

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE TECIDO CARDÍACO DE  
RATOS COM DIFERENTE CAPACIDADE AERÓBICA  
INTRÍNSECA**

**LEONARDO PERIN RIBEIRO**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Dezembro de 2012

# **ANÁLISE PROTEÔMICA DE TECIDO CARDÍACO DE RATOS COM DIFERENTE CAPACIDADE AERÓBICA INTRÍNSECA**

**LEONARDO PERIN RIBEIRO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 17/12/2012 por:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Suely Gomes de Figueiredo – Orientadora, UFES

---

Prof. Dr. Wellington Lunz – Co-orientador, UFES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone da Fonseca Pires, UFMG

---

Prof. Dr. José Geraldo Mill, UFES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivanita Stefanon - Coordenadora do PPGCF, UFES

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

Vitória, Dezembro de 2012

---

Ribeiro, Leonardo Perin, 1982

Análise proteômica de tecido cardíaco de ratos com diferente capacidade aeróbica intrínseca. [Vitória] 2012

xiii, 84p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2012)  
Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF

---

I – Química de Proteínas

II – PPGCF/CCS/UFES

III – Análise proteômica de tecido cardíaco de ratos com diferente capacidade aeróbica intrínseca.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química de Proteínas do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, com apoio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória (FACITEC).
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).

## DEDICATÓRIA

À minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.  
Tenham certeza que sou eternamente grato e espero que gostem do resultado final.

## RESUMO

A capacidade ao exercício físico é um atributo complexo que envolve diferentes sistemas fisiológicos sob a influência de fatores genéticos e ambientais. Estudos relacionados à influência genética têm demonstrado que mais de 70% da capacidade ao exercício aeróbio é intrinsecamente determinada. Neste trabalho, foi utilizada uma abordagem proteômica comparativa por eletroforese em gel bidimensional (2D) acoplada à espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF), para investigar possíveis diferenças moleculares em nível de expressão protéica entre corações (ventrículo esquerdo - VE) de ratos com diferente capacidade aeróbica intrínseca. Utilizando um protocolo de teste de esforço máximo realizado em esteira motorizada, ratos foram separados em dois grupos, de acordo com a distância total percorrida (DTP): baixo desempenho de corrida (BDC) e alto desempenho de corrida (ADC). O desempenho dos animais ADC foi 3,5 vezes maior que o dos animais BDC. O perfil protéico dos VE revelou diferença na expressão de 29 spots protéicos ( $p < 0,05$ ) entre ADC e BDC, e 15 proteínas foram identificadas por MALDI-TOF/TOF (MS e MS / MS). Alterações robustas foram detectadas em proteínas envolvidas na resposta ao estresse, miofibrilares e citoesqueléticas. Foram encontradas diferenças na expressão de proteínas contráteis, como a isoforma  $\alpha$  da miosina de cadeia pesada-6, a miosina de cadeia leve-1 e a creatina quinase tipo M, mais expressas no VE dos animais ADC. Por outro lado, o VE dos animais BDC apresentou aumento na expressão de proteínas associadas à resposta ao estresse. Estes animais exibiram maior expressão da enzima antioxidante aldeído desidrogenase 2, e de proteínas de choque térmico ( $\alpha$ -cristalina cadeia B, a proteína de choque térmico  $\beta$ -2). Além disso, as proteínas do citoesqueleto, desmina e  $\alpha$ -actina, também apresentaram maior expressão nos animais deste grupo. Em conclusão, nossos resultados sugerem que o aumento dos níveis de proteínas contráteis em ratos ADC pode explicar, em parte, a maior capacidade destes ao exercício. A maior expressão de proteínas de estresse nos animais do grupo BDC sugere um elevado estresse no tecido cardíaco destes animais.

