubo cardíaco do embrião entre o décimo e o décimo primeiro dia. Os mesmos autores citam ainda que a MHC aparece, inicialmente, na porção ventricular, estando a definição da isoforma, no entanto, dependente do tamanho do animal.

Em embriões de camundongos no oitavo dia, o tubo cardíaco já está formado e iniciam-se as primeiras contrações. Neste momento, todos os tipos e isoformas de cadeia pesada de miosina (MHC), α e β e as isoformas de cadeia leve (MLC) 1A e 1V, aparecem em abundância, o que sugere uma sobre-regulação dos genes de miosina. Ainda segundo os mesmos autores estes resultados parecem ser coincidentes com os estudos de imunohistoquímica da miofibrila de ratos.

As maiores modificações, em relação à distribuição da miosina em camundongos, foram vistas por volta do nono dia quando se define a distinção entre átrio e ventrículo (RUGH & THEILER, 1990 citados por LYONS, 1997).

1.2 Diferenciação celular

A conversão de células tronco em miócitos requer a transcrição gênica controlada e eficiente. Vários estudos demonstraram que esta ação depende da interação de uma série de fatores reguladores. A precisa regulação desta expressão ocorre como resposta a sinais fisiológicos modulados, por fatores associados tanto ao estímulo quanto à inibição destes genes-alvo, que estão por sua vez relacionados à etapa do desenvolvimento, regulação hormonal ou associada a eventos patológicos (LEE *et al.*, 1997).

O músculo cardíaco apresenta pelo menos duas diferentes isoformas da cadeia pesada de miosina (α e β -MHC) e duas cadeias leves de miosinas (MLC) que estão codificadas em dois genes distintos, (MAHDAVI *et al.*, 1995; BARTON *et al.*, 1996 citados por LYONS *et al.*, 1997). Os genes que codificam as MHC apresentam-se regulados de modo diferente em resposta a diferentes estímulos como, por exemplo, a sobrecarga, o que parece óbvio devido a importância do trabalho cardíaco. No rato, os cardiomiócitos expressam as isoformas α e β da cadeia pesada de miosina sendo, no entanto, a α -MHC a maior proteína contrátil exclusivamente expressa no miocárdio (KIM *et al.*, 2005). Ainda segundo os mesmos autores no nível do promotor do gene estão associados a esta expressão o M-CAT; E-box; CarG box; o hormônio tireiodeano T_3 ; MEF2; e GATA4 e PUR, os quais serão descritos a seguir.

A família de fatores MEF (*myosin enhancer factor*) apresenta-se essencial à expressão de genes relacionados à diferenciação celular dos cardiomiócitos no rato, e também com a diferenciação do músculo liso e do estriado esquelético. Neste último caso, o MEF-2 parece ser o principal fator

atuante, refletindo na transcrição de seqüências conservadas de DNA referente à maioria dos genes estruturais do músculo (LIN *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2005). Existem quatro genes desta família MEF2 conhecidos como: MEF2A, - B, - C, e - D. No rato, estão co-expressos o MEF2-B e o MEF2-C. A importância destes genes pode ser comprovada uma vez que mutações ou deleções, em um único gene MEF2 em *Drosóphila melanogaster*, impedem a diferenciação dos cardiomiócitos (KIM *et al.*, 2005). Em ratos, o silenciamento destes genes provocam alterações morfológicas, hemodinâmicas bem como alterações na maquinaria contrátil. (LIN *et al.*, 1997). Segundo Lee *et al.* (1997), o fator MEF2 apresenta-se como um dos mais importantes da transcrição da MHC, atuando em conjunto, sinergicamente, com o hormônio tireiodeano T₃. Esta interação ocorre de modo ativo no promotor em uma região rica em A/T (2222 a 2205), para o MEF2 e em uma outra região rica em A/T (2153 à 2132), para a região responsiva a T₃

Izumo & Mahdavi (1988) sugerem que, de uma forma não totalmente elucidada, a ausência do MEF2 ligado ao promotor possibilita a ação de inibidores junto ao mesmo, inativando a expressão. Por outro lado, a ação complementar do T₃ apresenta-se em dois passos: T₃ associa-se ao inibidor TRACs, impedindo sua fixação no promotor o que, possivelmente, permitiria a associação com o DNA, por sua mudança topológica. Além disto, o domínio MADS do MEF2 interage fisicamente com os fatores miogênicos, ativando cooperativamente, a expressão gênica para α -MHC (LEE *et al.*, 1997 KAUSHAL *et al.*, 1994).

Além do MEF, a família de fatores de transcrição GATA apresenta um importante papel não só na diferenciação, bem como crescimento e manutenção dos diversos tipos de células cardíacas (MOLKENTIN, 2000). Seis membros desta família foram identificados em vertebrados, sendo os GATA-4,5 e 6, considerados responsáveis pela diferenciação em coração, fígado, pulmões e intestino.1b. Estudos *in vitro* demonstraram sua presença no mesoderma e posteriormente nas células diferenciadas do endocárdio e do miocárdio, tendo sido considerados de fundamental importância no desenvolvimento dos mesmos (MOLKENTIN, KALVAKOLANU & MARKHAM, 1994; MCFADDEN *et al.*, 2000; DODOU *et al.*, 2004).

A família GATA possui um domínio de associação ao DNA altamente conservado, composto por duas regiões do tipo *zinc finger* (HON *et al.*,1994) que parecem exercer uma ação competitiva com inibidores da síntese de MHC no miócito cardíaco (HON *et al.*,1994; CSERJESI, MARKHAM, & MOLKENTIN,2002). Além disso, o GATA4 parece exercer um papel fundamental na expressão de genes críticos na maquinaria contrátil cardíaca (troponina C e miosina de cadeia pesada- β), atuando também na expressão de fatores de transcrição como Nkx2.5, Hand2 e MEF2C (promotor do miócito cardíaco 2C) e MLP, e Mhox (MOLKENTIN, KALVAKOLANU & MARKHAM, 1994; GREPIN, NEMER & NEMER, 1997; MOLKENTIN, 2000). Sinalizadores como BMP-2 or BMP-4, podem atuar como inibidores da transformação das células mesodermis em cardiomiócitos (células contráteis), inibindo o papel do GATA-4 e do Kkx. (CSERJESI, MARKHAM, & MOLKENTIN,2002). Estudos realizados por Evans, Reitman & Felsenfeld (1992 citados por Hon *et al.*, 1994) descrevem que o gene GATA4 pode ser expressado inicialmente por volta do

sétimo dia de idade do embrião sendo o mRNA do GATA4 pode ser detectado no tubo cardíaco no oitavo dia de idade, continuando a ser expresso por toda a vida do animal.

Outros promotores importantes são as proteínas PUR α e β , classificadas como proteínas homólogas da murina. Apresentam grande afinidade pela região PNR (*purine-rich negative regulatory*) localizada no íntron do gene da α -miosina que, por sua vez, associa-se ao mRNA da MHC regulando a expressão gênica, participando da proliferação, diferenciação e da apoptose, estando sua expressão, em decorrência desta atividade, muito aumentada em patologias associadas ao coração. As PUR associam-se a PNR, inibindo sua ação regulando assim, positivamente a expressão da MHC. Gupta *et al.* (2003) encontraram evidências da participação das proteínas PUR na transcrição e tradução do gene da MHC.

1.3 Estrutura do músculo estriado

O movimento é característica universal de todo organismo vivo, podendo ter evoluído a partir da alteração da forma apresentada por diversas moléculas de enzimas e de proteínas, quando participam de trocas energéticas, em geral, ligadas ao ATP (DAVIES, BLAKELEY & KIDD, 2002). Cooper & Hausman (2004) descrevem a célula do músculo esquelético como uma “célula gigante”, formada pela fusão de células isoladas que mantêm seus núcleos logo abaixo da membrana plasmática. O citoplasma é composto fundamentalmente por miofibrilas, que são os elementos contráteis da célula. Isto tudo caracteriza o

músculo esquelético como uma célula altamente especializada e compartimentalizada.

O músculo estriado é classificado quanto à caracterização anatômica em: estriado esquelético, principal determinante do sistema locomotor ativo e estriado cardíaco, responsável pela contratilidade cardíaca. Ambos, quando analisados microscopicamente, apresentam-se formados por filamentos organizados em regiões claras e escuras, de modo alternado. Estas regiões são chamadas de bandas I e A e apresentam, respectivamente, de forma predominante as proteínas actina e miosina. A banda escura, também é conhecida como filamento espesso ou grosso e a banda clara como filamento delgado ou fino e a interação entre os dois feixes de proteínas é responsável pela contração muscular (Figura 01) (WIDMAIER *et al.*, 2003; CLARK *et al.*, 2002).

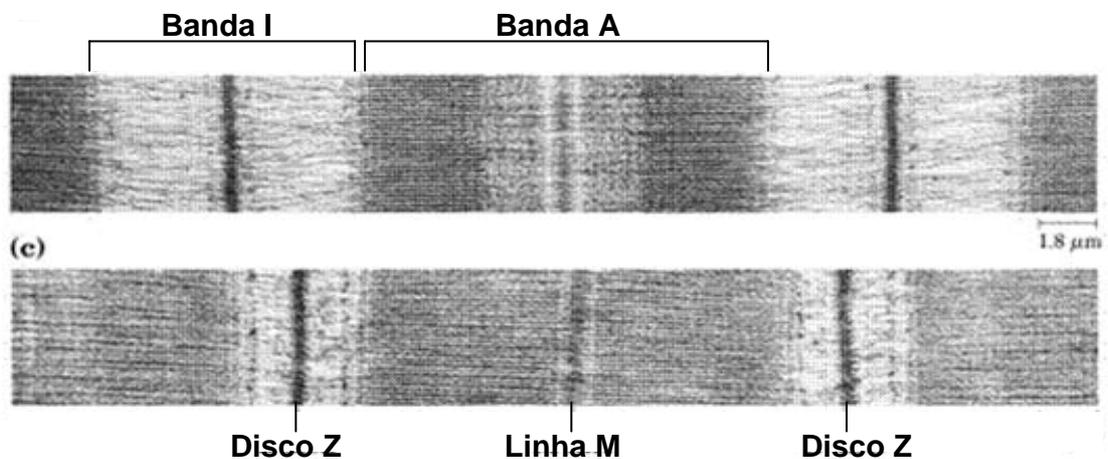


Figura 01. Sarcomero do músculo estriado esquelético. Fotografia de microscopia eletrônica. Retirado de Fisiologia, Vander *et al.* (1981), p. 239.

Cada filamento é formado por proteínas não covalentes associadas. O filamento espesso é formado por proteínas de baixa massa molecular como as proteínas presentes no terço médio do filamento, miomesina, proteína M e creatina quinase, em uma região conhecida como linha M e a enzima

AMPdeaminase presente nas extremidades. Todas estas proteínas estão associadas à titina, uma proteína que funciona como uma espécie de “esqueleto”, conferindo sustentação ao filamento e à miosina, um hexâmero de alta massa molecular, com aproximadamente 220 kDa, que se apresenta como a maior e mais importante proteína contrátil, bem como o maior constituinte do filamento espesso (TSKHOVREBOVA & TRINICK, 1997; ENGEL & FRANZINNI-ARMSTRONG, 1994; TRINICK, 1991).

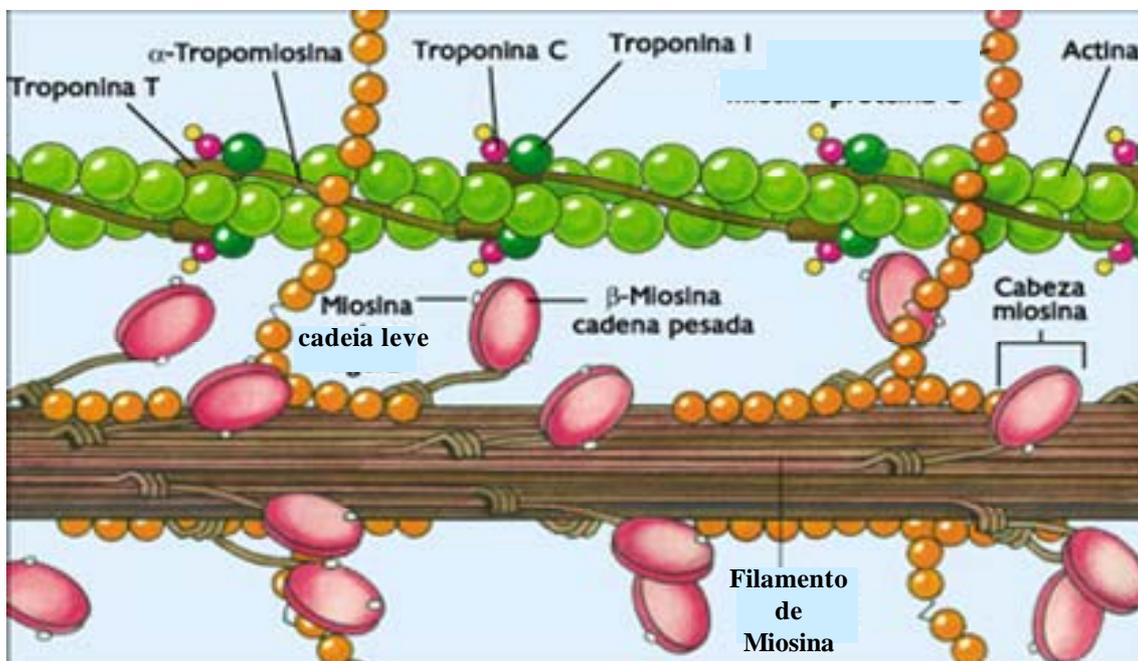


Figura 02. Ilustração da estrutura dos filamentos proteicos de miosina e actina-tropomiosina-troponina: Contração muscular. Retirado de www.edcenter.sdsu.edu/cso/paper/image005.jpg .

O filamento delgado é formado, em sua maioria, por um complexo constituído de três proteínas: actina, troponina e tropomiosina, além de uma proteína menor envolvida na estabilização do filamento conhecida como nebulina (TSKHOVREBOVA & TRINICK, 1997; TRINICK, 1991). A troponina e a tropomiosina atuam neste complexo como reguladoras da contração

muscular, sendo dependentes para esta atividade de íons de cálcio retidos no retículo sarcoplasmático. A interação do cálcio com a troponina ocasiona a movimentação da tropomiosina, o que por sua vez permite a interação das proteínas actina e miosina na formação da contração muscular (Figura 02). Durante o desenvolvimento embrionário, átrios e ventrículos originam-se do tubo cardíaco, diferindo, entretanto, por suas capacidades contráteis e pelos genes que os expressarão. Entretanto, o mecanismo contrátil apresenta-se fundamentalmente o mesmo, em todas as espécies, que apresentam este tipo de músculo, diferindo apenas na estrutura da miosina de cadeia leve (ROBERGS & ROBERTS, 1997; BANDMAN & ROSSER, 2000 citado por SEMIR *et al.*, 2006).

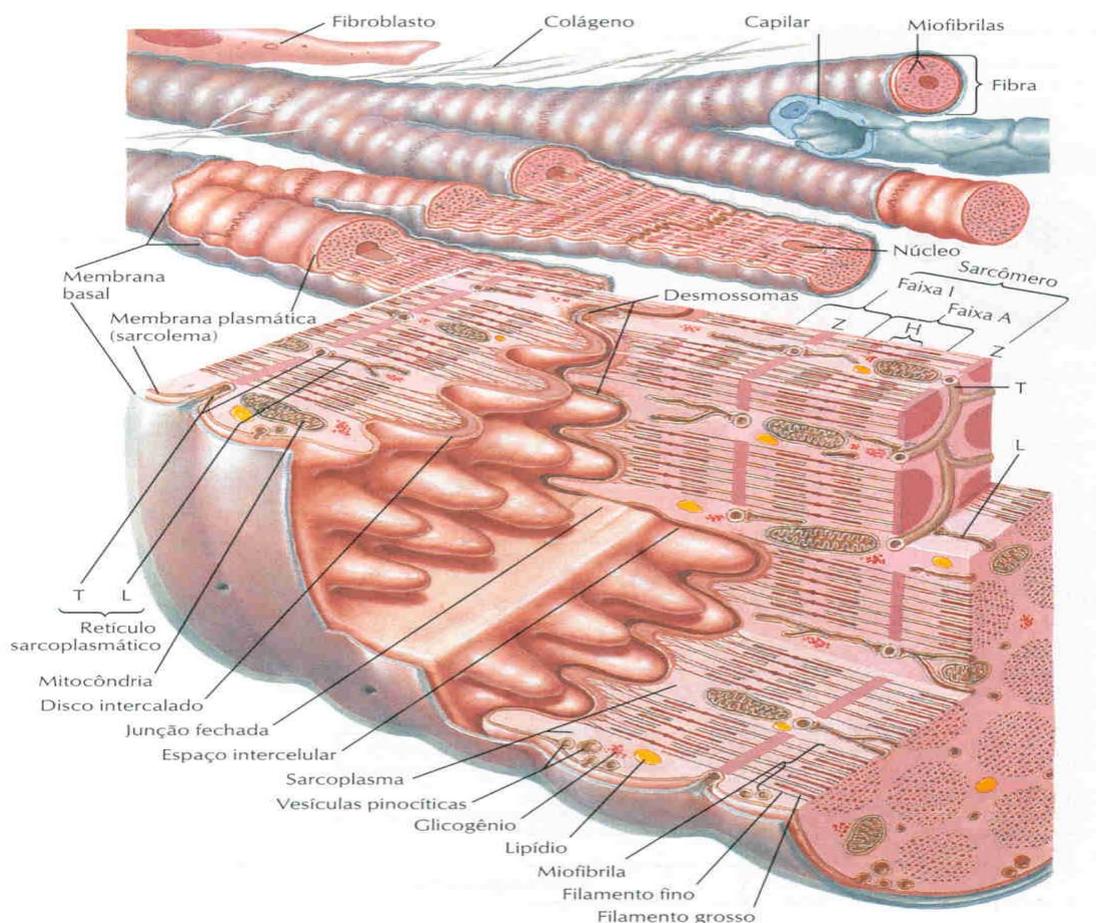


Figura 03. Ilustração da estrutura anatômica da fibra muscular estriada cardíaca e sua junção término-terminal Retirado do Atlas de Fisiologia Humana de Netter, Hansen e Koeppen, (2003) p. 76.

As fibras do miocárdio estão conectadas em uma disposição conhecida como término-terminal onde as fibras projetam-se em diferentes ângulos uma das outras o que permite um trabalho mecânico, eficiente, que circunda o órgão em um trajeto helicoidal (ROBERGS & ROBERTS, 1997; DAVIES, BLACKELEY & KIDD, 2002). Tal angulação modifica-se de acordo com a profundidade e distribuição das fibras na parede do miocárdio, o que confere ao coração sua função de bomba circulatória (Figura 03).

Outra diferença importante das fibras estriadas cardíacas é o fato de não possuírem, em sua organização, unidades motoras e sim, um sistema extremamente organizado de geração e propagação do potencial de ação, formado por células musculares adaptadas (GUYTON, 1998).

A capacidade contrátil do músculo é gerada pela capacidade de interação entre miosina e actina, na formação da ponte cruzada que, de forma cíclica, utilizando a energia da hidrólise do ATP, em última instância, é a responsável pela contração muscular (Figura 04).

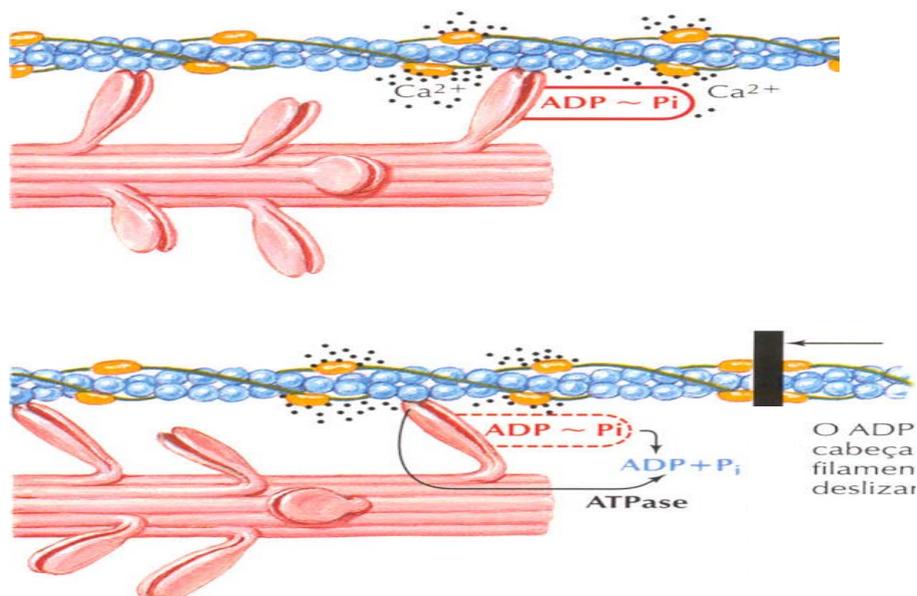


Figura 04. Ilustração esquemática das pontes contráteis. Retirado do Atlas de Fisiologia Humana de Netter. Hansen e Koeppen, (2003) p. 74.

A ponte cruzada é uma máquina molecular que apresenta três áreas funcionais distintas: um sítio de ligação com a actina; um sítio ativo de hidrólise do ATP e um “braço” de movimentação que amplifica as alterações estruturais da proteína (CRAIG *in* ENGEL & FRANZINNI-ARMSTRONG, 1994; LOWEY *in* ENGEL & FRANZINNI-ARMSTRONG, 1994).

A miosina, a principal proteína desta maquinaria, apresenta-se como um hexâmero formado por duas cadeias pesadas e dois pares diferentes entre si de cadeias leves (WEISS & LEINWAND, 1996). Estas apresentam uma estrutura formada por uma região longa, em alfa hélice, e uma região em forma de bulbo no final, que, respectivamente, são conhecidos como cauda e cabeça da miosina (CRAIG *in* ENGEL & FRANZINNI-ARMSTRONG, 1994).

1.4 Estrutura da miosina

A importância da miosina pode ser determinada pelo grande número de organismos em que é encontrada, bem como pela diversidade de funções relatadas. Existem, segundo Sellers (2000), dezessete classes de miosina em eucariotos (Tabela 01). Esta classificação filogenética é baseada na comparação das seqüências dos domínios motores. Um importante detalhe descrito pelo mesmo autor é que uma classificação similar pode ainda ser obtida pela comparação da cauda da miosina.

Em mamíferos um grande número de genes de miosina, cerca de vinte e oito, é descrito para as classes I, II, III, V, VI, VII, IX, X e XV, (SELLERS, 2000). Brown (1997) descreve em *Saccharomyces cerevisiae*, cinco genes,

responsáveis por duas classes I, uma classe II e duas classes V. Em nematóides, *Caenorhabditis elegans*, quatorze genes para miosina foram seqüenciados relacionados a duas classes I, seis classes II, uma classe V, duas classes VI, uma classe VII, uma classe IX e uma classe XII (BAKER & TITUS, 1997). Os genes associados às classes VIII, XI e XIII encontram-se expressos somente em plantas, sendo que dos vinte e seis genes identificados, dezesseis são expressos em *Arabidopsis thaliana* (REICHELDT & KENDRICK-JONES, 1999 citados por SELLERS, 2000).

