



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

ANDRÉ ACCIOLY NOGUEIRA MACHADO

PROTEÍNAS MARCADORAS DO EXERCÍCIO FÍSICO
AERÓBIO EM TECIDO MUSCULAR DE RATOS TREINADOS
EM DIFERENTES INTENSIDADES

FORTALEZA – CE

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ANDRÉ ACCIOLY NOGUEIRA MACHADO

PROTEÍNAS MARCADORAS DO EXERCÍCIO FÍSICO
AERÓBIO EM TECIDO MUSCULAR DE RATOS
TREINADOS EM DIFERENTES INTENSIDADES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Marilande Ceccatto

FORTALEZA – CE
2009

ANDRÉ ACCIOLY NOGUEIRA MACHADO

PROTEÍNAS MARCADORAS DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO EM
TECIDO MUSCULAR DE RATOS TREINADOS EM DIFERENTES
INTENSIDADES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Aprovada em 28 de maio de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Vânia Marilande Ceccatto (Orientadora)
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr^o Danilo Lopes Ferreira Lima
Universidade de Fortaleza

Prof^a. Dr^o. José Henrique Leal Cardoso
Universidade Estadual do Ceará

Dedico esse trabalho a minha família, meu
chão, e meu céu...

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Vânia Marilande Ceccatto, pela grande paciência, pelos ensinamentos e pelo incentivo;

Aos professores do Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, em especial aos professores José Henrique Leal Cardoso, Aline Alice Cavalcante de Albuquerque, Bruno Andrade Cardi, Cláudia Ferreira Santos, Roseli Barbosa e Sandra Maria Dias Moraes, por todo o apoio;

À professora Maria Goretti Rodrigues de Queiroz, sempre disposta a ajudar;

A todos os professores que tive nessa longa jornada, pela contribuição na minha formação acadêmica e pessoal;

À CAPES pelo apoio financeiro;

À minha mãe, minha eterna professora;

Ao meu pai, grande amigo de todos os momentos;

Aos meus irmãos, Daniel, Pedro e Karlla, obrigado por tudo;

À Paola e Mello, pelo apoio e ajuda de sempre;

Ao grande amigo Alex Ferraz, por estar sempre presente, na alegria e na tristeza;

Aos amigos de laboratório que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho, Beth, Fleury, Patrick, Jamile, Jarde, Howard, João Paulo e Rogério;

Aos amigos que fiz no ISCB, Dienniffer, Felipe, Diana, Joca, Luís, Walber, Kerly, Liza, Paula, Pedro, entre tantos outros;

Aos meus colegas de turma pelo apoio e pelo prazeroso convívio durante o curso;

Aos meus amigos e amigas que há dois anos me ajudaram a começar e, agora, a terminar o curso de mestrado;

Aos meus alunos pelo convívio e aprendizado a cada dia;

Aos colegas de trabalho e de profissão, pelo esforço em contribuir para a formação de nossos alunos;

A todos os funcionários do ISCB, que fazem seu trabalho e assim nos dão condições de fazer o nosso.

RESUMO

Há alguns anos a prática de exercícios físicos vem sendo utilizada como uma ferramenta tanto na promoção da saúde quanto na busca por um melhor desempenho esportivo. O tecido muscular, o qual está diretamente envolvido com a prática de exercícios, é um tecido dinâmico, com alta capacidade adaptativa, cujas células passam por uma constante remodelação em resposta a diferentes demandas funcionais. Esse processo adaptativo está diretamente ligado à ativação da transcrição específica de genes, desencadeando alterações estruturais e funcionais. Desta forma, busca-se neste trabalho, caracterizar o exercício físico aeróbio induzido em diferentes intensidades, pela identificação de possíveis proteínas marcadoras em tecido muscular esquelético, juntamente com a análise dos padrões morfológicos da fibra muscular esquelética e cardíaca. Dezoito ratos *Wistar* machos foram divididos em três grupos e submetidos a um programa de treinamento físico em esteira adaptada, por 12 semanas, em diferentes intensidades. Após o treinamento os animais foram sacrificados para posterior análise histológica do tecido muscular esquelético e cardíaco e análise proteômica do tecido muscular esquelético. Os animais dos três grupos experimentais tiveram um desenvolvimento normal em relação ao peso corporal. O protocolo de treinamento de baixa intensidade se mostrou mais eficiente em provocar adaptações fisiológicas favoráveis à prática de exercícios, comprovado pela hipertrofia nas fibras musculares esqueléticas e cardíacas, bem como uma maior rede vascular cardíaca. A partir do protocolo de identificação proteica utilizado foram identificadas nove proteínas, dentre elas temos proteínas enzimáticas, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, aldolase e anidrase carbônica, e proteínas estruturais, como a actina e a troponina I. As outras proteínas identificadas em nosso estudo foram isoformas de miosina de cadeia leve (MLC1s, MLC1f, MLC2f e MLC3f), demonstrando uma variação significativa entre essas diferentes isoformas. Os resultados obtidos sugerem que exercícios de baixa intensidade apresentam uma maior habilidade em gerar os ajustes fisiológicos causados pelo treinamento aeróbio e que estudos quantitativos poderiam caracterizar as proteínas identificadas como possíveis marcadores para o estudo da adaptação do músculo esquelético.

Palavras-chave: Proteômica, exercício físico, músculo esquelético.

ABSTRACT

Years ago physical exercise has been used both as a tool in promoting health and in search for a better performance. Muscle tissue, which is directly involved with exercise, is a dynamic tissue, with high adaptive capacity, whose cells pass through a constant remodeling in response to different functional demands. This adaptive process is related to transcription of specific genes, unleashing structural and functional changes. Thus, this work purpose characterizes aerobic induced exercise at different intensities by the identification of proteins potential markers in skeletal muscle tissue, together with the analysis of skeletal and cardiac muscle fiber morphological patterns. Eighteen male Wistar rats were divided into three groups and submitted to an exercise training program on treadmill for 12 weeks, in different intensities. After training the animals were sacrificed for further histological analysis of skeletal and cardiac muscle and proteomic analysis of skeletal muscle. The animals of all experimental groups had a normal development in relation to body weight. The low-intensity training protocol was more effective in provoke favorable physiological adaptations, evidenced by the hypertrophy in cardiac and skeletal muscle fibers and greater cardiac vascular system. The protocol used for protein identification identified nine proteins, including enzymatic proteins such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, aldolase and carbonic anhydrase, and structural proteins such as actin and troponin I. Other proteins identified in our study were the myosin light chain isoforms (MLC1s, MLC1f, MLC2f and MLC3f), showing a significant variation between these different isoforms. The results suggest that low-intensity exercises have a greater ability to generate the physiological adjustments caused by aerobic training and quantitative studies could characterize the identified proteins as possible markers for the study of adaptation of skeletal muscle.

Keywords: Proteomic, physical exercise, skeletal muscle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem ilustrativa da esteira ergométrica adaptada utilizada para o treinamento dos animais.	38
Figura 2 – Imagem detalhada das raia adaptadas na esteira ergométrica utilizada para o treinamento dos animais	38
Figura 3 – Ganho de peso corporal dos animais ao longo do tratamento (n =6 por grupo experimental).....	50
Figura 4 – Nível de desempenho no teste de esforço máximo antes, durante e após o treinamento físico. (n =6 por grupo experimental).	51
Figura 5 – Diâmetro transversal médio da fibra muscular esquelética (n=1800 por grupo experimental). * exercício baixa intensidade > exercício alta intensidade, sedentário (p<0,05)	52
Figura 6 – Diâmetro transversal médio da fibra muscular cardíaca (n=1800 por grupo experimental). * exercício baixa intensidade > exercício de alta intensidade, sedentário (p<0,001).	53
Figura 7 – Diâmetro transversal médio do capilar do miocárdio (n=1350 por grupo experimental). * exercício baixa intensidade, exercício de alta Intensidade < sedentário (p<0,001)	54
Figura 8 – Quantificação de capilares do miocárdio. (n = 3 animais por grupo experimental) * exercício baixa intensidade > exercício alta intensidade (p<0,05), sedentário (p<0,001).	55
Figura 9 – Gel de eletroforese de duas dimensões (2-D), de extrato de músculo gastrocnêmio. <i>Strip</i> de focalização de 7 cm, faixa de pl de 3 - 10. Gel corado com <i>Coomassie Brilliant Blue</i> . Imagem digitalizada no <i>software ImageMaster™ 2D Platinum 6.01 – GE Helthcare</i>	56
Figura 10 – A-Imagem de uma pequena área do gel bidimensional onde estão destacadas as isoformas de miosinas identificadas. B-Imagem obtida através da ferramenta 3D do <i>software ImageMaster Platinum 2D</i> (s-slow; f-fast).....	59
Figura 11 – Distribuição das isoformas de miosinas de cadeia leve (s-slow; f-fast) em músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela – 1 Protocolo de treinamento físico utilizado na esteira ergométrica adaptada.....	39
Tabela 2 – Velocidades médias (m\min) atingidas pelos animais dos grupos experimentais, no início, na 6 ^a semana e ao final do treinamento	52
Tabela – 3 <i>Spots</i> protéicos identificados por espectrometria de massa (LC-MS/MS), suas respectivas sequências polipeptídicas e coberturas peptídicas.....	57
Tabela – 4 <i>Spots</i> protéicos identificados por espectrometria de massa (LC-MS/MS) e seus respectivos dados de identificação.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura	Nome
2DE	Eletroforese Bidimensional
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poiacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
IEF	Focalização isoeétrica
ATP	Adenosina trifosfato
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATPase	Adenosina trifosfatase
Ca ²⁺	Íon cálcio
kDa	Quilodáton
pI	Ponto isoeétrico
P _i	Fosfato inorgânico
O ₂	Gás oxigênio
CO ₂	Gás carbônico
2D	Bidimensional
GST P1-1	Glutathiona-S-transferase p
ECH	Enoil-CoA-hidratase
GAPDH	Gliceraldeido-3-fosfatodesidrogenase
LDH	Lactato desidrogenase
PGA	Fosfoglicerato mutase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NUGM	NADH-ubiquinona oxidoreductase
VO ₂	Consumo de oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico
m/min	Metros por minuto
g	Gramas
mg/Kg	Miligramas por quilogramas
C	Célsius
HE	Hematoxilina e Eosina
µm	Micrômetros
µm ²	Micrômetros quadrados
N ₂	Gás nitrogênio
mg	Miligrama
M	Molar
DTT	Ditiotreitol
rpm	Rotações por minuto
µg	Micrograma
mg	Miligrama
cm	Centímetro
µl	Microlitro
mg/mL	Miligramas por mililitro
mL	Mililitro
mA	Miliampere

v/v	Volume/volume
m/v	Massa/volume
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
mM	Milimolar
LC - MS/MS	Espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida
3D	Três dimensões
VO ₂ Máx	Consumo máximo de oxigênio
HSP 70	Proteínas de Choque Térmico 70
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
CA III	Anidrase carbônica 3
TnI	Troponina I
TnC	Troponina C
TnT	Troponin T
MLC1s	Cadeia leve de miosina 1 lenta
MLC1f	Cadeia leve de miosina 1 rápida
MLC2f	Cadeia leve de miosina 2 rápida
MLC3f	Cadeia leve de miosina 3 rápida
MHC	Cadeia pesada de miosina
MLC	Cadeia leve de miosina
ELC	Cadeia leve essencial
RLC	Cadeia leve regulatória
MHC1	Cadeia pesada de miosina tipo 1
MLC2s	Cadeia leve de miosina 2 lenta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Aspectos moleculares relacionados ao exercício físico	19
2.2	O músculo esquelético e sua composição protéica	23
2.3	Proteínas marcadoras e estudos proteômicos	27
3	OBJETIVOS	31
3.1	Geral	32
3.2	Específicos	32
4	JUSTIFICATIVA	33
5	MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1	Delineamento experimental	37
5.1.1	Materiais biológicos	37
5.1.2	Grupos experimentais	37
5.1.3	Treinamento físico	38
5.1.4	Sacrifício dos animais	40
5.1.5	Laboratórios	40
5.2	Análise histológica	41
5.2.1	Processamento das amostras de tecido	41
5.2.2	Processo de desidratação das amostras de tecido	41
5.2.3	Coloração das lâminas	42
5.2.4	Montagem das lâminas	42
5.2.5	Metodologia de análise das lâminas	43
5.3	Análise proteômica	44
5.3.1	Processamento das amostras de tecido	44
5.3.2	Eletroforese bidimensional	44
5.3.3	Cálculo de massa molecular e ponto isoelétrico de bandas e spots	46
5.3.4	Digestão dos spots proteicos	46
5.3.5	Análise e identificação dos <i>spots</i> protéicos por espectrometria de massa (LC-MS/MS)	47
5.3.6	Análise dos géis de proteômica	48
5.4	Tratamento estatístico	48

6	RESULTADOS	49
6.1	Peso corporal e teste de esforço dos animais.....	50
6.2	Análise histológica.....	52
6.3	Análise proteômica.....	55
7	DISCUSSÃO	61
7.1	Peso corporal e teste de esforço dos animais.....	62
7.2	Análise histológica.....	63
7.3	Análise proteômica.....	67
7.3.1	Identificação por espectrometria de massa.....	67
7.3.2	Proteínas enzimáticas identificadas	68
7.3.3	Proteínas estruturais identificadas	69
7.3.4	Iso-mioformas de miosinas de cadeia leve identificadas.....	70
8	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	76



Introdução

1 INTRODUÇÃO

Em meio aos grandes avanços no conhecimento na área de Biociências, talvez o que tenha desencadeado o maior impacto no meio científico nos últimos anos foi, sem dúvidas, o Projeto Genoma. Este gerou o conhecimento da sequência completa de todos os genes de diversos organismos, incluindo o genoma humano, contribuindo assim para um melhor estudo dos organismos vivos. Entretanto, essas informações são insuficientes no esclarecimento da real expressão protéica em um determinado tecido sob momentos e condições específicas. A partir desse questionamento foi criado o projeto *Human Proteome Initiative*, que tem por objetivo não só informar as sequências protéicas humanas, mas também a descrição de sua função, domínio estrutural, localização subcelular, semelhanças com outras proteínas, entre outros dados (O'DONOVAN; APWEILER; BAIROCH, 2001).

No contexto desse questionamento, os projetos proteomas, que objetivam investigar o caráter da expressão e função das proteínas, constituíram uma vertente que ficou conhecida como “genômica funcional” (BOWER; CHI, 2005). Percebe-se então, uma intensa correlação entre os estudos proteômicos e genômicos, uma vez que ambas as áreas de estudo de proteínas e genes, investigam a organização celular de forma interativa e complementar (CIERO; BELLATO, 2002).

O termo proteoma refere-se ao conjunto de proteínas presente num compartimento biológico particular, uma célula ou um conjunto de células com uma determinada função, em um tecido bem definido, ou parte dele (por exemplo, proteoma muscular) ou ainda em uma série de proteínas ligadas a uma função particular (por exemplo, as proteínas ligadas à cadeia respiratória) (O'FARRELL, 1978; WILKINS *et al.*, 1997). Entretanto, este termo pode também ser usado em um sentido menos universal, para referir-se ao conjunto de proteínas que está sendo expresso num dado momento da vida da célula (ABBOTT, 1999).

Já o termo proteômica diz respeito ao conjunto de tecnologias, que tem por objetivo separar, quantificar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas (ISFORT *et al.*, 2002). Dentre o conjunto de técnicas empregadas para a separação de espécies macromoleculares, especialmente as proteínas, glicoproteínas e fragmentos de ácidos nucleicos, destaca-se a técnica de

eletroforese em gel de poliacrilamida, a qual tem sido vastamente utilizada durante os últimos sessenta anos.

Atualmente, a união de duas técnicas de eletroforese tem ganho lugar de destaque, constituindo a Eletroforese Bidimensional (2DE), que nada mais é do que a realização de uma separação por massa molecular (SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio) e uma separação por gradiente de pH também em gel de poliacrilamida contendo anfólitos carregados (IEF – Focalização isoeletrica). A 2DE foi utilizada pela primeira vez, para a separação de proteínas, por O’Farrell em 1975 em estudos com células de *Escherichia coli* (BÁRÁNY; BÁRÁNY; GIOMETTI, 1995).

Após décadas de avaliação da expressão e função protéica, utilizando uma grande variedade de técnicas para separar, quantificar, visualizar e identificar proteínas, o campo da proteômica emergiu como uma importante ferramenta para analisar a expressão protéica em conjunto com os processos fisiológicos que possam ser desencadeados. Assim, iniciou-se uma busca pela caracterização do proteoma juntamente com aspectos fisiológicos complementares, permitindo, a partir dessa interação, uma correlação de medidas quantitativas fenotípicas com o genótipo, numa tentativa de definir o nível e a qualidade das interações protéicas e fisiológicas do organismo (WASINGER; CORTHALS, 2002).

Por outro lado, juntamente com o avanço das Ciências Biomédicas, a prática de exercícios físicos foi reconhecido como agente preventivo e atenuante de inúmeros fatores de risco para diversas doenças crônicas não transmissíveis, como: obesidade, diabetes, hipertensão e dislipidemias (CARVALHO *et al.*, 1996; PATE *et al.*, 1995; PITANGA, 2004).

Dados sustentam que a prática de atividade física desencadeia eventos moleculares de superexpressão ou inibição gênica, portanto, protéicas. Deste modo,, estudos relacionados aos mecanismos de expressão gênica tornaram-se fundamentais para o entendimento de como a atividade física atua e interage no organismo, induzindo alterações estruturais e funcionais favoráveis à aquisição e manutenção de bons níveis de saúde. Logo, o estudo desses mecanismos se tornou um recente interesse para o campo da Biologia Molecular e da Fisiologia do exercício.

Neste contexto, a 2DE hoje é considerada uma ferramenta indispensável na análise de proteínas expressas de modo diferencial, sendo única em sua

capacidade de analisar simultaneamente milhares de proteínas, possibilitando dessa forma a visualização de todo o proteoma de uma determinada célula ou tecido em um determinado momento fisiológico (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003). A técnica se torna necessária no estudo de tecidos biológicos que contêm muitas proteínas com pontos isoelétricos ou massas moleculares semelhantes (BÁRÁNY; BÁRÁNY; GIOMETTI, 1995), como no caso específico do tecido muscular.

Diversos eventos podem atuar de forma a agredir o tecido muscular esquelético, sejam eles fisiológicos, como o processo de envelhecimento, ou não fisiológicos, como distrofias e miopatias, que leva a perdas estruturais e funcionais. Por outro lado, a prática de atividades físicas representa um potente estímulo para a adaptação fisiológica, induzindo alterações celulares que resultam em um aumento da funcionalidade tecidual (COFFEY; HAWLEY, 2007; MAHONEY; TARNOPOLSKY, 2005). Todas essas alterações, patológicas ou não, se relacionam com a expressão protéica e acontecem em decorrência de estímulos multifatoriais tais como: atividade física, má-nutrição protéica ou energética, aumento da atividade citoquímica, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e declínio dos motoneurônios- α (ATTAIX *et al.*, 2005). Durante um processo de atrofia muscular, por exemplo, a degradação protéica é maior que sua síntese, esse fato ocasiona uma perda funcional na musculatura, ao passo que em um processo de hipertrofia há ganho estrutural da musculatura e a síntese protéica supera a sua degradação (ISFORT, 2002).

O tecido muscular esquelético é um tecido complexo e capaz de responder a estímulos, tais como o exercício físico, de maneira notável. Uma única sessão de exercícios pode induzir a alterações momentâneas que incluem, por exemplo, um acréscimo na demanda de ATP, o qual é acompanhado pelo aumento na mobilização, transporte e utilização de substratos energéticos. Portanto, o entendimento sobre a ativação da transcrição específica de genes no tecido muscular esquelético durante e após uma única sessão de exercícios, bem como as adaptações produzidas pelo treinamento, têm aumentado com o crescente avanço nas pesquisas.

Embora a resposta transcricional ao exercício não esteja claramente esclarecida, uma única sessão de exercícios pode acarretar um aumento agudo na expressão do RNAm de um grande número de genes (MAHONEY; TARNOPOLSKY, 2005). Acredita-se que as elevações transitórias na quantidade de RNAm, em decorrência da realização de sucessivas sessões dentro de um programa de

treinamento, levam a um aumento, a longo prazo, na quantidade de proteínas, culminando em adaptações fisiológicas favoráveis. Estas adaptações são determinadas por fatores como volume e intensidade do exercício, bem como, frequência de treinamento. Além disso, as características das adaptações são específicas ao tipo de estímulo, no caso, o exercício (COFFEY; HAWLEY, 2007; MAHONEY; TARNOPOLSKY, 2005).