## ABSTRACT

Exercise capacity is a complex attribute that involves different physiological systems under the influence of both genetic and environmental factors. Related to genetic influence, results have shown that more than 70% of aerobic exercise capacity is intrinsically determined. In this work, a comparative proteomic approach, two-dimensional gel electrophoresis (2D) combined with MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry, was used to investigate possible molecular differences at the protein expression level between rats heart (left ventricle - LV) with distinct intrinsic exercise capacity. Low running performance (LRP) and high running performance (HRP) rats were categorized by a maximal exercise test protocol performed on a motor-driven treadmill, according to total distance performed (TDP). The running capacity of HRP rats was 3.5 fold greater than LRP rats. Protein expression profiling revealed 29 statistically significant ( $p < 0,05$ ) differences between HRP and LRP, and 15 of these proteins were identified by MALDI-TOF/TOF (MS and MS/MS). Robust alterations were detected in components involved in antioxidant and stress response, miofibrillar and cytoskeletal proteins. Contractile proteins were found to have special expression modification:  $\alpha$ -myosin heavy chain-6, myosin light chain-1 and creatine kinase up regulation in LV of HRP rats on patterns in HCR. In contrast, LV of LRP rats exhibited increase in abundance of protein associated with stress response. These animals exhibited enhanced expression of the antioxidant enzyme (aldehyde dehydrogenase 2), and heat shock proteins ( $\alpha$ -crystallin B chain, heat shock protein  $\beta$ -2). In addition, the cytoskeletal proteins, desmin and  $\alpha$ -actin, were upregulated in LCRs. In conclusion, our results suggest that the increased contractile proteins levels in HCRs rats may explain, in part, the improved exercise capacity. The increased stress protein expression in LCR suggests that the LV proteome of these animals are exposed to greater stress.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Fluxograma das etapas experimentais utilizadas neste estudo, para a análise proteômica 32
- Figura 2** – Histograma de distribuição das distâncias totais percorridas em teste máximo de corrida em esteira rolante (n = 73 ratos). BDC = Baixo desempenho de corrida (9 ratos). DCP = Desempenho de corrida padrão (55 ratos). ADC = Alto desempenho de corrida (9 ratos) 41
- Figura 3** – Perfil protéico de amostras de ventrículos esquerdos dos animais dos grupos BDC, DCP e ADC. Foram focalizadas alíquotas de 1000 µg de proteínas em “IPG strip” pl 3-10 não linear (NL) de 17 cm. As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando-se SDS-PAGE 12%. À esquerda dos géis encontram-se os valores que representam a massa molecular de proteínas utilizadas como padrão. (■) Imagens de referência 45
- Figura 4** – Análise de fatores. Gráfico de projeção dos géis analisados para delineamento dos grupos experimentais 47
- Figura 5** – Comparação do perfil protéico dos géis bidimensionais de referência dos grupos ADC e BDC. Os *spots* numerados e circundados com linha vermelha são os que apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) de volume entre os grupos. Os retângulos verdes mostram os *spots* com maior expressão e os amarelos mostram os *spots* com menor expressão no grupo ADC em relação ao grupo BDC. (\*) Proteínas identificadas por MS e MS/MS 48
- Figura 6** – Figura representativa da análise de um spot protéico diferencialmente expresso entre os grupos ADC e BDC 51

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Características dos animais dos grupos BDC, DCP e ADC.** Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média 43
- Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos séricos dos animais dos grupos selecionados (BDC, DCP e ADC)** 44
- Tabela 3 – Análise de reprodutibilidade das imagens dos géis intragrupos.** As imagens foram relacionadas com a imagem de referência de cada grupo 46
- Tabela 4 – Identidade dos spots protéicos diferentemente expressos entre os grupos BDC e ADC, por MS e MS/MS.** Homologia com a taxonomia *Rattus norvegicus* 49
- Tabela 5 – Dados das proteínas diferentemente expressas entre os grupos ADC e BDC** 50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Alto desempenho de corrida
BDC	Baixo desempenho de corrida
DCP	Desempenho de corrida padrão
VO <sub>2</sub> max	Medida do consumo máximo de oxigênio
LCR	Low-capacity runners
HCR	High-capacity runners
2DE	Eletroforese Bidimensional
IEF	Focalização Isoelétrica
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio)
MS	Espectrometria de Massas
m/z	Relação massa/carga
TFA	Ácido trifluoracético
IPG	Immobilized pH Gradient (gradiente de pH imobilizado)
GO	Gene Ontology
DIGE	Differential Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel Diferencial)
MALDI-TOF/TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight/Time of Flight (Ionização/Desorção a Laser assistida por Matriz – Tempo de Vôo/Tempo de Vôo)
DTT	Dithiothreitol
CHAPS	3-([3-cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-propanesulfonate
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
DTP	Distância Total Percorrida
VE	Ventrículo Esquerdo
NCBI nr	National Center for Biotechnology Information non-redundant (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não redundantes)
EPM	Erro Padrão da Média
CHCA	$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico)
BSA	Albumina Sérica Bovina
ACTH	Hormônio Adenocorticotrófico
TTF	Tempo Total até a Fadiga