A miosina consiste em duas cabeças globulares associadas a uma longa cauda entrelaçada (LOWEY *in* ENGEL & FRANZINNI-ARMSTRONG, 1994), na forma de uma alfa-hélice. Cada cabeça da miosina, também conhecida como região S1, é composta por três domínios, apresentando um peso molecular de cerca de 130 kDa e um comprimento de cerca de 17 a 19 nm por 5 nm de circunferência, em sua região de maior diâmetro (CRAIG *in* ENGEL & FRANZINNI-ARMSTRONG, 1994; CRAIG e WOODHEAD, 2006). Modelos teóricos demonstraram um arranjo similar de miosina entre diferentes espécies de aves e mamíferos (CRAIG & WOODHEAD, 2006).

Os três domínios na região S1 estão arranjados da seguinte maneira: um grande domínio da região da cabeça; um domínio pequeno no meio das duas cabeças e o último no local de ligação entre a cauda e as cabeças, região denominada, por alguns autores como pescoço (CRAIG *in* ENGEL & FRANZINNI-ARMSTRONG, 1994).

Muitas das idéias a respeito das interações entre as proteínas envolvidas na contração muscular têm sido influenciadas pelo estudo da seqüência da miosina de *Caenorhabditis elegans* (MCLACHLAN & KARN

citado por CRAIG & WOODHEAD, 2006). Estes autores demonstram ainda a presença, na cauda da miosina, de uma estrutura em repetição (alfa-hélice) formada por 28 resíduos, em duas regiões carregadas positiva e negativamente, separadas por 14 resíduos de aminoácidos, formando um dispositivo de 14,4 e 43,2 nm, que representam a periodicidade do arranjo entre os filamentos.

Como mencionado anteriormente, o filamento espesso (formado pelo arranjo de miosinas), tanto no músculo estriado cardíaco quanto no estriado esquelético encontra-se associado a duas proteínas elásticas gigantes, titina, (também conhecida por conectina) e nebulina que formam um complexo polipeptídico com cerca de 3000 kDa que, por sua vez, funciona como um molde de desenvolvimento do sarcômero durante o processo de maturação do músculo estriado sendo, em muitos aspectos, responsável pelo comportamento mecânico do músculo (CRAIG *in* ENGEL & FRANZINNI-ARMSTRONG, 1994; RUPPE & SPUDICH, 1996; CRAIG e WOODHEAD, 2006).

A grande capacidade de movimentação das duas cabeças da miosina foi descrita por Slayter e Lowey (1992) citados por Lowey (1994) *in* Engel & Franzinni-Armstrong (1994) como sendo possíveis tanto no sentido do eixo axial (sentido da calda), quanto perpendicular ao mesmo, tendo sido descrito posteriormente que as cabeças possuem uma aparente independência uma da outra (ENGEL & FRANZINNI-ARMSTRONG, 1994). Os mesmos autores citam ainda que mais recentemente foi demonstrado que as cabeças podem, ainda, girar 180 graus sobre o próprio eixo (HUXLEY & SIMMONS, 1971; MARGOSSIAN & LOWEY, 1973; EISENBERG, HILL & CHEN, 1980; HARADA *et al.*, 1987).

A fragmentação proteolítica (utilizando papaína, tripsina e quimotripsina) proporcionou um maior conhecimento estrutural e mecânica da miosina. As proteinases clivam a molécula em três regiões: a região próxima da cabeça, chamada meromiosina pesada; a região da cauda, meromiosina leve, região S2, além da própria cabeça, região S1, que por sua vez, contém um segmento de nucleotídeos e o sítio ativo de ligação com a molécula de actina (CRAIG *in* ENGEL & FRANZINI-ARMSTRONG, 1994).

Tabela 01. Diferentes classes de miosina em diversos organismos. Adaptado de James R. Sellers, (2000) Myosins: a Diverse Superfamily. *in* Biochem. Biophys. Acta - Molecular Cell Research Volume 1496, p. 3-22.

Classe	Função
I – amebóide	Motilidade celular; fagocitose; contratilidade do vacúolo
I – brush border	Microvilosidades ; possível transporte vesicular
IB	Estereocílios; possível transporte vesicular; desenvolvimento epitelial
I – myr 4	Possível transporte vesicular; desenvolvimento epitelial
II –citoplasma	Citocinese; fagocitose,morfologia celular
II – músculo liso	Contração do músculo liso
II – sarcomérica	Contração do músculo estriado
III	Fotoadaptação (<i>D. melanogaster</i>)
IV	Presentes somente em espécies amebóides
V	Transporte vesicular; transporte de RNAm
VI	Transporte vesicular; função epitelial; translocação de filamentos de actina.
VII	Epitélio sensorial
VIII – plantas	
IX	Envolvimento na transdução de sinal
X	Envolvimento na transdução de sinal
XI – plantas	Transporte vesicular
XII	Função não definida
XIII – plantas	Função não definida
XIV	Espécies de plasmídeos e toxoplasmídeos
XV	Possível função auditiva
XVII	Síntese de quitina, localizada na membrana citoplasmática, somente em espécies de <i>Pyricularia</i> e <i>Emiricella</i> .

As miosinas de cadeia leve (*Ligth Chain*) apresentam uma seqüência idêntica nos 141 resíduos da porção C-terminal, diferindo em apenas cinco

resíduos de aminoácidos na porção N-terminal, tendo em função desta pequena diferença a determinação de uma distinção fenotípica entre as duas proteínas (FRANK & WEEDS citados por ENGEL & FRANZINI-ARMSTRONG, 1994). Segundo Lowey (1994), pode-se ainda diferenciá-las como LC1_f, LC2_f e LC3_f, nas fibras de contração rápida, *fast twist*, e LC1_s e LC2_s, nas fibras de contração lenta, *slow twist*. Todas as isoformas são codificadas por um único gene, com dois promotores e um *splicing*, que define a especificidade da porção N-terminal das mesmas.

1.5 Cadeia pesada de miosina

O sítio de catálise da interação actina-miosina e a atividade hidrolítica do ATP foi amplamente demonstrado por Kron & Spudich, (citados por RUPPE & SPUDICH, 1996), em estudos *in vitro*, determinando inclusive que somente este domínio é requerido nesta ação.

A cadeia pesada de miosina (MHC) pode ser dividida em dois domínios funcionais sendo, uma porção globular, N-terminal (cabeça com 25 kDa) que se liga com a molécula de actina, hidrolisa ATP e é a responsável pela modificação conformacional e uma porção longa em forma de alfa hélice, (chamada de centro com 50 kDa), ligada à extremidade C-terminal (20 kDa) (RUPPE & SPUDICH, 1996; STELZER *et al.*, 2007). O sítio catalítico do ATP encontra-se acerca de 50 Å da ponta da cabeça da miosina em uma região de oposição ao sítio de ligação com a actina¹⁸. De acordo com Clark *et al.* (2002) a região C-terminal de ambas as cadeias pesadas da miosina, no início da haste, também é conhecida com meromiosina (*Ligth meromyosin* - LMM), e

contém um domínio em espiral envolto em polímeros de miosina. A outra porção da haste está conectada à cabeça da miosina no filamento espesso de forma estrutural.

Cada cabeça de miosina apresenta um comprimento total de 17 a 19 nm e os três domínios supracitados estão arranjados com os dois maiores na ponta do segmento e o menor centralmente (CRAIG *in* ENGEL & FRANZINNI-ARMSTRONG, 1994).

A cadeia pesada da miosina constitui a maior proteína do músculo esquelético, servindo inclusive de base à classificação histoquímica tradicional: tipo I (fibras lentas) e tipo II (fibras rápidas). As diferenças entre as ATPases miofibrilares, velocidade de encurtamento e a eficiência na geração de força estão diretamente relacionadas à presença das diferentes isoformas da cadeia previamente mencionada (BOTTINELLI *et al.*, 1991; DENARDI *et al.*, 1993). A partir da hidrólise do ATP, a interação entre o domínio motor da cabeça da miosina interage com o sítio ativo da actina em uma grande rotação angular, resultando em um deslocamento de cerca de 100 Å. Após o fim do encurtamento provocado por tal arranjo o ADP é dissociado e o complexo actina-miosina retorna ao estado relaxado. Este ciclo pode ser repetido inúmeras vezes em uma única contração (WEISS & LEINWAND, 1996; CLARK *et al.*, 2002).

Os tipos de isoformas de miosina podem ser considerados como determinantes primários desta propriedade contrátil nos diferentes tipos de músculo. Assim sendo, as isoformas da miosina têm recebido maior atenção em relação a outras proteínas miofibrilares devido às diferenças encontradas na velocidade de encurtamento associada à hidrólise do ATP no sítio catalítico

localizado na cabeça da miosina (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996; MEDLER & MYCLES, 2003).

Ao menos nove isoformas da cadeia pesada de miosina foram identificadas em músculo estriado de mamíferos (esquelético e cardíaco) e estas foram designadas: embriogênicas, neonatais, cardíacas α e β ou de contração lenta tipo I (expressa em músculo esquelético, contração rápida tipo IIa; IIx/IIid e tipo IIb; extra ocular e mandibular ou mastigatória (m-MHC) (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996).

A diferenciação miogênica, do tipo de fibra, por exemplo, pode ser detectado em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (DIMARIO *et al.*, 1993; ONTELL *et al.*, 1993; STOCKDALE 1997 citados por CHIN *et al.*, 1998), mantendo sua plasticidade em adultos, podendo ainda ser modificada pelo treinamento desportivo, variações hormonais ou doenças sistêmicas, tais como a hipertensão arterial (HOLLOSZY & COYLE 1984; MASSIE *et al.*, 1988; IANUZZO *et al.*, 1991; SABBAH *et al.*, 1993; WILLIAMS & NEUFER 1996 citados por CHIN *et al.*, 1998).

Para D'Albis *et al.* (1995) citados por Baldwin & Haddad, (2001) a isoforma embriogênica e neonatal são expressas predominantemente durante o desenvolvimento do músculo esquelético e podem ser detectadas no tecido muscular adulto durante processos regenerativos, bem como em músculos especializados como o masseter e músculos extras oculares.

As isoformas α e β são expressas somente no músculo cardíaco. A cadeia pesada α também pode ser encontrada em certos músculos esqueléticos especializados, como o masseter (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996). Ainda para os mesmos autores, a expressão da cadeia β (tipo I) não

aparece somente confinada ao músculo cardíaco, mas também pode ser encontrada na embriogênese do músculo esquelético, sendo expressa em maior quantidade em fibras de contração lenta no músculo esquelético. Adicionalmente às isoformas de cadeia pesada do tipo I, o músculo esquelético expressa várias outras como as isoformas do tipo IIa, IIx, and IIb. A isoforma extra-ocular apresenta-se expressa somente nas proximidades do olho e músculos da região laríngea assim como a isoforma mastigatória está expressa somente na mandíbula de animais carnívoros.

No ser humano, durante as fases de crescimento e desenvolvimento do coração, a isoforma β da cadeia pesada da miosina permanece dominante em ventrículos normais, não obstante terem sido relatadas a presença de pequenas quantidades de isoformas do tipo α (MIYATA *et al.*, 2000). As isoformas da cadeia pesada da miosina sofrem regulação em sua ação contrátil por diversos estímulos, tais como estímulos fisiológicos, hormonais, mecânicos, neurais dentre outros. (WEISS & LEINWAND, 1996) Em geral, a classificação das fibras de acordo com sua velocidade de contração, lenta ou rápida, é um reflexo da expressão das diferentes isoformas lentas ou rápidas da cadeia pesada da miosina. Fibras do tipo I (lentas) são recrutadas em uma baixa frequência de estimulação e são oxidativas, no que diz respeito à ressíntese de energia para sua contração (ATP). Contrariamente, as fibras tipo IIx (rápidas) necessitam de uma alta frequência de estimulação e apresentam resíntese de energia glicolítica, enquanto as fibras do tipo IIa (também chamadas rápidas) possuem características intermediárias entre os tipos I e IIx (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996; HESSELINK *et al.*, 2001; RUSSELL *et al.*, 2003). Os custos da síntese e ressíntese de ATP variam de forma diretamente proporcional à

isoforma da cadeia pesada da miosina expressa no músculo. A co-expressão destas isoformas pode aparecer em cerca de 30% dos indivíduos e varia de acordo com a idade e o nível de treinamento. Assim sendo, a determinação da isoforma da cadeia pesada da miosina predominante na composição muscular apresenta-se como um importante índice de identificação fenotípica do tecido muscular (ANDERSEN *et al.*, 1994; WILLIAMSON *et al.*, 2000 citados por COENEN-SCHIMKE *et al.*, 2005).

Estas diferenças também estão evidenciadas na distribuição da miosina presente nos átrios em relação à miosina presente nos ventrículos cardíacos (FLINK *et al.*, 1978; SATORI, PIEROBON-BORMIOLI & SCHIAFFINO, 1978). No ventrículo, podem-se diferenciar, de acordo com a velocidade de deslocamento, três componentes distintos: um rápido e um lento, contendo homodímeros de duas isoformas de cadeia pesada distintas quimicamente (α e β) e um heterodímero intermediário, composto por ambos os tipos citados. A homologia entre estas isoformas é de 93% (McNALLY *et al.*, 1989 citado por STELZER *et al.*, 2007; KRENZ, SANBE & BOUYER-DALLOZ, 2003).

A diferença na composição da cadeia pesada da miosina no miócito cardíaco está relacionada à característica funcional nas regiões do coração. O ventrículo se contrai contra grandes pressões, enquanto o átrio apresenta maior velocidade e sobrecarga tensional. Assim sendo, as isoformas suprem, de acordo com a velocidade de hidrólise do ATP, o mecanismo contrátil de modos diferentes (SWEENEY, ZAK & MANASEK, 1987; STELZER *et al.*, 2007).

Segundo Krenz, Sanbe & Bouyer-Dalloz (2003), são profundas as diferenças entre as isoformas α e β em termos de geração de força, velocidade

de contração e atividade enzimática (ATPase). As fibras do tipo II (α -MHC) em coelhos, por exemplo, apresentam três vezes mais velocidade de contração e cerca de 50% menos de força contrátil que as fibras do tipo I (β -MHC). Esta diferença em relação à força de contração, no entanto, não foi descrita, segundo os próprios autores, em ratos.

Em cardiomiócitos humanos, existe uma grande diferença entre as quantidades expressas das isoformas, estando a α -MHC em muito menor quantidade (SCHIAFFINO *et al.*, 1984; MIYATA *et al.*, 2000; REISER *et al.*, 2001). O motivo desta discrepância permanece obscuro. No entanto, alguns autores acreditam que há uma estreita relação entre a menor quantidade e a integridade do miócito ventricular, visto que, durante estados de insuficiência cardíaca, ocorre um aumento na expressão da mesma (STELZER *et al.*, 2007).

Fitzsimons *et al.* (1998); Herron & McDonald, (2002); Rundell *et al.* (2005); Korte *et al.* (2005) todos citados por Stelzer *et al.*, (2007) relacionaram este aumento a concomitante perda da capacidade funcional do ventrículo.

Esta diferença funcional e mecânica, entre as isoformas α e β , reside em duas regiões formadas por 1881 resíduos de aminoácidos que formam dois “loops”. O “loop” 1 (L1), cuja localização está entre os resíduos 213 - 223 forma a cavidade do sítio de contato com a actina e o “loop” 2 (L2), na posição 624–646, forma o sítio de ancoramento (KRENZ, SANBE & BOUYER-DALLOZ , 2003). A comparação destes sítios com seqüências do miócito humano revela uma alta conservação (WEISS, SCHIAFFINO & LEINWAND, 1999). Neste sentido Spudich *et al.*, (2002 citados por Krenz, Sanbe & Bouyer-Dalloz, 2003)

propuseram que o L1 modula a velocidade de ressíntese de ADP, enquanto o L2 auxilia na regulação da ressíntese de ATP.

1.6 Adaptação do miócito ao exercício

A prática regular da atividade física tem sido reconhecida como um dos fatores mais importantes na manutenção dos níveis de saúde e qualidade de vida, no tocante à sua ação preventiva. Os níveis de aptidão física seriam, então, um dos principais componentes desta melhoria (NIEMAN, 1999). Com base neste conceito, fazem parte da aptidão física relacionada à saúde componentes que apresentem associação direta ao melhor estado de saúde e, adicionalmente, demonstrem adaptação positiva à prática regular de atividade física.

Neste sentido, é importante lembrar o conceito de adaptação ou adaptabilidade. Segundo Gürtler , 1982 (citado por WEINECK, 2005), adaptação é o nome que se dá à diferente assimilação dos estímulos, frente à carga de treinamento, que pode ser atribuída à correlação organismo/meio ambiente, sob o ponto de vista da predisposição hereditária e sua expressão genética. A adaptação é então, um princípio biológico relacionado à manutenção da vida, pois a cada novo estímulo, existe uma quebra da homeostasia corporal e, por conseguinte, uma adaptação a nova situação.

Para Yan (2000), a adaptação pode ser definida como uma mudança na estrutura, função ou forma que possibilitaria uma melhoria nas condições de sobrevivência de um determinado animal em um dado ambiente. O músculo

estriado é um tecido dinâmico com grande capacidade de adaptação produzida por alterações de demanda funcional.

Além disso, o exercício físico é um potente indutor de adaptações nas estruturas neuromusculares. Tais mudanças estão relacionadas, sobretudo, ao tipo de exercício desenvolvido. Porém, o exercício característico de força muscular é o melhor estímulo para induzir mudanças nas estruturas musculares (WILMORE & COSTILL, 2001; GARRET JR & KIRKENDALL, 2000). A percepção da importância desta adaptação ao exercício e seu significado positivo para a saúde existe há séculos, mesmo antes de sua perfeita compreensão. Galeno, o pai da medicina moderna, em seu livro *Tratado De Sanitate tuenda – Hygiene* (citado por NADER & NERY, 2003) escrito no início do século I, já fazia referências à importância do exercício e as adaptações fisiológicas ao mesmo.

Zoppi (2005), afirma que grande parte dos estudos nesta área vem focando principalmente a indução da hipertrofia muscular em decorrência do aumento na expressão de proteínas contráteis, tendo em vista a relação da força contrátil com parâmetros relacionados tanto à saúde quanto ao desempenho desportivo. Yang *et al.* (2002 citado por ZOPPI, 2005) demonstraram uma das prováveis ligações entre o estresse mecânico da sobrecarga imposta aos músculos e a regulação da expressão do gene que codifica as moléculas de miosina. Os autores mostraram que tal regulação é feita pelo fator de crescimento mecânico (*Mechanic Growth Factor* - MGF). Esse fator de crescimento possui muita similaridade com o IGF-1 (*Insuline Growth Factor*) e está presente apenas em células musculares que foram sujeitas à tensão.

O aumento da transcrição das proteínas contráteis parece estar associado ao processo de ativação gênica, estimulado pelo IGF-I, que sinaliza aumento da transcrição de proteínas contráteis (McKOY *et al.*, 1999). Além destes, Dunn *et al.* (2000) relataram a ativação de vários genes envolvidos na síntese de proteínas contráteis.

Por outro lado, existe também uma classe de inibidores que atua na sinalização da hipertrofia muscular. A miostatina parece ser a principal substância inibitória da síntese de proteínas contráteis (McPHERRON *et al.*, 1997; SHARMA *et al.*, 2001) inibindo a ativação dos genes específicos das proteínas contráteis.

1.7 Efeito do exercício crônico sobre os miócitos cardíacos

A ação do exercício físico e seus efeitos sobre o sistema cardiocirculatório encontram-se bem descritas na literatura. O aumento da capacidade aeróbia, representados por incrementos no $VO_2max.$, aumento da perfusão sangüínea no miocárdio, além de melhorar a performance cardíaca, parecem significar maior proteção ao stress. (POWERS *et al.*, 2002; FREIMANN *et al.*, 2005; STROM *et al.*, 2005). Destes, parece ser um consenso na literatura, a importância o papel na prevenção da isquemia cardíaca a partir do aumento da densidade e diâmetro e dos capilares sangüíneos no músculo estriado; elevação do conteúdo de mioglobina; aumento da capacidade oxidativa (HEARSE, 1994). Natali (2004) e Ghorayeb (2005) descreveram a hipertrofia cardíaca como um dos mais significativos resultados da adaptação

crônica ao exercício. Segundo Meloni (2005) a hipertrofia muscular é um processo adaptativo, resultante de um aumento da área de secção transversa do músculo, como resposta ao aumento da síntese protéica, aumento do número e tamanho das miofibrilas, assim como a adição de sarcômeros no interior da fibra muscular.

A hipertrofia ventricular secundária ao exercício pode ser vista como forma de adaptação fisiológica à sobrecarga de treinamento, comumente encontrada em atletas de alto nível. O exercício correspondente ao treinamento pode provocar alterações hipertróficas diferentes, de acordo com a sua natureza. Os exercícios estáticos, isométricos ou anaeróbicos provocam sobrecarga de pressão e aumento da espessura da parede, sem aumento da cavidade ventricular. Já os exercícios dinâmicos, isotônicos ou aeróbios impõem uma sobrecarga de volume que provoca aumento da espessura da parede com aumento proporcional da câmara ventricular (BARROS NETO, 1994).

Atletas de alto nível, via de regra, estão associados a modificações morfológicas no coração, conhecidas como “coração de atleta”. Essa hipertrofia ventricular foi postulada inicialmente por Morganroth *et al.* (citado por PLUIM *et al.*, 1999). Ainda segundo os mesmos autores, essa hipertrofia pode ser distinguida quanto à sua natureza por estar relacionada a exercícios de *endurance* e a exercícios de força. De acordo com esta teoria, atletas envolvidos em atividades relacionadas a componentes dinâmicos (ciclismo, corrida, natação), desenvolvem predominantemente aumento do volume ejeção ventricular esquerdo associado a espessamento da parede ventricular (hipertrofia ventricular) esquerda. Atletas envolvidos com exercício estático ou

isométrico (fisiculturistas, levantadores de peso) apresentam hipertrofia ventricular esquerda sem, no entanto, aumento concomitante do volume ejeção. (PLUIM *et al.*, 1999)

Essa relação pôde ser verificada em um treinamento de natação de longa duração (60 minutos, 5 vezes na semana, durante 8 semanas), em ratos, provocando uma adaptação significativa em nível cardíaco. Neste caso, houve um aumento do volume ventricular (18%), de peso (13%) e do diâmetro do miócito cardíaco (21%), se comparados ao grupo controle, formado por ratos sedentários. (MEDEIROS *et al.*, 2004)

Moore *et al.*, 1993 demonstraram em ratos, como resultado de exercícios contínuos de longa duração, aumento dos miócitos no ventrículo esquerdo sem, no entanto, alterações no diâmetro e na espessura (hipertrofia excêntrica). Em exercícios intermitentes, os mesmos autores constataram um aumento significativo no diâmetro celular, porém, sem alterações notáveis no seu comprimento (hipertrofia concêntrica). Natali *et al.* (2002) demonstraram incrementos de força absoluta de cerca de 300%, quando comparada a valores encontrados em animais sedentários. Segundo esses autores, o aumento da contratilidade intrínseca das células cardíacas se dá, provavelmente, em função da modificação no influxo e efluxo de cálcio no sarcolema.