Nas últimas décadas a comunidade científica tem despertado o interesse pelos estudos e aplicações da Biologia Molecular e da Fisiologia para as ciências da atividade física terapêutica e do esporte. Poucos trabalhos no Brasil têm buscado esta perspectiva. A definição e implementação de novas técnicas e protocolos para a produção do treinamento físico em ratos, a análise molecular da expressão gênica, conseqüentemente protéica, bem como a análise morfológica da fibra muscular, podem ser entendidas como o ponto de partida para a busca de subsídios para melhorar nosso entendimento sobre estes processos básicos.

Desta forma busca-se, neste trabalho, caracterizar o exercício físico aeróbico induzido em diferentes intensidades, em ratos, pela identificação de possíveis proteínas marcadoras em conjunto com a análise dos padrões morfológicos da fibra muscular esquelética e cardíaca.

Revisão de literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS MOLECULARES RELACIONADOS AO EXERCÍCIO FÍSICO

Com relação à capacidade de adaptação do músculo esquelético, Spriet (1992) cita que esse é um tecido dinâmico cujas células passam por remodelação em resposta a diferentes demandas funcionais. Fato que provoca modificações em seu fenótipo protéico, conferindo ao mesmo um novo e diferente estado protéico e fisiológico (JEMIOLO; TRAPPE, 2004). Essas demandas diferenciadas podem acontecer, por exemplo, através da prática de exercícios físicos, o qual é entendido como um estímulo que promove estresse físico em diversas estruturas corporais, tendo como um dos resultados, a adaptação do organismo a esse estímulo.

Nos filamentos contráteis do tecido muscular, a prática de exercícios pode gerar a hipertrofia dessas estruturas por estimulação da síntese de proteínas miofibrilares (SPRIET, 1992), porém, para que esses efeitos sejam observados, os estímulos devem vir de exercícios de força e não de exercícios aeróbicos (NADER, 2005). Os efeitos dos exercícios de força sobre o músculo esquelético são mediados pela ativação de cascatas de sinais específicas que aumentam o nível de proteínas do citoesqueleto e, conseqüentemente, a massa muscular e a força de contração.

O estresse gerado pelo exercício induz a transcrição de genes envolvidos no crescimento, vascularização e metabolismo, indicando que as mudanças no padrão transcricional possuem um papel fundamental no remodelamento muscular por desencadear respostas metabólicas e de crescimento (ZAMBON *et al.*, 2003). Estas respostas podem contribuir para o tratamento de estados em que a degradação de proteínas excede a síntese, tais como em condições de exposição à microgravidade, envelhecimento, câncer, diabetes e AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (NADER, 2005).

O novo estado fisiológico do organismo, gerado pela adaptação ao exercício, passa agora a ser analisado pela comunidade científica em nível molecular com ênfase nas mudanças da expressão gênica e na síntese protéica (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003). Diversos estudos nessa área buscaram

identificar as mudanças fenotípicas decorrentes da hipertrofia (GILROY; SALMONS; PENNINGTON, 1997; O'BRIEN *et al.*, 1992).

É consenso entre os fisiologistas do exercício que, apesar das diferenças na forma de classificação, as fibras musculares esqueléticas, baseando-se em diferentes propriedades morfológicas, bioquímicas e, portanto, funcionais, podem ser classificadas essencialmente em fibras rápidas e lentas. É comum para esse tipo de classificação o uso da sensibilidade diferencial da fibra à enzima Miosina ATPase (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003). Além disso, cada tipo de fibra muscular apresenta padrões específicos de funcionamento metabólico. As fibras lentas, Vermelhas ou do Tipo I utilizam predominantemente o metabolismo oxidativo, possuem um maior conteúdo de enzimas oxidativas, maior conteúdo de mioglobina e mitocôndrias, além de uma baixa atividade da miosina ATPase, enquanto as fibras do Tipo II, Brancas ou rápidas, apresentam maior número de enzimas glicolíticas e alta atividade da miosina ATPase (POWERS; HOWLEY, 2000).

A grande diversidade de fenótipos encontrados nas fibras musculares esqueléticas leva a ocorrência de fibras intermediárias, com características que variam entre as fibras Tipo I e Tipo II, que apresentam propriedades tanto de fibras lentas quanto de fibras rápidas. Variações na expressão de genes para as numerosas proteínas e suas isoformas acarretam diferenças nos tipos de fibras, tais variações incluem proteínas ligadas às vias energéticas metabólicas, ligadas ao aparato contrátil e acoplagem excitação-contração. Os fenômenos expressos por uma fibra individual possuem importantes conseqüências com respeito às demandas energéticas e parâmetros funcionais fisiológicos da fibra (TORGAN; DANIELS, 2001).

Pette (1998) afirma que as propriedades adaptativas do músculo esquelético se baseiam tanto na presença de múltiplos genes quanto no processo de *splicing* alternativo dos transcritos, permitindo esse tecido originar múltiplas isoformas protéicas. Devido a esse alto potencial adaptativo, as fibras da musculatura esquelética são capazes de modificar sua estrutura em resposta a um determinado estímulo, que pode ser exemplificado por alterações na sua demanda funcional (BRUTON, 2002). Muitos experimentos comprovam a capacidade do músculo esquelético em adaptar-se ao treinamento físico, através de mudanças qualitativas e quantitativas no suprimento energético, especialmente no que diz

respeito ao aumento na capacidade das vias metabólicas oxidativas (BAR; PETTE, 1998).

Wada *et al.* (2003) analisaram eletroforeticamente, através de biópsias da porção profunda do músculo vasto lateral, as mudanças na expressão protéica de miosinas decorrentes de um programa de exercícios físicos extenuantes realizados durante 10 semanas. Os resultados eletroforéticos deste trabalho apontam que ocorrem mudanças nos perfis de distribuição das isoformas miosínicas mais leves, quando comparadas com as mais pesadas.

Na musculatura adulta os perfis de atividade contrátil possuem um importante papel na regulação do fenótipo muscular, demonstrado na literatura pelos experimentos ligados a alterações neuronais (PETTE; VRBOVA, 1999). As estimulações tônicas de baixa frequência induzem a um fenótipo de fibra lenta, enquanto a estimulação de alta frequência leva a um fenótipo de fibra rápida. Entretanto, a caracterização do caminho pela qual a informação neural/perfil contrátil é traduzida em mudanças na expressão gênica não é conhecida. Um dos caminhos mais estudados relativos a este processo envolve a calcineurina. Quando ativada por Ca^{2+} /calmodulina, a calcineurina defosforila várias proteínas, incluindo a ativação de fatores nucleares de transcrição. A estimulação neural através deste processo é considerada um dos caminhos da decodificação da sinalização no tecido muscular (TIMMERMAN *et al.*, 1996).

Donoghue *et al.* (2005) estudaram as respostas fisiológicas e bioquímicas de fibras musculares esqueléticas rápidas sob condições de estimulação crônica de baixa frequência, caracterizando estímulos aeróbicos. Os autores puderam verificar através de eletroforese em gel bidimensional que dezesseis proteínas tiveram sua expressão alterada. Dentre elas podemos citar a albumina, que teve sua expressão aumentada em 4 vezes, e enzimas glicolíticas, como a enolase e a aldolase, que tiveram uma diminuição na expressão. Junto a isso também foi observado mudanças na expressão de isoformas protéicas relacionadas ao aparato contrátil. Enquanto as isoformas rápidas de miosina de cadeia leve tipo 2 e troponina T tiveram sua expressão diminuída, as isoformas lentas dessas proteínas exibiram um aumento na expressão.

Embora a resposta molecular transcricional ao treinamento físico não seja ainda claramente conhecida, uma sessão isolada de exercícios aeróbicos pode ocasionar um aumento agudo transitório na expressão do RNAm de um grande

número de genes, dentre eles, genes envolvidos na biogênese mitocondrial, no metabolismo oxidativo e nos mecanismos relacionados à defesa antioxidante (MAHONEY *et al.*, 2005). Podemos apenas citar como exemplos, o co-ativador 1 alfa (PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003), fatores nucleares respiratórios (MURAKAMI *et al.*, 1998), glicogênio sintase (PILEGAARD *et al.*, 2000) e outros. Em adição a estes, o exercício também mostra a elevação nos níveis de RNAm relacionados a defesa contra o estresse oxidativo, como exemplo, a manganês superóxido dismutase (HOLLANDER *et al.*, 2001) entre outros genes.

Já uma única sessão de exercícios de força resulta em respostas moleculares agudas que geram hipertrofia por dois mecanismos. O primeiro mecanismo se dá através da ativação de proteínas quinases que atuam no maquinário de síntese protéica aumentando a taxa de expressão, o que gera um acúmulo de proteínas, principalmente proteínas contráteis. Já o segundo mecanismo é explicado pela expressão de fatores de regulação miogênicos, que estão ligados à proliferação, ativação e diferenciação de células satélites musculares, as quais também contribuem para o aumento da área de secção transversa da fibra muscular (BICKEL *et al.*, 2005). As células satélite permanecem presentes dentro do músculo esquelético, até mesmo em idade avançada, retendo seu potencial proliferativo (MARSH *et al.*, 1997). A proliferação de células satélite e sua diferenciação em miócitos maduros capacitam o reparo e a hipertrofia das miofibras existentes, bem como a geração de novas miofibras (SEALE; RUDNICKI, 2000).

Dessa forma, acredita-se que a realização de sucessivas sessões dentro de um programa de treinamento físico causam pulsos de elevação transitória na quantidade de RNAm. Em consequência, a adaptação crônica ao treinamento se dá provavelmente pelo efeito cumulativo de cada sessão, o que gera um aumento, a longo prazo, na quantidade de proteínas, conduzindo a alterações na quantidade de proteínas específicas que culminam em adaptações fisiológicas favoráveis ao tipo de exercício imposto. Estas adaptações são específicas e determinadas pelo tipo de exercício realizado, o qual pode ser caracterizado por fatores como volume e intensidade do exercício, bem como pelo substrato energético utilizado durante sua realização (COFFEY; HAWLEY, 2007; MAHONEY; TARNOPOLSKY, 2005).

2.2. O MÚSCULO ESQUELÉTICO E SUA COMPOSIÇÃO PROTÉICA

O tecido muscular esquelético o qual é formado em sua maior parte por água, cerca de 75% do seu conteúdo, também apresenta em sua composição, um percentual de aproximadamente 20% de proteínas, sendo os demais 5% representados por sais e outras substâncias (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003).

São as proteínas que compõem o tecido muscular as responsáveis por desempenhar as mais diversas funções celulares. Essa capacidade de exercer inúmeras funções ocorre, em parte, devido a uma complexa estrutura tridimensional. Essa complexidade da estrutura protéica é estabelecida em função dos diversos níveis de interação entre a seqüência de aminoácidos que formam cada proteína. Dá-se o nome a essa seqüência de aminoácidos, formados a partir dessas ligações, de cadeia polipeptídica. Já os grupamentos presentes nos diversos aminoácidos que não estão envolvidos nessas ligações, mas que influenciam fortemente as propriedades da proteína em questão são denominados de cadeia lateral.

Tais cadeias laterais conferem diversas características específicas a cada um dos diferentes aminoácidos, podendo atribuir propriedades polares ou apolares e carregá-los negativa ou positivamente. São essas características que originam as interações que irão determinar a estrutura tridimensional das proteínas através de inúmeras ligações fracas não-covalentes, podemos citar as pontes de hidrogênio, ligações iônicas, forças de *Van der Waals* e interações hidrofóbicas (ALBERTS *et al.*, 2004). Essa forma tridimensional adotada tende a uma única conformação estável onde a energia livre é mínima, porém essa conformação pode sofrer leves alterações temporárias no momento da interação da proteína com outras moléculas. As modificações conformacionais é que determinarão a capacidade das proteínas realizarem inúmeros processos dinâmicos da célula, dando origem a suas funções específicas. Dessa forma, devido à grande possibilidade de variações entre essas interações, encontramos proteínas com funções estruturais, metabólicas, de defesa, de contratilidade, entre outras (BOULEY; CHAMBOM; PICARD, 2004).

A proteína mais abundante do aparato contrátil, representando aproximadamente 60-70% do conteúdo protéico total do músculo esquelético é a miosina (ATTAIX *et al.*, 2005). Ela também foi a primeira proteína motora do músculo esquelético a ser identificada, inicialmente apenas nesse tecido, e recebeu a

denominação de miosina II (ALBERTS *et al.*, 2004). Hoh (1975) foi o primeiro pesquisador a identificar essa proteína em sua forma nativa pelo método de Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Posteriormente foram identificadas por 2DE diferentes isoformas das cadeias leves e pesadas da molécula de miosina, exibindo pesos moleculares que variavam entre 16 e 27 kDa., para as cadeias leves, e entre 200 kDa e 204 kDa. para as cadeias pesadas (BÁRÁNY; BÁRÁNY; GIOMETTI, 1995). Shinshkin, Kovalyov e Kovalyova (2004), em sua revisão sobre estudos proteômicos de proteínas musculares, afirmam que as cadeias pesadas de miosina possuem mais de 6 genes, que codificam cerca de 10 isoformas e se organizam em dímeros espiralados, formando o filamento espesso de miosina. Enquanto as cadeias leves de miosina, encontradas nas extremidades das cadeias pesadas, possuem mais de 5 genes codificando cerca de 7 isoformas, subdivididas em cadeias leves Essenciais e Regulatórias.

A actina aparece como a segunda proteína em nível de abundância na formação dos miofilamentos estruturais e contráteis, tendo função determinante na formação do citoesqueleto celular, na contração muscular e em outros processos celulares. Compondo o esqueleto do filamento fino, a actina apresenta-se em forma filamentosa (actina-F) disposta em dupla hélice, onde cada um destes é composto por moléculas globulares de actina-G polimerizadas. Dispostos por todo o seu comprimento existem sítios ativos, que são os locais onde as pontes cruzadas das miosinas interagem com os filamentos de actina. São conhecidos pelo menos 6 isoformas de actina, codificadas por 6 diferentes genes, no músculo esquelético, cardíaco e em outros tecidos (SHINSHKIN; KOVALYOV; KOVALYOVA, 2004). Essa diversidade de isoformas parece estar relacionada a diferentes demandas fisiológicas teciduais, assim conferindo variadas propriedades contráteis tanto em células musculares, quanto em células não-musculares (GUNNING; WEIBERGER; JEFFREY, 1997).

A actina juntamente com a tropomiosina e a troponina formam os filamentos finos, que durante a interação com os filamentos espessos de miosina também são responsáveis pelo processo de contração muscular. No músculo esquelético a tropomiosina é formada por duas subunidades, classificadas em forma α (rápida) e a β (lenta). Após separação em eletroforese SDS-PAGE, foi visto que a forma α apresenta uma isoforma nas fibras de contração rápida e outra isoforma nas

fibras de contração lenta, enquanto a forma β é a mesma entre ambos os tipos de fibra. Todas apresentam um peso molecular de aproximadamente 33 kDa. e pI entre 5.25 e 5.30 (BÁRÁNY; BÁRÁNY; GIOMETTI, 1995), além dessas isoformas, Muthuchamy, Rethinasamy e Wieczorek (1997) apresenta-nos as isoformas tropomiosina 30 e a tropomiosina 4.

Também presente no filamento fino está a proteína troponina, que na verdade é um complexo protéico composto por três subunidades que tem participação específica na regulação da contração muscular. A subunidade troponina-T, tem afinidade com a tropomiosina e massa molecular aproximada de 37 kDa., a troponina-I tem afinidade com a actina e massa molecular de 24 kDa. e a última, com massa molecular de 18 kDa. e afinidade pelo cálcio, é chamada de troponina-C (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003). A troponina-T apresenta 10 isoformas, codificadas por 3 genes, que são divididas em subfamílias rápida, lenta e cardíaca. Já a troponina-C, pertencente a família de proteínas ligadoras de cálcio, apresentam 4 domínios de ligação ao cálcio e possuem 2 isoformas codificadas por 2 genes. Enquanto a troponina-I apresentam 3 isoformas, rápidas e lentas, codificadas por 3 genes (GUNNING; WEIBERGER; JEFFREY, 1997).

Podemos listar uma série de outras proteínas descritas na literatura, denominadas de filamentos intermediários. Elas compõem um sistema de estruturas filamentosas no citoplasma e no núcleo da célula eucariótica que são essenciais na manutenção da integridade estrutural e funcional do músculo. São elas: desmina, vimentina, nestina, cineína, cincoilina, lamínulas e citoqueratinas (PAULIN; LI, 2004); nebulina, proteína C, proteína M, proteína X, proteína H, miomesina, creatina cinase M, α -actinina, titina (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003); vinculina, tubulina, tropomodulina (BOULEY; CHAMBOM; PICARD, 2004).

A desmina tem papel importante na manutenção da organização estrutural da fibra muscular. Responsável pela conexão longitudinal entre os sucessivos discos-Z na formação dos sarcômeros, a desmina é particularmente abundante nas junções miotendinosas e neuromusculares no músculo esquelético (PAULIN; LI, 2004). As duas formas variantes apresentam massa molecular semelhante, cerca de 53.000 Da., mas pI diferentes, 5.4 para a α -desmina e 5.5 para a β -desmina (BÁRÁNY; BÁRÁNY; GIOMETTI, 1995).

No músculo esquelético de vertebrados, a titina depende de sua associação com outras estruturas para desempenhar sua função. A extremidade

carboxi-terminal da titina está fixada na linha M, provavelmente mediada pela ligação com a proteína miomesina e proteína-M. Já a extremidade amino-terminal está presa à linha Z, possivelmente pela interação com a α -actinina. Enquanto na banda-I a molécula de titina se encontra presa lateralmente a moléculas paralelas, na banda-A estima-se que ela esteja associada ao filamento espesso de miosina. Essa proteína parece desempenhar um papel organizacional dinâmico na fibra muscular, através de suas propriedades elásticas, quando a mesma é alongada além de seu limite elástico. Outra proteína também ligada ao controle da regulação do comprimento do sarcômero é a nebulina, proteína de 600 a 900 kDa. que possui domínios estruturais repetitivos que interagem com os monômeros de actina no filamento fino (KELLER, 1995).

Blake *et al.* (2002) ressaltam a importância do estudo de uma proteína chamada de distrofina, que está diretamente ligada à manutenção da arquitetura da junção neuromuscular e da homeostase muscular. A distrofina é uma proteína pertencente à família protéica das β -espectrina e α -actinina, de aproximadamente 427 kDa., presente em um complexo protéico localizado no sarcolema muscular, conectando o citoesqueleto celular com a lâmina basal. A ocorrência de mutações no gene que codifica a distrofina pode acarretar uma desestabilização da membrana e ativar múltiplos processos patológicos relacionados às distrofias musculares.

Uma segunda classe de proteínas está presente no músculo esquelético além das proteínas estruturais. São elas as proteínas com funções metabólicas, que apesar de representarem um menor percentual do conteúdo protéico total da célula muscular, aparecem como as mais abundantes em termos de diversidade. É possível fazer uma classificação dessas proteínas de acordo com sua função enzimática, em hidrolases, nucleases, proteases, sintases, isomerases, polimerases, quinases, fosfatases, oxido-redutases e ATPases, responsáveis pela catalisação da hidrólise do ATP (Adenosina trifosfato) originando ADP (Adenosina difosfato) e Pi (Fosfato inorgânico), promovendo a liberação de energia. Essas proteínas são responsáveis por uma gama de funções, tais como: catálise, transdução de sinal, canais, bombas de sucção, etc. (ALBERTS *et al.*, 2004).

Dentre elas, uma das mais importantes proteínas do metabolismo celular muscular é uma proteína homóloga da hemoglobina, a mioglobina, que apresenta três isoformas no músculo esquelético e é responsável pelo transporte de O_2 (Oxigênio) e CO_2 (Gás Carbônico) no músculo. Especula-se também que a

Mioglobina desempenhe outro papel além de transporte e armazenamento de oxigênio, por exemplo, a regulação de Óxido Nítrico em nível microvascular (GELFI *et al.*, 2004).

2.3. PROTEÍNAS MARCADORAS E ESTUDOS PROTEÔMICOS

O estudo adequado dos processos dinâmicos dos sistemas biológicos se torna difícil quando se tem como alvo de estudo o genoma do organismo, pois são as proteínas e não os genes que determinam a funcionalidade e o fenótipo de um organismo. Dessa forma, o estudo do proteoma é fundamental por envolver aspectos importantes que implicam diretamente diversos campos da biotecnologia.