$\alpha$ -MCP	Isoforma $\alpha$ da Miosina de Cadeia Pesada-6
CKMM	Creatina Quinase do tipo M
MCL-1	Miosina de Cadeia Leve-1
MCP	Miosina de Cadeia Pesada
MCL	Miosina de Cadeia Leve
CK	Creatina Quinase
CKmi	Creatina Quinase Mitocondrial
ALDH-2	Aldeído Desidrogenase 2 Mitocondrial
Cryab	$\alpha$ -B Cristalina
HSP $\beta$ 2	Proteína de Choque Térmico $\beta$ 2
sHSPs	Proteínas de Choque Térmico de Baixo Peso Molecular
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
MDA	Malondialdeido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Aspectos Éticos	29
3.2 Reagentes	29
3.3 Animais	29
3.4 Protocolos experimentais	30
<b>3.4.1 Protocolo de medida da capacidade intrínseca ao exercício</b>	<b>30</b>
<b>3.4.2 Seleção dos animais com diferente capacidade intrínseca ao exercício</b>	<b>31</b>
<b>3.4.3 Sacrifício dos animais e coleta de amostras</b>	<b>33</b>
<b>3.4.4 Dosagens bioquímicas</b>	<b>33</b>
<b>3.4.5 Obtenção do extrato protéico dos ventrículos esquerdos</b>	<b>33</b>
<b>3.4.6 Eletroforese bidimensional (2-DE)</b>	<b>34</b>
3.4.6.1 Focalização isoeletrica (1ª dimensão)	34
3.4.6.2 Redução e alquilação das proteínas eletrofocalizadas	34
3.4.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE (2ª dimensão)	35
<b>3.4.7 Aquisição, processamento e análise das imagens</b>	<b>35</b>
<b>3.4.8 Identificação das proteínas com diferença de expressão entre os grupos</b>	<b>36</b>
3.4.8.1 Digestão das proteínas, extração dos peptídeos e análise por espectrometria de massas	36
3.4.8.2 Pesquisa em banco de dados	38
3.5 Análise estatística	38

4 RESULTADOS	40
4.1 Seleção dos animais com diferente capacidade intrínseca ao exercício	40
4.2 Características dos grupos selecionados	40
4.3 Análise dos parâmetros bioquímicos	41
4.4 Análise comparativa dos géis bidimensionais dos extratos proteicos de VE	42
4.5 Identificação das proteínas	46
5 DISCUSSÃO	53
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ADENDO I	83
ADENDO II	84

# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1 INTRODUÇÃO

Os sistemas produtores de energia, em organismos vivos, podem ser classificados de acordo com a necessidade de oxigênio, em aeróbicos e anaeróbicos. Durante o processo evolutivo, sistemas bioquímicos e fisiológicos que utilizam o oxigênio atmosférico (sistemas aeróbicos), foram favorecidos pela seleção natural. Em organismos multicelulares, que incluem os animais, a maior parte da produção de energia metabólica é obtida por sistemas aeróbicos. Um metabolismo aeróbico eficiente parece ser determinante para o bom funcionamento destes organismos, e deficiências neste sistema produtor de energia podem resultar em sérios prejuízos e danos biológicos.