Diffie & Nagle (2003) demonstraram que o exercício crônico não alterou a velocidade máxima de contração celular, porém observou-se um aumento na velocidade de desenvolvimento de força (contração com sobrecarga), ou seja, modificação na relação tensão ativo-comprimento celular (mecanismo de Frank-Starling) em miócitos do ventrículo esquerdo, acarretando, conseqüentemente, uma maior contratilidade intrínseca.

O exercício de baixa intensidade e longa duração, *endurance*, também demonstrou significativa queda na frequência cardíaca de repouso, o que, segundo os autores, está associado à maior estabilização do sistema de condução do potencial de ação no coração, bem como à diminuição da estimulação vagal. (The European Society of Cardiology e The North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996 citado por PORTIER, 2001)

1.8 Tecnologia proteômica e o estudo molecular do músculo

O termo proteoma, que pode ser definido como um equivalente de genoma, para as proteínas, foi originalmente proposto em 1994 pelo “Committee of the Conference “2-D Eletrophoresis; from Protein Maps to Genomes” (SHISHKIN *et al.*, 2004,) sendo inicialmente usado para descrever a totalidade das proteínas codificadas pelo genoma (D’ÁMBROSIO *et al.*, 2004; VIVANCO *et al.*, 2003). Para os mesmos autores este termo engloba ainda, a identificação da função, modificações pós-traducionais, interação, localização, atividade e estrutura tridimensional, dentre outros e, a partir daí, surge então a proteômica.

Ainda sob esta ótica, os crescentes avanços na biologia molecular no século passado possibilitaram o conhecimento de uma enorme gama de componentes celulares e teciduais referentes a genes e proteínas, como resultado da decodificação do genoma de vários organismos, ampliando ainda mais o escopo inicial do conhecimento humano. A crescente demanda aliada a nova tecnologia computacional mudaram radicalmente a visão do

funcionamento de determinados organismos baseado no conhecimento da função de novos genes. Sob esse aspecto, pode-se caracterizar o surgimento e o desenvolvimento da proteômica ou da genômica funcional, como o início da identificação da função de milhares destas proteínas. (WESTERMEIER, 2001)

Apesar da caracterização relativamente simples do papel da proteômica, as ferramentas utilizadas para sua análise apresentam-se muito complexas. Para VIVANCO *et al.* (2003), existem inúmeros métodos clássicos e avançados para a separação e mensuração global de proteínas de um tecido como os géis bidimensionais (2-DE), a cromatografia multidimensional e a espectrometria de massa (MS), além de outros métodos que tentam avaliar o estado funcional da proteína, sua interação com outras moléculas como, por exemplo, a cristalografia, a difração por raios – X, ressonância nuclear magnética e a microscopia confocal.

A eletroforese bidimensional foi desenvolvida, simultaneamente por dois pesquisadores diferentes O'Farrell & Close no ano de 1975 (WESTERMEIER, 2001), sendo composta por dois estágios eletroforéticos diferentes de eletroforese. Inicialmente, o primeiro estágio, conhecido como primeira dimensão, consiste em uma focalização isoelétrica da proteína. Essa etapa do processo baseia-se na mobilidade das proteínas em um determinado ponto isoelétrico (pI) em um gradiente de pH. Isto ocorre em um suporte contendo um gel, denominado, *strip*, que contém determinados tampões fixados. Esta técnica foi desenvolvida por Görg *et al.* em 1988. (WESTERMEIER, 2001; VIVANCO *et al.*, 2003) A segunda parte da eletroforese bidimensional, chamada de segunda dimensão, usualmente utiliza um gel SDS-PAGE (*Sódio dodecylsulphate poliacrylamide gel electrophoresis*) em um tampão de Tris-

glicina ou Tris-cloro. A associação de agentes dissociantes e detergentes facilita o deslocamento da proteína ao longo de um campo elétrico. Nesta etapa, as proteínas são separadas por massa molecular. (WESTERMEIER, 2001; VIVANCO *et al.*, 2003) O resultado deste gel passa então por um processo de coramento, utilizando corantes específicos como o Comassie Blue, a prata ou compostos fluorescentes, sendo digitalizado e analisado em softwares especializados.

A eletroforese bidimensional tornou-se então uma ferramenta indispensável para o estudo do proteoma e, aliado à tecnologia computacional, tem oferecido significativas informações em um só clique (acesso) tais como: o nome; número de acesso em bancos de dados; massa molecular; ponto isoelétrico; seqüência de resíduos de aminoácidos etc... (VIVANCO *et al.*, 2003) Associado a estas informações uma outra técnica, a espectrometria de massa, pode corroborar a seqüência de uma determinada proteína para sua identificação (ELRICK *et al.*, 2006; LAM; LIND & SEMSARIAN, 2006; VIVANCO *et al.*, 2003).

1.9 Análises genômicas e proteômicas dos efeitos do exercício.

O efeito crônico do exercício, também chamado de adaptação, tem sido estudado ao longo dos anos, na tentativa de estabelecimento, efetivo, de suas alterações no organismo humano.

Baldwin (2000), em uma interessante revisão da literatura, aponta importantes quebras de paradigmas, em diferentes momentos da ciência desportiva, em relação aos focos de estudo.

No final dos anos sessenta e começo dos anos setenta, buscava-se o conhecimento das alterações primárias em nível de organismo humano, entretanto, com a introdução e melhoria da acuidade das técnicas de biopsia muscular, a evolução das técnicas bioquímicas e o incremento de estudos em animais dos efeitos agudos e crônicos do exercício, no início da década de oitenta, o foco de estudo mudou, passando ao nível celular e sub-celular, período denominado pelo autor como “a era da bioquímica do exercício” (BALDWIN, 2000). Foi então, a partir do final da década de oitenta, que o exercício começou a ser estudado sob a ótica da biologia molecular. Isso se deveu ao surgimento de novas ferramentas como o aprimoramento das técnicas de clonagem, as tecnologias de seqüenciamento, técnicas de PCR e silenciamento gênico, dentre outras.

Hoje, os genes têm sido estudados sob a ótica de sua funcionalidade, que envolve além de sua identificação, sua participação em processos fisiológicos e fisiopatológicos, a expressão de intermediários da síntese protéica e como isto influencia na função ou disfunção celular, bem como a função e a capacidade de interação dessas proteínas. (YELLON & DOWNEY, 2003).

Sabe-se que diferentes regimes de treinamento (*endurance* e resistido) utilizam diferentes formas de ação, atuando por diferentes meios de regulação na tradução do RNA mensageiro (mRNA) de proteínas contráteis, aumentando assim, a síntese dessas proteínas. Este aumento de expressão reflete

diretamente na indução da hipertrofia muscular (BOOTH & BALDWIN, 1996, citados por BOOTH *et al.*, 1998; BAAR & ESSER, 1999 citados por ZOPPI, 2005).

Existem, todavia, divergências no que diz respeito a generalizações quanto ao aumento de transcritos em função do aumento das concentrações do mRNA, uma vez que um significativo aumento da expressão deste acontece em cerca de quatro horas após o exercício e o aumento da síntese protéica, no entanto, pode se estender de três a trinta e seis horas após o exercício (BOOTH *et al.*, 1998).

Inúmeros estudos têm sido desenvolvidos no intuito de compreender a expressão de proteínas contráteis em vários tipos de músculos. Biral *et al.* (1988) demonstraram haver três isoformas de cadeia pesada de miosina em humanos (MHC tipo I, IIa e IIb) que, antes da utilização da eletroforese, não haviam sido caracterizadas, uma vez que a utilização de ensaios enzimáticos, apresentavam atividade única relativa à quebra de ATP. Em trabalho similar, Hashimoto *et al.* (2003a), utilizando também eletroforese unidimensional (SDS-PAGE), analisaram as isoformas α e β da cadeia pesada de miosina (presentes no miócito cardíaco), determinando o aumento de sua síntese a partir do exercício, bem como os níveis de expressão do carreador de glicose GLUT4.

Estudos posteriores, em uma análise multifatorial de vários tecidos de mamíferos, inclusive muscular esquelético, avaliaram a utilização do gel bidimensional de eletroforese como de grande contribuição ao entendimento de processos biológicos (D'AMBROSIO *et al.*, 2005). Alguns estudos corroboram essa afirmação ressaltando, no entanto, a grande dificuldade de estabelecer,

utilizando a técnica de eletroforese bidimensional, estudos que envolvam a cadeia pesada de miosina, devido à baixa solubilidade de proteínas com alta massa molecular (SHISHKIN *et al.*, 2004). Tal questão parece ter sido resolvida em parte por Short *et al.* (2005) que demonstraram aumento de expressão da cadeia pesada de miosina a partir do exercício de longa duração, utilizando a técnica de SDS-PAGE. No entanto, neste caso específico, as análises são consideradas preliminares uma vez que a miosina foi caracterizada somente com relação a sua massa molecular em um gel de eletroforese unidimensional. Estudos através de géis bidimensionais provavelmente mostrariam maiores detalhes desta relação, mas a técnica de hidratação para a primeira dimensão de géis bidimensionais ainda permanece um desafio a ser resolvido e executado. Alguns testes têm sido feitos, utilizando *strips* manufaturadas de agarose, mas nenhum resultado conclusivo foi obtido até este momento (ZHAN & DESIDERIO, 2003 citados por SHORT *et al.*, 2005).

Por estes motivos, a maior parte dos recentes estudos que objetivam caracterizar adaptações estruturais no músculo esquelético, utilizando géis bidimensionais, fazem-no utilizando a cadeia leve da miosina (MLC) como marcador molecular (PIEC *et al.*, 2005; DONOGHUE *et al.*, 2005; SEO *et al.*, 2006). Análises das respostas induzidas pela sobrecarga e ausência de carga (gravidade zero), por exemplo, apontam como causas da diminuição da tensão gerada pelo músculo soléo de ratos a redução na expressão da cadeia leve da miosina (MLC) (SEO *et al.*, 2006). Esta diminuição poderia reduzir significativamente a estabilidade da estrutura do filamento de miosina. Resultados adicionais mostraram, através de análises de proteômica, o aumento da velocidade de contração no grupo submetido à sobrecarga,

provavelmente, deveu-se ao aumento de três a seis vezes da cadeia leve da miosina do tipo II, concomitantemente, a um aumento em cerca de nove vezes na expressão de algumas enzimas glicolíticas como a creatina quinase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (SEO *et al.*, 2006).

Outros estudos associam o decréscimo da massa muscular, também conhecida como sarcopenia, à perda de proteínas contráteis (PIEC *et al.*, 2005). Este resultado foi obtido a partir de uma associação do fenótipo com a redução da intensidade de “spots” em géis bidimensionais referentes a cadeia leve da miosina do tipo I e IIa. O mesmo autor observou ainda uma diminuição da expressão de actina e do filamento de miosina como um todo. No entanto, foi impossível verificar a expressão da cadeia pesada, que parece ser a maior responsável pela contração muscular (PIEC *et al.*, 2005).

Finalmente, análises em 2D-E mostraram que respostas evocadas por estímulos de alta intensidade quando comparados a estímulos de pequena intensidade demonstraram significativas diferenças de expressão em um grupo de vinte e uma proteínas, que foram posteriormente identificadas por espectrometria de massa. Estes resultados revelaram, dentre outras informações, uma diminuição significativa nas isoformas da cadeia leve da miosina e na troponina T, associadas às fibras do tipo IIb, responsáveis pela contração rápida (DONOGHUE *et al.*, 2005). Este dado corrobora com outros supracitados na afirmação que a diminuição do filamento de miosina seria o principal responsável pelo decréscimo de massa muscular.

O aumento da expressão de MHC- α em detrimento da expressão de MHC- β , no ventrículo esquerdo de ratos submetidos a treinamento de endurance, foi demonstrado por Rupp (citado por HASHIMOTO *et al.*, 2004) e

por Hashimoto *et al.*, (2004) que sugerem que isto está relacionado à compensação ao menor custo energético relacionado à menor disponibilidade de oxigênio.

Todavia o mecanismo responsável pelo aumento desta expressão, bem como a diferenciação do tipo de isoforma expressa, ainda permanece oculto. Iemitsu *et al.*, (2001) demonstraram que este incremento pode estar relacionado ao aumento da expressão de RNAm de receptores α -adrenérgicos.

Estes resultados foram encontrados tanto em ratos hipertensos quanto em treinados e sugerem uma relação com o aumento da concentração de AMPc intracelular que, por sua vez, necessita de mecanismos mais rápidos de síntese de ATP. Aumentos na velocidade de síntese e aumento da velocidade de contração estão diretamente relacionados à ativação da ATPase da MHC- α . Sugere-se ainda que o exercício de baixa intensidade aumente o metabolismo glicolítico sem concomitante aumento do metabolismo oxidativo devido ao incremento de enzimas glicolíticas e decréscimos de enzimas e transportadores oxidativos (IEMITSU *et al.*, 2001).

1.10 A utilização da proteômica no estudo de marcadores biológicos para doenças do coração

A publicação do genoma humano abriu caminho para novos questionamentos e, por que não, esperança de tratamento para doenças, principalmente as de grande impacto sócio econômico. A proteômica

representa um importante papel na descoberta dos mecanismos de ação de doenças, bem como a concepção de alvos para novas drogas. Outra ação significativa é a identificação de marcadores biológicos associados a estas doenças que podem auxiliar na determinação dos diferentes estágios biológicos de uma determinada patologia. (ARRELL, NEVEROVA & VAN EYK, 2001; ELRICK *et al.*, 2006)

A OMS (Organização Mundial de Saúde) citada por Lam, Lind e Sesariam (2006), indica que as doenças cardiovasculares, resultantes da disfunção cardíaca, são consideradas, hoje, como a maior causa de mortalidade no mundo. Segundo O'Donnell (2000), um dos principais objetivos da próxima década será o conhecimento das doenças do sistema cardiocirculatório. A elucidação do comportamento de determinados genes desde sua transcrição até sua expressão poderá oferecer grande subsídio a esta ação. Assim sendo, a proteômica cardíaca tem papel fundamental na interpretação destas mudanças.

O atual foco de estudo destas doenças é a identificação e determinação dos possíveis agentes causais envolvidos nestes processos patológicos, bem como, seu potencial papel diagnóstico (ABDELAIZ *et al.*, 2004; HANASH, 2003 citados por D'AMBROSIO *et al.*, 2004; WHITE *et al.*, 2005). Para a determinação de marcadores biológicos de lesões no miocárdio, a grande especificidade do tecido cardíaco é um evento crucial. A sensibilidade a lesão associada às características teciduais tornam a descoberta destes marcadores um importante passo na determinação assertiva de condutas de tratamento e a possibilidade de cura (DOLCI & PANTEGHINI, 2006).

De um modo geral, a falência cardíaca, resultado das doenças do coração, é considerada a maior causa de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos, podendo ser resultado de doenças sistêmicas, como a hipertensão arterial e isquemia cardíaca, ou associada a doenças musculares, cardiomiopatia dilatada. Na maioria dos casos, os mecanismos fisiopatológicos da falência cardíaca ainda não estão completamente esclarecidos. Sugere-se, no entanto, uma estreita relação com alterações em genes específicos e na expressão de determinadas proteínas no músculo cardíaco. (DUNN, 2000; ARRELL, NEVEROVA & VAN EYK, 2001)

Ainda segundo o mesmo autor, apenas recentemente começou-se a estudar a falência cardíaca sob a ótica molecular das alterações nas proteínas contráteis. Sendo assim, vários estudos têm sido elaborados na intenção de conhecer melhor estes comportamentos associados. Hoje, existem vários bancos de dados que contêm informações sobre proteínas cardíacas já identificadas em vários organismos como ratos, porcos e homem. (McGREGOR & DUNN, 2006) Estes dados facilitam a construção de novos paradigmas e a orientação de novos estudos a respeito do tema. (DUNN, 2000)

Estudos comparativos em seres humanos que avaliaram a insuficiência cardíaca utilizando 2D-E em pl de 4 a 7 revelaram mais de sete mil *spots* de proteínas. Destes, sessenta e dois são expressos diferencialmente em corações afetados e apenas vinte e três foram identificados. (HEINKE *et al.*, 1998) Estes estudos demonstraram o decréscimo de enzimas oxidativas (creatina quinase M; citocromooxidase C; citocromo b5; mioglobina e 3,2-trans-enol-CaA transferase) que, segundo estes autores podem estar relacionadas a

diminuição do aporte energético como resultado da falência do miócito (WEEKES *et al.*, 1999; PRENTICE & WEBSTER, 2004).

McGregor & Dunn (2006) relataram ainda que, na cardiomiopatia dilatada, que é uma doença de etiologia desconhecida, caracterizada pela perda da função sistólica que resulta em falência cardíaca, cerca de cem proteínas cardíacas, analisadas por eletroforese bi-dimensional, tiveram sua expressão significativamente modificada (Li *et al.*, 1999; KNECHT *et al.*, 1994; DUNN, CORBETT & WHEELER, 1997; PLEISSNER *et al.*, 1997; SCHELER, 1999 todos citados por MCGREGOR & DUNN, 2006) Isto demonstra um imenso caminho a ser seguido na investigação do escopo destas modificações que provocam a disfunção cardíaca resultante. A determinação dos marcadores biológicos associados a estas doenças certamente são de extrema importância para o diagnóstico e tratamento.

Um dos marcadores propostos são as isoformas I e T da troponina, uma proteína estrutural do miócito cardíaco. A expressão desta proteína tem sido considerada chave no diagnóstico do infarto agudo do miocárdio, visto que a lesão provocada pelo infarto tem como consequência a necrose do tecido cardíaco que provoca o aumento expressivo desta na circulação sanguínea, especificamente de dois complexos protéicos oxidados, nas regiões N e C-terminal. (APPLE, 2006; JAFFE, BABUIN & APPLE, 2006)

Outro marcador promissor é a creatina quinase (CK) e suas respectivas isoformas. A CK é um potente carreador fosfatado do citosol celular, que está associado à angina *pectoris*. Uma vez que sua quantificação é rápida e barata, parece ser o futuro do diagnóstico simplificado do infarto agudo (JAFFE, BABUIN & APPLE, 2006).

Os mesmos autores citam ainda um outro marcador de alto valor biológico, a proteína C-reativa, cujo receptor foi descrito recentemente. (DEVARAJ, DUCLOS & JIALAL, 2005 citados por JAFFE, BABUIN & APPLE, 2006). A determinação de seus valores séricos é considerada um potente indicador de infarto (valores acima de 10 mg/l), alto risco de infarto (valores entre 3 e 10mg/l) e valores abaixo de 1 mg/l como indicativo de baixo risco de infarto.

Além desta proteína, o estudo da via de transdução de sinal da enzima proteína quinase C (PKC), pode ser associada à isquemia do miocárdio e a condições pré-isquêmicas. Sua detecção e seu bloqueio provocam tanto a redução do infarto quanto a necrose tecidual associada a este (MARBER, WALKER & YELLON, 1994 citados por MCGREGOR & DUNN, 2006).

As alterações pós-traducionais associadas ao stress provocado, por exemplo, pelo infarto, podem ser demonstradas pelo grande número de *heat shock proteins*, HSP, expressas no mesmo tecido (ARRELL, NEVEROVA & VAN EYK, 2001). A síntese de quinze espécies diferentes de HSP27 encontradas em ensaios imunohistoquímicos ilustra o grande potencial destas análises.

ANDERSON (2005), em uma extensa revisão da literatura, relata a capacidade de detecção de cerca de mil proteínas séricas diferentes destas, cento e setenta e sete são potenciais biomarcadores protéicos, relacionados à doença do coração, o que demonstra o imenso campo de estudo à frente.

1.11 Objetivo geral

Estabelecer a relação entre diferentes níveis de carga e o aumento da expressão da cadeia pesada de miosina no miócito cardíaco de *Rattus norvegicus* por meio de técnicas proteômicas.

1.12 Objetivos específicos

- Quantificar a expressão da cadeia pesada de miosina, no miócito cardíaco de ratos adultos machos submetidos a treinamento de natação durante oito semanas, três sessões semanais com 30 minutos de duração com 2,5; 5,0 e 7,5% de intensidade (sobrecarga relativa ao peso corporal total do animal) utilizando a técnica de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa.
- Avaliar os efeitos do exercício sob ponto de vista histopatológico do miócito cardíaco de ratos adultos machos submetidos a treinamento de natação durante oito semanas, três sessões semanais com 30 minutos de duração com 2,5; 5,0 e 7,5% de intensidade (sobrecarga relativa ao peso corporal total do animal).

2 MATERIAIS e MÉTODOS

2.1 Preparação e manejo dos animais.

Foram utilizados 40 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), isogênicos com 12 (\pm 3) semanas de vida. O peso médio inicial de cada indivíduo foi de 230 (\pm 15)g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco animais por gaiola) com temperatura média de 22,5°C (\pm 1,5)°C, luz controlada em ciclo de doze horas (claro/escuro), alimentados com ração padrão roedores Labina® (Purina) e água *ad libitum*. (Figura 05)



Fig 05. Gaiola, local de manutenção e manejo dos animais.

Para o experimento os animais foram subdivididos, de forma aleatória, em seis grupos: um grupo controle e cinco grupos de indivíduos submetidos ao treinamento durante doze semanas com sobrecarga individualizada por rato.

O grupo de treinamento foi dividido da seguinte forma:

- GT₁, 2,5% (dois vírgula cinco por cento) de sobrecarga relativa ao peso corporal total do animal, considerado exercício de baixa intensidade segundo Lancha Junior (1991);

- GT₂, 5,0% (cinco por cento) de sobrecarga relativa ao peso corporal total do animal, também considerado exercício de baixa intensidade segundo o autor supracitado.

- GT₃, 7,5% (sete vírgula cinco por cento) considerado consequentemente exercício de alta intensidade segundo o autor supracitado.

O grupo controle (GC) foi composto de dez ratos que não foram submetidos a nenhum tipo de treinamento, sacrificados ao fim do período de treinamento.

Cada grupo de animais teve seu peso corporal total aferido semanalmente em uma balança marca Filizolla® modelo EF1100 com acuidade de 1,0 gr (um grama).

Com a finalidade de adaptação ao meio líquido, os animais foram submetidos durante uma semana a três sessões de natação, em dias alternados, com duração de 5, 10 e 15 minutos cada, sem nenhuma sobrecarga.

Visando a adaptação à sobrecarga, bem como ao aparato de sobrecarga, os animais realizaram por duas semanas, nas mesmas características fixadas do programa de exercício, duas semanas com 2,5% (dois vírgula cinco por cento) de sobrecarga.