A caracterização proteômica possibilita a revelação de caminhos metabólicos envolvidos em diversas situações, permitindo a identificação e caracterização de possíveis marcadores biológicos específicos de um determinado estado de saúde. Dessa forma, através da identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, é possível desenvolver novos medicamentos. Assim, os resultados alcançados com abordagens proteômicas podem ser diretamente aplicados em diferentes áreas, principalmente nas áreas médicas e farmacêuticas, que estão intimamente ligadas aos avanços da biotecnologia (ANDERSON; MATHESON; STEINER, 2000).

Nos últimos anos foram vistos inúmeros avanços nas ferramentas disponíveis para a investigação médica atual quando relacionada à Biologia molecular e celular. Os desenvolvimentos de novas ferramentas permitiram a separação adequada de proteínas, seguida de técnicas de identificação, dando origem à análise proteômica moderna. Tais ferramentas, em geral, são aplicadas no estudo das doenças humanas e permitem, além de identificar marcadores moleculares, conhecer a resposta de uma célula ou tecido a estresses diversos através da comparação de seu perfil protéico, contribuindo assim para um melhor entendimento de como as proteínas atuam de maneira a regular os mais diversos mecanismos celulares (CIERO; BELLATO, 2002).

A identificação de marcadores pela análise proteômica se baseia nas diferenças de expressão protéica detectadas no gel de indivíduos portadores da

patologia em estudo, quando comparados ao de indivíduos saudáveis. Após a utilização das técnicas de coloração, os spots no gel com intensidades diferentes podem representar os marcadores, nesse caso, proteínas diferencialmente expressas (CARVALHO *et al.*, 2005). Maciel *et al.* (2005) demonstraram a aplicabilidade de tal método em pacientes com câncer de pulmão. Neste estudo foram identificadas 5 proteínas diferencialmente expressas que puderam ser caracterizadas como marcadores moleculares em potencial para o uso no diagnóstico e no tratamento.

O estudo das mudanças globais na expressão protéica entre os estados patológicos e de saúde, ou células tratadas com drogas ou outros estímulos, pode ser chamado por *expressão proteômica* (BLACKSTOCK; WEIR, 1999; CORTHALS; NELSON, 2001; KIM, 2005). Doenças multigênicas como o câncer, diabetes e doenças cardíacas, caracterizam 98% das doenças (STROHMAN, 1995b). O diagnóstico e a caracterização das doenças multigênicas é dificultada pelas complexas interações entre e intra genes e eventos epigenéticos que circundam os caminhos metabólicos afetados (STROHMAN, 1995a). Descobrir marcadores patológicos desta forma requer abordagens globais e mapas de expressão protéica comparativos, onde se torna possível verificar a diminuição ou aumento dessa expressão, identificando e quantificando as proteínas. Pela medida da expressão de um grande número de proteínas, pode-se monitorar as mudanças coordenadas de expressão de proteínas específicas da patologia. Esta abordagem é mais comumente efetuada pela combinação de eletroforese 2D e métodos de identificação protéica, como a espectrometria de massa (KIM, 2005).

As patologias que trazem danos aos músculos esqueléticos podem acarretar profundos efeitos fisiológicos, como perda dos movimentos e desequilíbrio metabólico. Uma grande parte da literatura médica e desportiva está focada no entendimento das causas moleculares de várias doenças da musculatura estriada, incluído nesta categoria as distrofias musculares, as miopatias, as desordens metabólicas e desordens neurais. A pesquisa foca também os processos fisiológicos normais do músculo estriado, incluindo as contrações, desenvolvimento, diferenciação, metabolismo, biologia neuromuscular (ISFORT, 2002) e ainda, na dinâmica de liberação e armazenamento de aminoácidos, conduzindo respectivamente a processos de atrofia e hipertrofia muscular.

Os estudos proteômicos publicados com relação ao tecido muscular esquelético, ainda estão em desenvolvimento e aparecem em pequeno número na literatura especializada. Normalmente, buscam através de identificação e comparação do fenótipo protéico do músculo submetido a diferentes tratamentos experimentais, identificar variações no aumento, diminuição e/ou inibição da síntese de proteínas.

Nesse sentido, Isfort *et al.* (2000) apresentam dados de análises proteômicas de ratos submetidos a diferentes estímulos de atrofia: suspensão de membro, imobilização de membro, deservação, além de hipertrofia após suspensão. Segundo essa avaliação, a proteína solear-114, identificada como troponina T, teve sua expressão diminuída após deservação, aumentada na imobilização e hipertrofia e não sofreu alteração após suspensão. A proteína solear-255 (ainda não identificada) apresentou decréscimo após deservação e suspensão, aumento após hipertrofia, e não apresentou alteração após imobilização. A proteína solear-459 apresentou-se aumentada em decorrência dos processos de deservação, imobilização e suspensão, e diminuída na hipertrofia, e a proteína solear-333 mostrou comportamento oposto a solear-459, diminuindo na deservação, suspensão e imobilização e aumento após a hipertrofia.

Em outro trabalho do mesmo autor (ISFORT *et al.*, 2002), são apresentados dados de perda de massa muscular após imobilização do calcâneo da pata direita de rato. No músculo solear – formado principalmente por fibras lentas – em comparação com o músculo tibial anterior – formado principalmente por fibras rápidas – onde as maiores perdas de massa muscular se dão entre 0 e 0,5 dias após a imobilização, com o músculo solear apresentando modificações estatisticamente significantes no nível de 17 proteínas enquanto o músculo tibial anterior apresentou modificações no nível de 45 proteínas.

De forma a entender melhor os processos moleculares acarretados pela deservação, Sun *et al.* (2006), utilizou um modelo experimental de esmagamento do nervo ciático para examinar as proteínas expressas diferencialmente no músculo gastrocnêmio de ratos, em diferentes semanas após o procedimento, usando análise proteômica. A expressão relativa de 11 proteínas, incluindo a actina α e a cadeia pesada de miosina, demonstrou uma diminuição nas duas primeiras semanas após o procedimento cirúrgico. Enquanto outras cinco, incluindo a alfa e beta enolase, apresentaram um aumento em sua expressão após uma semana do procedimento.

Com esses achados, os autores esperam contribuir para o desenvolvimento de novos alvos e para intervenção terapêutica na atrofia do músculo esquelético acarretada por danos ao nervo.

Gelfi *et al.* (2004), investigaram os mecanismos de adaptação das estruturas protéicas musculares, decorrente da exposição prolongada a altitudes elevadas dos “Sherpas” Tibetanos. Os autores compararam Tibetanos nascidos e residentes entre 3500 e 4500m, com Tibetanos nascidos e residentes em altitudes de até 1300m, tendo como grupo controle Nepalenses nascidos e residentes em altitudes de até 1300m. Todos os indivíduos pesquisados tinham idades entre 18 e 23 anos. As análises foram realizadas a partir de amostras de tecido muscular retiradas por biopsia do músculo vasto lateral. A partir dessas análises foi visto diferenças estatísticas na expressão de sete diferentes proteínas: glutationa-S-transferase p (GST P1-1), enoil-CoA-hidratase (ECH), gliceraldeido-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH), lactato desidrogenase (LDH), fosfoglicerato mutase (PGA), NADH-ubiquinona oxidoreductase (NUGM), e mioglobina.

Burniston (2008), ao estudar o efeito do exercício aeróbicos sobre o músculo esquelético de ratos treinados de 70-75% do VO_2 de pico, por 30 minutos, 5 dias por semana, durante 4 semanas, encontrou em seus géis 2D cerca de 187 *spots* que tinham uma relação entre o grupo treinado e o grupo sedentário. Tendo identificado 80 proteínas que correspondiam aos produtos de 40 genes por espectrometria de massa, o autor observou uma expressão diferencial em 15 proteínas envolvidas na diminuição da glicólise e no aumento da oxidação de ácidos graxos como fonte de energia, indicando que essa adaptação do músculo esquelético pode estar envolvida com o estresse oxidativo induzido pelo exercício.



Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL:

Verificar as alterações nos padrões morfológicos do músculo esquelético e cardíaco e identificar possíveis proteínas marcadoras em músculo esquelético decorrentes da indução de exercício físico aeróbio em ratos

3.2 ESPECÍFICOS:

- Aperfeiçoar protocolos e estratégias para o treinamento aeróbio em esteira ergométrica sob diferentes intensidades, em ratos.
- Mensurar a morfologia da fibra muscular esquelética por parâmetros de diâmetro médio
- Mensurar a morfologia da fibra muscular cardíaca por parâmetros de diâmetro médio
- Mensurar a vascularização do miocárdio através de medidas do diâmetro e quantificação de capilares.
- Identificar possíveis proteínas marcadoras através de análise proteômica e por espectrometria de massa.



Justificativa

4 JUSTIFICATIVA

A identificação de proteínas estruturais e regulatórias contribui na formação da base molecular para o entendimento da adaptação muscular esquelética causada pelo exercício. O exercício induz múltiplos tipos de alterações estressantes, incluindo aumento na demanda por ATP, engatilhando mobilização, transporte e utilização de substratos energéticos, aumento na produção de radicais livres do oxigênio, desbalanceamento dos eletrólitos através das membranas celulares e desregulação do pH (MAHONEY *et al.*, 2005).

Existe agora, em grande emergência junto aos fisiologistas do exercício, um entendimento crescente sobre os fatores de ativação da transcrição gene-específica durante e após o exercício. Tanto no restabelecimento da homeostase da musculatura esquelética após o exercício, quanto na contribuição das adaptações músculo-esqueléticas que ocorrem em resposta ao treinamento físico.

Numerosos estudos demonstram que sessões únicas de exercícios, têm como conseqüências significativas elevações na expressão de diversas espécies de RNAm de genes de grupos metabólicos, coordenatórios (GUSTAFSSON *et al.*, 1999; PUNTSCHART *et al.*, 1998) e imunomodulatórios (FEBBRAIO; KOUKOULAS, 2000), observados em amostras de músculos. Em resposta ao exercício, a transcrição gênica pode ser ativada em segundos (NEUFER; ORDWAY; WILLAMS, 1998).

Em trabalhos anteriores, no Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará (ISCB – UECE), Ferraz (2007) e Machado (2006) caracterizaram várias proteínas estruturais altamente abundantes em tecido muscular de ratos, em géis bidimensionais. Estas proteínas se mostram ligadas ao aparato contrátil, incluindo as actinas, miosinas, tropomiosinas e troponinas. A análise dos géis nas duas faixas de pH (4-7 e 6-11) apresentou proteínas estruturais, como as cadeias leves de miosina, proteínas ligadoras de miosina, actinas e troponinas T. A maioria dos trabalhos da literatura demonstram serem essas proteínas musculares susceptíveis a alterações de sua expressão em função de mudanças no estado fisiológico do organismo.

Junto a isso, resultados preliminares, ainda não publicados, demonstraram a utilização de géis bidimensionais na determinação de isoformas protéicas no músculo esquelético de ratos treinados aerobicamente (MACHADO *et al.*, 2009). Outros resultados encontrados por CARLOS *et al.* (2008) sugerem que animais exercitados, em uma intensidade moderada, apresentam um aumento no diâmetro médio de fibras musculares esqueléticas do músculo gastrocnêmio.

Dessa forma, o presente estudo busca informações acerca dos produtos finais da expressão gênica resultantes de treinamento físico crônico em diferentes intensidades, verificando a presença de possíveis proteínas marcadoras úteis em aplicações biotecnológicas para o entendimento da adaptação muscular e fisiológica ao exercício.

Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

5.1.1. Materiais Biológicos

Ética na experimentação animal: o projeto de pesquisa foi encaminhado para o Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará. Sendo aprovado sob o protocolo de N° 08351787. Todos os princípios éticos sobre experimentação e manipulação animal foram respeitados conforme os princípios regidos pelo COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados ratos machos da raça *Wistar*, com idade aproximada de 90 dias e peso médio de 150 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no centro de aclimação de animais situado no Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Durante o treinamento físico, os animais ficaram no laboratório, sob temperatura de 22 a 25 °C, com ciclo 12 horas claro e 12 horas escuro, recebendo ração e água *ad libitum*.

5.1.2. Grupos Experimentais

Os grupos controle e experimental foram constituídos a partir de 18 ratos *Wistar* machos divididos aleatoriamente em três grupos: treinado com exercício de baixa intensidade (Ex B. Int), treinado em alta intensidade (Ex A. Int) e sedentário (SED)

5.1.3. Treinamento Físico

Nos grupos submetidos ao programa de treinamento com exercício aeróbio, os ratos foram submetidos a sessões de treinamento em esteira humana adaptada por Ferraz (2007) de modelo *Athletic Speed 2* (Figura 1 e 2).



Figura 1 – Imagem ilustrativa da esteira ergométrica adaptada utilizada para o treinamento dos animais (FERRAZ, 2007).



Figura 2 – Imagem detalhada das raia adaptadas na esteira ergométrica utilizada para o treinamento dos animais (FERRAZ, 2007).

O protocolo de treinamento utilizado teve uma frequência de 5 dias por semana, 30 minutos por dia, durante 12 semanas e está descrito na tabela 1, sendo que na 1ª e 2ª semanas, foi realizado um período de adaptação dos animais à esteira rolante. Os ratos foram submetidos inicialmente à uma velocidade de 6,7 m/min, a qual foi aumentada progressivamente até atingir a velocidade final de 21,7 m/min para o grupo de baixa intensidade e 40 m/min para o grupo de alta intensidade, ao fim da 12ª semana. Ressaltamos que o treinamento foi realizado utilizando luz vermelha e no horário da noite, devido ao hábito noturno desses animais.

Tabela 1 – Protocolo de treinamento físico utilizado na esteira ergométrica adaptada.

Semanas	Protocolo de treinamento		
	Sedentário	Exercício de Baixa Intensidade	Exercício de Alta Intensidade
1°		10 min. – 6,7 m/min	10 min. – 6,7 m/min
2°		15 min. – 6,7 m/min	15 min. – 10 m/min
3°		20 min. – 6,7 m/min	20 min. – 11,7 m/min
4°		25 min. – 6,7 m/min	25 min. – 13,3 m/min
5°		30 min. – 10 m/min	30 min. – 20 m/min
6°	05 min. - Esteira	30 min. – 11,7 m/min	30 min. – 20 m/min
7°	desligada	30 min. – 13,3 m/min	30 min. – 20 m/min
8°		30 min. – 15 m/min	30 min. – 23,3 m/min
9°		30 min. – 16,7 m/min	30 min. – 23,3 m/min
10°		30 min. – 18,3 m/min	30 min. – 23,3 m/min
11°		30 min. – 20 m/min	30 min. – 40 m/min
12°		30 min. – 21,7 m/min	30 min. – 40 m/min

A intensidade do treinamento foi determinada a partir de uma pesquisa realizada por Carvalho, Masuda e Pompeu (2005). Neste estudo os autores propuseram um protocolo de determinação do limiar de lactato e um teste de validação do treinamento aeróbio baseado no limiar de lactato em ratos. Através desta investigação os autores puderam concluir que, em grupos homogêneos, a média da velocidade em que um pequeno número de animais atinge o limiar de

lactato, pode ser usada com sucesso para a prescrição da intensidade do treino aeróbio de um grupo maior.

Todos os animais tiveram sua capacidade funcional avaliada antes do treinamento, após 6 semanas de treino e no final do experimento. O objetivo da avaliação funcional foi de verificar possíveis melhoras no desempenho físico dos animais. A avaliação funcional foi realizada através de um teste de esforço máximo em esteira adaptada, aumentando progressivamente a velocidade a cada minuto, após os 3 minutos iniciais de aquecimento. O ponto de exaustão foi determinado pela recusa do animal em se movimentar ou devido à perda da mecânica adequada do movimento (OLIVEIRA, DINIZ; AMAYA-FARFAN, 2002). Neste momento, o animal foi retirado da esteira rolante e anotada sua identificação, o tempo percorrido e a velocidade atingida.

5.1.4. Sacrifício dos animais

Ao fim do tratamento os animais foram anestesiados com Thiopental Sódico 1g de marca Cristália, na dose de 3 mg/Kg de peso do animal. Em seguida, os mesmos foram sacrificados por decaptação, de acordo com a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV/CRMVs - Nº 714, 20/06/2002, para posterior dissecação dos tecidos a serem utilizados (músculo gastrocnêmio e coração).

5.1.5. Laboratórios

Os experimentos envolvendo os animais e análises foram conduzidos nos laboratórios: Bioquímica e Cultura de Células nas dependências do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (www.uece.br/cmacf) pertencentes à Universidade Estadual do Ceará - UECE. A análise histológica foi efetuada no Laboratório de Histologia da Universidade de Fortaleza – UNIFOR.

5.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA

5.2.1. Processamento das amostras de tecido

Após o sacrifício e dissecação, os músculos gastrocnêmio da pata direita e esquerda e o músculo cardíaco foram processados para os estudos histológicos. Com os tecidos acondicionados em placa de Petre, contendo solução de Ringer, foram realizados cortes longitudinais no músculo esquelético e no músculo cardíaco. A referência básica para estas metodologias pode ser encontrada em publicação de Ross e Reith (1993).

O processo de preparação das peças começou com a seqüência de banhos para a desidratação do material: inicialmente as peças foram colocadas por 1 hora em solução de formaldeído a 10%; trocando-se então essa por uma nova solução de formaldeído a 10%, na qual as peças permanecerão por mais 24 horas; em seguida os materiais passaram para o álcool a 70% (solução de conservação).

5.2.2. Processo de desidratação das amostras

No processo de desidratação, foram realizados banhos consecutivos de 1 hora em álcool 70%, 80%, 90% e 100%, esse último por três vezes. Após a seqüência de banhos com álcool, foram realizados banhos de 1 hora de Álcool-Xilol (50% Álcool e 50% Xilol), seguidos por dois banhos de 1 hora de Xilol 100%. O tecido foi preparado dessa forma para que fosse impregnado com parafina nos banhos seguintes, utilizando parafina histológica a 60° C, por 3 horas em estufa. Por fim, as peças foram incluídas em blocos de parafina, resfriadas no congelador, para posterior corte em micrótomo. A espessura dos cortes foi de $\pm 8 \mu\text{m}$.

Os cortes da parafina com tecido foram colocados em água a $\pm 45^\circ \text{C}$, para que a parafina derreta e libere os tecidos, dessa forma esses puderam ser “pescados” com as lâminas embebidas em Albumina (50% glicerina / 50% clara de ovo) e armazenados em estantes de madeira. Uma vez nas estantes, as mesmas

foram colocadas na estufa por um período de 1 a 2 horas, de forma que tivesse sido removida cerca de 80% da parafina.

5.2.3. Coloração das lâminas

A coloração básica dos tecidos foi feita com hematoxilina e eosina (HE). Com a intenção de retirar o restante da parafina (20%), foram feitos dois banhos consecutivos de Xilol absoluto (100%) por 10 minutos.

Dando seqüência ao processo de coloração realizou-se a hidratação do material na lâmina. A hidratação consistiu em banhos rápidos, apenas mergulhando as lâminas, nas soluções de álcool absoluto, álcool 95%, álcool 90%, álcool 80% e água destilada, seguido de banho de 8 a 10 minutos em Hematoxilina, lavagem em água destilada, banho rápido em Eosina e por fim, lavagem em água corrente.

Uma vez coradas, foi preciso realizar novamente a desidratação do material na lâmina para fixação do material. Foram feitos novos banhos rápidos nas soluções de álcool 80%, álcool 90%, dois banhos de álcool absoluto, álcool-xilol (50% Álcool e 50% Xilol) e dois banhos de xilol absoluto. Após a seqüência esperou-se secar para montagem das lâminas.

5.2.4. Montagem das lâminas

Para a montagem, foram utilizados gases para a limpeza ao redor do material na lâmina, colocado uma gota de Entelâm e uma gota de xilol na lamínula, além de uma gota de xilol no material que se encontra na lâmina. Então foi posta a lamínula sobre o material e pressionada para colagem de forma a evitar bolhas entre a lâmina e a lamínula. Foi preciso esperar secar para que a lâmina pudesse ser analisada em microscópio óptico.

5.2.5. Metodologia de análise das lâminas

Para o estudo morfométrico, foi utilizado um microscópio de modelo *Zeiss Primo Star*, conectado a uma câmera *Pixelink* modelo PLA662, com objetiva 4x/0,10 para o diâmetro de fibras do músculo esquelético e diâmetro de fibras do músculo cardíaco. Para a quantificação e diâmetro médio dos capilares do músculo cardíaco foi utilizada a objetiva de 40x/0,65. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do *software AxioVision 3.1.2.1* no laboratório de Histologia da Universidade de Fortaleza. Todas as análises foram feitas por um único avaliador. Todas as lâminas dos protocolos descritos abaixo foram analisadas em triplicata.