Diversos estudos clínicos têm demonstrado disfunções no metabolismo de oxigênio e energético em diversos tipos de doenças (Koch e Britton, 2008). Por exemplo, em 2003, Petersen e colaboradores demonstraram que a resistência à insulina, em idosos, pode ser associada à uma queda de 40% das atividades oxidativas mitocondriais (Petersen *et al.*, 2003). A capacidade aeróbica é uma característica complexa definida como a eficiência de utilização do oxigênio atmosférico como aceptor final de elétrons em processos de transferência de energia (Ways *et al.*, 2002); e, a capacidade aeróbica máxima ajustada para o tamanho e para a composição corporal é definida como aptidão física e é uma medida integrada das funções cardiorrespiratória, neuromuscular esquelética e de transporte e distribuição de oxigênio (Erikssen, 2001).

Estudos epidemiológicos demonstraram que indivíduos com altos níveis de aptidão física apresentam menores índices de mortalidade, principalmente por menor incidência de doenças cardiovasculares e de câncer (Blair *et al.*, 1989), e que níveis baixos de capacidade aeróbica estão associados com aumento nos índices de doenças cardiovasculares e com maior taxa de mortalidade (Blair *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2003). Em um trabalho recente, Koba e colaboradores (2011) demonstraram que indivíduos com baixa capacidade aeróbica, inaptidão física e baixos níveis de



atividade física, aumentam o risco de desenvolvimento de síndrome metabólica, diabetes tipo 2, hipertensão arterial e doença arterial coronariana. A capacidade aeróbica ao exercício tem sido considerada como um preditor mais importante de mortalidade, quando comparado a outros fatores de risco, para doenças cardiovasculares (Myers *et al.*, 2002, Leeper *et al.*, 2012). Dessa forma, a manutenção dos níveis de capacidade aeróbica em patamares satisfatórios mostra-se de fundamental importância.

A capacidade aeróbica de um indivíduo pode ser aferida por diversos testes. O índice mais utilizado é a medida do consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ) que pode ser aferido por meio de testes de esforço físico específicos (Levine, 2008). O  $VO_{2max}$  é definido como a maior taxa na qual o oxigênio pode ser captado e utilizado pelo corpo durante exercício de alta intensidade (Bassett e Howley, 2000). Esse índice tem sido utilizado como medida da capacidade de desempenho de exercício (di Prampero, 2003) e como marcador de aptidão física e de doenças cardiovasculares de base populacional (LaMonte *et al.*, 2006).

Entretanto, alguns fatores como a capacidade de difusão pulmonar, o débito cardíaco máximo, a capacidade sanguínea de carreamento de oxigênio, e a capacidade dos músculos esqueléticos de captarem e utilizarem o oxigênio, limitam o  $VO_{2max}$  e comprometem o desempenho físico (Bassett e Howley, 2000). Estudos têm demonstrado que o principal fator limitante da capacidade física aeróbica é a manutenção de um débito cardíaco específico e suficiente, para que o aporte sanguíneo supra as demandas energéticas teciduais em situações de repouso e de atividade física extenuante (Costill *et al.*, 1973; Hussain *et al.*, 2001). Considerando o papel essencial do coração na determinação da capacidade aeróbica, a investigação de seus fundamentos no tecido cardíaco em nível molecular mostra-se de fundamental importância para o avanço do conhecimento e geração de dados na área de fisiologia cardiovascular.

Estudos em humanos demonstraram que dois substratos genéticos contribuem para

a variação fenotípica natural da capacidade aeróbica de um organismo: (1) genes que determinam a variação da capacidade aeróbica no estado não-treinado (Klissouras, 1971; Bouchard *et al.*, 1986), a qual é denominada capacidade aeróbica intrínseca (Troxell *et al.*, 2003), (2) conjunto de genes que aparentemente é responsável pela resposta adaptativa ao exercício físico (Bouchard *et al.*, 1999; Bouchard *et al.*, 2000). Assim, a capacidade aeróbica de um organismo é o resultado da soma das expressões gênicas intrínsecas e adaptativas, à medida que interagem com o ambiente (Koch e Britton, 2001).