Os grupos treinados foram compostos por dez animais cada, submetidos ao treinamento de natação. Devido à especificidade e a intensidade do exercício, os animais participaram de dois modelos de treinamento diferentes. (Tabela 02). Os grupos GT₁ e GT₂ foram submetidos a treinamento contínuo três vezes por semana, em dias intercalados, com duração de trinta minutos por sessão. O grupo GT₃ foi submetido a treinamento intervalado planejado da

seguinte forma: durante a terceira semana (primeira semana com sobrecarga máxima), 30 segundos de exercício com 2 minutos de intervalo (6 séries de 30" x 2' de intervalo); Na segunda semana: 45 segundos de carga com 1'45 minuto de intervalo (6 séries de 45" x 1'45 de intervalo) e, a partir da terceira semana, 6 séries de 1'30 minuto de exercício com 1'30 minuto de intervalo

Tabela 02. Planificação do treinamento dos animais. Período dividido em semanas com variação de cargas por grupo de treinamento, (GT). GT₁ : Grupo1; GT₂ Grupo 2; GT₃ e Grupo 3.

Semana		GT₁/Carga	GT₂/Carga	GT₃/Carga
1º	Adapt.	0	0	0
2º	Adapt.	0	0	0
3º	Adapt.	2,5%	2,5%	2,5%
4º	Trein.	2,5%	5%	7,5%
5º	Trein.	2,5%	5%	7,5%
6º	Trein.	2,5%	5%	7,5%
7º	Trein.	2,5%	5%	7,5%
8º	Trein.	2,5%	5%	7,5%
9º	Trein.	2,5%	5%	7,5%
10º	Trein.	2,5%	5%	7,5%
11º	Trein.	2,5%	5%	7,5%
12º	Trein.	2,5%	5%	7,5%
13º	Trein.	2,5%	5%	7,5%
14º	Trein.	2,5%	5%	7,5%
15º	Trein.	2,5%	5%	7,5%

O treinamento foi realizado em um tanque de amianto medindo 100 x 100 cm, contendo água a uma altura de 50 cm a cerca de 31°C. (Figura 06)



Figura 06 Tanque de amianto utilizado para o treinamento de natação. Diâmetro de 100cm e profundidade de 100cm.

A sobrecarga adicionada à amostra foi colocada atada à região peitoral, utilizado um aparato constituído de uma fita de velcro (macho/fêmea) e um invólucro manufaturado com fita adesiva marca 3M® modelo *Silver Tape* de filme de polietileno (0,25 mm x 9,8 mm).

O aparato foi colocado de modo a permitir total movimentação de membros superiores, bem como a amplitude de movimentos respiratórios dos sujeitos do estudo (Figuras 07A e 07B)

Os animais foram sacrificados ao final de cada respectivo período de treinamento, por meio de torção cervical após a sedação com clorofórmio a 100%.

Cada animal foi dissecado sendo o coração removido (Figura 08). Após a remoção, o ventrículo esquerdo foi seccionado e fragmentado em três segmentos de cerca 0,5 cm de espessura cada (Figura 09). Dois destes foram imediatamente congelados com nitrogênio líquido e armazenados

separadamente a 80°C negativos e o terceiro fragmento foi colocado em solução de formol a 10 %.



Figura 07A. Aparato de sobrecarga. 07B. Rato utilizando o aparato de sobrecarga, atado ao corpo, durante o exercício.

2.2 Preparação das amostras

2.2.1 Confeção das lâminas histológicas para a análise microscópica

Após a coleta do tecido (fragmentos de tecido muscular do ventrículo esquerdo), estes foram colocados em um frasco contendo formol a 10 % por 2 (dois) dias para ser devidamente fixado.

Após esta primeira etapa de fixação, o material foi clivado para a descrição macroscópica do material recolhido, especificando as características próprias como peso, consistência, coloração, tamanho. Após este procedimento, os fragmentos foram armazenados em cassetes histológicos.

Na segunda etapa, o material coletado foi preparado em um processador automático (autotécnico), marca Lupe® modelo PT02 (Figura 11), composto de 12 (doze) cubas assim divididas (Figura 10):

- 2 cubas contendo formol (solução de formol a 10 %).

- 5 cubas de álcool etílico, assim especificadas: 1 cuba de etanol a 70 %, 1 cuba de etanol a 80 %, 1 cuba de etanol a 90 %, 2 cubas de etanol absoluto a 99,8 %. O objetivo desta etapa é desidratar o material, ou seja, retirar toda a água deste.

- 3 cubas de xilol (xileno), onde o material passará por um processo de clareamento, ou melhor, de diafanização, do seguinte modo: 1º cuba xilol/etanol à 50%; 2º cuba de xilol a 100% durante uma hora e a 3º cuba de xilol também a 100% por 30 minutos.

- 2 cubas de parafina, com a finalidade de preencher o espaço que a água e a gordura do material ocupavam (impregnação).



Figura 08 Dissecação e retirada do coração.

Logo após, o material foi levado para a inclusão (Figura 11) em moldes de alumínio, que por sua vez foram preenchidos com parafina purificada a temperatura de 55 (± 1)°C. O material embocado foi tratado, até chegar ao

fragmento propriamente dito, e a seguir encaminhado para a geladeira por 10 minutos, com a finalidade de tornar a parafina menos quebradiça.

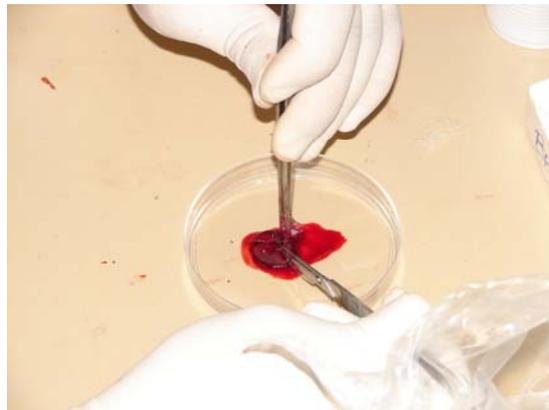


Figura 09 Separação e fragmentação do ventrículo esquerdo.

Após gelado, o bloco foi levado para o micrótomo, marca Leica®, modelo RM2125RT, onde este foi cortado a uma espessura de 3 à 4 μ .



Figura 10 Processador de tecidos autotécnico.

Retirado o corte, o bloco foi preparado (banho histológico) em água a 60° C para a colocação em lâmina de microscopia (26 x 76 mm e espessura de 1,0) em seguida aquecido em estufa a uma temperatura de 60° C por 10 minutos para a aderência na lâmina.



Figura 11. Cuba de inclusão onde o fragmento e tecido é emblocado em parafina

Após 10 minutos, estas lâminas passaram por um processo de coloração (Figuras 12A e 12B), em hematoxilina, (solução de 5,0 gramas de hematoxilina; 50,0 mL de álcool absoluto; 100 gr de alúmen de potássio; 2,5 gr de O_2Hg e 1,000 mL de dH_2O) por 30 segundos a seguir foram levadas em água corrente para retirar o excesso do corante.

A seguir as lâminas foram submetidas a álcool etílico a 70%, antes de serem coradas em eosina (100 mL de eosina; 10 mL de floxina básica; álcool etílico a 95 % e 4 mL ácido acético), por 20 segundos. Por fim, as lâminas foram desidratadas em cinco cubas com álcool etílico, sendo uma a 70%, uma a 80%, uma a 90%, duas a 100% e três cubas contendo xilol para diafanizá-las.

A



B



Figuras 12A e 12B. Processo de coramento do tecido.

Ao final do coramento, as lâminas foram montadas (Figura. 13), utilizando-se cola Entellan Microscopy® e uma lamínula (dimensões 24 mm x 32 mm). O processo de confecção das lâminas foi realizado no laboratório de histopatologia da Universidade Católica de Brasília.



Fig.13 Tecidos corados e fixados nas lâminas para a análise histológica.

2.2.2 Extração para a quantificação protéica.

As amostras do tecido muscular (cerca de 100 mg) foram homogeneizadas em uma solução contendo 250 mM de sacarose, 2 mM de EDTA, e 10 mM de Tris-EDTA em pH 7,4 e centrifugadas a 4.000 rpm x 10 min. Após este procedimento o precipitado foi ressuscitado em uma solução com 176 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCL e 2 mM de EDTA em pH 7,2. Para a determinação do teor total de proteínas, foi utilizado o método Bradford, (1976

apud GALLO, 2006) a uma absorbância de 595 nm em um espectrofotômetro modelo Ultraspec pro 3100, marca Amersham Bioscience® (Figura 14)

O reagente de Bradford foi constituído por 100 mg de Azul de Comassie G-250; 50 ml de etanol a 95%; 100 ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) a 85%, sendo o volume da mistura aferido para 1000 ml e filtrado duas vezes em papel de filtro qualitativo.



Figura 14 espectrofotômetro modelo Ultraspec pro 3100 marca Amersham Bioscience®

O teor de proteína das amostras foi calculado, tomando-se por base os dados de uma curva padrão obtida com albumina de soro bovino (BSA). (GALLO, 2006). Após isto, as amostras foram ajustadas para 3 mg/ml segundo o protocolo descrito por Short *et al.*. (2005) e dialisadas utilizando o kit de Mini-diálise com cut-off de 1 kDa e volume máximo de 2mL marca Amersham Bioscience®, “overnight”, sendo posteriormente concentradas em um “*speed vacuom*” modelo *Concentrator 5301* marca Eppendorf® .

2.2.3 Análise Eletroforéticas

As proteínas foram separadas e avaliadas por eletroforese uni e bidimensional em um gel *SDS-PAGE* (TALMADGE & ROY, 1993 citado por SHORT *et al.*, 2005), em equipamento modelo Multiphor II marca Amersham Bioscience® (Figura 15).

Para o *SDS-PAGE*, unidimensional as amostras foram aquecidas a 94° C por 4 minutos, resfriadas em temperatura ambiente e, posteriormente, aplicados 20 µL em um gel de poliacrilamida de 0,75 mm de espessura formado por uma malha de 8%, gel de separação e 4% para o *staining* gel. Para a preparação do gel de separação, foi utilizada uma solução contendo 5,0 mL de acrilamida a 10 %; 3,12 mL de tampão Tris-HCl pH 8,8; 6,63 ml de água MilliQ®; 0,62 mL de glicerol; 0,125 ml de APS (persulfato de amônio), a 10 % e 0,006 ml de TEMED (N, N, N', N'-tetra metiletilenodiamina). Para o *staining* gel, foi utilizada uma solução de 1,0 mL de Acrilamida a 10 %; 0,72 mL de tampão Tris-HCl pH 6,8; 0,75 ml de água MilliQ®; 0,1 mL de APS (persulfato de amônio), a 10 % e 0,006 mL de TEMED.

O gel unidimensional foi submetido a uma corrente elétrica de 250 V, 30 mA e 10 W de potência durante cerca de oito horas a uma temperatura de 15°C.



Figura 15 Equipamento para 2D-E modelo Multiphor II (Amersham Bioscience®), a) cuba de focalização isoeétrica b) cuba de eletroforese c) banho de circulação d) fonte de alimentação elétrica.

Para a primeira dimensão do 2D-E, a amostra foi diluída em 250µg de um tampão de reidratação, contendo 8,3 M de uréia; 1 M de tiourea; 2% de CHAPS (*cholamidopropyl dimethylammonio propane sulfonate*); 0,28% de DTT (dithiothreitol); 2% de um tampão, contendo uma solução de anfólitos para o equilíbrio das proteínas (IPG Buffer - *immobilized pH gradients*) pH 3 -11 e 0,01 de azul de comassie R-250. Cada “strip” (tiras de imobiline de 13 cm e pH variando de 3 a 11) foi reidratada em repouso, durante dezesseis horas a temperatura ambiente.

Após isto, as tiras foram reequilibradas com uma solução contendo 6 M de uréia; 50 mM de tampão Tris-HCl; 30 % de glicerol; 2 % de SDS, sendo adicionado imediatamente antes do início do procedimento 0,1 % de DTT.

As tiras foram submetidas à focalização em um processo composto por três fases distintas: inicialmente as tiras foram submetidas, por trinta minutos, a uma corrente elétrica de 500 V. Em seguida, a corrente foi aumentada para 1.500V durante uma hora e trinta minutos e, a seguir, a corrente foi novamente aumentada desta vez para 3.500 V durante cinco horas. Em todas as etapas deste processo, a amperagem e a potência foram constantes em 50 mA e 10 W e temperatura de 15° C.

Para a segunda dimensão, foi confeccionado um gel de SDS-PAGE com 2 mm de espessura e 8% de malha de separação. Para sua preparação, foi utilizada uma solução contendo 20,0 mL de acrilamida a 10 %; 14,5 ml de tampão Tris-HCl pH 8,8; 12,5 mL de água MilliQ®; 2,5 mL de glicerol; 0,75 mL de APS, a 10 % e 0,048 mL de TEMED.

O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 250V, 30 mA e 10 W de potência durante cerca de oito horas a uma temperatura de 15°C.

2.3 Coloração do gel

Após a corrida, o gel foi colocado em uma solução descorante com 50% de metanol e 10% de ácido acético (SHORT *et al.*, 2005) por duas horas. Para o coramento do gel, foi utilizado o protocolo descrito por pelo mesmo autor onde o gel é posto inicialmente em água MilliQ® e, logo após, incubados durante 5 min. em uma solução contendo 8 mM de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Depois de três lavagens consecutivas com 30 segundos de duração em água MilliQ®, o gel foi incubado por 25 min. em uma solução com 12 mM

de nitrato de prata (AgNO_3) e, posteriormente lavado por três vezes, um minuto de duração cada, em água MilliQ®. Depois de incubado durante dez minutos em solução contendo 280 mM de carbonato de sódio (Na_2CO_3); 0,16 mM de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) e 2 % de formaldeído e estabilizado por 10 min. em uma solução de 37,2 mM de sódio-EDTA, (Na_2 -EDTA), foi posteriormente lavado em água MilliQ®.

Os géis corados foram envolvidos em papel celofane e escaneados em equipamento modelo *Scanjet 5590 Digital Flatbed*, marca Hewlett-Packard®.

2.4 Identificação protéica por espectrometria de massa

Com o objetivo de identificar o *spot* referente à cadeia pesada da miosina, foi utilizado o método “peptide mass fingerprinting”, utilizando um espectômetro de massa MALDI-TOF/TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption ionized Time of Flight-Time of Flight*), marca Bruker Daltonics®, modelo UltraFlex II MALDI-TOF/TOF

Os “spots” foram removidos e digeridos de acordo com Shevchenko *et al.*, (1996), com auxílio de uma lâmina estéril para bisturi, marca/fabricante Paramount® e dispostos em recipientes do tipo *ependorfs* onde foram adicionados 300µL de acetonitrila a 100%, durante 5 min. quando foi então retirado do sobrenadante, concentrada em “Speed Vac” e incubada a 56°C por 1 hora em 50µL de 10 mM de DTT em 100 mM de NH_4HCO_3 . Em seguida a amostra foi encubada por 45 min. em temperatura ambiente e local escuro em

uma solução de 50µl de iodoacetamida e 55 mM de NH_4HCO_3 . Após isto, foram realizadas duas lavagens com 100µL de 100mM de NH_4HCO_3 e 100 µL de acetonitrila por 10 min. e, subsequentemente, concentrada em “Speed Vac”. A rehidratação foi feita em uma solução de 50µL de mM NH_4HCO_3 , 5mM de CaCl_2 e 600ng de tripsina Gold marca Invitrogen® em gelo durante 45 min. A seguir o sobrenadante foi substituído pela mesma solução, sem tripsina, e encubadas durante 24h a 37°C.

Os peptídeos foram extraídos com uma lavagem em uma solução de 50µL de 20 mM de NH_4HCO_3 em 4 lavagens, com duração de 20 min. cada, em uma solução de 5% TFA (ácido trifluoracético) e 50% de acetonitrila. A seguir foi aplicado 2µL de amostra diluída em TFA 1.0% adicionando 6µL de uma matriz composta por ácido sinapínico (em uma solução dissolvida de acetronitrila/ácido trifluoracético 0.1% 1:1, v/v). Em seguida, a solução foi homogeneizada em um agitador tipo vortex e 0,5µL foi aplicado no UltraFlex II.

As amostras foram secas à temperatura ambiente e o espectrômetro foi operado em modo linear para obtenção das massas dos fragmentos gerados pela tripsina. Os íons das amostras foram submetidos à irradiação automatizada, onde o laser foi operado com potência modulada (de baixa para alta), com 200 tiros aleatórios, utilizando um método de procura hexagonal. Os espectros resultantes foram armazenados para posterior análise.

Após a identificação por PMF as seqüências encontradas foram comparadas ao banco de dados não redundante do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando como ferramenta o software MASCOT versão 2.1.0, *Matrix Science*®, (disponível em http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) assumindo carboximetilação e oxidação da

metionina como modificações. Os resultados encontrados foram avaliados segundo “score” significativo e comparado à massa molécula e ponto isoelétrico do “spot” em análise.

2.5 Determinação do Limiar anaeróbio

Os animais foram submetidos a um protocolo de natação com incrementos de carga correspondentes a 1% da massa corporal a cada 3 minutos até a exaustão com intervalos de 60 a 90 segundos onde era realizada coleta sanguínea e permuta de carga de trabalho.

Amostras de 2 μ L de sangue eram coletadas através de corte na extremidade distal da cauda, em capilares heparinizados. Imediatamente após a coleta o sangue era armazenado em uma solução de fluoreto de sódio a 1% visando a interrupção tanto do processo coagulativo como da glicólise.

As dosagens de lactato foram determinadas utilizando o analisador de mesa modelo YSI 2700 S® (Yellow Springs Inc. – USA). O protocolo utilizado consistia de 30 minutos de natação com coleta sanguínea no repouso e a cada 10 min. de exercício para dosagens de lac. A variação máxima de lac aceita para a identificação da MFEL foi de 0,07 mM.min⁻¹.

Para a análise estatística foi utilizado o teste t para amostras não pareadas do *software SPSS for Windows (Statistical Package for the Social Sciences)* versão 13.0 .

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

A literatura científica tem descrito de forma ampla que o exercício regular apresenta-se como um importante fator de implemento de saúde e, dentre as principais causas deste fenômeno, encontra-se o incremento da função cardiocirculatória. Esta melhoria deve-se a um aumento do número e da densidade dos capilares sanguíneos dos músculos estriados, oferecendo maior capacidade de adaptação circulatória a esforços físicos; elevação do conteúdo de mioglobina dos músculos e aumento da síntese oxidativa de energia (GHORAYEB, 2005). Porém, também é consenso na literatura que um dos processos adaptativos mais importantes para o coração, promovido pelo exercício físico, é a hipertrofia cardíaca, pois esta se relaciona diretamente com o desenvolvimento da força celular no miócito cardíaco (NATALI, 2004; GHORAYEB, 2005).

Como forma de comprovar que as possíveis alterações no miócito cardíaco seriam conseqüência a adaptação ao treinamento físico o limiar anaeróbio (Lan), foi utilizado como parâmetro a esta adaptação pois, segundo PRADA *et al.* (2004) este apresenta-se como um excelente indicador da performance aeróbia. Nossos achados demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa, utilizando o teste t de *student* para amostras não pareadas. Os valores médios dos os grupos submetidos a treinamento (um menor acúmulo de lactato) 4,6 (\pm 0,7)mmol/L em relação ao grupo controle, 5,9 (\pm 0,7)mmol/L após o período de treinamento. Estes dados corroboram os efeitos do treinamento físico sobre o sistema energético predominante.

Um dos primeiros trabalhos que abordaram a hipertrofia cardíaca foi realizado por Hickson *et al.* (1979) citado por Verzola *et al.* (2006) em ratos submetidos à natação. Neste estudo, foi demonstrado um aumento significativo do peso e da concentração total de proteínas em tecido muscular cardíaco, já no segundo dia, após o início do treinamento.

Para Meloni (2005), a hipertrofia muscular é um processo resultante de um aumento da área de secção transversa do músculo, como resposta ao aumento da síntese protéica, aumento do número e tamanho das miofibrilas, assim como a adição de sarcômeros no interior da fibra muscular. De acordo com Barros Neto (1994), a hipertrofia ventricular secundária ao exercício pode ser vista como forma de adaptação fisiológica à sobrecarga de treinamento. É importante ressaltar que variáveis que afetam o tipo de exercício, tais como volume, intensidade e duração podem provocar alterações hipertróficas diferentes que irão influenciar no aumento da secção transversa da fibra muscular cardíaca acompanhada ou não do aumento proporcional da câmara ventricular.

Nossos achados demonstraram alterações morfológicas nos sujeitos submetidos a treinamento físico (GTs), em relação ao grupo controle (GC), não submetido a nenhum treinamento. Neste último, as fibras cardíacas e suas células constituintes mostraram-se inalterados em relação ao seu tamanho. Seus núcleos eram pequenos e apresentavam um formato arredondado, sendo estes em alguns casos levemente ovalados, sem, no entanto, apresentarem nenhuma alteração patológica clara (Figura 16).

Nas análises das lâminas do ventrículo esquerdo dos ratos pertencentes ao grupo GT₁ e GT₂, respectivamente sobrecargas de 2,5 % e 5% relativos ao

peso corporal total, apresentaram algumas alterações morfológicas. Foram evidenciadas áreas de esclerose discreta com infiltrado de lipofuscina, também chamados grânulos de pigmento lipofuscina (Figura 17 e 18), que sugerem alterações metabólicas possivelmente associadas ao esforço, sem, no entanto, apresentar nenhuma alteração estrutural, o que indica ausência de hipertrofia.

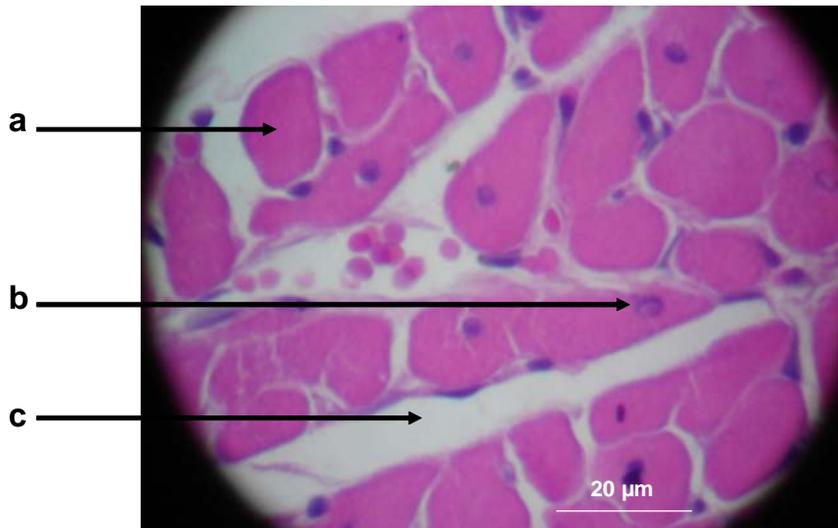


Figura 16. Corte transversal de miócito cardíaco de *R. novergicus*, aumentado 40 vezes, coletado no grupo controle (GC) nota-se que todas as células apresentam aspecto normal sem alterações estruturais ou morfológicas (seta a); núcleo celular sem nenhum tipo de alteração visível (seta b) e nenhuma modificação estrutural no tecido conjuntivo (seta c).