Na análise do diâmetro médio das fibras musculares esqueléticas foram selecionados aleatoriamente 3 animais de cada grupo, de cada animal foi escolhida 1 lâmina de cada pata. Em cada lâmina foram identificadas duas áreas distintas onde o corte fosse predominantemente transversal. Em cada área foi definido 1 círculo com raio de 1.000 μm , demarcadas 50 fibras e medido seus diâmetros médios.

Na análise do diâmetro médio das fibras musculares cardíacas foram selecionados aleatoriamente 3 animais, de cada animal foram escolhidos 3 lâminas. Em cada lâmina foram identificadas áreas com corte predominantemente transversal. Nas áreas identificadas foram obtidas 4 imagens com tamanho de 63788,82 μm^2 , de cada imagem foi demarcada e mensurada o diâmetro médio de 50 células, totalizando 200 células por lâmina.

Já na análise do diâmetro médio dos capilares do tecido cardíaco foram selecionados 3 animais de cada grupo, de cada animal foi escolhida 1 lâmina. Em cada lâmina foram selecionadas 3 áreas distintas (ápice, lado direito e lado esquerdo), onde foi medido o diâmetro médio de 50 capilares em cada área.

Para a análise da quantificação de capilares no tecido muscular cardíaco foram selecionados 3 animais, de cada animal foi escolhido 1 lâmina, de cada lâmina foram obtidas 9 imagens com tamanho de 63788,82 μm^2 , onde 3 imagens foram do ápice, 3 do lado direito e 3 do lado esquerdo. Então, foi realizada a contagem total de capilares na área das imagens selecionadas.

5.3. ANÁLISE PROTEÔMICA

5.3.1. Processamento das amostras de tecido

As amostras obtidas do tecido muscular esquelético foram lavadas com água deionizada fria ou com tampão de baixa força iônica. A ruptura do tecido muscular foi efetuada por maceração, após a qual as amostras foram então solubilizadas em solução desnaturante não iônica, homogeneizadas e agitadas por 30 minutos em centrífuga.

A metodologia baseia-se especialmente nos manuais técnicos dos equipamentos de focalização isoeletrica e nas recomendações dos fabricantes de equipamentos (especialmente *Amersham/GE Bioscience*). As principais referências para a análise proteômica são: BERKELMAN; STENSTEDT, 2002 e WILKINS *et al.*, 1996.

O processo de extração de proteínas é fundamentado em metodologia proposta por Bouley; Chambon; Picard (2004). O tecido obtido da musculatura esquelética dos ratos foi congelado com N₂ líquido. Do tecido congelado foi utilizado cerca de 40 mg para extração, o mesmo foi pulverizado em almofariz previamente resfriado com N₂ líquido com o auxílio do pistilo e solução de extração (Uréia 8,0 M, Thiouréia 2,0 M, DTT 1%, Chaps 2%, IPG *buffer* pH 3-10 2%) e transferido para tubos de centrífuga. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos. A concentração de proteínas foi então determinada usando o método reativo de Bradford (1976).

5.3.2. Eletroforese bidimensional

Aproximadamente 500 µg de proteína total extraída de músculo gastrocnêmio foram carregadas diretamente no gel de focalização com gradiente de pH imobilizado, na faixa de 3 a 10 (*Immobiline IPG strips – GE Healthcare*), quando se tratar de um gel em escala analítica. Em escala preparativa, até 1 mg de proteína

total foi carregado em géis de 7 cm, com a mesma faixa de pH imobilizado. A focalização das proteínas foi feita num equipamento *Multiphor II* (*GE Healthcare*) acoplado a um circulador termostático ou *Ettanphor*, contendo sistema de troca de calor do tipo Peltier (*GE Healthcare*). Os parâmetros de focalização foram obtidos experimentalmente. Em geral, foram seguidos aqueles descritos em Görg *et al.* (2000). A análise através dessa técnica foi feita com a separação das proteínas através do seu gradiente de pH por focalização isoelétrica. Essa é a primeira dimensão onde foi utilizando o sistema *Multiphor II* com gel de focalização *Immobiline Dry Strip*, de 7 cm testando-se uma faixa de pH de 3 a 10. Já na segunda dimensão as proteínas focalizadas foram separadas através de suas massas moleculares em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, a coloração foi feita com *Coomassie Brilliant Blue*.

Montagem da Focalização Isoelétrica: amostras de proteínas totais (200 µg) foram homogeneizadas com 200 µl de tampão de rehidratação de gel (uréia 8 M, tiouréia 1 M, 10% glicerol, 2 % CHAPS, 0,5 a 2 % de *IPG Buffer* pH 3-10, 25 mM de DTT e 0,001 % de bromofenol blue). Géis *Immobiline dry strip* de 7 cm, pH 4-7, foram retirados do freezer e equilibrados a temperatura ambiente (20 a 25 °C). As amostras transferidas para a bandeja de rehidratação (*Reswelling tray*) e os géis colocados sobre as amostras. Óleo de silicone (*IPG cover fluid*) foi despejado sobre ambos (amostra e gel). A hidratação das tiras de géis, simultaneamente ao carregamento da amostra, se deu por 12 horas.

Armazenagem dos géis de focalização: uma vez terminadas as focalizações isoelétricas e quando não analisadas de imediato por SDS-PAGE, os géis ficaram estocados entre filmes plásticos e armazenados a – 80° C.

Realização da segunda dimensão ou SDS-PAGE das proteínas focalizadas:

As tiras de géis com gradiente de pH imobilizado (*Immobiline dry strip gel*), contendo as proteínas focalizadas anteriormente, foram retiradas do freezer a – 80° C e equilibradas à temperatura ambiente. Em seguida, as tiras de gel foram incubadas com 5 – 10 mL da solução de equilíbrio, contendo 10 mg/mL de DTT, por 15 minutos, entre 10 e 25 °C. Após essa incubação, a primeira solução de equilíbrio foi substituída por 5-10 mL da segunda solução de equilíbrio, contendo 25 mg/mL de iodoacetamida, por 15 minutos, entre 20 e 25 °C. Uma vez procedida essa segunda incubação, as tiras de géis foram posicionadas no topo dos géis SDS-PAGE e

seladas com 0,3 a 0,5 mL de solução de selagem. Então os sistemas de eletroforese vertical (*Hofer SE-600*, *Ruby* ou *DaltSix*) foram montados e a separação por eletroforese foi iniciada.

Parâmetros de separação: 25 mA/gel (4 géis x 25 mA = 100 mA), tempo de corrida aproximado: 5 horas.

Após a corrida, os géis foram desmontados e procedeu-se a coloração.

Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*: *Coomassie Brilliant Blue* R250 0,2% (m/v) em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v). O gel foi descorado com metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) e seco com celofane e lido por scanner para o computador.

Análise dos padrões bidimensionais: A análise dos padrões bidimensionais foi efetuada por digitalização da imagem em *software* específico (*ImageMaster 2D Platinum*).

5.3.3. Cálculo de massa molecular e ponto isoelétrico de bandas e spots

Os géis foram digitalizados e utilizados como *input* para o *software ImageMaster 2D Platinum 6.01 (GE Healthcare)*. Os cálculos de massa molecular aparente foram efetuados através da plotagem de dados de cada banda ou *spot*, ligados à corrida eletroforética (parâmetros de migração da banda ou *spot* em mm x curva padrão dos marcadores moleculares utilizados) em planilha e posteriormente em gráfico que possibilita obter a massa molecular relativa e ponto isoelétrico dos peptídeos e proteínas contidos nos *spots*.

5.3.4. Digestão dos Spots protéicos

Os *spots* recortados do gel foram transferidos para tubos de 0,5 mL, contendo traços de água Mili-Q. O gel foi cortado em pedaços com auxílio de um bisturi. O gel foi lavado com NH_4HCO_3 50 mM. Foi acrescentado então acetonitrila

50 % / NH_4HCO_3 50 mM para o descoloramento do gel e novamente acrescentou-se acetonitrila 100%. O gel foi seco em *Speed vac*. Passou-se então à fase de digestão: adicionou-se 0,2 μg de tripsina dissolvida em NH_4HCO_3 50 mM, no gel totalmente seco, até que toda a solução tivesse sido absorvida. O gel reidratado foi coberto com NH_4HCO_3 50 mM e deixado a 37°C por toda a noite. Foi feita a centrifugação e adicionado 5 μL de ácido acético 10%. O sobrenadante foi retirado e posto em novo microtubo. Adicionou-se então, novamente, acetonitrila/ácido trifluoroacético 50%/0,1% ao gel. Foi feita sonicação seguido de centrifugação. Foi retirado o sobrenadante e posto em novo tubo. Esta última lavagem com acetonitrila/ácido trifluoroacético foi repetida mais uma vez. O sobrenadante foi seco em *Speed Vac* até o volume final de cerca de 2-5 μL . Adicionou-se água Mili-Q até o volume de 11 μL . Centrifugou-se novamente, removendo-se 10 μL do sobrenadante e guardada a amostra em refrigeração a 10 °C para a leitura final por espectrometria de massa.

5.3.5. Análise e identificação dos spots protéicos por espectrometria de massa (LC - MS/MS)

Foi utilizado para análise por espectrometria de massa, o equipamento *Finnigan Orbi-Trap* equipado com *Dionex 3000 HPLC*, de acordo com os procedimentos de rotina do Laboratório de LC - MS/MS do "*Proteomics Resource Centre*" da Universidade *Rockefeller*, Nova York - EUA. Após a análise, os dados foram analisados pelo *software Mascot Search Engine (Matrix Science Ltd.)*. As análises obtidas referem-se à cobertura peptídica, fornecida em sequências peptídicas e em porcentagem de cobertura, e sua consequente utilização para busca em bancos de dados de proteínas. A busca foi efetuada pelo próprio *software*, retornando ao usuário as possíveis identidades protéicas possíveis. Considerou-se então como identificada, a proteína que apresentou a maior cobertura peptídica, com o maior escore, fornecido pelo relatório do *software*.

Calculou-se então a massa molecular teórica e o pI teórico através da ferramenta *online "ProMoST: Protein Modification Screening Tool"* (<http://proteomics.mcw.edu/node/27>), usando como entrada, o registro do banco de

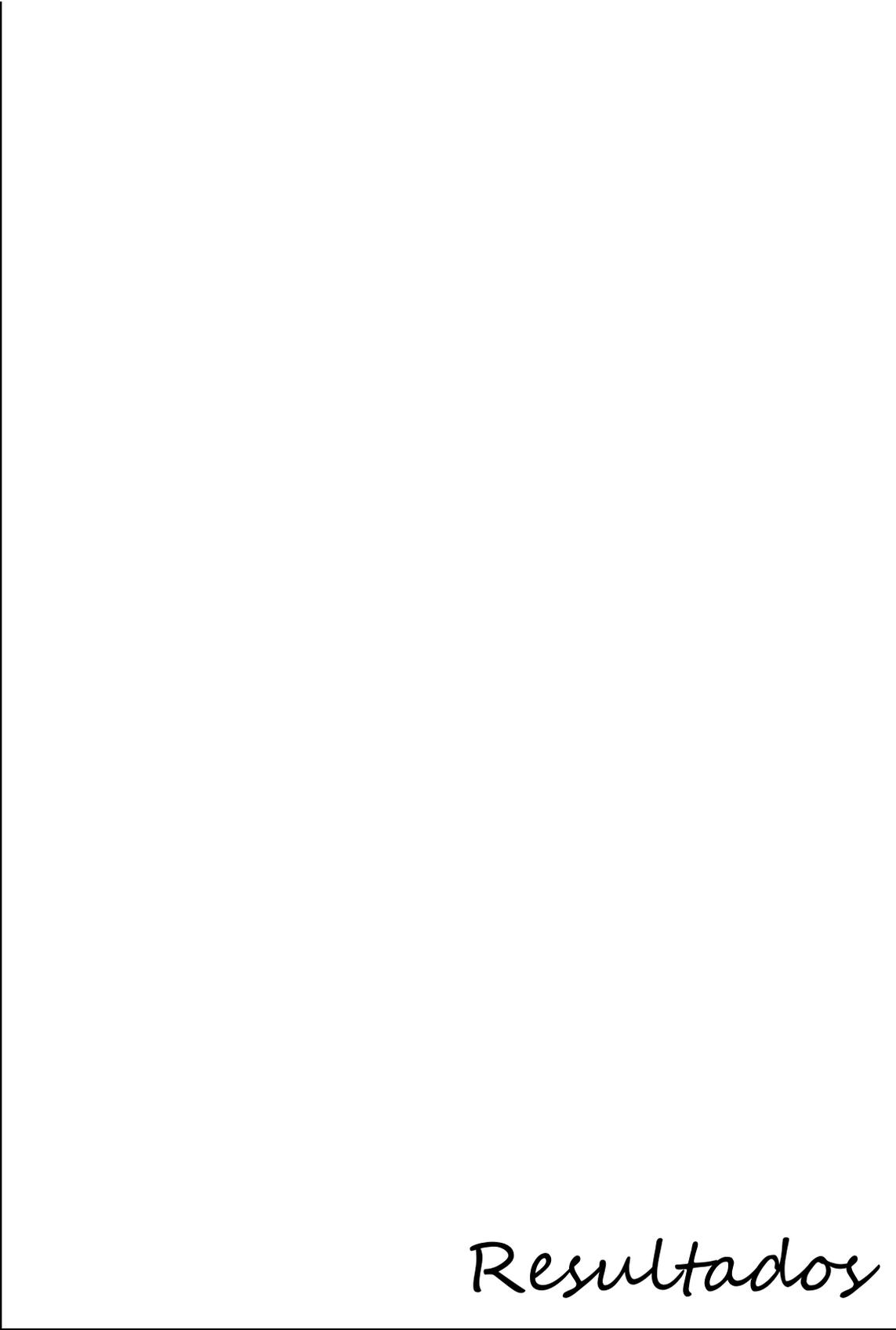
dados, da proteína identificada, para futuras comparações com a massa molecular experimental e o pI experimental (fornecidas pelo *Mascot*).

5.3.6. Análise dos géis de proteômica

As imagens dos géis foram capturadas usando software de escaneamento e analisados utilizando *ImageMaster® 2D Platinum 6.01 software* (GE HealthCare), onde foram visualizados e analisados. Foi efetuada a limpeza seletiva do *background* de fundo do gel correspondente a falsos *spots*. Os géis foram efetuados sempre em triplicata para obtenção estatística de gel "*master*" pelo *software*. Valores quantitativos como intensidade, volume e área de cada spot foram obtidos e analisados. Comparações entre géis, obtendo-se diferenças e semelhanças entre tratamentos, foram analisadas estatisticamente também desta forma.

5.4. Tratamento Estatístico

Para a análise estatística foi utilizado inicialmente o teste de Kolmogorov-smirnov, para verificar a normalidade dos dados. Na análise estatística do peso corporal e do teste de esforço máximo foi utilizado ANOVA na comparação entre os grupos, complementado com o teste de Tukey, e Teste T para amostras dependentes dentro do mesmo grupo. Para os dados histológicos foi utilizado ANOVA, complementado com o teste de Tukey. A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando o programa SPSS versão 15.0 para *Windows*.



Resultados

6 RESULTADOS

6.1 PESO CORPORAL E TESTE DE ESFORÇO DOS ANIMAIS

A figura 3 representa a evolução do peso corporal médio dos animais dos grupos experimentais. Podemos observar um ganho de peso corporal homogêneo, dentro de todos os grupos experimentais.

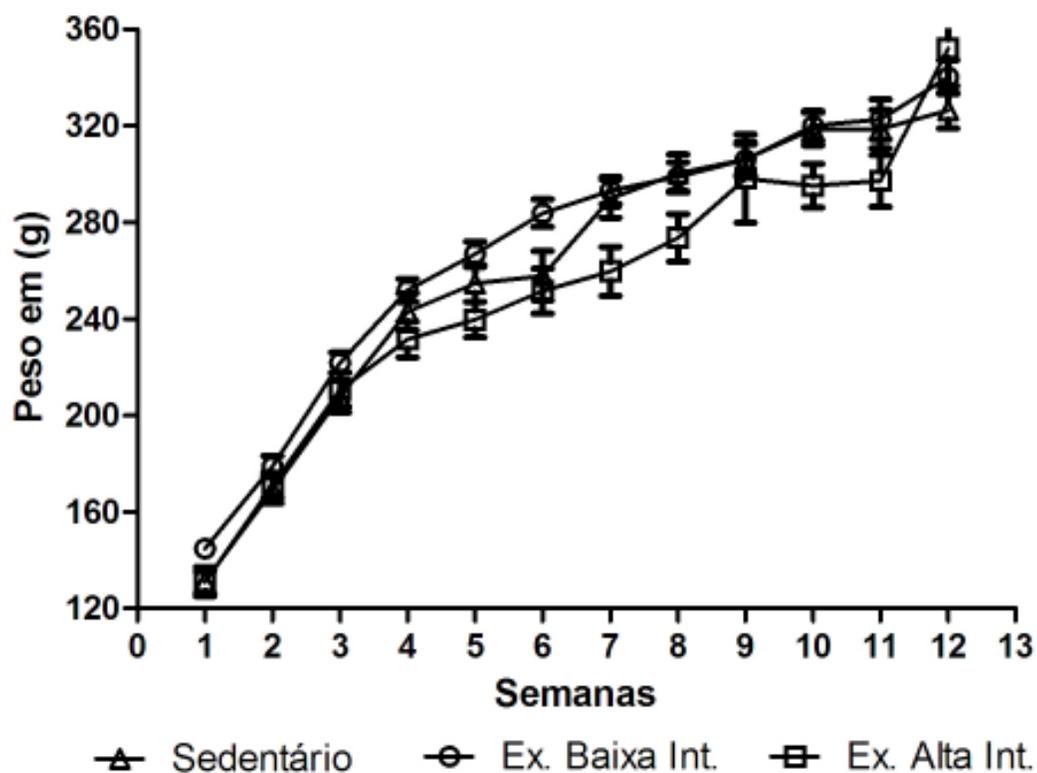


Figura 3 – Ganho de peso corporal dos animais ao longo do tratamento (n =6 por grupo experimental)

A figura 4 mostra a comparação dos resultados médios dos testes realizados no início do experimento, no final da 6ª semana (resultados parciais) e ao final do experimento. Diante dos resultados apresentados, verifica-se que o

treinamento aeróbio de alta e baixa intensidade em esteira adaptada para ratos não provocou uma diferença significativa entre os grupos na comparação da velocidade máxima atingida no teste de esforço máximo. Entretanto, o nível de desempenho do grupo de alta intensidade apresentou tendência à melhora durante as 12 semanas de treino. Em relação ao grupo de baixa intensidade, houve uma tendência a manutenção no desempenho, já o grupo sedentário, tendeu à queda no desempenho com o passar do treinamento.

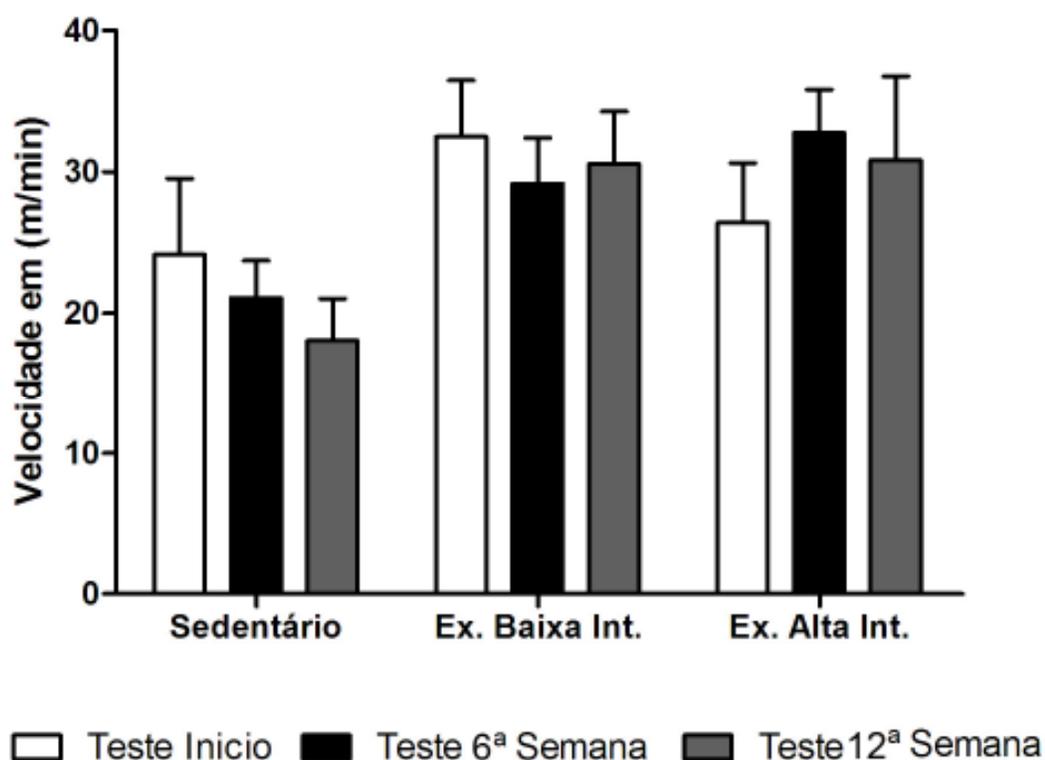


Figura 4 – Nível de desempenho no teste de esforço máximo antes, durante e após o treinamento físico. (n =6 por grupo experimental).