Como descrito acima, a capacidade aeróbica de um organismo é de origem poligênica, e subsequentemente influenciada por diversos fatores ambientais (Koch *et al.*, 1998). Bouchard e colaboradores (1986), ao estudarem o desempenho físico de gêmeos mono e dizigóticos, mostraram que vários aspectos da capacidade física ao exercício são devidos a componentes genéticos. Estudos realizados tanto em humanos quanto em animais experimentais, demonstraram que o componente genético é responsável por 70 a 90% de toda a da variação na capacidade aeróbica (Henderson *et al.*, 2002). Dada a relevância da capacidade aeróbica para a saúde e sobrevivência dos indivíduos e tendo seu componente intrínseco papel fundamental em sua determinação, demonstra-se ser de grande importância a identificação do substrato genético que governa a diferença entre baixo e alto desempenho de capacidade aeróbica (Koch *et al.*, 1998).

Na tentativa de identificar os genes responsáveis pelas diferenças de capacidade aeróbica, vários trabalhos têm sido desenvolvidos para obter animais experimentais (ratos) que sirvam de modelos genéticos de resistência aeróbica intrínseca. Em um trabalho, Koch e colaboradores (1998), a partir de um modelo de seleção artificial baseado no desempenho de ratos sedentários em teste de corrida em esteira (capacidade aeróbica intrínseca), separaram estes animais em dois grupos: ratos com baixa capacidade para corrida (LCR – *low-capacity runners*) e ratos com alta capacidade para corrida (HCR – *high-capacity runners*).

Após serem separados, estes grupos de animais foram cruzados somente entre si formando as linhagens LCR e HCR (Koch *et al.*, 1998). A capacidade de corrida dos animais HCR foi 3,5 vezes maior que a dos LCR (capacidade aeróbica avaliada por meio de teste de corrida até a exaustão) após onze gerações das duas linhagens (Wisløff *et al.*, 2005). Além dessa grande diferença na capacidade aeróbica, os animais pertencentes às linhagens LCR e HCR apresentam substanciais diferenças em alguns parâmetros séricos. Ratos da linhagem LCR apresentaram níveis maiores de glicose, insulina, ácidos graxos e triglicérides em jejum, quando comparados aos ratos HCR (Wisløff *et al.*, 2005).

Por sua vez, os animais HCR têm maior  $VO_{2max}$  (Wisløff *et al.*, 2005), maior capacidade de transporte e utilização de oxigênio no músculo esquelético (Howlett *et al.*, 2003), maior resistência à dieta rica em gordura (Noland *et al.*, 2007), maior atividade osteoblástica em resposta à ovariectomia (Goulet *et al.*, 2011), maior capacidade oxidativa mitocondrial hepática (Thyfault *et al.*, 2009), maior volume de ejeção e débito cardíaco (Hussain *et al.*, 2001); maior amplitude do transiente de cálcio, além de contração e relaxamento sarcoméricos mais rápidos, em cardiomiócitos isolados (Palpant *et al.*, 2009; Wisløff *et al.*, 2005) e maior eficiência na produção energética (Bye *et al.*, 2008), dentre outras diferenças.

As diversas diferenças bioquímicas e fisiológicas descritas acima entre animais LCR e HCR, levaram pesquisadores a considerar que a linhagem LCR constitui um modelo de síndrome metabólica associado à prevalência de fatores de risco cardiovasculares (Wisløff *et al.*, 2005). Em um trabalho recente, Koch e colaboradores (2011) demonstraram que a obtenção destas linhagens, depois de várias gerações, aprimoraram as características fisiológicas e bioquímicas descritas para os animais HCR, os quais apresentavam diferenças significativas na longevidade, sendo mais longevos em relação aos LCR (Koch *et al.*, 2011).

Embora diversos estudos demonstrem as diferenças bioquímicas e fisiológicas entre ratos das linhagens LCR e HCR, apenas poucos têm se preocupado com as

diferenças em animais com capacidade aeróbica distinta, mas que não passaram por processo de seleção artificial, ou seja, obtidos somente por separação em teste de corrida em esteira. Em um estudo utilizando ratos com capacidade aeróbica intrínseca diferente (obtidos somente por separação em teste de corrida em esteira), Prímola-Gomes e colaboradores (2009) demonstraram que animais com alto desempenho apresentaram maior transiente de cálcio e maior amplitude de contração dos cardiomiócitos em relação aos animais com desempenho padrão, além de diferenças na expressão de proteínas envolvidas no manejo do cálcio nestas células, como a cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) e o receptor de rianodina do tipo 2 (RyR2).