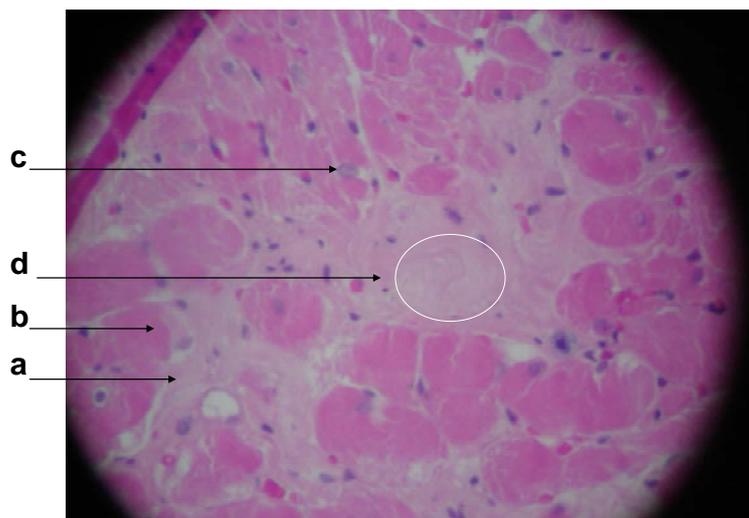


Figura 17. Corte transversal de miócito cardíaco de *R. novergicus*, aumentado 20 vezes, coletado no grupo treinado (GT₁). As setas identificam: a) área de expansão do infiltrado de lipofuscina; b) miócito; c) núcleo celular d) área esclerótica.

É importante ressaltar que não foram identificadas diferenças significativas nas quantidades de lipofuscina em ambos os grupos.

Segundo Chandrasoma (1993), a lipofuscina é um pigmento fino, granular, de cor castanho-ouro, composto basicamente de fosfolipídios e proteínas. Este se acumula no citoplasma em consequência ao dano causado às membranas das organelas citoplasmáticas, sendo mais comumente observado nas células do miocárdio e células neurais (OCAMPO, 2005; CHANDRASOMA, 1993). A lipofuscina é também conhecida como pigmento do “uso e desgaste” em virtude da sua associação com o envelhecimento e as doenças crônicas. Acredita-se que a lipofuscina seja o produto final da peroxidação lipídica de proteínas celulares, sendo, portanto, utilizada como um marcador do envelhecimento associado à produção de radicais livres de oxigênio.

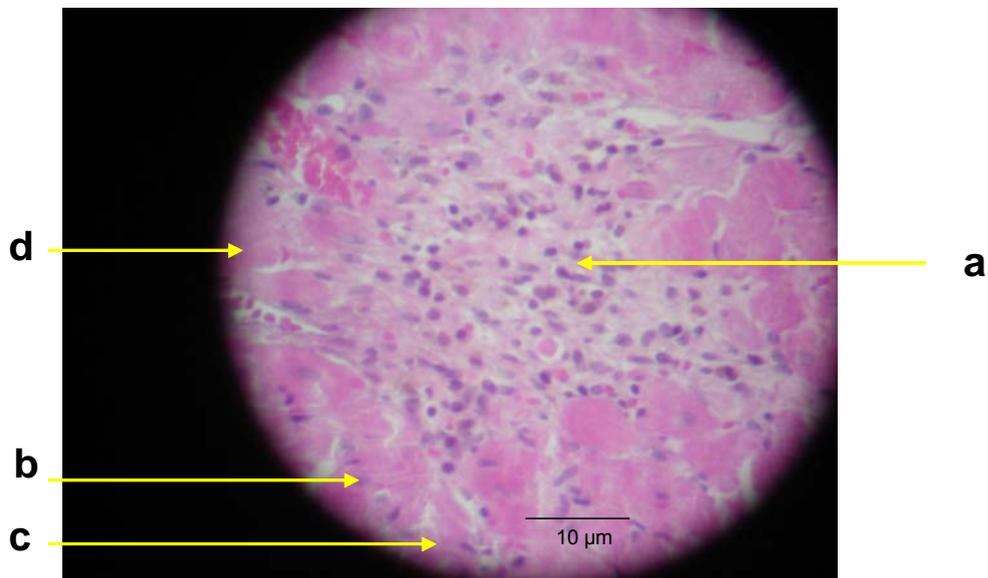


Figura 18. Corte transversal de miócitos de *R. norvegicus* coletado no grupo treinado (GT₂). As setas identificam: a) área de expansão do infiltrado de lipofuscina; b) miócito; c) núcleo celular; d) áreas escleróticas. A imagen foi aumentada 20 vezes.

A produção de radicais livre do oxigênio tem sido discutida como um importante componente da fadiga muscular. Reid (2001), em uma extensa revisão, explica que durante a síntese mitocondrial de ATP (adenosina trifosfato) ocorre a produção de superóxidos que irão formar radicais hidroxílicos e peróxidos de hidrogênio, estes com menor capacidade reativa e eletricamente neutros, o que possibilita um maior potencial de difusão tecidual. A literatura sugere que este acúmulo possa estar relacionado ao papel das superóxido desmutase, um grupo de metaloenzimas que catalisam a desmutação (potencial redox) do radical livre do oxigênio, principalmente, a Mn-SOD (manganês superóxido desmutase) (RAVI KIRAN, SUBRAMANYAN & ASHA; 2004; RAVI KIRAN *et al.*, 2006). Ambos os íons funcionam como moléculas sinalizadoras modificando funções protéicas. Os radicais hidroxílicos têm uma contribuição extremamente significativa no desenvolvimento da fadiga muscular, estando intrinsecamente relacionados ao exercício de alta intensidade (REID, 2001).

As intensidade relativas de exercício estão relacionadas diretamente a variações no consumo de oxigênio, conhecido como $VO_{2máx}$. Duranteau *et al.* (1998) sugeriram que a mitocôndria exerce papel fundamental na cascata de sinalização-ativação da síntese de superóxidos e que, a partir disto, uma série de sinais intra e extracelulares, associados ao stress provocado pelo exercício, induziriam tanto a redução inicial da capacidade contrátil do miócito cardíaco quanto à ativação do ciclo celular. Os mesmos autores sugerem ainda que esta última deve-se ao aumento da expressão de proteínas cinases da família das *MAPK* (*mitogen-activated protein kinase*), que desempenham um importante papel na divisão e diferenciação dos cardiomiócitos. As cinases desta família

são ativadas pela fosfoliração de resíduos de tirosina (Tyr) e treonina (Thr) presentes em uma região conservada, o que pode ocorrer através da ativação de uma tirosina cinase ou da proteína G acoplada a receptores de membrana. Esta ativação, por sua vez, está associada à produção de superóxidos (GILLESPIE-BROWN *et al.*, 1995). Deste modo, podemos inferir que a variável intensidade nos diferentes grupos de treinamento poderia induzir a ativação da cascata de ações descrita acima.

A presença de lipofuscina configura-se de modo semelhante em todos os sujeitos submetidos à sobrecarga de treinamento sem, aparentemente, nenhuma diferença intra-grupos. Estes achados parecem, de certo modo, encontrar respaldo na literatura, demonstrando, no entanto, que o exercício com intensidade relativamente baixa, parece ter significativa resposta no miócito cardíaco, o que não foi demonstrado, na literatura, no músculo esquelético.

Segundo TERMAN & BRUNK (2005), o stress oxidativo responsável pelo acúmulo de lipofuscina ocorre também em decorrência do envelhecimento, ocorrendo como parte do processo de degradação de mitocôndrias. Não acreditamos, no entanto, que este fato represente alguma influência significativa a este estudo, pois os animais, na fase de coleta dos dados, eram considerados jovens.

Em mamíferos adultos, a capacidade de diferenciação dos cardiomiócitos finaliza-se com o nascimento, no entanto, o aumento da sobrecarga de trabalho contrátil pode ocasionar hipertrofia celular (CHIEN *et al.* 1991), tendo papel importantíssimo no remodelamento do miócito nas

diferentes fases do desenvolvimento do coração. Os mesmos autores explicam que o estímulo para a hipertrofia provoca transitoriamente um aumento na expressão dos genes *c-fos*, *c-jun* e *egr-1* que, por sua vez estimulam a expressão de genes que normalmente são somente expressos na fase fetal, como *SkM α -actin*, e *β -MHC*, respectivamente, relacionados as proteínas contráteis actina e a cadeia pesada de miosina, que são comumente utilizados como marcadores da hipertrofia muscular.

Nos animais pertencentes ao grupo III (GT₃), submetidos a 7,5% de sobrecarga, foi possível identificar alterações importantes em nível nuclear, observando-se variação de tamanho e forma. Em um grau discreto, cerca de 25% dos núcleos apresentam hipertrofia (Figura 19).

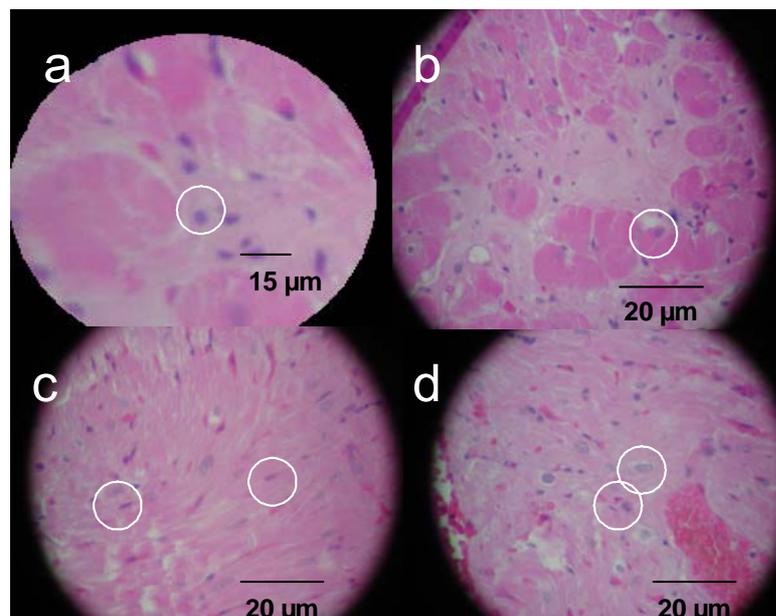


Figura 19. Corte transversal de miócitos de *R. norvegicus*. Os círculos brancos mostram os núcleos dos miócitos: a) grupo controle; b) ratos submetidos a sobrecarga de 2,5% do peso corporal (GT₁); c) ratos submetidos a sobrecarga de 5,0% do peso corporal (GT₂); ratos submetidos a sobrecarga de 7,5% do peso corporal (GT₃). Para a medida dos núcleos foi utilizado como referência o valor de uma unidade em milímetros na imagem impressa para a comparação, levando-se em consideração possíveis distorções relacionadas a modificação da lente utilizada. A imagen “a” foi aumentada 40 vezes as imagens “b, c, d” foram aumentadas 20 vezes.

Chandrasoma (1993) afirma que a hipertrofia pode ocorrer como adaptação à maior demanda circulatória imposta pela sobrecarga de trabalho. Quando a demanda é suprimida, os tecidos voltam ao tamanho normal. Meloni (2005) sugere que sobrecargas crônicas, impostas ao músculo esquelético em várias espécies animais, parecem estimular o surgimento de novas fibras (hiperplasia) através de dois mecanismos: a partir das células satélites e por meio da cisão longitudinal da fibra muscular.

Natali (2004); Natali *et al.* (2002) citam que a adaptação do miocárdio ao estímulo do exercício físico parece não ser uniforme nas diferentes regiões do miocárdio. Estes parecem adaptar-se à carga hemodinâmica do exercício dependendo da região da parede ventricular onde se encontram. Em nosso estudo não foram encontrados indicativos desta ação, possivelmente por ter sido utilizado somente o ventrículo esquerdo como referência. Tal escolha deveu-se à relação de sobrecarga circulatória, gerada pelo exercício, encontrar fisiologicamente, um maior esforço relativo nesta câmara.

Natali (2004) sugere que as características contráteis intrínsecas das miofibrilas são modificadas para contribuir para um aumento da função do ventrículo esquerdo e que estas podem estar associadas ao treinamento. Espera-se ainda que o aumento do retorno venoso, estimulado pela ação da epinefrina, liberada na corrente sanguínea pela glândula adrenal em resposta ao exercício, possa promover adaptação positiva da capacidade concêntrica das fibras cardíacas, levando a uma provável adaptação em nível celular, no que diz respeito à força absoluta desenvolvida pelas fibras cardíacas. Estes achados parecem ser suportados pelos dados de Medeiros *et al.* (2004), que demonstraram que após um treinamento de natação de longa duração de uma

hora, cinco sessões semanais durante oito semanas, em ratos, houve um aumento do volume e no peso do ventrículo em 18% e 13%, respectivamente, e cerca de 20% no diâmetro do miócito cardíaco, em comparação ao grupo controle. E ainda, Pluim *et al.* (1999) em uma extensa meta análise além de ratificar estes dados associam o crescimento a um maior desempenho em força absoluta, sendo esta cerca de três vezes maior em homens treinados *versus* não treinados, relacionando este achado ao maior influxo de cálcio no sarcolema.

No que diz respeito ao nível celular, Diffie & Chung (2003) demonstraram que o exercício crônico não alterou a velocidade máxima de contração celular, porém observou-se um aumento na velocidade em desenvolver força (contração com sobrecarga). Isto pode estar relacionado à modificação da estrutura celular. Por fim, o exercício crônico pode modificar a relação tensão ativo-comprimento celular (mecanismo de Frank-Starling) em miócitos do ventrículo esquerdo, acarretando, conseqüentemente, uma maior contratilidade intrínseca.

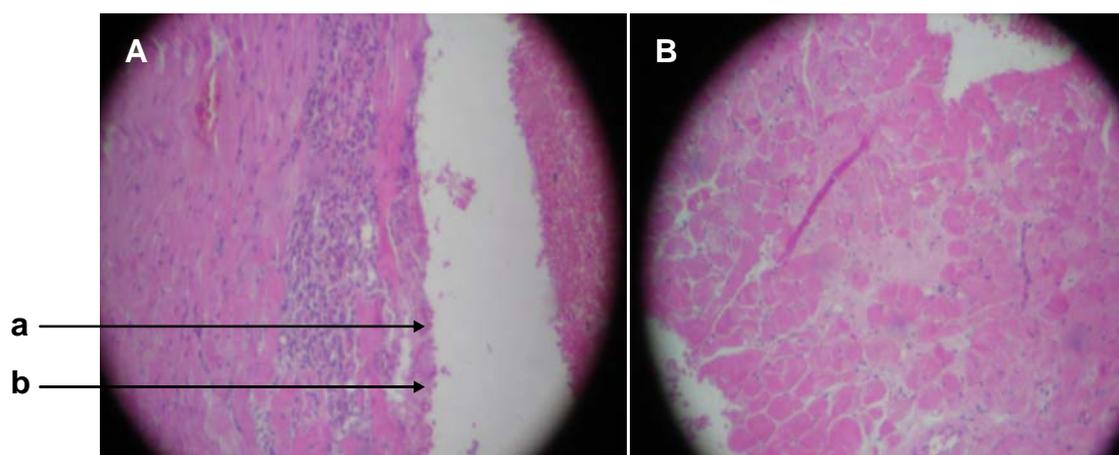


Figura 20. Corte transversal de miócitos de *R. norvegicus*. Os círculos brancos, na figura A mostram os núcleos dos miócitos ratos submetidos a sobrecarga de 7,5% do peso corporal (GT₃). Área “a” indica a esclerose tecidual característica da cicatrização fibrosa, área “b” indica região que apresenta um infiltrado de leucócitos como conseqüência do processo inflamatório instalado. Não foram encontrados sinais significativos de esclerose tecidual no grupo controle (GC) figura B. Ambas as imagens foram aumentados 40 vezes.

Foi possível identificar no grupo submetido à alta intensidade uma área de necrose de coagulação (Figura 20), juntamente com a presença de leucócitos. Segundo Cotran, Kumar & Collins (2000), a necrose de coagulação é o tipo mais comum de morte celular após estímulos exógenos, ocorrendo após estresse, como isquemia e lesão química. Manifesta-se por tumefação intensa ou ruptura da célula, desnaturação, coagulação das proteínas citoplasmáticas e degradação das organelas celulares. Na mesma amostra, foi possível identificar presença de leucócitos que estão associados à remoção das células mortas por fagocitose. CHAZAUD *et al.* (2003) propuseram um modelo cuja deposição de monócitos e leucócitos pode ser explicada pela promoção de micro-traumas no tecido celular que, por sua vez, promovem a hipertrofia muscular. Segundo estes autores as células da medula vermelha são atraídas por quimiotaxia ao sítio de lesão inicialmente pelo acúmulo de monócitos, ao mesmo tempo os leucócitos fagocitam as células mortas, promovendo uma cascata de fatores que culminam no reparo e assimilação de núcleos provindos das células satélites, periféricas à estrutura muscular (HAWKE & GARRY, 2001; CHAZAUD *et al.*, 2003).

Nota-se que cerca de 20% da amostra do grupo submetido a treinamento de alta intensidade (GT₃) apresenta áreas de esclerose miocárdica com presença de tecido fibroso. Este achado vai ao encontro à descrição de Dorn II (2007), que encontrou em treinamento com cargas de exercício intermitente uma elevada hipertrofia concêntrica, acompanhada de pequenos sinais de fibrose sem, no entanto, encontrar aumento na expressão gênica da cadeia pesada da miosina.

A maior parte das vias sinalizadoras da hipertrofia do miócito cardíaco também promove a proliferação celular (hiperplasia) de fibroblastos, o que por sua vez, estimula a produção de colágeno (VERZOLA *et al.*, 2006). O aumento da pressão no ventrículo, como resultado do maior retorno venoso induzido pelo exercício, estimula o aumento tanto da síntese quanto da deposição de colágeno (BISHOP & LINDAHL, 1999). Estudos *in vitro* demonstraram que o aumento da expressão do gene *pro-collagen type I* é estimulado por fibroblastos cardíacos que, por sua vez, também estão associados à sobrecarga ventricular (GONZALEZ, LOPEZ & DIEZL, 2002).

Tem sido reportado na literatura científica recente um grande número de trabalhos voltados à exploração dos efeitos do treinamento físico sobre a composição das proteínas contráteis. Oliveira e Krüger (2002) demonstraram aumento da ATPase miosínica no ventrículo esquerdo, secundária ao aumento da expressão de α -MHC em ratos submetidos a treinamento de natação. Os mesmos autores citam ainda que, em modelos de treinamento físico com esteira, em ratos, podem ocorrer alterações na função contrátil do miocárdio sem que ocorram mudanças significativas na atividade da ATPase miosínica, bem como na composição das isoformas da miosina ventricular, o que significa dizer que o aumento na capacidade de ejeção ventricular, necessariamente, não é decorrente do aumento da expressão de proteínas contráteis, podendo ser resultado do aumento do influxo de Ca^{2+} no miócito, o que também é sustentado por Natali *et al.* (2002).

Este dado é corroborado em estudos recentes, utilizando a técnica de SDS-PAGE, que não demonstraram aumento relativo da expressão da MHC em miócitos cardíacos submetidos a treinamento físico com esteira e natação,

apesar de apresentarem incremento circulatório. Neste caso, aos autores acreditam que este aumento parece estar associado ao aumento da velocidade da formação de pontes contráteis (DIFFEE & CHUNG, 2003; HINKEN, KORTE & McDONALD, 2006).

Em um trabalho clássico do final da década de 80, Baumann *et al.* (1987) demonstrou a hipertrofia do músculo esquelético em ciclistas submetidos a treinamento de longa duração, comparando resultados histológicos a eletroforese unidimensional (*SDS-PAGE*). Desde, então esta ferramenta para o estudo da proteômica tem sido utilizada no intuito de quantificar alterações no músculo estriado.

Levando-se em consideração que o aumento da capacidade circulatória cardíaca depende em parte de sua força contrátil e a miosina é o motor operacional desta ação, torna-se de extrema importância o estudo das alterações evocadas pelo exercício, na expressão da miosina no miócito cardíaco. Inúmeros estudos anteriores demonstraram, utilizando técnicas eletroforéticas unidimensionais, aumento na quantidade expressa das diferentes isoformas de miosina no miócito cardíaco (HAYDAR *et al.*, 1999; JOUMAA & LE'OTY, 2002; SCHEINOWITZ *et al.*, 2003; DIFFEE & CHUNG, 2003; HERRON, KORTE & McDONALD, 2001; HASHIMOTO *et al.*, 2004; HINKEN, KORTE & McDONALD, 2006). Vale ressaltar que todos estes trabalhos supracitados estão relacionados com aumento da expressão da MHC em animais que apresentaram algum tipo de cardiomiopatia e foram submetidos a treinamento como visando tratamento clínico.

Em nosso estudo, inicialmente, demonstrou-se, em géis unidimensionais, um aparente aumento quantitativo da expressão da MHC (Figura 19), no grupo GT₂ e GT₃ em relação ao GC.