A tabela 2 apresenta os valores para as velocidades médias atingidas pelos animais dos três grupos experimentais, no início, na 6ª semana e ao final do treinamento.

Tabela 2 – Velocidades médias (m/min) atingidas pelos animais dos grupos experimentais, no início, na 6ª semana e ao final do treinamento.

	Sedentário	Ex. Baixa Int.	Ex. Alta Int.
Início	25±13,3	31,7±10	26,7±10
6ª semana	21,7±6,7	30±8,3	33,3±8,3
Final	18,3±6,7	30±8,3	31,7±15

Média±Erro padrão da média (n=6 por grupo experimental)

6.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Na figura 5 são apresentados os valores médios por grupo do diâmetro (em μm) da fibra muscular esquelética, na qual o grupo exercício de baixa intensidade mostra valor estatisticamente significante maior, tanto em relação ao grupo sedentário, quanto em relação ao de exercício de alta intensidade.

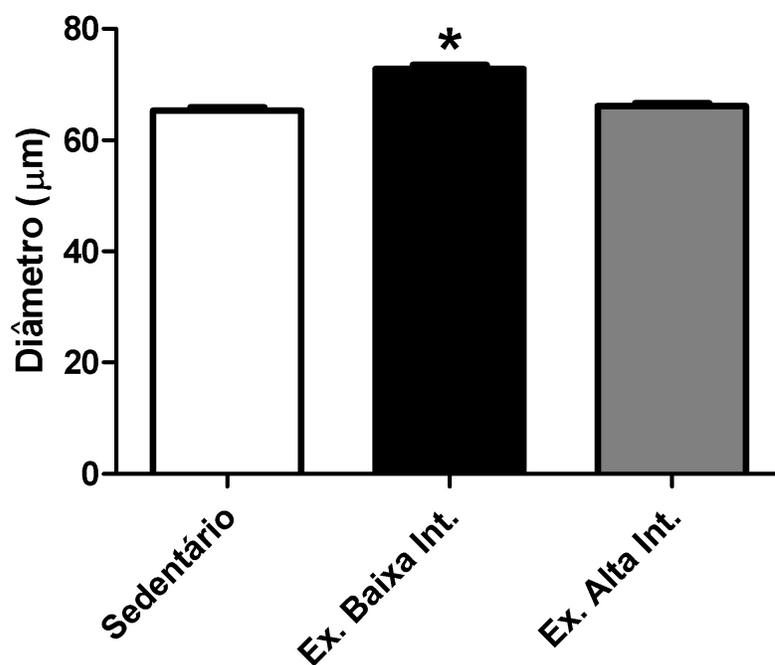


Figura 5 – Diâmetro transversal médio da fibra muscular esquelética (n=1800 por grupo experimental). * exercício baixa intensidade > exercício alta intensidade, sedentário ($p < 0,05$)

Os valores médios do diâmetro da fibra muscular cardíaca estão apresentados na figura 6. Para o diâmetro da fibra muscular cardíaca podemos verificar que o grupo submetido a exercícios de baixa intensidade apresentou maiores valores ao fim do treinamento quando comparado aos demais grupos experimentais.

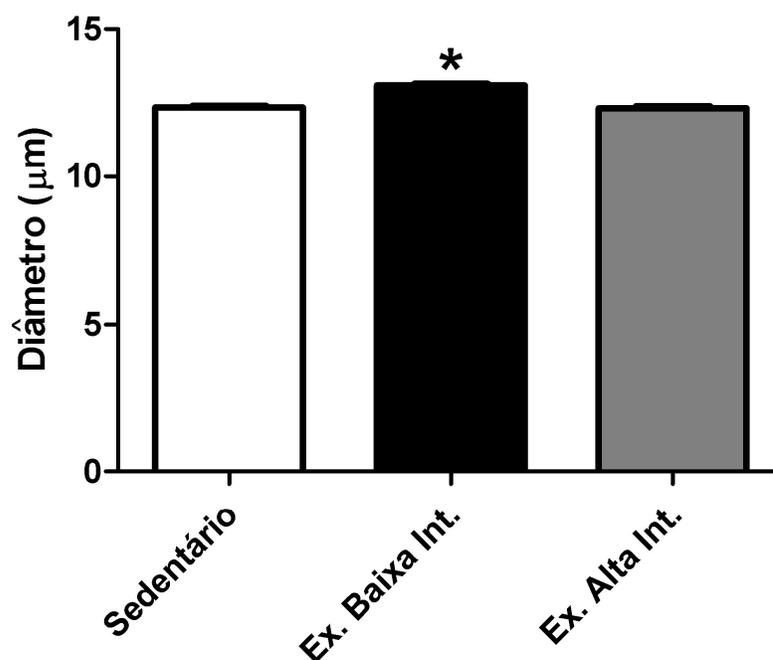


Figura 6 – Diâmetro transversal médio da fibra muscular cardíaca (n=1800 por grupo experimental). * exercício baixa intensidade > exercício de alta intensidade, sedentário (p<0,001)

Como pode ser visto na figura 7, o diâmetro transversal médio do capilar cardíaco apresentou-se significativamente maior para o grupo sedentário em comparação com os demais grupos, este fato nos dá a indicação do aumento do número de capilares nos grupos tratados com exercício.

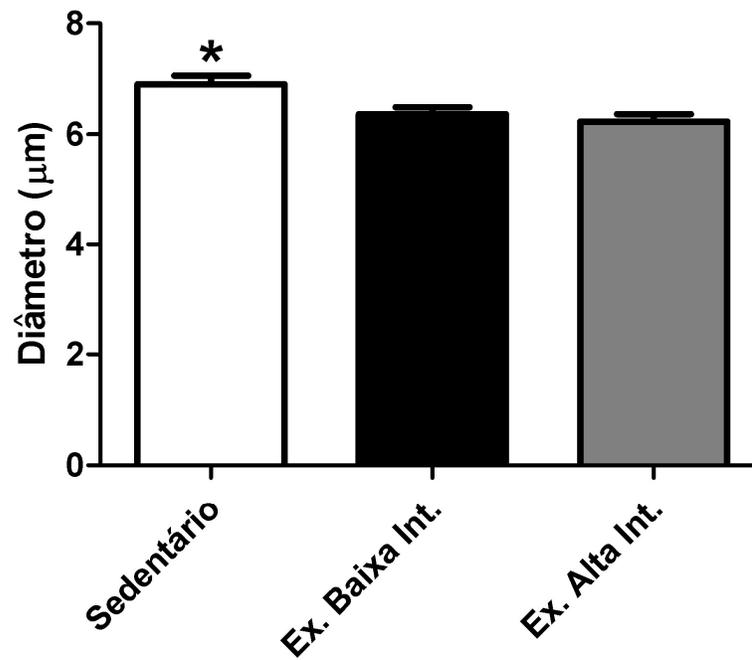


Figura 7 – Diâmetro transversal médio do capilar do miocárdio (n=1350 por grupo experimental). * sedentário > exercício baixa intensidade, exercício de alta Intensidade (p<0,001)

Na figura 8, que mostra parâmetros de vascularização no músculo cardíaco, podemos observar um aumento significativo no leito capilar miocárdico nos ratos treinados em baixa intensidade quando comparados com os controles sedentários e com o grupo treinado em alta intensidade.

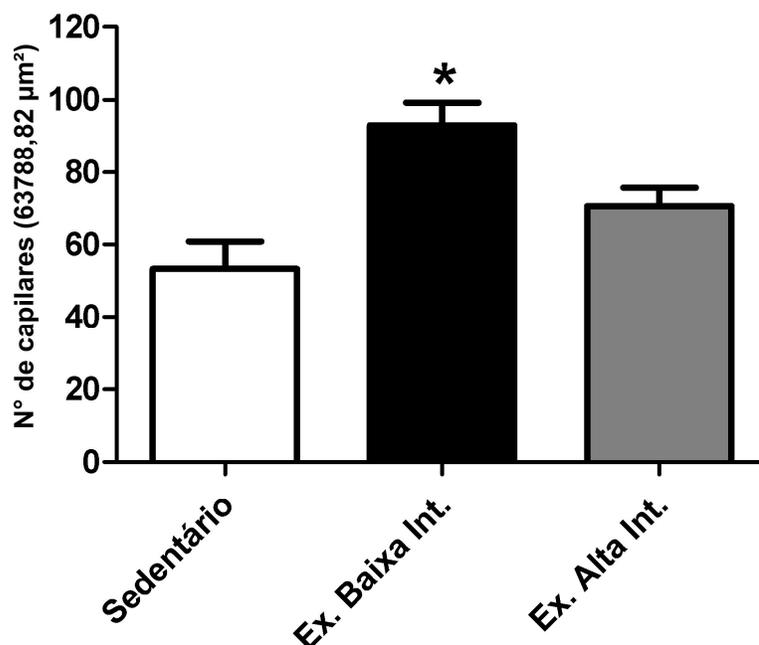


Figura 8 – Número de capilares do miocárdio por área de 63788,82 μm^2 . (n = 3 animais por grupo experimental) * exercício baixa intensidade > exercício alta intensidade ($p < 0,05$), sedentário ($p < 0,001$)

6.3 ANÁLISE PROTEÔMICA

Em relação à análise proteômica, está representado na figura 9 uma imagem representativa do gel proteômico de tecido muscular esquelético com os devidos *spots* identificados por espectrometria de massa. Foram realizadas corridas eletroforéticas em duplicata para cada grupo experimental, na faixa de pI de 3 – 10.

Após feita a eletroforese bidimensional de tecido muscular esqueléticos dos grupos experimentais, foram selecionados 9 *spots* protéicos para identificação por espectrometria de massa (LC-MS/MS), pelo *Rockefeller Institute*. Na tabela 3 temos a lista de proteínas identificadas por espectrometria de massa, e sua sequência peptídica. Em vermelho estão destacados os peptídeos que tiveram similaridade e na última coluna está descrita a cobertura, em percentual, da equivalência da sequência peptídica de todas as proteínas identificadas.

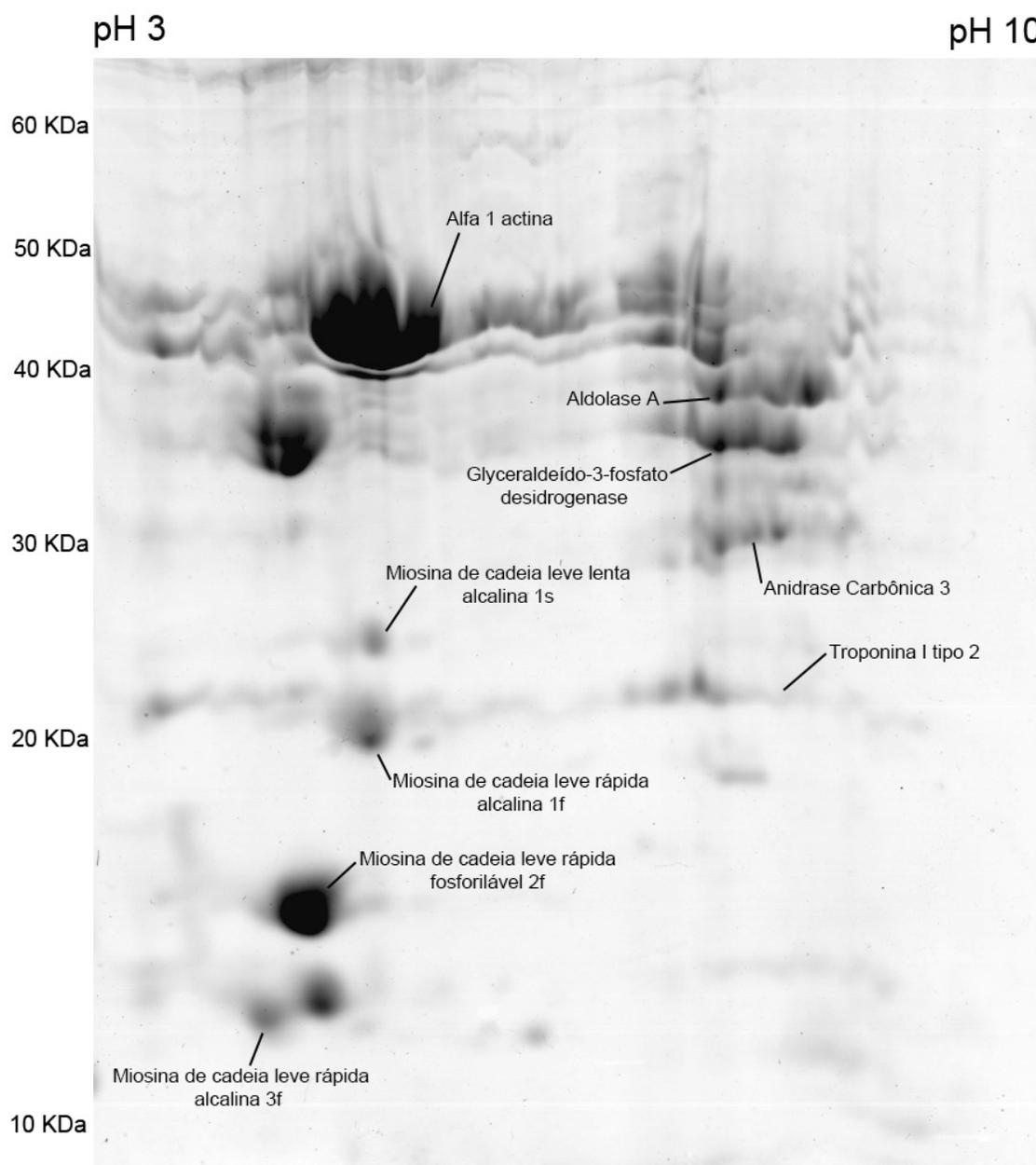


Figura 9 - Gel de eletroforese de duas dimensões (2D), de extrato de músculo gastrocnêmio. *Strip* de focalização de 7 cm, faixa de pl de 3 - 10. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue*. Imagem digitalizada no software *ImageMaster™ 2D Platinum 6.01* - GE Healthcare

Tabela 3 – Spots protéicos identificados por espectrometria de massa (LC-MS/MS), suas respectivas sequências polipeptídicas e coberturas peptídicas.

Proteína identificada	Peptídeos equivalentes (em vermelho)	Cobertura (%)
Miosina de cadeia leve rápida alcalina 3f [Rattus norvegicus]	1 MSFSADQIAE FKEAFLLFDR TGECKITLSQ VGDVLRALGT NPTNAEVKKV 51 LGNPSNEEMN AKKIEFEQFL PMMQAISNNK DQGGYEDFVE GLRVFDKEGN 101 GTVMGAELRH VLATLGEKMK EEEVEALLAG QEDSNGCINY EAFVKHIMSV	78%
Miosina de cadeia leve rápida fosforilável 2f [Rattus norvegicus]	1 MAPKKAKRRA AEGSSNVFS MFDQTQIQEF KEAFTVIDQN RDGIIDKEDL 51 RDTFAAMGRL NVKNEELDAM MKEASGPINF TVFLTMFGEK LKGADPEDVI 101 TGAFKVLDPG GKGTIKKQFL BELLTTQCDR FSQEEIKNMW AAFPPDVGGN 151 VDYKNICYVI THGDAKDQE	92%
Miosina de cadeia leve rápida alcalina 1f [Rattus norvegicus]	1 MAPKKDVKKP AAAAPAPAPA PAPAPAKPKE EKIDLSAIKI EFSKQEQEEF 51 KEAFLLFDR TGECKITLSQV GDVLRALGTN PTNAEVKKVL GNPSNEEMNA 101 KKIEFEQFLP MMQAISNNKD QGGYEDFVEG LRVFDKEGNG TVMGAELRHV 151 LATLGEKMK EEEVEALLAGQ EDSNGCINYE AFVKHIMSV	91%
Miosina de cadeia leve lenta alcalina 1s [Rattus norvegicus]	1 MAPKKPEPKK DDAKTAAPKA APAPAAAPAA APEPERPKEA EFDASKIKIE 51 FTPEQIEEFK EAFQLFDRTP KGEMKITYGQ CGDVLRALGQ NPTQAEVLRV 101 LGKPKQEELN SKMDFEFTFL PMLQHISKNK DTGTIEDFVE GLRVFDKEGN 151 GTVMGAELRH VLATLGERLT EDEVEKLMAG QEDSNGCINY EAFVKHIMAS	84%
Gliceraldeído-3fosfato desidrogenase [Rattus norvegicus]	1 MVKVGVNGFG RIGRLVTRAA FSCDKVDIVA INDPFIDLNY MVYMFQYDST 51 HGKFNQTVKA ENKLVINGK PITIFQERDP ANIKWGDAGA EYVVESTGVF 101 TTMEKAGAHL KGGAKRVIIS APSADAPMFV MGVNHEKYDN SLKIVSNASC 151 TTNCLAPLAK VIHDNFGIVE GLMTTVHAIT ATQKTVDGPS KGLWRDGRGA 201 AQNIIPASTG AAKAVGKVIP ELNGKLTGMA FRVPTPNVSV VDLTCRLEKP 251 AKYDDIKKVV KQAAEGPLKG ILGYTEDQVV SCDFNSNSHS STFDAGAGIA 301 LNDNFVKLIS WYDNEYGYSN RVVDLMAYMA SKE	79%
Aldolase A [Rattus norvegicus]	1 MHPYPALTP EQKKEADIA HRIVAPGKI LAADESTGSI AKRLQSIGTE 51 NTEENRRFYR QLLLTADDRV NPCIGGVILF HETLYQKADD GRFPFQVIKS 101 KGGVVGKIVD KGVVPLAGTN GETTTQGLDG LSERCAQYK DGADFAKWRG 151 VLKIGEHTPS SLAIMENANV LARYASICQQ NGIVPIVEPE ILPDGDHDLK 201 RCQYVTEKVL AAVYKALSDH HVYLEGTLK PNMVTPGHAC TQKFSNEEIA 251 MATVTALRRT VPPAVPGVTF LSGGQSEEEA SINLNAINKC PLLKWPALTF 301 SYGRALQASA LKAWGGKKN LKAAQEEYIK RALANSLAQ GKYPSPQSG 351 AAASESLFIS NHAY	86%
Alfa 1 actina [Homo sapiens]	1 MCDEDETTAL VCDNGLVVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHQGMVGMG 51 QKDSYVGDEA QSKRGILTLK YPIEHGII TN WDDMEKIWHH TFYNELRVAP 101 EEHPTLLTEA PLNPKANREK MTQIMFETFN VPAMYVAIQ VLSLYASGRT 151 TGIVLDSGDG VTHNVPIYEG YALPHAIMRL DLAGRDLTDY LMKILTERGY 201 SFVTTAEREI VRDIKEKLCY VALDFENEMA TAASSSLEK SYELPDGQVI 251 TIGNERFRCP ETLFQPSFIG MESAGIHET YNSIMKCID IRKDLYANNV 301 MSGGTTMYPG IADRMQKEIT ALAPSTMKIK IIAPPERKYS VWIGGSILAS 351 LSTFQQMWIT KQEYDEAGPS IVHRKCF	78%
Troponina I tipo 2 [Rattus norvegicus]	1 MGDEEKRNR ITARRQHLKS VMLQIAATEL EKEESRRESE KQNYLSEHCP 51 PLHIPGMSME VQELCKQLHA KIDAAEEKY DMEVKVQKSS KELEDMNQKL 101 FDLRGKFKRP PLRRVRMSAD AMLKALLGSK HKVCMDLRAN LKQVKKEDTE 151 KERDLRDVGD WRKNIEEKSG MEGRKKMFES ES	63%
Anidrase carbônica 3 [Rattus norvegicus]	1 MAKEWGYASH NGPEHWHELY PIAKGDNQSP IELHTKDIRH DPSLQPSVSV 51 YDPGSAKTIL NNGKTCRVVF DDTFDRSMLR GGPLSGPYRL RQPHLHWGSS 101 DDHGEHTVD GVKYAAELHL VHWNPKYNTF GEALKQPDGI AVVGIFLKIG 151 REKGEFQILL DALDKIKTKG KEAPFNHFD P SCLFPACRDY WTYHGSFTTP 201 PCEECIVWLL LKEPMTVSSD QMAKLRSLFA SAENEPVPL VGNWRPQPI 251 KGRVVRASFK	61%

Na tabela 4 são apresentados dados de identificação das proteínas contidas nos *spots* analisados no *Rockefeller Institute*.

Tabela 4 – *Spots* protéicos identificados por espectrometria de massa (LC-MS/MS) e seus respectivos dados de identificação

Proteína identificada	Identidade gênica	Número de acesso	pl teórico	Massa Molecular Teórica (Da)
Miosina de cadeia leve rápida alcalina 3f [Rattus norvegicus]	gi 13487933	NP_064489.1	4,64	16572,34
Miosina de cadeia leve rápida fosforilável 2f [Rattus norvegicus]	gi 6981238	NP_036737.1	4,80	18951,54
Miosina de cadeia leve rápida alcalina 1f [Rattus norvegicus]	gi 117676401	NP_00107112 4.1	5,00	20661,68
Miosina de cadeia leve lenta alcalina 1s [Rattus norvegicus]	gi 6981240	NP_036738.1	5,04	22138,27
Gliceraldeído-3fosfato desidrogenase [Rattus norvegicus]	gi 8393418	NP_058704.1	7,90	35810,06
Aldolase A [Rattus norvegicus]	gi 6978487	NP_036627.1	7,70	39334,01
Alfa 1 actina [Homo sapiens]	gi 4501881	NP_001091.1	5,25	42033,14
Troponina I tipo 2 [Rattus norvegicus]	gi 8394466	NP_058881.1	8,49	21310,56
Anidrase carbônica 3 [Rattus norvegicus]	gi 31377484	NP_062165.2	7,17	29413,45

pl: ponto isoelétrico

A partir da análise dos géis foi possível observar os *spots* detectados pelo *software*, através de uma ferramenta do próprio *software* que nos permite visualizá-los em 3 dimensões. A figura 10A representa uma pequena área do gel onde vemos os *spots* correspondentes às isoformas de miosinas de cadeia leve identificadas. Na figura 10B temos uma imagem obtida através da ferramenta 3D do *software ImageMaster Platinum 2D*.

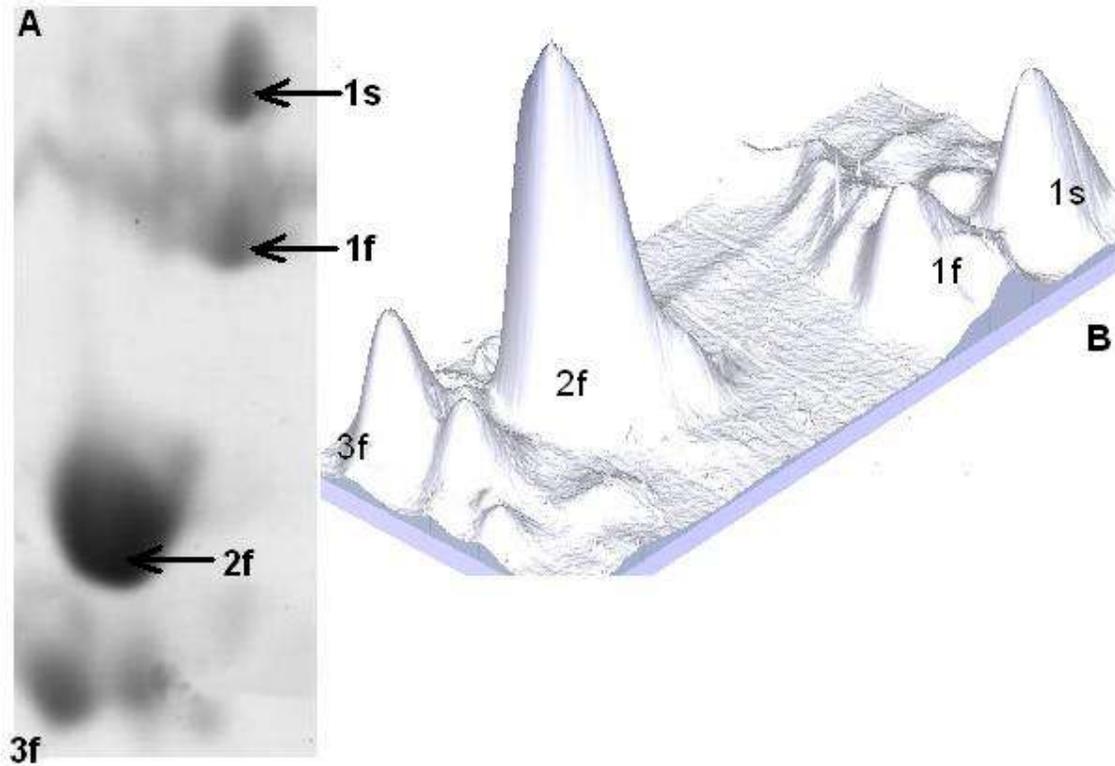


Figura 10 – A-Imagem de uma pequena área do gel bidimensional onde estão destacadas as isoformas de miosinas de cadeia leve identificadas. B-Imagem obtida através da ferramenta 3D do software *ImageMaster Platinum 2D*. (s-slow; f-fast)

A identificação das isoformas de miosina de cadeia leve possibilitou a realização de uma análise qualitativa entre as isoformas presentes no músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais. Dessa forma na figura 11 vemos a distribuição da composição de miosinas de cadeia leve presentes nos grupos submetidos a treinamentos físicos e do controle sedentário, e identificadas.

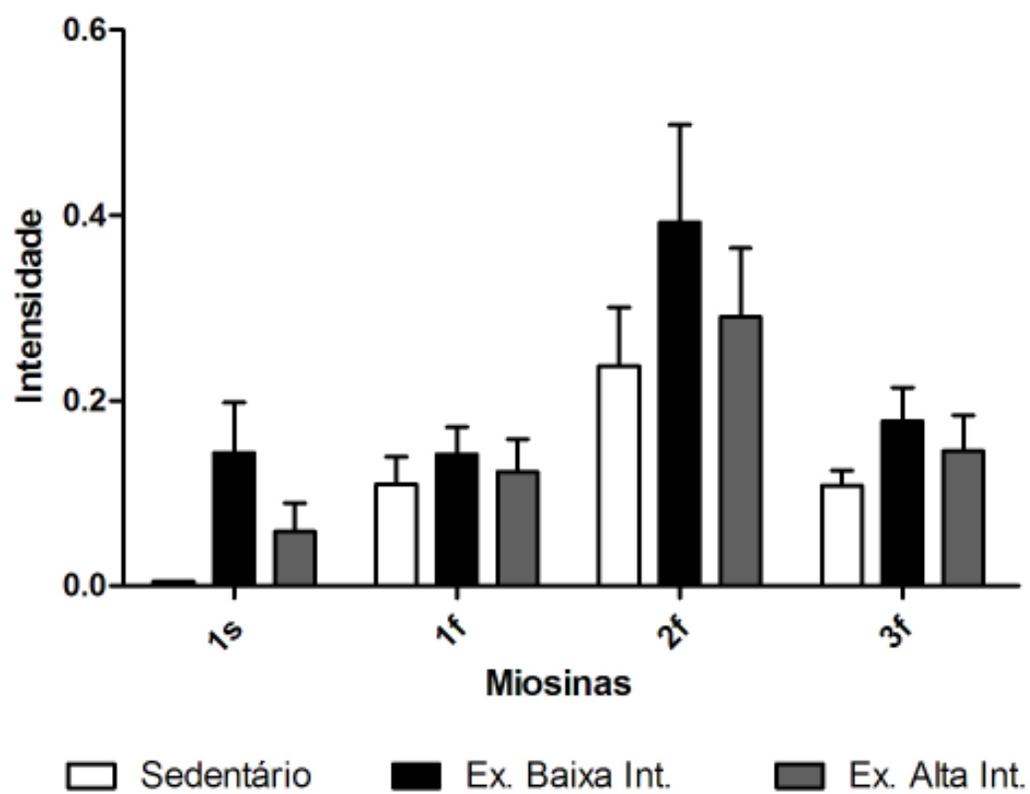


Figura 11 – Distribuição das isoformas de miosinas de cadeia leve (s-slow; f-fast) em músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais.



Discussão

7 DISCUSSÃO

7.1. PESO CORPORAL E TESTE DE ESFORÇO DOS ANIMAIS

O acompanhamento do peso corporal dos animais ao longo do experimento é uma forma clássica de avaliação do seu desenvolvimento orgânico (BELLAYER *et al.*, 2001; BOAVENTURA *et al.*, 2003; BOTELHO *et al.*, 2005; GUZMÁN-SILVA *et al.*, 2004). Possíveis alterações hipoplásicas e atróficas dos tecidos causam comprometimento de sua massa e estrutura, resultando assim em uma diminuição acentuada do tamanho e peso corporal frente a diversas situações de estresse (GUZMÁN-SILVA *et al.*, 2004). Oliveira, Diniz e Amaya-Farfan (2002), por exemplo, utilizam o ganho de peso para cálculo do quociente de conversão alimentar como forma de analisar o fator anti-nutricional. Dessa forma, a observação da similaridade das curvas de evolução do peso corporal dos grupos experimentais estudados (figura 3) indica que a manipulação e o treinamento desses animais não ocasionaram situações de estresse danosas ao seu desenvolvimento normal.

Em relação ao comportamento do peso corporal médio, visto na figura 3, podemos observar uma discreta redução, ao longo do treinamento, no peso dos animais treinados em alta intensidade, assim corroborando com dados de diversos outros estudos, onde o peso dos animais submetidos a diferentes protocolos de exercícios físicos também se apresentava mais baixo em relação ao peso dos animais controles sedentários (ALESSIO *et al.*, 2005; KIRAN; SUBRAMANYAN; DEVI, 2004; MIYSAIKA *et al.*, 2003; NOVELLI *et al.*, 2004). Já em outro estudo, realizado por Nakao *et al.* (2000), no qual foram investigados os efeitos do exercício sobre enzimas antioxidantes, onde camundongos foram submetidos a um protocolo de exercícios de natação durante 1 hora por dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, ao fim do tratamento não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para o peso corporal entre animais exercitados e não exercitados.

Como forma de avaliação e controle dos níveis de exercício é proposto na literatura testes de capacidade orgânica para esses animais, alguns avaliam o $VO_{2Máx}$ pelo método direto, onde o animal é colocado em uma caixa hermeticamente

fechada e os gases inspirados e expirados são analisados (AOKI; BELMONTE; SEELAENDER, 2003; LAWLER *et al.*, 1993), outros analisam parâmetros de respostas bioquímicas ao exercício através da curva de concentração de lactato em função do incremento da intensidade, tanto em esteira quanto em piscina (CARVALHO; MASUDA; POMPEU, 2005; GOBATTO, *et al.*, 2001). Contudo, em um grande número de artigos que utilizam a atividade de corrida em ratos, não são citados testes de mensuração da efetividade do treinamento.

Kregel *et al.* (2006) ressaltam que os protocolos de exercício devem ser cuidadosa e criteriosamente analisados e que os animais devem ser manuseados de forma a minimizar o estresse ao qual são submetidos e, dessa forma, possibilitar uma coleta válida de informações sobre a resposta ao exercício físico. Diante desse fato poderíamos suspeitar que o teste por nós proposto não obtivesse diferença significativa entre os grupos, uma vez que o princípio do mesmo é avaliar o desempenho dos animais em situação de estresse crescente. Porém, o grupo sedentário mostra uma clara tendência de perda em seu desempenho (figura 4 e tabela 2). Oliveira, Diniz e Amaya-Farfan (2002) estudando ratos sob restrição energética em um teste similar, no intuito de verificar os níveis de glicogênio muscular e hepático, também observaram respostas fisiológicas ao exercício bastante controversas, uma vez que os animais sob restrição suportaram o exercício por mais tempo que o grupo controle. Dessa forma acreditamos que os testes em animais devem ser submáximos ao invés de máximos.

7.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA

As análises histológicas mostraram que o diâmetro médio da fibra muscular esquelética (Figura 5) do grupo exercício baixa intensidade foi maior que para os demais grupos, contudo, o consenso na área do treinamento desportivo é que estímulos mais elevados geram maiores ganhos estruturais (BOMPA, 2002; KRAEMER; HAKKINEN, 2004). Entretanto essa afirmação, que é consensual para o treinamento com humanos, parece não ter a mesma validade para o treinamento de animais.

Poderíamos sugerir que o nível de exercício do grupo baixa intensidade foi suficiente para gerar a síndrome geral da adaptação, observada pelo ganho no corte transversal da fibra muscular. Enquanto isso, para o grupo alta intensidade, a elevação na intensidade pode ter desencadeado um estresse tal que impossibilitou a adaptação das fibras ao exercício. Bacurau (2007) estudando, em ratos, um modelo de intolerância ao exercício físico, também observou menores diâmetros da fibra muscular para ratos com cardiomiopatia induzida. Já em estudo com animais em que eram administradas doses de testosterona, resposta hormonal padrão pós-treinamento, Isayama *et al.* (2006) observaram aumento da área das fibras musculares para esse grupo em relação a animais do grupo controle.

Camargo Filho *et al.* (2005), ao aplicarem exercícios de esteira em ratos sob diferentes condições, observaram um aumento do diâmetro das fibras musculares do músculo sóleo, indicando que ocorreu hipertrofia muscular. Neste estudo, os animais submetidos a treinamento físico durante 45 e 60 dias, cinco vezes por semana, com sessões de sessenta minutos, apresentaram valores médios do diâmetro das fibras musculares maiores que os controles sedentários. Em outro estudo, dos mesmos autores (CAMARGO FILHO *et al.*, 2006), foram estudadas as alterações histológicas do músculo sóleo de ratos submetidos a um programa de natação durante nove semanas, cinco vezes por semana, com aumento progressivo de carga e administração do esteróide anabólico Decanoato de Nandrolona, duas vezes por semana na dose de 5 mg/kg. Os autores puderam observar que os animais submetidos a treinamento físico sob administração de esteróide apresentaram fibras musculares com maior diâmetro quando comparados com os animais controle.

Sabe-se que o treinamento físico conduz ao melhor desempenho cardiovascular o qual está associado com aumento no peso e no volume ventricular, além da hipertrofia de fibras musculares. Tal resposta adaptativa resulta da exposição do organismo a uma maior carga de trabalho, representada pelo exercício (LA GRECHE; TAYLOR; PRIOR, 2009; MARON; PELLICCIA, 2006; GORAYEB *et al.*, 2005). De acordo com a Figura 6, pode-se observar que o grupo submetido a exercícios de baixa intensidade apresenta diferenças significativas nas médias do diâmetro de fibras musculares cardíacas, quando comparado aos demais grupos. De acordo com Portes & Tucci (2006) e Pinheiro *et al.* (2007) a musculatura cardíaca sofre modificações estruturais em termos de quantidade de tecidos, ou seja, ganho

de peso, estando esta resposta relacionada a uma maior demanda funcional provocada pelo exercício crônico e pelo incremento na massa corporal total.

A hipertrofia cardíaca é uma resposta adaptativa a sobrecarga funcional imposta ao coração. Diversas são as condições fisiológicas e patológicas capazes de desencadear essa resposta. A hipertrofia cardíaca, denominado hipertrofia fisiológica, pode ser consequência do remodelamento induzido pelo exercício, principalmente o exercício aeróbio, ocorrendo devido a adaptações mecânicas, como o estiramento da parede ventricular pela sobrecarga de volume promovida pelo aumento do retorno venoso (SOUZA *et al.*, 2007).

Evangelista, Brum e Krieger (2003) ao aplicarem exercícios de natação sobre diferentes condições de duração, frequência e intensidade em camundongos, observaram um aumento no peso do coração de 14 a 25 %, bem como na dimensão dos miócitos de 13 a 20 % nos animais submetidos a um protocolo de exercícios com duração de 90 minutos, 2 vezes por dia, 5 dias por semana, durante 4 semanas, sem sobrecarga presa ao corpo do animal. A partir dos dados obtidos e de dados já descritos na literatura, os mesmos autores concluíram que os protocolos de exercício de natação aplicados em modelos animais são os mais eficientes em induzir alterações hipertróficas cardíacas em camundongos.

Também são bem descritas alterações adaptativas da rede vascular em função do treinamento. Brown (2003) afirma, em sua revisão, que ocorrem eventos de adaptações estruturais da circulação coronária. Junto a essa afirmação, Denipoti, Moraes e Hernandez (2006), também afirmam existir uma correlação positiva entre o exercício físico e alterações na vascularização, envolvendo modificações no calibre e no número de vasos sanguíneos dos tecidos musculares.

Analisando detalhadamente o diâmetro transversal médio do capilar, ilustrado na Figura 7, percebe-se que os dois grupos que foram submetidos ao exercício sofreram uma diminuição da luz do capilar quando comparados ao grupo sedentário. A ocorrência desse fato está ligada a uma maior quantidade de capilares ativos, como pode ser visto na figura 8. Isso pode ser explicado pela ligação direta entre o diâmetro do capilar e a quantidade de capilares ativos. Uma vez que a prática de exercícios leva à uma demanda aumentada de oxigênio e nutrientes, tanto em situação de repouso, quanto durante a realização de uma sessão de exercícios, faz-se necessário uma maior rede capilar para a manutenção correta do suprimento energético.

Carvalho *et al.* (2004), ao estudarem o efeito do treinamento aeróbio, realizado em esteira, com duração de 8 e 12 semanas, duas vezes por dia, a uma velocidade de 17 m/min, por 5 minutos, 5 dias por semana, em modelos animais com insuficiência arterial periférica puderam verificar que, através de análises histológicas do músculo vasto medial, ambos os grupos tiveram valores médios para a contagem de capilares, superiores ao dos respectivos grupos sedentários, porém, não foi visto diferença estatisticamente significativa entre os grupos exercitados. Demonstrou-se assim que o treinamento aeróbio durante 8 semanas se mostra eficiente em promover um aumento do número médio de capilares no tecido muscular esquelético.

White *et al.* (1998), em seu estudo, encontraram um aumento de 37 % no total do leito vascular transversal miocárdico, em 16 semanas de treino. Entretanto, para os capilares, no miocárdio, os mesmos autores encontraram aumento no diâmetro médio apenas na 3ª semana e na 16ª. Após nova análise não foram detectadas mudanças significativas para capilares, mas sim para arteríolas. Já no presente estudo, encontramos aumento significativo no número de capilares cardíacos após 12 semanas de treinamento.

Ao investigar os efeitos de um programa de treinamento de natação, com sessões que duravam 1 hora, 5 dias por semana, durante 17 semanas, seguidas de uma única sessão até à exaustão do animal suportando 4 % do seu peso corporal, sobre a expressão de Proteínas de Choque Térmico 70 (HSP 70), sobre a estrutura histológica do miocárdio e dos músculos Sóleo e Reto Femoral de ratos *Wistar* treinados e sedentários, Silva (2007) observou que os ratos treinados apresentaram um discreto aumento não significativo na rede vascular miocárdica quando comparados aos controles sedentários.

Redondo (2007) estudou os efeitos do uso de esteróides anabolizantes no sistema cardiovascular, especificamente no fluxo sanguíneo de ratos normotensos submetidos ou não ao treinamento físico de natação. O protocolo de exercícios consistiu em sessões de uma hora, 5 dias por semana, durante 10 semanas com aumento gradual de carga até atingir 5 % do peso corporal, caracterizando treinamento de baixa intensidade e longa duração. A autora pode notar que a administração de esteróide e o treinamento físico, isoladamente, não foram capazes de alterar a densidade capilar miocárdica, enquanto que a associação do

treinamento físico com o uso de esteróides anabolizantes foi capaz de reduzir o número de capilares por área no coração, quando comparado aos demais grupos.