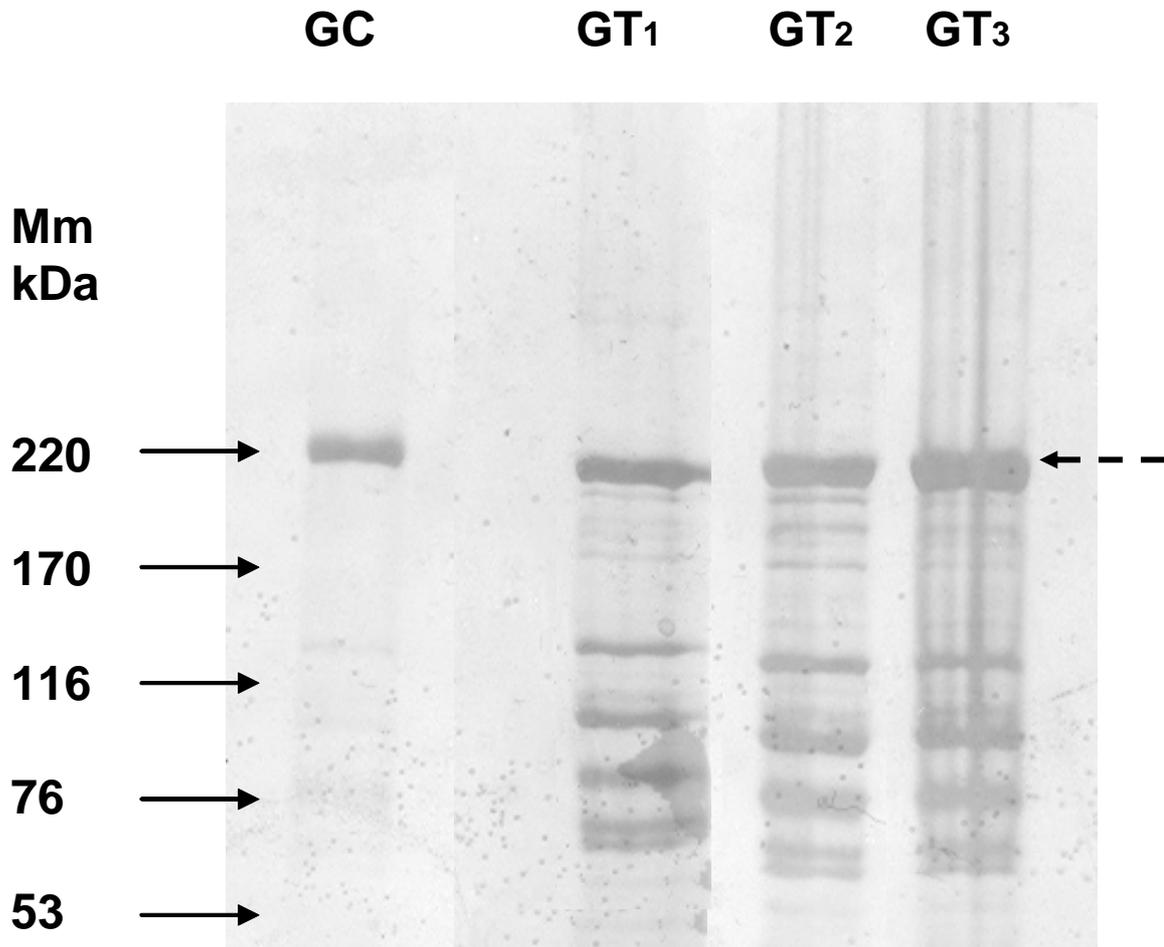


Figura 21. SDS-PAGE corado como prata. GC grupo controle GT₁ grupo treinado durante oito semanas com sobrecarga de 2,5% do peso corporal total, GT₂ grupo treinado durante oito semanas com sobrecarga de 5,0% do peso corporal total, GT₃ grupo treinado durante oito semanas com sobrecarga de 7.5% do peso corporal total. A seta tracejada indica a provável localização da cadeia pesada de miosina (MHC).

Este dado corrobora os achados de Hashimoto *et al.*, (2004) que demonstraram aumentos de 30 a 50%, respectivamente, em ratos infartados e não infartados, submetidos a exercício de baixa intensidade em esteira rolante durante seis semanas. Resultados semelhantes aos de Iemitsu *et al.* (2004),

em ratos idosos, submetidos a treinamento de natação, durante oito semanas, bem como os achados de Paganni & Sollaro (1983) e Jin *et al.* (2000) citados por Difee *et al.* (2003). Um estudo pioneiro comparando ratos normais e hipertensos submetidos a exercício de natação, encontrou-se aumentos significativos de MHC, em ambos os grupos, quando comparados a seus respectivos controles, utilizando SDS-PAGE (SCHEUER *et al.*, 1982).

A técnica 2D-E para a análise proteômica do músculo estriado tem sido utilizada em vários estudos envolvendo exercício. Gelfi *et al.* (2006) analisaram variações no proteoma do músculo esquelético humano durante o processo de envelhecimento associado ou não, ao exercício. Seus achados demonstraram que, no processo de envelhecimento, ocorre uma significativa diminuição da expressão de α -MHC acompanhada de um decréscimo da capacidade de fosforilação da miosina de cadeia leve 2 (regulatória). Estas modificações contribuiriam para a diminuição do desempenho motor enquanto o exercício contribui de forma significativa no aumento da expressão da β -MHC, o que supriria o decréscimo na capacidade de fosforilação da miosina de cadeia leve. Em um estudo importante sobre o efeito do exercício no miócito cardíaco, utilizando a técnica de microarranjo, verificou-se aumento na expressão da MLC e MHC. A expressão desta última, entretanto, não foi demonstrada utilizando a técnica de 2D-E (DIFEE *et al.*, 2003; DIFEE, 2004).

Em nosso estudo, a análise comparativa do 2D-E demonstrou, inicialmente, a possibilidade de quantificação da expressão da MHC o que não pôde ser observado na literatura científica, até o momento. Deste modo, acreditamos que os resultados gerados neste trabalho representam um avanço

para o estudo do miócito cardíaco, utilizando a técnica de 2D-E podendo este ser considerado pioneiro na avaliação de proteínas acima de 100 kDa.

Foram observadas diferenças significativas no padrão protéico em todos os tratamentos (Figura 22). Entre estes, se observa claramente o aumento da expressão da miosina (MHC) em relação ao controle e a variável sobrecarga (Figura 23). Um claro limitante deste estudo, além da difícil manufatura do gel, está relacionado diretamente ao método de identificação dos *spots* por MS/MS. Griffin e Aebersold (2001), em uma interessante revisão, descrevem ao menos três limitações a esta análise relacionadas à própria técnica de 2D-E que oferece uma pequena quantidade de proteínas para a detecção. A utilização de prata para o coramento, o que reduz a sensibilidade da análise. Além do fato que uma substancial fração dos *spots* selecionados contém mais de uma proteína ou ainda uma fração modificada ou processada de uma proteína que pode migrar para uma posição diferente, complicando sua quantificação e criando um viés de identificação importante para este método, pois sua idéia central reside na identificação de uma única proteína. Por último, devemos considerar ainda que o 2D-E é uma técnica que exige um alto grau de proficiência para a reprodução dos resultados.

A sobreposição das imagens demonstrou diferenças entre a expressão quantitativa, bem como a presença ainda de outras diferentes proteínas, além da MHC (Figura 24), que serão posteriormente discutidas neste trabalho.

A curva de regressão das sobreposições, calculada pelo *software Bionumerics*® mostra que existem diferenças significativas entre todos os tratamentos GT₁, GT₂ e GT₃ quando comparados entre eles mesmos e ao controle ($r^2 < 0,43$ em todas as comparações). Este valor demonstra uma

expressão diferencial de algumas proteínas em relação a diferentes intensidades de treinamento. Em relação comparação intra-grupos existe uma correlação significativa, ($r^2 = 0,82$ a $0,94$) o que demonstra a boa reprodutibilidade dos géis.

A sobreposição dos géis (Figura 24) e a comparação tridimensional (Figura 25), ambos obtidos através da utilização do *software* *Bionumerics*® demonstram uma boa similaridade principalmente pela presença de um padrão comum a todos estes. Foram descritos 186 *spots* dos quais 22 apareciam em ao menos dois tratamentos diferentes. Destes, somente três *spots* apareceram em todos os tratamentos e no controle simultaneamente. Os dados obtidos por MS/MS são apresentados na Tabela 03.

Estudos recentes, utilizando 2D-E, realizados por Lindsey *et al.* (2006), encontraram cerca de 120 proteínas diferentes em miócitos cardíacos submetidos a sobrecarga tensional, dentre estas a MHC, que apresentou aumentos significativos em sua expressão quando comparada ao controle. Cardiomiócitos de coelhos submetidos à hipoxia demonstraram alterações em proteínas contráteis principalmente à miosina de cadeia leve e a troponina C, além de diversas proteínas associadas ao metabolismo energético de potencial redox do O_2 (WHITE *et al.*, 2005).

Estes estudos corroboram nossos achados a respeito do aumento da expressão da MHC em função do exercício. Este incremento parece estar associado à intensidade do exercício, o que, por sua vez, aumentaria a perfusão de Ca^{2+} no retículo endoplasmático, causando uma regulação positiva na expressão de genes ligados ao aumento da síntese protéica (DIFFEE, 2004; HINKEN *et al.*, 2006; DEPRE *et al.*, 2006).

Spot	pl real	pl mascot	Peso molecular real	Peso mol. mascot	Probabilidade de cobertura em %	Código	Cobertura	Descrição da proteína/ Função	Grupo
1	9,00	9.44	≈ 120	122.82	53,57	Q8K4V5	16%	Receptor de membrana de alta afinidade com imunoglobulina gama. Associado a cadeia de eventos da fagocitose.	GT ₃
2	8,06	9.23	248	344.40	78,57	Q3KRD5	32%	Translocase de membrana mitocondrial 34 (proteína hipotética). Receptor de membrana associado à síntese de energia	GC e GT ₃
3	6,95	5.91	175	105.94	37,5	Q60I07	32%	Major histocompatibility complex classe 1 Envolvida na resposta imunológica leucocitária	GC e GT ₂
4	4,34	9.69	≈ 230	227.81	75	AAH83554	16%	Superoxido desmutase homóloga ao transportador de Magnésio da membrana mitocondrial. Mn-SOD	GC
5	5,07	7.06	≈ 220	369.89	66,07	Q5I0M4	16%	Oxidoredutase. Tem papel fundamental na transferência de elétrons na cadeia respiratória	GC
6	5,99	5.24	≈ 230	364.70	66,07	Q924V0	17%	Receptor classe 1 de cadeia	GC
7	5,20	5.75	≈ 100	314.06	85,71	BAA18993	29%	Hidrolase N-N-dimetil-Larginina. Atua como um inibidor da óxido nítrico sintetase	GC GT ₂ GT ₃
8	6,48	9.14		127385	39,2	S52517	4%	CADEIA PESADA DE MIOSINA Motor primário da contração muscular no miócito cardíaca	Todos
9	5,59	9.23	193,97	34440	87,5	Q3KRD5	42%	Translocase de membrana mitocondrial 34 (proteína hipotética). Receptor de membrana associado à síntese de energia	GT ₃
10	4,51	5.50	212,66	168430	71,42	AAG28597	7%	Rho Guanina. Atua na regulação da GTPase	GC
11	6,02	4.55	204	5291	64,28	1VDFA	71%	Matrix oligomérica cartilaginosa. Associada a adesão celular.	GT ₂
12	6,95	5.24	192,61	107927	62,50	AAF37622	8%	Glutamil aminopeptidase. Aparece na via de catabolismo do sistema renina-angiotensina.	Todos
13	7,36	9.78	213,04	8263	62,5	CAA40164	26%	NADH-ubiquinona oxidoredutase . Tem	Todos

								atividade de NADH dehidrogenase.	
14	7,03	8.25	201,67	137667	73,21	BAC00851	9%	Filamina-A. Proteína de interação atua junto ao eixo actina -filamina-A/F, controlando o início da migração celular da zona ventricular. Sugere-se sua localização junto à actina F.	GT ₃
15	5,85	9.39	223,18	46392	48,21	Q60118	9%	Major histocompatibility complex classe 1 Envolvida na resposta imunológica leucocitária	GT ₃
16	8,32	9.61	244,93	21580	35,71	TNNI3	12%	Troponina I. (fibras ST). Atua como um regulador da contração muscular devido a sua associação com o cálcio.	GT ₃
17	5,6	9.23	227,03	34440	87,5	Q3KRD5	39%	Translocase de membrana mitocondrial 34 (proteína hipotética). Receptor de membrana associado à síntese de energia.	GT ₃
18	4,87	9.61	222,29	21580	41,00	TNNI3	12%	Troponina I. (fibras ST). Atua como um regulador da contração muscular devido a sua associação com o cálcio.	GC GT ₁ e GT ₃
19	5,59	6.12	193,97	42056	103,5	Q861Q1	18%	Major histocompatibility complex classe 1 Envolvida na resposta imunológica leucocitária	GT ₃
20	7,53	7.59	250,68	34985	69,76	CAA73137	18%	F-actina-capping protein. Liga-se ao cálcio. Atua na morfogênese da espermátide.	GC e GT ₃
21	8,67	9.23	361	34440	94,5	Q3KRD5_ RAT	39%	Translocase de membrana mitocondrial 34 (proteína hipotética). Receptor de membrana associado à síntese de energia.	GT ₃
22	4,73	5.24	209,77	107927	91,07	AAF37622	30%	Glutamil aminopeptidase. Via de catabolismo do sistema renina-angiotensina.	GC e GT ₃

Tabela 03 – Identificação por espectrometria de massa das proteínas comuns presentes em dois ou mais géis. O método utilizado foi *Peptide Mass Fingerprint*.

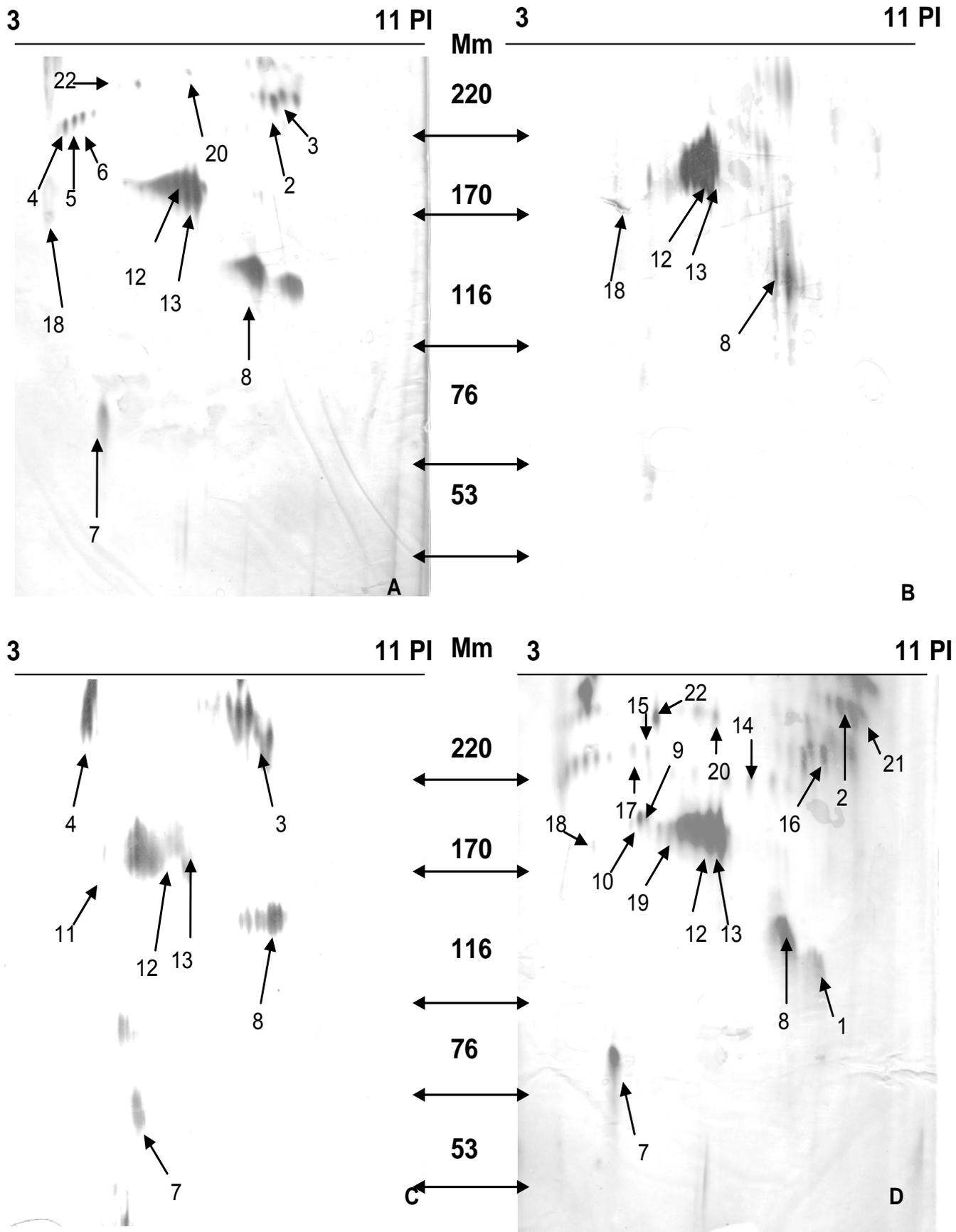


Figura 22. 2D-E representativo dos tratamentos A) GC - Grupo controle; B) GT₁-Grupo treinado submetido a sobrecarga de 2,5% do peso corporal total. C) GT₂- Grupo treinado submetido a sobrecarga de 5,0% do peso corporal total.. D) GT₃-Grupo treinado submetido a sobrecarga de 7,5% do peso corporal total.

Dentre nossos achados, também foi detectada a presença de outra proteína sarcomérica a troponina. De acordo com o modelo de regulação da contração muscular o sítio de ligação entre a actina e a miosina é ocupado por um complexo protéico formado pela troponina e pela tropomiosina. A troponina, por sua vez, é um tetrâmero formado pelas subunidades: TnC, que se associa ao Ca^{2+} , TnT e TnI ambas regulatórias (SPUDICH & WATT, 1971; SORICHTER *et al.*, 1997; LIU & POLLACK, 2004).

A troponina I tem sido amplamente utilizada como um marcador de lesão do miócito cardíaco. A determinação dos níveis séricos da mesma apresentam uma alta correlação com a insuficiência cardíaca e, por consequência com a hipertrofia patológica do miócito cardíaco (ADAMS III *et al.*, 1993; LIU & POLLACK, 2004; AGIANIAN *et al.*, 2004).

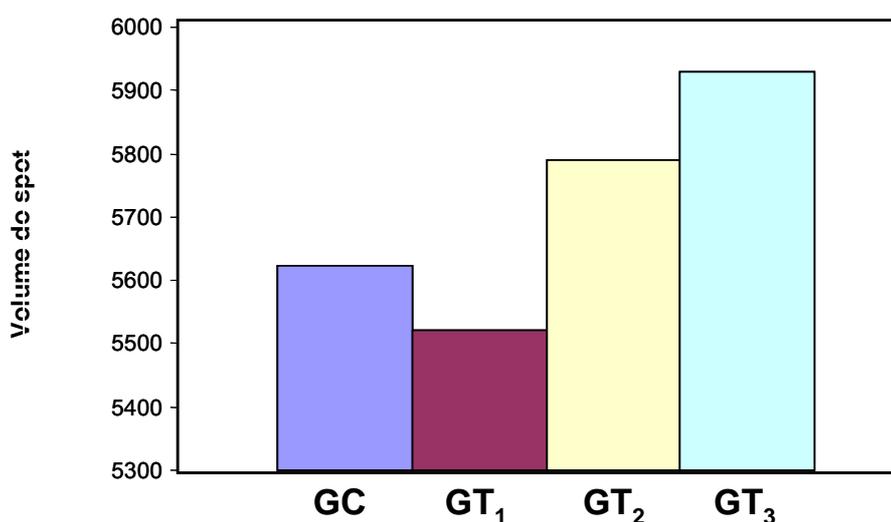


Figura 23. Quantificação da MHC entre os grupos Controle (GC), e os grupos de ratos submetidos a treinamento de natação. GT₁, submetido à sobrecarga de 2,5%. GT₂, sobrecarga de 5% e GT₃, sobrecarga de 7,5%. Os valores do eixo y representam o volume do spot tendo sido gerados a partir da análise do 2D-E utilizando o software *Bionumerics*®.

Nossos dados demonstraram seu aparecimento no GT₃ (Tabela 03), o que, parece ir ao encontro aos dados da análise histoquímica que indicam neste mesmo grupo área necrótica, indicativa de lesão, bem como a forte presença leucocitária associada à hipertrofia do miócito cardíaco (CHAZAUD *et al.*, 2003). É possível que a ausência de troponina nos outros grupos treinados e no controle esteja ainda associada à baixa sensibilidade da técnica, conforme já descrito anteriormente neste trabalho ou mesmo ao fato de que somente altas concentrações poderiam ser identificadas como ocorrido no GT₃.

Outro achado a ser destacado no GT₃ é a presença do complexo principal de histocompatibilidade, (MHC: *major histocompatibility complex*), (Tabela 03) que representa a região gênica que codifica as moléculas de histocompatibilidade responsáveis pela apresentação de antígenos ao sistema imune. Estes estão associados à histocompatibilidade expressa na superfície de todas as células nucleadas, das células apresentadoras de antígenos e a outras moléculas, como os fatores de necrose tumoral, as proteínas do choque térmico (*Heat shock proteins*) e as enzimas hidroxilase (ALVES *et al.*, 2006).

Um importante indicativo da adaptação ao treinamento foi a presença de algumas proteínas associadas ao metabolismo oxidativo como as oxidoredutases, translocases de membrana mitocondrial e proteínas análogas as SOD, superóxido desmutases (Tabela 03). Os processos de liberação e conservação da maior parte da energia livre nas células aeróbias é função das mitocôndrias.

Seu número em diferentes tecidos é resultado de seu importante papel fisiológico (NELSON & COX, 2002). O miócito cardíaco apresenta metade de

seu volume citosólico composto de mitocôndrias, sendo, conseqüentemente altamente dependente da síntese oxidativa de energia (DAVIES, BAKELEY e KIDD, 2002). Este dado parece ser confirmado por dados aqui reportados.

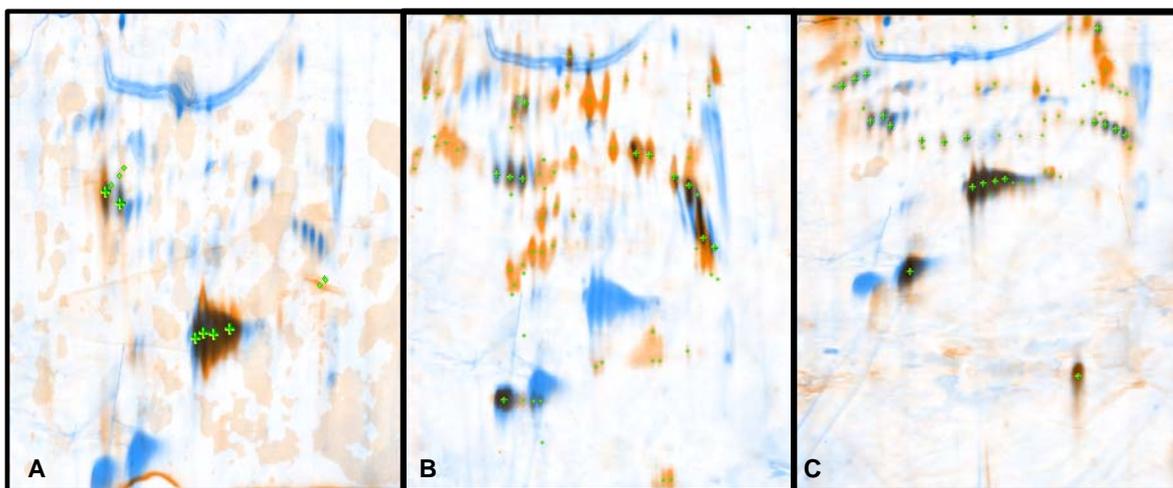


Figura 24. Sobreposição dos 2D-E em diferentes tratamentos utilizando o software Bionumerics®. A) GC e GT₁; B) GC e GT₂ e C) GC e GT₃. A imagem do grupo controle (GC), aparece em cor laranja enquanto a imagem dos tratamentos (GT's), aparece em cor azul.