7.3. ANÁLISE PROTEÔMICA

7.3.1. Identificação por espectrometria de massa

Na figura 9 tem-se uma imagem digitalizada de um gel 2D utilizado na separação das proteínas de músculo gastrocnêmio. A partir da imagem os *spots* foram selecionados e enviados para identificação por espectrometria de massa. A espectrometria de massa tornou-se uma ferramenta revolucionária na química de proteínas moderna, sendo atualmente essa técnica considerada a forma mais rápida e eficiente de se identificar uma proteína. Esta metodologia se baseia na digestão enzimática da proteína a ser identificada, produzindo fragmentos denominados peptídeos. As massas desses peptídeos são então determinadas com grande precisão, formando o que é chamado de “impressão digital da proteína” (*peptide mass fingerprinting*). Então o *peptide mass fingerprinting* da proteína em identificação é comparado, através de *softwares* específicos, com as sequências que estão contidas em bancos de dados na rede mundial de computadores. Como a identificação é obtida através da probabilidade de similaridade da sequência, temos como um dos principais parâmetros de identificação a porcentagem de cobertura dos peptídeos da amostra com a proteína pareada (CUNHA; CASTRO; FONTES, 2006).

Ao comparar nossos resultados com os de outros trabalhos descritos na literatura, que também fizeram uso de espectrometria de massa, podemos constatar, de acordo com a excelente cobertura obtida em nossa identificação, a qual variou entre 61 e 92 % de similaridade (tabela 3), uma grande confiabilidade em nossos resultados. Donoghue *et al.* (2005), ao realizarem a identificação por espectrometria de massa de 21 proteínas de músculo esquelético estimulado cronicamente à baixa frequência, obtiveram uma variação 14,9 a 56,2 % em suas coberturas peptídicas. Em outra pesquisa, Okumura *et al.* (2005) compararam o perfil de expressão protéica tanto de músculo esquelético, composto predominantemente por fibras de

contração rápida, quanto de músculo esquelético composto predominantemente por fibras de contração lenta. Os autores puderam verificar que as coberturas obtidas na identificação de 26 proteínas variaram de 3 a 83 % de similaridade. Já Burniston (2008), ao investigar as mudanças no proteoma de músculo esquelético de ratos submetidos a exercícios de moderada intensidade, identificou por espectrometria de massa 80 proteínas com coberturas que variaram entre 13 e 71 %.

7.3.2. Proteínas enzimáticas identificadas

Proteínas enzimáticas que estão envolvidas diretamente com a via glicolítica de produção de energia foram identificadas, são elas a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a aldolase (Tabela 3 e 4). A aldolase age de forma a clivar, reversivelmente, a Frutose 1,6-bifosfato em gliceraldeído-3-fosfato e diidroxicetona fosfato. Já a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase atua, através de fosforilação oxidativa, convertendo a gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato (ERLANDSEN; ABOLA; STEVENS, 2000; MAUGHAN, 2008).

É certo que durante a mudança de um estado de repouso para uma situação de exercício existe um aumento no consumo de ATP e conseqüentemente, um aumento na geração de seus produtos (ADP, AMP e Fosfato inorgânico). Devido à habilidade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em responder a mudanças nessas concentrações, ela é considerada, junto a outras enzimas, como a glicogênio fosforilase e a lactato desidrogenase, enzima chave na regulação do fluxo de produção de energia pela via glicolítica (SELIVANOV *et al.*, 2008).

Donoghue *et al.* (2005) investigaram, através de técnicas proteômicas, os efeitos da estimulação crônica de baixa frequência sobre o padrão de expressão protéica em músculo esquelético composto predominantemente por fibras de contração rápida de coelhos. Os autores puderam verificar alterações na expressão de 16 proteínas. Entre outras mudanças favoráveis, foi visto a conversão de fibras de contração rápida a lenta e uma diminuição na expressão de enzimas glicolíticas, como a aldolase e a enolase, indicando uma menor utilização da via glicolítica no processo de produção de energia.

Uma outra proteína identificada em nossos géis bidimensionais é a anidrase carbônica III (CA III), uma proteína citosólica de aproximadamente 28 kDa, presente em grandes concentrações em fibras lentas de músculo esquelético (BEUERLE *et al.*, 2000). A CA III é uma proteína enzimática que contém Zinco em sua estrutura e tem como uma de suas funções catalisar a hidratação reversível de dióxido de carbono em bicarbonato e íon hidrogênio. Existem cerca de 12 isoformas de anidrase carbônica expressas e que apresentam atividade biológica em humanos, porém a CA III difere das demais por ter baixa atividade enzimática e ser a única entre as demais a exibir atividade fosfatase (LINDSKOG, 1997; SHANG *et al.*, 2009).

Shang *et al.* (2009) afirmam que, com a prática de exercícios, o meio intramuscular se torna mais ácido devido à acumulação de íons hidrogênio, o que é considerado uma das principais causas da fadiga local. Devido à sua atividade enzimática, ela desempenha um importante papel na manutenção do equilíbrio ácido-básico. Os mesmos autores também relatam que a CA III, por exibir atividade fosfatase e por estar presente em altas concentrações nos músculos compostos predominantemente por fibras de contração lenta, está possivelmente envolvida com processos de fosforilação oxidativa e produção de energia. Assim, existe uma suspeita de que baixos níveis de CA III no músculo esquelético podem estar relacionados com a ocorrência precoce de fadiga.

7.3.3. Proteínas estruturais identificadas

Além das isoformas de miosina de cadeia leve identificadas, que serão discutidas posteriormente, outras proteínas estruturais foram encontradas em nossos géis bidimensionais, são elas a actina e a troponina (tabela 3 e 4).

A actina é uma proteína do citoesqueleto celular expressa em diversas células eucarióticas que desempenha importantes funções, como a manutenção da forma celular, motilidade celular e contração muscular. Até o momento 6 isoformas de actina foram identificadas em vertebrados superiores, são elas a α -actina esquelética ou actina 1, a α -actina cardíaca, α -actina de músculo liso, γ -actina de músculo liso, a β -actina citoplasmática e a γ -actina citoplasmática, sendo as duas

primeiras expressas em músculos estriados. A expressão das diferentes isoformas de actina é regulada de forma específica em relação ao estado de desenvolvimento e tecido. Por exemplo, a isoforma predominante em músculos cardíacos adultos e em músculo esquelético em desenvolvimento é a α -actina cardíaca. Entretanto, com o processo de desenvolvimento sua expressão é diminuída e a expressão da isoforma α -actina esquelética é aumentada, atingindo mais de 95% do total de isoformas de actina que compõem o músculo esquelético adulto. Acredita-se que essa expressão coordenada ocorra de forma a facilitar o rápido acúmulo dessas proteínas no processo de desenvolvimento muscular (BERTOLA *et al.*, 2008; LANCIONI *et al.*, 2007).

Outra proteína estrutural também identificada em nossos géis proteômicos foi a isoforma 2 da troponina I. A troponina I (TnI) é a subunidade inibitória do complexo protéico de troponina, que também é composto pela troponina C (TnC), que apresenta afinidade a íons cálcio e a troponina T (TnT) que se apresenta ligada ao filamento de tropomiosina. A expressão dos genes que codificam essas subunidades é específica de células musculares estriadas (JIN; ZHANG; BAUTISTA, 2008).

São encontrados 3 isoformas de TnI, a TnI cardíaca (tipo 3), expressa somente em músculo cardíaco, a TnI esquelética de músculo de contração rápida (tipo 2), identificada em nosso estudo e expressa somente em fibras de contração rápida, e a TnI esquelética de músculo de contração lenta (tipo 1), expressas em fibras de contração lenta e de forma transiente em músculo cardíaco de embriões e neonatos. As 3 isoformas de TnI são codificadas por 3 genes distintos (SHINSHKIN; KOVALYOV; KOVALYOVA, 2004) e até então não foram observados processos de *splicing* alternativo na expressão dos genes que codificam essas isoformas (JIN; ZHANG; BAUTISTA, 2008).

7.3.4. Iso-mioformas de miosina de cadeia leve identificadas

Na figura 11 temos a distribuição por grupo experimental das isoformas de miosina de cadeia leve identificadas em nossos géis proteômicos, são elas, MLC1s, MLC1f, MLC2f e MLC3f.

A molécula de miosina é o complexo protéico motor mais bem conhecido e estudado, sendo capaz de converter energia química em energia mecânica através de mudanças na sua conformação molecular (REGGIANI; BOTTINELLI; STIENEN, 2000). Vários autores vêm buscando caracterizar iso-mioformas e sua expressão molecular de forma a encontrar padrões que possam caracterizar o treinamento em diferentes músculos e diferentes situações. Em músculo estriado de vertebrado esse complexo é, na verdade, um hexâmero composto por duas cadeias pesadas de miosina (MHC), de aproximadamente 200 kDa cada, e quatro cadeias leves de miosina (MLC), de aproximadamente 20 kDa cada. Cada MHC encontra-se ligada a duas MLC, uma alcalina ou essencial (ELC) e outra regulatória ou fosforilável (RLC). Tais MLC desempenham um papel de ajuste na atividade motora da miosina, adicionando versatilidade à sua cinética enzimática (CHOI; KIM, 2009).

Diferentes padrões de contração são desempenhados pelos músculos esqueléticos, principalmente quando relacionados à força mecânica aplicada. Essas variações estão presentes em diferentes músculos de um único organismo e em diferentes espécies. A habilidade da molécula de Miosina em cumprir as diferentes necessidades funcionais necessárias reside na existência de múltiplas isoformas de MHC e MLC. Isoformas são proteínas muito similares, com ligeiras alterações em suas sequências de aminoácidos, capazes de substituir umas as outras com pequenas diferenças estruturais e funcionais (REGGIANI; BOTTINELLI; STIENEN, 2000).

São encontradas quatro isoformas predominantes de MHC expressas em músculo esquelético de mamíferos adultos (1, 2A, 2X e 2B). Enquanto a isoforma de MHC1 é encontrada em fibras de contração lenta, as demais (2A, 2X e 2B) são expressas em fibras de contração rápida (CHOI; KIM, 2009). Já em relação às isoformas de MLC, são vistas três isoformas de miosinas ELC, que incluem uma isoforma lenta (1s) e duas rápidas (1f e 3f), enquanto a miosina RLC apresenta duas isoformas, uma rápida (2f) e uma lenta (2s) (BOTTINELLI, 2001). As isoformas rápidas e lentas de MHC e MLC são expressas predominantemente em fibras de contração rápida e lenta, respectivamente. No que diz respeito às MLC, a maioria das fibras de contração rápida expressam isoformas rápidas de MLC2f, junto a MLC1f ou MLC3f, enquanto fibras de contração lenta expressam isoformas lentas de MLC1s e MLC2s (BICER; REISER, 2004).

Bicer e Reisner (2004) relatam a existência de um consenso entre os pesquisadores da área de que a composição de isoformas de MHC, numa fibra muscular, seria o fator determinante primário da máxima velocidade de encurtamento e da geração de força, enquanto as isoformas de MLC atuariam de forma complementar, influenciando a regulação dessas propriedades. Essas diferenças são encontradas tanto na comparação entre fibras de contração rápida e fibras de contração lenta, quanto entre os diferentes tipos de fibras de contração rápida (IIA, IIX e IIB). Junto a isso, é visto nas fibras tipo IIB, que contém a isoforma de MHC2B, os maiores valores de velocidade de encurtamento. Entretanto, não somente as isoformas de MHC, mas também as isoformas de ELC influenciam essas propriedades motoras. Como exemplo disso vemos que a velocidade de encurtamento aumenta de forma diretamente proporcional com a quantidade de MLC3f (CHOI; KIM, 2009).

O papel da miosina de cadeia leve alcalina em músculo esquelético ainda não está totalmente esclarecido, embora, em músculo liso, as cadeias alcalinas têm sido envolvidas no sítio ativo da molécula de miosina. Várias isoformas desta cadeia têm sido identificadas. Como foi citado anteriormente, estas isoformas estão associadas com diferentes tipos musculares e são codificadas por uma família de genes codificadores de miosinas de cadeia leve (BARTON E BUCKINGHAN, 1985). As isoformas rápidas de MLC são fortemente correlacionadas em estrutura, possuindo uma sequência carboxiterminal de 141 aminoácidos. O *locus MLC1f/3f (My1)* codifica duas miosinas alcalinas de cadeia leve MLC1f e MLC3f, cada uma possuindo promotores gênicos regulados diferencialmente (ZAMMIT *et al.*, 2008).

A literatura também mostra que existem significativas correlações entre o aumento de treinamento e a diminuição da isoforma MLC3f. No trabalho de Wahrman, Winard e Rieu (2001) o treinamento de resistência diminuiu, nas fibras rápidas, a quantidade das isoformas MLC3f e MLC2f, enquanto as isoformas MLC1s, MLC1f e MLC2s mostraram uma aumento na expressão, entretanto, no músculo Plantar, composto predominantemente por fibras lentas, a expressão de MLC3f aumentou. Na mesma pesquisa, os autores verificaram que no músculo Sóleo os animais treinados apresentaram uma diminuição das isoformas MLC1s, MLC2f e MLC3f, enquanto a isoforma MLC2s aumentou significativamente quando comparado aos controles sedentários.

Seene *et al.* (2005) investigaram mudanças na expressão de isoformas de miosinas de cadeia leve nos músculos Plantar e Extensor longo dos dedos de ratos em treinamento aeróbio. No seu trabalho, as variações no conteúdo relativo de isoformas não foram significativas. Estes autores sugerem que as mudanças nas isoformas durante o treinamento aeróbio indicam que outras proteínas miofibrilares participam na modulação do maquinário contrátil durante a adaptação ao treinamento aeróbio.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados alcançados com os nossos experimentos e, a partir da comparação desses dados com estudos descritos na literatura, podemos apresentar as seguintes conclusões:

- O teste de esforço máximo não mostrou sensibilidade suficiente para mensurar as melhoras no desempenho dos animais.
- O protocolo de exercícios de baixa intensidade apresenta uma maior habilidade em gerar os ajustes fisiológicos causados pelo treinamento aeróbio.
- O protocolo de identificação protéica utilizado mostrou uma excelente cobertura peptídica, indicando um alto grau de confiabilidade na técnica.
- Nove *spots* protéicos foram analisados por espectrometria de massa nos géis proteômicos. Neles foram identificadas proteínas estruturais, como as isoformas de miosina de cadeia Leve, a actina e a troponina I, e proteínas enzimáticas, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, aldolase e anidrase carbônica.
- Ocorreu variação significativa entre os diferentes tipos de iso-mioformas leves de miosina.
- Os resultados sugerem que as proteínas identificadas, mediante estudos quantitativos, poderiam vir a ser usadas como possíveis marcadores para o estudo da adaptação do músculo esquelético ao exercício aeróbio.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. **Nature**. v. 16, n. 402, p. 715-720, 1999.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4^a ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004.
- ALESSIO, H. M.; HAGERMAN, A. E.; NAGY, S.; PHILIP, B.; BYRNES, R. N.; WOODWARD, J. L.; CALLAHAN, P.; WILEY, R. L. Exercise improves biomarkers of health and stress in animals fed ad libitum. **Physiology & Behavior**. v.84, p. 65 – 72, 2005.
- ANDERSON, N. L.; MATHESON, A. D.; STEINER, S. Proteomics: applications in basic and applied biology. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 11, n. 4, p. 408, 2000.
- AOKI, M. S.; BELMONTE, M. A.; SEELAENDER, M. C. L. Influência da suplementação lipídica sobre a indução do efeito poupador de glicogênio em ratos submetidos ao exercício de “endurance”. **Rev. Paul. Educ. Fís**. v.2, n.17, p. 93-103, 2003.
- ATTAIX, D.; MOSONI, L.; DARDEVET, D.; COMBARET, L.; MIRAND, P. P.; GRIZARD. Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 37, p. 1962-73, 2005.
- BACURAU, A. V. N. **Caracterização fenotípica do Músculo Esquelético na Cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática**. Dissertação (Mestrado em educação física), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BAR, A.; PETTE, D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. **FEBS Letters**. v. 235, p. 153-155, 1998.
- BÁRÁNY, K.; BÁRÁNY, M.; GIOMETTI, C. S. Polyacrilamide gel electrophoretic methods in separation of structural muscle proteins. **Journal of Chromatography A**. v. 698, p. 301-32, 1995.
- BARTON, P. J.; BUCKINGHAM, M. E. The myosin alkali light chain proteins and their genes. **Biochemical Journal**, v. 231, n. 2, p. 249-61, 1985.
- BELLAVER, L. H.; VITAL, M. A.; ARRUDA, A. M. BELLAVAR, C. Efeitos da Dietilpropiona, energia da dieta e sexo sobre o ganho de peso corporal, peso dos órgãos e deposição de tecidos em ratos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, v. 45, n. 2, p.167-72, 2001.
- BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T. **2-D Electrophoresis. Principles and Methods**. Handbook from Amershan Biosciences. EDITA Vastra Aros, 2002.

BERTOLA, L. D.; OTT, E. B.; GRIEPSMA, S.; VONK, F. J.; BAGOWSKI, C. P. Developmental expression of the alpha-skeletal actin gene. **BMC Evolutionary Biology**. v. 8, 2008.

BEUERLE, J. R.; AZZAZY, H. M. E.; STYBA, G.; DUH, S. H.; CHRISTENSON, R. H. Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III and myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise, and myocardial infarction patient. *Clinica Chimica Acta*. v. 294, p. 115-128, 2000.

BICER, S.; REISER, P. J. Myosin light chain isoforms expression among single mammalian skeletal muscle fibers: species variations. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. v. 25, p. 623-633, 2004.

BICKEL, C.S.; SLADE, J.; MAHONEY, E.; HADDAD, F.; DUDLEY, G.A.; ADAMS, G.R. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. **J Appl Physiol**, v. 98, p. 482-8, 2005.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends Biotechnology**. v. 17, n. 3, p.121-7, 1999.

BLAKE, D. J.; WEIR, A.; NEWAY, S. A.; DAVIES, K. E. Function and genetics of Dystrophin and Dystrophin-related proteins in muscle. **Physiol. Rev.** v. 82, p. 291-329, 2002.

BOAVENTURA, G. L.; SILVA, R. H. L.; TOSTES, L. F.; AZEREDO, V. B. Ganho de peso, hemoglobina e hematócrito de ratos recebendo dieta de quissamã, RJ, com ou sem suplemento alimentar alternativo. **Rev. Nutr. Campinas**, v.16, n.3, p.321-31, 2003.

BOMPA, T. O. **Periodização: Teoria e Metodologia do Treinamento**. 4ª ed. São Paulo: Phorte editora, 2002.

BOTELHO, A. P.; SANTOS-ZAGO, L. F.; REIS, S. M. P. M.; OLIVEIRA, A. C. A Suplementação com ácido linoléico conjugado reduziu a gordura corporal em ratos wistar. **Rev. Nutr. Campinas**, v.18, n. 4, p.561-5, 2005.

BOTTINELLI, R. Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibers: do myosin isoforms tell the whole story. **Pflugers Arch**. v. 443, p. 6-17, 2001.

BOULEY, J.; CHAMBON, C.; PICARD, B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**. v. 4, p 1811-24, 2004.

BOWER, J. J.; CHI, X. Environmental health research in the post-genome era: new fields, new challenges, and new opportunities. **Journal Toxicology Environmental Health B Critical Review**. v. 8, n.2, p. 71-94, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v. 72, n. 7, p. 248-54, 1976.

BROWN, M. D.; Exercise and coronary vascular remodelling in healthy heart. **Exp. Physiol.** n. 88, p. 645-658, 2003.

BRUTON, A. Muscle plasticity. Response to training and detraining. **Physiotherapy.** v. 88, n. 7, p 398-407, 2002.

BURNISTON, J.G. Changes in the rat skeletal muscle proteome induced by moderate-intensity endurance exercise. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1784, p. 1077-1086, 2008.

CAMARGO FILHO, J. C. S.; VANDERLEI, L. C. M.; CAMARGO, R. C. T.; FRANCISCHETI, F. A.; BELANGERO, W. D.; PAI, V. D. Efeitos do esteróide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico através de natação: estudo histológico, histoquímico e morfométrico. **Rev Bras Med Esporte**, v.12, n.5, p. 243-247, 2006.

CAMARGO FILHO, J. C. S.; VANDERLEI, L. C. M.; CAMARGO, R. C. T.; OLIVEIRA, D. A. R.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. A.; PAI, V. D.; BELANGERO, W. D. Análise histológica, histoquímica e morfométrica do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico em esteira rolante. **Arq Ciênc Saúde**, v. 12, n. 3, p. 196-199, 2005.

CARLOS, P.S.; VASCONCELOS, J.P.L.; FERRAZ, A.S.M.; MACHADO, A.A.N.; CECCATTO, V.M. Comparação do ganho funcional a partir de um teste de esforço máximo em ratos Wistar submetidos a treinamento aeróbio de baixa e alta intensidade. **Coleção pesquisa em educação física.** v. 7, n. 2, p. 173-80, 2008.

CARVALHO, C. C.; MORAES, S. R. A.; CHALEGRE, S. T.; TASHIRO, T. Quantificação de capilares no tecido muscular esquelético em animais com insuficiência arterial periférica induzida submetidos a treinamento de endurance. **Acta. Cir. Bras.** v. 19, n. 5, 2004.

CARVALHO, P. C.; FISCHER, J. S. G.; SILVA, M. S. M.; MUSACCHIO, J.; SPECTOR, N.; DEGRAVE, W. M.; CARVALHO, M. G. C. Detection of potential serum molecular markers for Hodgkin's disease. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 3, p. 99-103, 2005.

CARVALHO, J. F.; MASUDA, M. O.; POMPEU, F. A. M. S. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.140, p. 409-413, 2005.

CARVALHO, T.; NOBREGA, A. C. L.; LAZZOLI, J. K.; MAGNI, J. R. T.; RESENDE, L.; DRUMMOND, F. A.; OLIVEIRA, M. A. B.; DE ROSE, E. H.; ARAÚJO, C. G. S.; TEIXEIRA, J. A. C. Posição oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: Atividade física e saúde. **Revista Brasileira Medicina Esportiva.** v. 2, n. 4, p.79-81, 1996.

CHOI, Y. M.; KIM, B. C. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. **Livestock Science**. v. 122, p. 105-118, 2009.

CIERO, L.; BELLATO, C. M. Proteoma: Avanços recentes em técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 5, n. 29, p. 158-164, 2002.

COFFEY, V.G.; HAWLEY, J. A. The molecular basis of training adaptation. **Sports Med**. v. 37, n. 9, p. 737-763, 2007.

CORTHALS, G. L.; NELSON, P. S. Large-scale proteomics and its future impact on medicine. **Pharmacogenomics Journal**. v. 1, n. 1, p. 15-19, 2001.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. n. 36, p. 40-46, 2006.

DENIPOTI, C. H.; MORAES, S. M. F. de; HERNANDES, L. Angiogênese e exercício. **Arq. Mudi**. n. 10, v. 2, p. 17-22, 2006.

DONOGHUE, P.; DORAN, P.; DOWLING, P.; OHLENDIECK, K. Differential expression of the fast skeletal muscle proteome following chronic low-frequency stimulation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1752, p. 166-76, 2005.

ERLANDSEN, H.; ABOLA, E. E.; STEVENS, R. C. Combining structural genomics and enzymology: completing the picture in metabolic pathways and enzyme active sites. **Curr. Opin. Struct. Biol**. v. 10, n. 6, p. 719-30, 2000.

EVANGELISTA, F. S.; BRUM, P. C.; KRIEGER, J. E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res**. v. 36, n. 12, 2003.

FEBBRAIO M.; KOUKOULAS, I. Hsp72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. **J. Appl. Physiol**. v.89, p.1055–60, 2000.

FERRAZ, A.S.M. **Estudo proteômico e fisiológico da resposta músculo-esquelética ao exercício físico em ratos**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

GELFI, C.; PALMA, S.; RIPAMONTI, M.; WAIT, R.; EBERINI, I.; BAJRACHARYA, A.; MARCONI, C.; SCHNEIDER, A.; HOPPELER, H.; CERRETELLI, P. New aspects of altitude adaptation in Tibetans: a proteomic approach. **The FASEB Journal**. v. 18, n. 3, 2004.

GILROY, S.J.; SALMONS, S.; PENNINGTON, S.R. Changes in nuclear protein composition in response to chronic electrical stimulation of skeletal muscle. **Electrophoresis**. v. 18, n. 5, p. 809-813, 1997.

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**, v. 85, n. 3, 2005.

GOBATTO, C. A.; ROSTOM DE MELO, M. A.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.130, p. 21-27, 2001.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SHEIBE, B.; WILDGRUBER, R. WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-53, 2000.

GUNNING, P.; WEINBERGER, R.; JEFFREY, P. Actin and tropomyosin isoforms in morphogenesis. **Anat. Embryol**. v. 195, p. 311-315, 1997.

GUSTAFSSON, T.; PUNTSCHART, A.; KAIJSER, L.; JANSSON, E.; SUNDBERG, J. Exercise induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors In human skeletal muscle. **Am. J. Physiol**. v.276, p. 679–85, 1999.

GUZMÁN-SILVA, M. A.; WANDERLEY, A. R.; MACÊDO, V. M.; BOAVENTURA, G. T. Recuperação da desnutrição em ratos mediante rações adicionadas ou não de suplemento alimentar e de vitaminas e minerais durante o período de crescimento. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 17, n. 1, p.59-69, 2004.

HOH, F. Y. Neural regulation of mammalian fast and slow muscle myosins. Electrophoretic analysis. **Biochemistry**, v. 14, n. 4, p. 742–747, 1975.

HOLLANDER, J.; FIEBIG, R.; GORE, M.; OOKAWARA, T.; OHNO, H.; JI, L.L. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.442, p.426–434, 2001.

ISAYAMA, R. N.; OISHI, J ; CAGNON, V. H. A.; CAMPOS, G. E. R. Effect of testosterone on skeletal muscle of young and old male rats. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 23, p. 247-253, 2006.

ISFORT, R.J.; HINKLE, R.T.; JONES, M.B.; WANG, F.; GREIS, K.D.; SUN, Y.; KEOUGH, T.W.; ANDERSON, N.L.; SHELDON, R.J. Proteomic analysis of the atrophying rat soleus muscle following denervation. **Electrophoresis**. v. 21, n. 11, p. 2228-2234, 2000.

ISFORT, R.J. Proteomic analysis of striated muscle. **Journal of Chromatography B**. v. 771, p. 155-165, 2002.

ISFORT, R.J.; WANG, F.; GREIS, K.D.; SUN, Y.; KEOUGH, T.W.; BODINE, S.C.; ANDERSON, N.L. Proteomic analysis of soleus and tibialis anterior muscle following immobilization. **Journal of Chromatography B**. v. 769, p. 323-332, 2002.

JEMIOLO, B.; TRAPPE, S. Single muscle fiber expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 320, p. 1043-1050, 2004.

JIN, J. P.; ZHANG, Z.; BAUTISTA, J. A. Isoform diversity, regulation, and functional adaptation of troponin and calponin. **Eukaryotic Gene Expression**. v. 18, n. 2, p. 93-124, 2008.

KELLER, T. C. S. Structure and function of Titin and Nebulin. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 7, p. 32-38, 1995.

KIM, D. L. Proteomic changes during the B cell development. **Journal Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci**. v. 815, n. 1-2, p. 295-303, 2005.

KIRAN, T. R.; SUBRAMANYAM, M. V. V.; DEVI, S. A. 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**, v. 137, p. 187-196, 2004.

KRAEMER, W. J.; HAKKINEN, K. **Treinamento de força para o esporte**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

KREGEL, K. C.; ALLEN, D. L.; BOOTH, F. W.; FLESHNER, M. R.; HENRIKSEN, E. J.; MUSCH, T. I.; O'LEARY, D. S.; PARKS, C. M.; POOLE, D. C.; RA'NAN, A. W.; SHERIFF, D. D.; STUREK, M. S.; TOTH, L. A. **Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols**. American Physiological Society. 2006.

LA GRECHE, A.; TAYLOR, A. J.; PRIOR, D. L. Athlete's heart: The potential for multimodality imaging to address the critical remaining questions. **J. Am. Coll. Cardiol**. v. 2, n. 3, 2009.

LAWLER, J. M.; POWERS, S. K.; HAMMEREN, J.; MARTIN, A. D. Oxygen cost of treadmill running in 24-month-old Fischer-344 rats. **Medicine Science Sports Exercise**. v.25, n.11, p. 1259-64, 1993.

LANCIONI, H.; LUCENTINI, L.; PALOMBA, A.; FULLE, S.; MICHELI, M. R.; PANARA, F. Muscle actin isoforms are differentially expressed in human satellite cells isolated from donors of different ages. *Cell Biology International*. v. 31, p. 180-185, 2007.

LINDSKOG, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. **Pharmacol. Ther.** v. 74, n. 1, p. 1-20, 1997.

MACHADO, A. A. N. **Estudo dos padrões Bioquímicos e Proteômicos de ratos executados aerobicamente**. Monografia (Especialização em Bioquímica Clínica e Biologia Molecular), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MACHADO, A. A. N.; FERRAZ, A. S. M.; OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; BARBOSA, R.; CECCATTO, V. M. Identificação de isoformas miosínicas estruturais

de músculo gastrocnêmio de ratos treinados e sedentários em gel bidimensional. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**. (Submetido para publicação), 2009.

MAHONEY, D.J.; PARISE, G.; MELOV, S.; SAFDAR, A.; TARNOPOLSKY, M.A. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. **FASEB J.** v. 19, n. 11, p. 1498-500, 2005.

MAHONEY, D.J.; TARNOPOLSKY, M.A. Understanding skeletal muscle adaptation to exercise training in humans: contributions from microarray studies. **Phys Med Rehabil Clin N Am.** v. 16, p. 859-873, 2005.

MACIEL, C. M.; JUNQUEIRA, M.; PASCHOAL, M. E.; KAWAMURA, M. T.; DUARTE, R. L.; CARVALHO, M. G.; DOMONT, G. B. Differential proteomic serum pattern of low molecular weight proteins expressed by adenocarcinoma lung cancer patients. **JETO**, v. 5, p. 21-28, 2005.

MARON, B.; PELLICCIA, A. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. **Circulation.** v. 144, p. 1633-1644, 2006.

MARSH, D.R. *et al.* Myogenic regulatory factors during regeneration of skeletal muscle in young, adult, and old rats. **J. Appl. Physiol.** v. 83, p. 1270-5, 1997.

MAUGHAN, R. Carbohydrate metabolism. **Surgery.** v. 27, n.1, 2008.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano.** 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MIYASAKA, K.; ICHIKAWA, M.; KAWANAMI, T.; KANAI, S.; OHTA, M.; SATO, N.; EBISAWA H.; FUNAKOSHI, A. Physical activity prevented age-related decline in energy metabolism in genetically obese and diabetic rats, but not in control rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, p. 183-90, 2003.

MURAKAMI, T.; SHIMOMURA, Y.; YOSHIMURA, A.; SOKABE, M.; FUJITSUKA, N. Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. **Biochim Biophys Acta.** v. 1381, p. 113-122, 1998.

MUTHUCHAMY, M.; RETHINASAMY, P.; WIECZOREK, D.F. Tropomyosin structure and function. New insights. **Trends Cardiovasc Med.** v. 7, n. 4, p. 124-28, 1997.

NADER, G.A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** v. 37, n. 10, p. 1985-1996, 2005.

NAKAO, C.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; MIYAZAKI, H.; HAGA, S.; SATO, Y.; JI, L. L.; OHNO, H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, p. 649-654, 2000.

NEUFER, P.; ORDWAY, G.; WILLIAMS, R.; Transient regulation of C-Fos, α B-crystallin, and hsp70 in muscle during recovery from contractile activity. **Am. J. Physiol.** v. 274, p. 341–6, 1998.

NOVELLI, M.; POCAI, A.; SKALICKY, M.; VIIDIK, A.; BERGAMINI, E.; MASIELLO, P. Effects on long-life exercise on circulating free fatty acids and muscle triglyceride content in aging rats. **Experimental Gerontology**, v. 39, p. 1333-40, 2004.

O'BRIEN, G. A.; CORBETT, J. M.; DUNN, M. J.; CUMMING, D. V.; MAY, A. J.; YACOUB, M. H. Electrophoretic analysis of electrically trained skeletal muscle. **Electrophoresis**. v. 13, n. 9-10, p. 726-728, 1992.

O'DONOVAN, C.; APWEILER, R.; BAIROCH, A. The human proteomics initiative (HPI). **TRENDS in Biotechnology**. v. 19, n. 5, 2001.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal Biological Chemistry**. v. 250, p. 4007-4021, 1978.

OKUMURA, N.; HASHIDA-OKUMURA, A.; KITA, K.; MATSUBAE, M.; MATSUBARA, T.; TAKAO, T.; NAGAI, K. Proteomic analysis of slow- and fast-twitch skeletal muscle. **Proteomics**. v. 5, p. 2896-2906, 2005.

OLIVEIRA, S. L.; DINIZ, D.B.; AMAYA-FARFAN, J. Metabolic changes induced by energy restriction and vitamin E supplementation in exercised rats. **Revista de nutrição**. v. 15, n. 3, p. 283–290, 2002.

PATE, R.R.; PRATT, M.; BLAIR, S.N.; HASKELL, W.L.; MACERA, C.A.; BOUCHARD, C.; BUCHENER, C.; ETTINGER, W.; HAETH, G.W.; KING, A.C.; et al. Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. **JAMA**. v. 273, n. 5, p. 402-7, 1995.

PAULIN, D.; LI, Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. **Experimental Cell Research**. v. 301, p. 1-7, 2004.

PETTE, D. Training effects on the contractile apparatus. **Acta Physiologica Scandinavica**. v. 162, p. 367-376, 1998.

PETTE, D.; VRBOVA, G. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? **Muscle Nerve**. v. 22, n. 6, p. 666-77, 1999.

PILEGAARD, H.; ORDWAY, G.A.; SALTIN, B.; NEUFER, P.D. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 279, p. 806–814, 2000.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P.D. Exercise induces transcriptional activation of the Pgc-1 α gene in human skeletal muscle. **J. Physiol**. v. 546, p. 851–858, 2003.

PINHEIRO, A. R.; CUNHA, A. R.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. M. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**. v. 17, n. 5, p. 365-75, 2007.

PITANGA, F. J. G. **Epidemiologia da Atividade Física, Exercício Físico e Saúde**. 2ª ed, São Paulo: Phorte editora, 2004.

PORTES, L. A.; TUCCI, P. J. F. O Treinamento físico por natação atenua o remodelamento miocárdico e congestão pulmonar em ratas Wistar com insuficiência cardíaca secundária a infarto do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 87, n. 1, p.54-9. 2006.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho**. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2000.

PUNTSCHART, A.; WEY, E.; JOSTARNDT, K. VOGT, M.; WITTER, M.; WIDMER, H.R.; HOPPELER, H.; BILLETER, R. Expression of *fos* and *jun* genes in human skeletal muscle after exercise. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 274, p. 129-137, 1998.

REDONDO, F. R. R. **Efeitos do uso de esteróides anabolizantes associados ao treinamento físico de natação sobre o fluxo sanguíneo para o miocárdio de ratos normotensos**. Dissertação (Mestrado em Educação Física), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

REGGIANI, C.; BOTTINELLI, R.; STIENEN, G. J. M. Sarcomeric myosin isoforms: fine tuning of a molecular motor. **News Physiol. Sci**. v.15, p. 26-33, 2000.

ROSS, M.H.; REITH, E.J. **Histologia: texto e atlas**. 2ª edição. São Paulo: Panamericana, 1993.

SEALE, P.; RUDNICKI, M.A. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. **Dev Biol**. v. 218, n. 2, p.115–24, 2000.

SHANG, X. L.; CHEN, S. Y.; REN, H. M.; LI, Y. X.; HUANG, H. Carbonic Anhydrase III: The new hope for the elimination of exercise-induced muscle fatigue. **Medical Hypotheses**. v. 72, p. 427-429, 2009.

SHISHKIN, S. S.; KOVALYOV, L. I.; KOVALYOVA, M. A. Proteomic studies of human and other vertebrate muscle protein. **Biochemistry (Moscow)**. v. 69, n. 11, p. 1283-1298, 2004.

SELIVANOV, V. A.; ATAURI, P.; CENTELLES, J. J.; CAFEDAU, J.; PARRA, J.; CUSSÓ, R.; CARRERAS, J.; CASCANTE, M. The changes in the energy metabolism of human muscle induced by training. **Journal of Theoretical Biology**. v. 252, p. 402-410, 2008.

SEENE, T.; ALEV, K.; KAASIK, P.; PEHME, A.; PARRING, A. M. Endurance training: volume-dependent adaptations changes in myosin. **International Journal of Sports Medicine**, v. 26, p. 815-821, 2005.

SILVA, E. da. **Histomorfometria e expressão de proteínas de choque térmico (HSP-70) em músculos estriados de ratos sedentários, treinados e submetidos ou não ao exercício exaustivo.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SOUZA, H. C. D.; PENTEADO, D. M. D.; MARTIN-PINGE, M. C.; BARBOSA NETO, O.; TEIXEIRA, V. P. A.; BLANCO, J. H. D.; SILVA, V. J. D. O bloqueio da síntese do óxido nítrico promove aumento da hipertrofia e da fibrose cardíaca em ratos submetidos a treinamento aeróbio. **Arq. bras. Cardiol.** v. 89, n. 2, p. 99-104, 2007.

SPRIET, L. L. Anaerobic metabolism in human skeletal muscle during short-term, intense activity. **Canadian Journal Physiology Pharmacology.** v. 70, n. 1, p. 157-65, 1992.

STROHMAN, R.C. Epigenesis: the missing beat in biotechnology? **Biotechnology (N Y).** v. 12, n. 2, p. 156-164, 1995.

STROHMAN, R.C. Linear genetics, non-linear epigenetics: complementary approaches to understanding complex diseases. **Integrated Physiology Behaviour Science.** v. 30, n. 4, p. 273-282, 1995.

SUN, H.; LIU, J.; DING, F.; WAG, X.; LIU, M.; GU, X. Investigation of differentially expressed proteins in rat gastrocnemius muscle during denervation-reinnervation. **J Muscle Res Cell Motil.** v. 27, p. 241-250, 2006.

TIMMERMAN, L.A.; CLIPSTONE, N.A.; HO, S.N.; NORTHROP, J.P.; CRABTREE, G.R. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca^{2+} signals and immunosuppression. **Nature.** v. 383, p. 837-840, 1996.

TORGAN, C.E.; DANIELS, M. Regulation of myosin heavy chain expression during rat skeletal muscle development in vitro. **Molecular Biology Cell.** v. 12, p. 1499-1508, 2001.

WADA, M.; INASHIMA, S.; YAMADA, T.; MATSUNAGA, S. Endurance training-induced changes in alkali light chain patterns in type IIB fibers of the rat. **Journal Applied Physiology.** v. 94, p. 923-929, 2003.

WAHRMANN, J.; WINARD, R.; RIEU, M. Plasticity of skeletal myosin in endurance – trained rats (I): A quantitative study. **European Journal of Applied Physiology,** v. 84, p.367-372, 2001.

WASINGER, V.C.; CORTHALS, G.L. Proteomic tools for biomedicine. **Journal of Chromatography B.** v. 771, p. 33-48, 2002.

WHITE, F. C.; BLOOR, C. M.; MCKIRNAN, M. D.; CARROLL, S. M. Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. **Appl Physiol.** v. 85, n. 3, p. 1160-1168, 1998.

WILKINS, M.R.; WILLIAMS K.L.; APPEL, L.D.; HOCHSTRASSER, D.F. **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics**. Berlin, Germany: Springer Verlag, 1997.

WILKINS, M.R.; GASTEIGER, E.; SANCHEZ, J.C.; APPEL, L.D.; HOCHSTRASSER, D.F. Protein identification with sequence tags. **Current. Biology**. v.6, p.1543–1544, 1996.

ZAMBON, A.C.; MCDEARMON, E. L.; SALOMONIS, N.; VRANIZAN, K. M.; JOHANSEN, K. L.; ADEY, D.; TAKAHASHI, J. S.; SCHAMBELAM, M.; CONKLIN, B. R. Time- and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle. **Genome Biology**. v. 4, p. 61-67, 2003.

ZAMMIT, P. S.; COHEN, A.; BUCKINGHAM, M. E.; KELLY, R. G. Integration of embryonic and fetal skeletal myogenic programs at the myosin light chain 1f/3f locus. **Developmental Biology**, v. 313, n. 1, p. 420-33, 2008.

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](#)