A membrana mitocondrial interna exerce papel fundamental na fosforilação oxidativa e no transporte de elétrons. Os compostos movem-se através da membrana da mitocôndria através de proteínas carreadoras específicas, as translocases (NELSON & COX, 2002; VOET, VOET & PRATT, 2000; HEIDEN *et al.*, 2000).

Nas células eucarióticas o estágio final da oxidação de nutrientes ocorre na mitocôndria, com a rápida oxidação de NADH e FADH₂ produzidos nas reações de glicólise, ciclo tricarbóxico, β -oxidação de ácidos graxos e oxidação de aminoácidos. Em nosso estudo, encontramos em todos os grupos

(GC e GT's) a enzima NADH-ubiquinona oxidoreductase que tem papel fundamental na etapa inicial de transferência de elétrons na cadeia respiratória para a coenzima Q (ubiquinona) segundo (VOET, VOET & PRATT, 2000).

No entanto, somente no GT₃ encontramos uma maior expressão de translocases de membrana mitocondrial que estão associadas à transferência de ATP e H⁺ para o citosol. Estes achados parecem suportar a idéia do aumento da capacidade oxidativa em função do treinamento de natação aos quais os animais foram submetidos, reforçando a idéia do aumento da capacidade aeróbia. Não foi possível encontrar na literatura dados que, através do 2D-E, confirmassem estes achados.

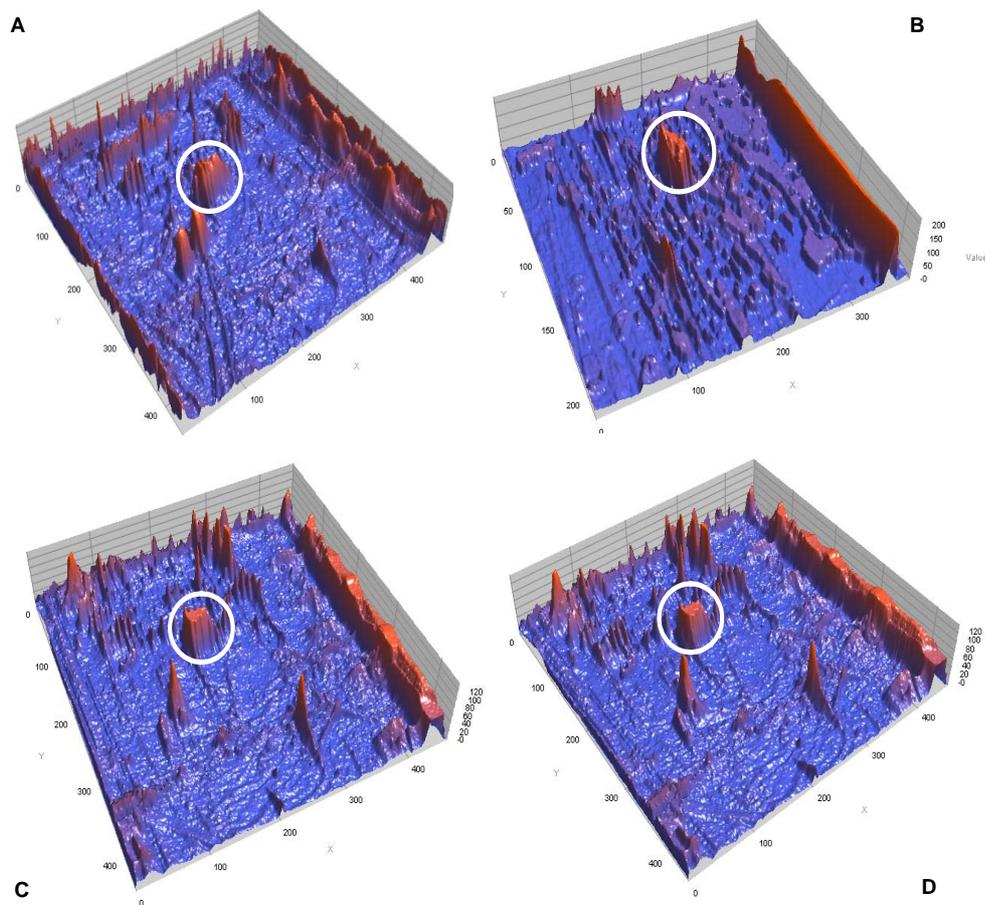


Figura 25. Análises do 2D-E em visão tridimensional. A) GC; B) GT₁; C)GT₂; D) GT₃. Os círculos brancos demonstram a MHC determinada pela espectrometria de massa MS/MS.

Além disto, deve-se também observar que o aumento da síntese de ATP implica aumento da participação das superóxido desmutase, um grupo de metaloenzimas que catalisam a desmutação (potencial redox) do radical livre do oxigênio, principalmente, a Mn-SOD (manganês superóxido desmutase) (RAVI KIRAN, SUBRAMANYAN & ASHA; 2004; RAVI *et al.*, 2006), estando esta enzima identificada em nosso grupo de animais.

Foram identificadas também em nosso estudo (Tabela 03) outras proteínas que estão envolvidas no controle hormonal da pressão arterial como a renina, um peptídeo altamente específico, envolvido na geração da angiotensina no plasma, o que irá iniciar uma cascata de reações que finalizam com a retenção de sódio nos rins e a elevação da pressão arterial (DAVIES, BAKELEY & KIDD, 2002) e a enzima Glutamil-aminopeptidase, envolvida na via de catabolismo do mesmo sistema renina-angiotensina. Acreditamos que ambas as proteínas descritas devem estar presentes na amostra em decorrência da presença de vasos sangüíneos que irrigam e drenam o miocárdio no ventrículo esquerdo (capilares teciduais, a artéria anterior descendente esquerda e a veia coronária anterior).

No entanto, outras proteínas identificadas não parecem estar relacionadas ao papel do miócito cardíaco nem tampouco a um processo adaptativo induzido pelo treinamento físico. Proteínas inibidoras de angiogênese classe 1 localizadas especificamente no cérebro humano; receptores de membrana de neurônios; proteínas relacionadas à cadeia celular anti-apoptótica; Rho-Guanina que atua na regulação da GTPase da guanina; Matrix oligomérica cartilaginosa associada à adesão celular; Filamina-A uma proteína de interação que controla o início da migração celular da zona

ventricular. *F-actin-capping protein* que se liga ao cálcio, impedindo a troca de subunidades na actina, atuando na morfogênese da espermatíde. Acreditamos que novos experimentos de seqüenciamento a fim de aumentar a cobertura devem ser feitos, objetivando uma melhor elucidação destes achados.

4 CONCLUSÃO

A literatura descreve que um dos maiores benefícios de exercício associados ao sistema cardio-circulatório é o aumento da eficiência do coração. Pôde-se constatar, em nosso estudo, que as alterações estruturais do miócito cardíaco que levam a hipertrofia muscular podem ser os responsáveis por este incremento, por influenciar diretamente na geração de força a partir do aumento da expressão do motor primário da contração muscular, a miosina.

Este aumento sugere uma clara correlação com o padrão de intensidade ao quais os indivíduos foram submetidos, demonstrando que o treinamento, intervalado de alta intensidade em relação ao treinamento contínuo de baixa e de moderada intensidade, realizados durante trinta minutos em três sessões semanais, apresentou-se mais eficaz no aumento da expressão da cadeia pesada de miosina no miócito cardíaco de *R. norvegicus*. A alta intensidade, no entanto, representou também um grau significativo de lesão celular, quando comparado aos indivíduos submetidos à baixa intensidade o que pode, em longo prazo, representar perda de capacidade contrátil e conseqüentemente diminuição funcional. Estes dados parecem ser corroborados pelo aumento da expressão da troponina, no grupo submetido à alta intensidade, outro achado importante em nosso estudo. A troponina tem sido reconhecida como um importante marcador da lesão no miócito cardíaco.

A presença de enzimas associadas ao transporte e a síntese de energia oxidativa também é um achado significativo, pois este dado da suporte a análise do comportamento do limiar anaeróbio do tocante a adaptação ao treinamento físico.

Outra importante contribuição deste estudo foi a implementação de parâmetros técnicos do 2D-E para a quantificação de proteínas de alto peso molecular o que, em nosso conhecimento, apresenta-se como um marco de pioneirismo científico.

Sugere-se, no entanto, que este estudo seja repetido utilizando adequações a técnica do 2D-E, no intuito de fomentar melhores respostas a questões inicialmente respondidas aqui.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMS III, J.E.; BODOR, G.S.; DAVILA-ROMAN, V.G.; DELMEZ, J.A.; APPLE, F.S.; LADENSON, J.H. & JAFFE, A.S.. Cardiac Troponin I A Marker With High Specificity for Cardiac Injury. **Circulation**. 1993;88:, 1009-1015.

AGIANIAN, B.; KRZIC, U.; QIU, F.; LINKE, W.A.; LEONARD, K. & BULLARD, B.. A troponin switch that regulates muscle contraction by stretch instead of calcium **The EMBO Journal**. 2004; 23 (4): 772-779.

ALVES, C.; VIEIRA, N.; MEYER, I.; ALVES, C.O.; TORALLES, M.B.P. e OLIVEIRA, M.F.S.P.. Antígenos de histocompatibilidade humanos e dermatologia: da pesquisa para a prática clínica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 2006; 81(1):65-73.

ANDERSON, Leigh Candidate-base proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. **Journal of Physiology**. 2005; 563.1: 23-60.

APPLE, F. S.. Clinical Biomarkers of Cardiac Injury: Cardiac Troponins and Natriuretic Peptides. **Toxicologic Pathology**. 2006; 34:91–93.

ARRELL, D.K.; NEVEROVA, I. & VAN EYK, J.E.. Cardiovascular Proteomics: Evolution and Potential. **Circulation. Research**. 2001;88:763-773.

BAKER, J.P. & TITUS, M.A. A family of unconventional myosins from the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Molecular Biology**. 1997;172: 523-535.

BALDWIN K.M.. Research in the exercise sciences: Where do we go from here? **Journal of Applied Physiology** 2000; 88: 332–336, 2000.

_____ & HADDAD, F.. Invited Review: Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. **Journal Applied Physiology**. 2001;90: 345–357.

BARROS NETO,. T.L.. Hipertrofia ventricular secundária ao exercício físico. **Revista da Sociedade de Cardiologia do estado de São Paulo** 1994; 4(4):81-83.

BAUMANN, H.; JÄGGI, M.; SOLAND, F.; HOWALD, H. & SCHAUB, M.C.. Exercise training induces transitions of myosin isoform subunits within histochemically typed human muscle fibres. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**. 1987 ; 409(4-5): 348-360.

BIRAL, D.; BETTO, R.; DANIELI-BETTO, D. & SALVIATI, G.. Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. **Biochemical Journal**. 1988; 250(1): 307–308.

BISHOP, J.E. & LINDAHL, G.. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. **Cardiovascular Research**. 1999; 42: 27-44.

BOHELER, Kenneth R.; CZYZ, Jaroslaw; TWEEDIE, David; YANG, Huang-Tian; ANISIMOV, Sergey V. & WOBUS, Anna M.. Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells Into Cardiomyocytes **Circulation Research** 2002;91:189-201

BOOTH, F.W.; TSENG, B.S.; FLUCK, M. & CARSON J.A. Molecular and Cell Adaptation of Muscle in Response to Physical Training. **Acta Physiologica Scandinava**. 1998;162, 343-350.

BROWN, S.S.. Myosins in yeast. **Current Opinion in Cell Biology**. 1997; 9: 44-48.

BURDON, T.; CHAMBERS, I.; STRACEY, C.; NIWA, H. & SMITH, A.. Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. **Cells Tissues Organs**. 1999;165:131–143.

CHANDRASOMA, P. & TAYLOR C.R.. **Patologia Básica**. Ed. Prentice-hall, Rio de Janeiro: 1993. 585p.

CHAZAUD, B.; SONNET, C.; LAFUSTE, P.; BASSEZ, G. ; RIMANIOL, A.C.; PORON, F. ; AUTHIER, F.; DREYFUS, P.A. & GHERARDI, R.K.. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth **The Journal of Cell Biology**. 2003;163(5):1133–1143.

CHEN, L.; KUO, W.; YANG, J.; WANG, S.P.; YEH, Y. *et al*. Eccentric cardiac hypertrophy was induced by long-term intermittent hypoxia in rats **Experimental Physiology**. 2007; 92(2): 409–416.

CHIN, E.R.; OLSON, E.N.; RICHARDSON, J.A.; YANG, Q.; HUMPHRIES, C.; SHELTON, J.M.; WU, H.; ZHU, W.; BASSEL-DUBY, R. & WILLIAMS, R.S.. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. **Genes Development**. 1998;12(16):2499-509.

CHIEN, K.R.; KNOWLTON, K.U.; ZHU, H. & CHIEN, S.. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. **FASEB Journal**. 1991; 5, 3037–3046.

CLARK, K.A.; McELHINNY, A.S.; BECKERLE, M.C. GREGORIO, C. C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annual Review of Cell Developmental Biology**. 2002; 18:637-706.

COENEN-SCHIMKE, P.R.; SREEKUMARAN, N.AIR; SHORT, K.R.; VITTONI, J.L.; BIGELOW, M.L.; PROCTOR, D.N. & JILL M. Endurance exercise training expression in human skeletal muscle with age and Changes. **Journal of Applied Physiology**. 2005; 99:95-102.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.. Necrose ou necrose de coagulação. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.. (org) **Patologia estrutural e funcional**. Ed Guanabara Koogan, 6ª edição. São Paulo. 2000. 125p.

COOPER, G.M. & HAUSMAN, R.E. **The cell: A molecular approach**. 3rd ed. Washington: ASM Press, 2004. 713 p

CRAIG, R. & WOODHEAD, J.L. Structure and function of myosin filaments **Current Opinion in Structural Biology** 2006, 16:204–212

_____. The Structure of The Contractile Filaments In: ENGEL, A.G. & FRANZINNI-ARMSTRONG, C. (org) **Myology**. Second edition v.1 Ed. McGraw-Hill, 1994. USA. 1315p

CSERJESI, Y.D.P.; MARKHAM, B.E. & MOKKENTIN, J.E.. The Transcription Factors GATA4 and d-HAND Physically Interact to Synergistically Activate Cardiac Gene Expression through a p300-dependent Mechanism **The Journal of Biological Chemistry** 2002; 277(27) 24390–24398,

D'AMBROSIO, C.; ARENA, S.; TLAMO, F.; LEDDA, L.; RENZONE, G.; FERRARA, L. & SCALONI A.. Comparative proteomic analyses of mammalian animal tissues and body fluids: bovine proteome database. **Journal of chromatography** 2005; B815: 157-168.

DAVIES, A.; BAKELEY, A. G. H. e KIDD, C.. **Fisiologia Humana**. Ed. Artmed, 2002. Porto Alegre. 980p.

DEBOSCH, B.; TRESKOV, I.; LUPU, T.S.; WEINHEIMER, C.; KOVACS, A.; COURTOIS, M.; MUSLIN, A.J.. Akt1 Is Required for Physiological Cardiac Growth. **Circulation**. 2006;113:2097-2104.

DEPRE, C.; WANG, L.Y.; HEDHLI, N.; PETER, P.; CHEN, L. *et al.* Activation of the Cardiac Proteasome During Pressure Overload Promotes Ventricular Hypertrophy **Circulation**. 2006;114:1821-1828.

DIFEE, G.M.; NAGLE D.F.. Regional differences in effects of exercise training on contractile and biochemical properties of rat cardiac myocytes. **Journal of Applied Physiology**, 2003; 95: 35-42.

_____. Adaptation of cardiac myocyte contractile properties to exercise training. **Exercise Sport Science Reviews**. 2004; 32(3): 112–119.

_____ & CHUNG, E.. Altered single cell force-velocity and power properties in exercise-trained rat myocardium. **Journal of Applied Physiology**. 2003; 94: 1941–1948.

_____ ; SEVERSEN, E.A.; STEIN, T.D. & JOHNSON, J.A.. Microarray expression analysis of effects of exercise training: increase in atrial MLC-1 in rat ventricles. **American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology**. 2003;284: H830–H837.

DODOU, E., VERZI, M. P., ANDERSON, J. P., XU, S. M. & BLACK, B. L. *Mef2c* is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development **Development** 2004; 131, 3931–3942.

DOETSCHMAN, T.C.; EISTETTER, H.; KATZ, M.; SCHMIDT, W. & KEMLER, R.. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. **Journal of Embryology And Experimental Morphology** 1985; 87:27–45.

DOLCI, A. & PANTEGHINI, M. The exciting story of cardiac biomarkers: From retrospective detection to gold diagnostic standard for acute myocardial infarction and more. **Clinica Chimica Acta**. 2006;369:179–18.

DONOGHUE, P.; DORAN, P.; DOWLING, P. & OHLANDIECK, K. Differential expression of the fast skeletal muscle proteome following chronic low-frequency stimulation. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2005; 1752 166-176.

DORN II, G.W.. The Fuzzy Logic of Physiological Cardiac Hypertrophy. **Hypertension**. 2007;49:962-970.

DUNN, Michael J. Studying heart disease using the proteomic approach. **Drug Discovery Today**. 2000;5(2):76-84.

DURANTEAU, J.; CHANDEL, N.S.; KULISZ, A.; SHAO, Z. & SCHUMACKER, P.T.. Intracellular Signaling by Reactive Oxygen Species during Hypoxia in Cardiomyocytes **The Journal of Biological Chemistry**. 1998; 273(19): 11619–11624.

EISENBERG, E.; HILL, T.L. & CHEN, Y.. Cross-bridge model of muscle contraction. Quantitative analysis. **Biophysical Journal**. 1980; 29, 195–227.

ELRICK, M.M.; WALGREN, J.L.; MITCHELL, M.D. & THOMPSON, D.C. Proteomics: Recent Applications and New Technologies **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. 2006, 98, 432–441.

ENGEL, A.G. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (org) **Myology**. 2ª Edição v.1 Ed McGraw-Hill, 1994. USA. 1315p

FARRELL, M.J. & KIRBY, M.L.. Cell biology of cardiac development. **International Review of Cytology** 2001; 202:99–158.

FASSLER, R.; ROHWEDEL, J.; MALTSEV, V.; BLOCH, W.; LENTINI, S.; GUAN, K.; GULLBERG, D.; HESCHELER, J.; ADDICKS, K. & WOBUS, A.M.. Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. **Journal of Cell Science**. 1996; 109:2989–2999.

FLINK, I.L.; RADER, J.H.; BANERJEE, S. K.; MORKIN, E.. Atrial and ventricular cardiac myosin contain different heavy chain species. **FEBS Letters** 1978; 94(1)125-130.

FREIMANN, S.; SCHEINOWITZ, M.; YEKUTIELI, D.; FEINBERG, M.S.; ELDAR, M.; KESSLER-ICEKSON, G.. Prior exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat. Heart structure, function, and gene expression. **Journal of American College of Cardiology** 2005; 45(6):931–938.

GALLO, Luiz Antonio. **Apostila de Aulas Praticas Fundamentos Básicos de Bioquímica de Plantas**, disponível em: [Http://www.ciagri.usp.br/~luagallo/apostila de aulas praticas.htm](http://www.ciagri.usp.br/~luagallo/apostila_de_aulas_praticas.htm) . Acessado em março de 2004.

GELFI, C.; VIGANO, A.; RIPAMONTI, M.; PONTOGLIO, A.; BEGUM, S.; PELLEGRINO, M.A.; GRASSI, B.; BOTTINELLI, R.R.W. & CERRETELLI, P.. The Human Muscle Proteome in Aging. **Journal of Proteome Research**. 2006; 5: 1344-1353.

GHORAYEB, N.; Batlouni, M.; Pinto, I.M.F. & Dioguardi, G.S.. Hipertrofia ventricular esquerda do atleta. Resposta adaptativa fisiológica do coração. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 2005; 85(3) 191-197.

GILLESPIE-BROWN, J.; FULLER, S.J.; BOGOYEVITCH, M.A.; COWLEY, S. & SUGDEN, P.H.. The Mitogen-activated Protein Kinase Kinase MEK1 Stimulates a Pattern of Gene Expression Typical of the Hypertrophic Phenotype in Rat Ventricular Cardiomyocytes **The Journal of Biological Chemistry**. 1995; 270(47): 28092–28096.

GONZALEZ, A.; LOPEZ, B. & DIEZL, J.. Myocardial fibrosis in arterial hypertension **European Heart Journal Supplements**. 2002; 4 Sup. D: D18-D22.

GREPIN, C.; DAGNINO, L.; ROBITAILLE, L.; HABERSTROH, L.; ANTAKLY, T. & NEMER, M.. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. **Molecular and Cellular Biology**. 1994; 14:3115-3129.

_____; NEMER, G. & NEMER, M.. Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. **Development**. 1997; 124:2387–2395.

GRIFFIN, T.J. & AEBERSOLD, R.. Advances in Proteome Analysis by Mass Spectrometry **Journal of Biological Chemistry**. 2001;276(49): 45497-45500.

GUPTA, M.; SUEBLINVONG, V.; RAMAN, J.; JEEVANANDAM, V. & GUPTA, M.P. Single-stranded DNA-binding Proteins PUR α and PUR β Bind to a Purine-rich Negative Regulatory Element of the Alpha-Myosin Heavy Chain Gene and Control Transcriptional and Translational Regulation of the Gene Expression:

Implications In The Repression of Alpha-Myosin Heavy Chain During Heart Failure **The Journal of Biological Chemistry** 2003; 278(7), 44935–44948

GUYTON, A.C. **Fisiologia humana e mecanismo das doenças**. 6. Ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro:1998. 639p

HARADA, Y., NOGUCHI, A., KISHINO, A. & YANAGIDA, T.. Sliding movement of single actin filaments on one-headed myosin filaments **Nature** 1987; 326, 805–808.

HASHIMOTO, T.; NAOSHIGE, K., RYUJI, N., MASAYUKI, Y. and SADAYOSHI, T.. Expression of MHC- β and MCT1 in cardiac muscle after exercise training in myocardial-infarcted rats. **Journal Applied Physiology**, 2004a; 97: 843–851.

_____ ; KAMBARA, N.; NOHARA, R.; YAZAWA, M. & TAGUCHI, S.. Expression of MHC- β and MCT1 in cardiac muscle after exercise training in myocardial-infarcted rats. **Journal of Applied Physiology**. 2004b; 97: 843–851.

_____ ; YAMASAKI, S; & TAGUCHI, S.. Alterations in the expression of myosin heavy chain isoforms in hypoxia-induced hypertrophied ventricles in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part B: Biochemistry & Molecular Biology**. 2003; 136: 139–145.

HAWKE, T.J., & GARRY, D.J.. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**.2001; 91:534–551.

HAYDAR, D.A.; POWERS, S.K.; NAITO, H.; HUGHES, M. & COOMBES, J.S. Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. **Journal Applied Physiology**. 1999; 86(3):1002–1008.

HANSEN, J.T. & KOEPPEN, B.M. **Atlas de Fisiologia Humana de Netter**, Ed. Artmed, Porto Alegre. 2003 237p.

HEARSE, D.J. Myocardial ischaemia: can we agree on a definition for the 21st century? **Cardiovascular Research** 1994 28(12):1737–1744.

HEIDEN, M.G.V.; CHANDEL, N.S.; LI, X.X; SCHUMACKER, P.T.; COLOMBINI, M. & THOMPSON, C.B.. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2000; 97(9): 4666–4671.

HEINKE, M.Y.; WHEELER, C.H.; CHANG, D.; *et al*. Protein changes observed in pacinginduced heart failure using two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**. 1998; 19:2021–2030.

HERRON T.J.; KORTE, F.S.; & MCDONALD, K.S.. Loaded shortening and power output in cardiac myocytes are dependent on myosin heavy chain isoform expression. **American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology**. 2001; 281: H1217–H1222.

HESCHELER, J.; FLEISCHMANN, B.K.; LENTINI, S.; MALTSEV, V.A.; ROHWEDDEL, J.; WOBUS, A.M. & ADDICKS, K. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. **Cardiovascular Research** 1997; 36:149–162.

HINKEN, A.C.; KORTE, F.S. & McDONALD, K.S.. Porcine cardiac myocyte power output is increased after chronic exercise training. **Journal of Applied Physiology**. 2006; 101: 40–46.

HOH, J.F.Y.; MCGRATH, P.A.; HALE, P.T.. Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin. Effects of hypophysectomy and tyrosine replacement. **Journal of Molecular Cell Cardiology** . 1978; 10:1053-58

HON, S.; DAVID, I.P.; WILSON, B.; HEIKINHEIMO, M.; TANG, Z.; TING, C.; SIMON, M.S.; LEIDEN, J.M.; & PARMACEKI, M.S.. The GATA-4 Transcription Factor Transactivates the Cardiac Muscle-Specific Troponin C Promoter-Enhancer in Nonmuscle Cells **Molecular and Cellular Biology**.1994; 14: 7517-7526

HUXLEY, A. F. & SIMMONS, R. M.. Proposed Mechanism of Force Generation in Striated Muscle **Nature** 1971; 233, 533–538.

IEMITSU, M., MIYAUCHI, T., MAEDA, S., SAKAI, S., KOBAYASHI, T., FUJII, N., MIYAZAKI, H., MATSUDA, M., and YAMAGUCHI, I.. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 2001; 281: R2029–R2036.

IEMITSU, M.; MIYAUCHI, T.; MAEDA, S.; TANABE, T.; TAKANASHI, M.; MATSUDA, M.; & YAMAGUCHI, I.. Exercise training improves cardiac function-related gene levels through thyroid hormone receptor signaling in aged rats. **American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology**. 2004; 286: H1696–H1705.

IZUMO, S. & MAHDAVI, V. Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription **Nature** 1988; 334, 539 - 542.

JAFFE, A. S., BABUIN L. & APPLE, F. S., Biomarkers in Acute Cardiac Disease The Present and the Future **Journal of the American College of Cardiology** .2006; 48(1) 1-11.

JOUMAA, W.H. & LEOTY, C.A comparative analysis of the effects of exercise training on contractile responses in fast- and slow-twitch rat skeletal muscles. **Journal of Comparative Physiology. B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology** 2002; 172: 329–338.

KAUSHAL, S.; SCHNEIDER, J. W.; NADAL-GINARD, B. & MAHDAVI, V. Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. **Science**. 1994; 266, 1236–1240.

KIM, T.; JOOYOUNG, J.; MATTHEW, R.M.; SEOGYOUNG K. & YOUNGSOOK L.. Jumonji represses α -cardiac myosin heavy chain expression via inhibiting MEF2 activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2005; 329, 544-553.

KLUG, M.G.; SOONPAA, M.H.; KOH, G.Y. & FIELD, L.J.. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. **Journal of Clinical Investigation**. 1996; 98:216–224.

KRENZ, M.; SANBE, A.; BOUYER-DALLOZ, F.; GULICK, J.; KLEVITSKY, R.; HEWETT, T.E.; OSINSKA, H.E.; LORENZ, J.N.; BROSSEAU, C.; FREDERICO, A.; ALPERT, N.R.; WARSHAW, D.M.; PERRYMAN, M.B.; HELMKE, S.M.; & ROBBINS, J.. Analysis of Myosin Heavy Chain Functionality in the Heart . **The Journal of Biological Chemistry** 2003; 278(19) 17466–17474.

KUO, C.T.; MORRISEY, E.E.; ANANDAPPA, R.; SIGRIST, K.L.U.; PARMACEK, M.M.; SOUDAIS, M.S. & LEIDEN, C.. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. **Genes & Development**. 1997; 11:1048–1060.

LAM, L.; LIND, J. & SEMSARIAN, C.. Application of proteomics in cardiovascular medicine. **International Journal of Cardiology** 2006; 108 12 – 19

LANCHA JUNIOR, A. H. Resistência ao esforço físico: efeito da suplementação nutricional de carnitina, aspartato e asparagina. São Paulo, 1991.**Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

LAUGHLIN, M. H. Cardiovascular Response to Exercise. **American Journal of Physiology**. 1999; 277 (Advanced in physiology education 22): S244–S259.

LEE, Y.J.; HAN, Y.; LU, H.T. *et al*. TGF-beta suppresses IFN-gamma induction of class II MHC gene expression by inhibiting class II transactivator messenger RNA expression. **The Journal of Immunology**. 1997;158(5): 2065-2075.

LI X.P.; PLEISSNER, K.P.; SCHELER, C.; REGITZ-ZAGROSEK, V.; SALNIKOW, J.; JUNGBLUT, P.R.. A two-dimensional electrophoresis database of rat heart proteins. **Electrophoresis**. 1999;20:891– 897.

LIN, Q.; SCHWARZ, J.; BUCANA C. & OLSON, E.N. Control of Mouse Cardiac Morphogenesis and Myogenesis by Transcription Factor MEF2C **Science** 1997; 1404-1407.

LINASK, K.K. Regulation of heart morphology: current molecular and cellular perspectives on the coordinated emergence of cardiac form and function. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**. 2003 69(1): 14-24.

LINDSEY, M.L.; GOSHORN, D.K.; COMTE-WALTERS, S.; HENDRICK, J.W.; HAPKE, E.; ZILE, M.R.; SCHEY, K.. A multidimensional proteomic approach to identify hypertrophy-associated proteins **Proteomics**. 2006; 6(7): 2225 –2235.

LIU, X. & POLLACK, G.H.. Stepwise Sliding of Single Actin and Myosin Filaments. **Biophysical Journal**. 2004;86:353–358.

LOWEY, S.. The Structure of Vertebrate Muscle Myosin In: ENGEL, A.G. & FRANZINNI-ARMSTRONG, C. (org) **Myology**. 2ª Edição v.1 Ed McGraw-Hill, 1994. USA. 1315p

LUO, J.; MCMULLEN, J.R.; SOBKIW, C.L.; ZHANG, L.; DORFMAN, A.L.; SHERWOOD, M.C.M.; LOGSDON, N.; HORNER, J.W.; DePinho, R.A.; IZUMO, S. & CANTLEY, L.C.. Class IA Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Heart Size and Physiological Cardiac Hypertrophy. **Molecular and Cellular Biology**. 2005; 25(21): 9491–9502.

LUPU, F.; TERWILLIGER, J.D.; LEE, K.; SEGRE, G.V.; EFSTRATIADIS, A.. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. **Developmental Biology**. 2001;229:141–162.

LYONS, G.E.; SCHIAFLINO, S.; SASSOON D.; BARTON, P. & BUCKINGHAM, M.. Developmental Regulation of Myosin Gene Expression in Mouse Cardiac Muscle **The Journal of Cell Biology**. 1997; 111, 2427 -2436.

MARGOSSIAN, S. S. & LOWEY, S. Substructure of the myosin molecule : IV. Interactions of myosin and its subfragments with adenosine triphosphate and F-actin. **Journal of Molecular Biology** 1973; 74, 313–330.

MARINI, M.; LAPALOMBELLA, R.; MARGONATO, V., Ronchi, R.; Samaja, M.; Scapin, C.; Gorza, L.; Maraldi, T.; Carinci, T.; Ventura, C. & Veicsteinas, A.. Mild exercise training, cardioprotection and stress genes profile **European Journal of Applied Physiology**. 2007: 99:503–510.

McFADDEN, D.G.; CHARITE, J.; RICHARDSON, J.A.; SRIVASTAVA, D.; Firulli, A.B. & OLSON, E.N.. A GATA-dependent right ventricular enhancer controls dHAND transcription in the developing heart **Development** 2000; 127, 5331–5341.

McGREGOR, E. & DUNN, M.J.. Proteomics of the Heart: Unraveling **Disease Circulation Research**. 2006;98:309-321

MEDEIROS, A., OLIVEIRA, E.M., GIANOLLA, R. *et al*. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2004; 37(12),1909-1917.

MELONI, V.H.M. Prováveis mecanismos da hiperplasia muscular. **Revista Brasileira de cinesiologia e desenvolvimento humano**. 2005;7(1):60-64.

MIYATA, S.; MINOBE, W.; BRISTOW, MR; & LEINWAND, L.A.. Myosin Heavy Chain Isoform Expression in the Failing and Nonfailing Human Heart. **Circulation Research**. 2000;86:386-390.

MOLKENTIN, J.D.; KALVAKOLANU, D.V. & MARKHAM, B.E.. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the α -myosin heavy-chain gene. **Molecular and Cellular Biology** 1994;14:4947-4957.

_____ ; JOBE, S.M. & MARKHAM, B.E. Alpha-myosin heavy chain gene regulation: delineation and characterization of the cardiac muscle-specific enhancer and muscle-specific promoter **Journal of Molecular Cell Cardiology** 1996; 28, 1211–1225

_____ ; LIN, Q. ; DUNCAN, S.A. & OLSON, E.N.. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. **Genes & Development**. 1997; 11:1061–1072.

_____ ; The Zinc Finger-containing Transcription Factors GATA-4, -5, and -6. ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression **The Journal of Biological Chemistry** 2000; 275, 38949–38952.

MONZEN, K.; SHIOJIMA, I.; HIROI, Y.; KUDOH, S.; OKA, T.; TAKIMOTO, E.; HAYASHI, D.; HOSODA, T.; HABARA-OHKUBO, A.; NAKAOKA, T.; FUJITA, T.; YAZAKI, Y. & KOMURO, I.. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. **Molecular Cell Biology**. 1999;19:7096–7105..

MOORE, R.L. et al. Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. **American Journal of Physiology**.1993; 264: C1180 – C1189.

NATALI, A. J., WILSON, L.A., TURNER, M. D. L., HARRISON, S. M. & WHITE, E. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. **Journal of Physiology**. 2002;v541;863-875, 2002.

_____. Efeitos do exercício crônico sobre os miócitos cardíacos: Uma revisão das adaptações mecânicas. **Revista Brasileira Ciência e Movimento**. 2004; 12(1):92-98.

NELSON, D.L. & COX, M.M. **Lehninger : Princípios de bioquímica**. Ed. Savier, 3º ed. São Paulo, 2002. p. 515-562.

NIEMAN, D.C. Exercício e Saúde. Ed. Manole. São Paulo, 1999.

NORMAN, A.R.; BROSSEAU, C.; FEDERICO, A.; KRENZ, M.; ROBBINS, J. & WARSHAW, D.M. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. **American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology**. 2002; 283: H1446–H1454.

O'DONNELL, C.J. Cardiovascular genomics: recent progress, current challenges, future promise **Genome Biology**. 2000, 1(1):reports 409.1–409.3

OCAMPO, J. M. & GUTIERREZ, J. Envejecimiento del sistema cardiovascular. **Revista Colombiana de Cardiología**. 2005;12(2):53-63.

OLIVEIRA, E.M. & KRIEGER, J.E.. Hipertrofia cardíaca e treinamento físico Aspectos moleculares **Hipertensão**. 2002; 5(2):73-78.

PIEC, I.; ALLIOT, A.L.J.; CHAMBON, C.; TAYLOR, R.G, & BECHET. D.. Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. **The FASEB Journal**. 2005;19:1143-1145.

PIKKARAINEN, S.; TOKOLA, H.; KERKELA, R. & RUSKOAHO, H. GATA transcription factors in the developing and adult heart **Cardiovascular Research** 2004; 63 (2): 196–207.

PLUIM, B.M.; ZWINDERMAN, A.H.; VAN DER LAARSE, A.; VAN DER WALL E. E.; The Athlete's Heart A Meta-Analysis of Cardiac Structure and Function **Circulation**.1999;100:336-344.

PORTIER, H., F.; LOUISY, D.; LAUDE, M.; BERTHELOT, G. & GUEZENNEC, C. Y.. Intense endurance training on heart rate and blood pressure variability in runners. **Medicine Science Sports Exercise**. 2001; 33(7) 1120–1125.

POWERS, S.K.; LENNON, S.L.; QUINDRY, J.; MEHTA, J.L.; REISER, P.J.; PORTMAN, M.A.; NING, X.H.; & SCHOMISCH-MORAVEC, C.. Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. **American Journal of Physiology-Heart Circulation Physiology** 2001; 280: H1814–H1820.

POWERS, S.R.; HOWLEY, E.T.. Miocárdio. In: **Fisiologia do Exercício: Teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. Ed. Manole, 2000. p. 153-154. São Paulo, SP

PRADA, F.J.A.; VOLTARELLI, F.A.; OLIVEIRA, C.A.M.; GOBATTO, C.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R.. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. 2004;12(2): 29-34.

PRENTICE, H. & WEBSTER, K.. A.Genomic and Proteomic Profiles of Heart Disease. **Trends in Cardiovascular Medicine**. 2004;14:282–288.

RAVI KIRAN, T.; SUBRAMANYAN, M. V. & ASHA, D. S. Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part B: Biochemistry & Molecular Biology**. 2004; 137(2):187-96

_____ ; SUBRAMANYAN, M. V.; PRATHIMA, S. & ASHA, D. S. Blood lipid profile and myocardial superoxide dismutase in swim-trained young and middle-aged rats: comparison between left and right ventricular adaptations to oxidative stress. **Journal of Comparative Physiology. B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology**. 2006;176(8):749-62.

REID, M.B.. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. **Journal Applied Physiology**. 2001; 90:724–731.

ROBBINS, J.; GULICK, J.; SANCHEZ, A.; HOWLES, P. & DOETSCHMAN, T. Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**. 1990; 265:11905–11909.

ROBERGS, R.A. & ROBERTS, S.O. **Exercise physiology: exercise, performance and clinical applications**. Ed. McGraw-Hill, Boston, USA. 1997. 840p.

RODRIGUES, T. M. A. **Caracterização das funções do gene ring finger 4 na embriogênese cardíaca**. Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. 2006.

ROFFE C. Ageing of the heart. **British Journal of Biomedical Science**, 1998; 55:136-148.

RUPPE, K.M.L. & SPUDICH, J.A. STRUCTURE-FUNCTION ANALYSIS OF THE MOTOR DOMAIN OF MYOSIN. **Annual Review of Cell Developmental Biology** 1996. 12:543–73

SÁNCHEZ, I.R.. Un viaje a través de la historia: el tren de las Olimpiadas Campo abierto. **Revista de educación**, 1994; 11: 251-278. Disponível em: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo>. acessado em junho de 2007.

SATORI, S.; PIEROBON-BORMIOLI, S.; SCHIAFFINO, S.. Immunohistochemical evidence for myosin polymorphism in the chicken heart. **Nature** 1978 274: 82-90.

SCHEINOWITZ, M.; KESSLER-ICEKSON, G.; FREIMANN, S.; ZIMMERMANN, R.; SCHAPER, W.; GOLOMB, E.; SAVION, N. & ELDAR, M.. Short- and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression **Growth Hormone & Insulin GF Research**. 2003; 13: 19–25.

SCHEUER, J.; MALHOTRA, A.; HIRSCH, C.; CAPASSO, J. & SCHAIBLE, T.F.. Physiologic Cardiac Hypertrophy Corrects Contractile Protein Abnormalities Associated with Pathologic Hypertrophy in Rats **Journal Clinical Investigation**. 1982; 70:1300-1305.

SCHIAFFINO, S.; GORZA, L.; SAGGIN, L.; VALFRE, C.; & SARTORE, S.. Myosin changes in hypertrophied human atrial and ventricular myocardium. A correlated immunofluorescence and quantitative immunochemical study on serial cryosections. **European Heart Journal** 1984; *J* 75: 95–102.

_____ & REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. **Physiological Reviews**, 1996; 76: 371– 423.

SELLERS, J.R. Myosins: a diverse superfamily. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2000;1496: 3-22.

SEMIR, S.A.; KLEIN, T.J.; HOUWELING, A.C.; RUIJTER, J.M.; BUFFING, A.A.M.; MOORMAN, A.F.M. & VAN DEN HOFF, M.J.B. Atrial and Ventricular Myosin Heavy-chain Expression in the Developing Chicken Heart: Strengths and Limitations of Non-radioactive In Situ Hybridization. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. 2006; 54(6): 649– 664.

SHISHKIN, S.S.; KOVALYOV, L.I. & KOVALYOVA, M.A. Proteomic studies of human and other vertebrate muscle proteins. **Biochemistry** (Moscow) 2004; 69 (11) 1283-1298, translated from *Biokhimiya*, 69 (11) 1574-1591.

SHORT, K.R.; VITTONI, J.L.; BIGELOW, M.L.; PROCTOR, D.N.; COENEN-SCHIMKE, J.M.; RYS, P. & NAIR, K.S. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein expression in human skeletal muscle with age and endurance exercise training. **J Appl Physiol**. 2005; 99 95 -102.

SORICHTER, S.; MAIR, J.; KOLLER, A.; GEBERT, W.; RAMA, D. *et al*. Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage. **Journal Applied Physiology**. 1997; 83(4): 1076–1082.

SPUDICH, J.H. & WATT, S.. The Regulation of Rabbit Skeletal Muscle Contraction histochemical, studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. **The Journal of Biological Chemistry**. 1971;246(15): 4866- 4871.

STELZER, J.E.; BRICKSON, S.L.; LOCHER, M.R. & MOSS, R.L.. Role of myosin heavy chain composition in the stretch activation response of rat myocardium **The Journal of Physiology** 2007; 579 (1) 161–173

STROM, C.C.; APLIN, M.; PLOUG, T.. *et al*.. Expression profiling reveals differences in metabolic gene expression between exercise-induced cardiac effects and maladaptive cardiac hypertrophy. **FEBS J**. 2005; 272(11):2684– 2695.

SWEENEY, L.J.; ZAK, R. & MANASEK, F.J. Transitions in Cardiac Isomyosin Expression During Differentiation of the Embryonic Chick Heart. **Circulation Research** 1987; 61:287-295,

TERMAN, A. & BRUNK, U.T. The Aging Myocardium: Roles of Mitochondrial Damage and Lysosomal Degradation. **Heart, Lung and Circulation**. 2005; 14(2):107-114.

TRINICK J.. Elastic filaments and gigants proteins in muscle. **Current Opinion Cell Biology**. 1991;3:112-119.

TSKHOVREBOVA, L.; TRINICK, .; SLEEP, J.A. & SIMMONS, R.M.. Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. **Nature**. 1997; 387:308-312,

VANDER, A.J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.S.; KRAEMER, Alcyr (Trad.). **Fisiologia humana: Os mecanismos da função de órgãos e sistemas**. Ed. McGraw-Hill do Brasil, São Paulo: 1981. 834 p.

VIVANCO, F.; LÓPEZ-BESCÓS, L.; TUÑÓN, J. & EGIDOE, J. Proteomics and Cardiovascular Disease. **Revista Espanhola de Cardiologia** 2003; 56(3):289-302.

VOET, D.; VOET, J.G. & PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2000. p. 492-528.

VONDRISKA, T.M.; KLEIN, J.B.; PING, P.. Use of functional proteomics to investigate PKC epsilon-mediated cardioprotection: the signaling module hypothesis. **American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology**. 2001;280: H1434–H1441.

WAARD, M.C.J.; VAN DER VELDEN, V.B.; BIESMANS, S.O.; BOONTJE, L.; NICKY, M.D.H.W. *et al.* Early Exercise Training Normalizes Myofilament Function and Attenuates Left Ventricular Pump Dysfunction in Mice With a Large Myocardial Infarction **Circulation Research**. 2007;100:1079-1088.

WEEKES, J.; WHEELER, C.H.; YAN, J.X.; *et al.* Bovine dilated cardiomyopathy: proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. **Electrophoresis**. 1999; 20:898–90.

WEINECK, J.. **Biologia do Esporte**. 7º edição. Ed Manole. São Paulo-SP, 2005.

WEISS, A. and LEINWAND, L. A. The Mammalian Myosin Heavy Chain Gene Family **Annual Review of Cell Developmental Biology** 1996; 12:417–39

WEISS, A.; SCHIAFFINO, S.; & LEINWAND, L. A. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity **Journal of Molecular Biology**. 1999; 290, 61–75

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice. A guide to methods and applications of DNA and Protein Separation.** Third edition Ed Wiley-VCH, Weinheim Federal Republic of Germany, 2001

WESTFALL, M.V.; PASYK, K.A.; YULE, D.I.; SAMUELSON, L.C. & METZGER, J.M.. Ultrastructure and cell-cell coupling of cardiac myocytes differentiating in embryonic stem cell cultures. **Cell Motility and the Cytoskeleton.** 1997; 36:43–54.

WHITE, M.Y.; CORDWELL, S.J.; MCCARRON, H.C.; PRASAN, A.M.; CRAFT G.; HAMBLY, B.D. & JEREMY, R.W.. Proteomics of ischemia/reperfusion injury in rabbit myocardium reveals alterations to proteins of essential functional systems. **Proteomics.** 2005;5(5):1395-410.

WIDMAIER, E.P.; HERSHEL, R. & STRANG, K.T. **Vander, Sherman and Luciano's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function** 9th ed Ed McGraw-Hill New York, 2003

WOBUS, A.M. Potential of embryonic stem cells. **Molecular Aspects of Medicine.** 2001; 22:149–164.

YELLON, D.M. & DOWNEY, J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. **Physiology Review.** 2003; 83(4):1113–1151.

YOUNGSOOK, L.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. & IZUMO, S. Myocyte-Specific Enhancer Factor 2 and Thyroid Hormone Receptor Associate and Synergistically Activate the α -Cardiac Myosin Heavy-Chain Gene. **Molecular and Cellular Biology.** 1997; 17(5), 2745–2755

VERZOLA, R.M.M.; MESQUITA, R.A.; PEVIANI, S.; RAMOS, O.H.P.; MORISCOT, A.S.; PEREZ, S.A.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.. Early Remodeling of Rat Cardiac Muscle Induced by Swimming Training. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 2006; 39:621-627.

ZOPPI, C.C.. Mecanismos moleculares sinalizadores da adaptação ao treinamento físico. **Revista Saúde.com** (Revista Digital). 2005;1(1) 60-70.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)