Em um estudo recente, Burniston e colaboradores (2011) utilizaram uma abordagem proteômica para identificar diferenças no proteoma de tecido cardíaco de animais LCR e HCR da 22ª geração dessas linhagens. O termo proteoma surgiu em meados da década de 90 e foi definido, inicialmente, como o complemento protéico total expresso por um genoma, por uma célula ou por um tipo de tecido (Wilkins *et al.*, 1996). Como é bem conhecido, o genoma dos organismos pode gerar centenas de milhares de produtos (proteínas) codificados por diferentes genes.

A idéia de que um gene codifica somente uma proteína parece ultrapassada, dada a influência de processos como “splicing” alternativo do mRNA e modificações protéicas pós-traducionais (McGregor e Dunn, 2006). Fosforilações, glicosilações, acetilação, ribosilação e proteólise são alguns exemplos de modificações pós-traducionais das proteínas, as quais aumentam a heterogeneidade molecular e a diversidade dos produtos gênicos (Jensen, 2006). Considerando esta observação, uma visão mais atual e abrangente foi elaborada por Arrell e colaboradores (2001) para definir o termo proteoma: proteoma consiste no conjunto de todas as proteínas presentes em uma célula ou em um organismo, num dado momento, incluindo não somente aquelas traduzidas diretamente a partir do material genético, mas também as proteínas modificadas a partir de “splicing” alternativo, processamento pós-traducional, ou de uma combinação de ambos, resultando em modificações que têm

o potencial de alterar a estrutura e/ou a função protéica. Dessa forma, o proteoma não pode ser diretamente previsto a partir de informações do genoma (Apweiler *et al.*, 2009).

Enquanto o genoma é relativamente constante, o proteoma se modifica de acordo com as interações momento-a-momento, entre o genoma e o ambiente (Arab *et al.*, 2006). O proteoma é altamente dinâmico e varia de acordo com o tipo e o estado funcional da célula, podendo refletir mudanças características e imediatas, em resposta, por exemplo, a estímulos externos e a processos patológicos (Apweiler *et al.*, 2009). Assim, a análise do proteoma mostra-se significativamente mais estimulante e complexa do que o sequenciamento do genoma (Rotilio *et al.*, 2012).

Para a análise de um determinado proteoma, utiliza-se de uma das abordagens proteômicas. O termo proteômica representa um amplo grupo de tecnologias decorrentes de métodos físico-químicos de análise de proteínas e envolve: métodos de separação e análise de proteínas (cromatografias, focalização isoeletrica, eletroforeses e espectrometria de massas) e bioinformática (Van Eyk, 2011). A associação dessas tecnologias tem contribuído para a caracterização de grande parte das proteínas presentes em organismos vivos e para a análise de proteomas complexos (Rotilio *et al.*, 2012).

A proteômica é um campo que vem se expandindo rapidamente e que tem o objetivo de estudar sistematicamente a estrutura, a função, as dinâmicas e as interações protéicas (Jensen, 2006), analisando o conjunto de proteínas expressas por um sistema biológico em resposta a vários estímulos, e/ou sob diferentes condições fisiológicas ou patológicas (Macri e Rapundalo, 2001).

Corretamente aplicada, a proteômica fornece aos pesquisadores “inventários protéicos celulares” em momentos específicos, tornando-se ferramenta ideal para a documentação das modificações protéicas fruto de determinada doença, condição

ou tratamento (Arrell *et al.*, 2001). Tecnologias proteômicas já estabelecidas, juntamente a novas e alternativas estratégias atualmente em desenvolvimento, estão tornando possível o estudo de importantes questões em biomedicina (McGregor e Dunn, 2006). A proteômica claramente revelou mudanças notáveis e dinâmicas em nível celular, muitas das quais nunca haviam sido observadas (Arrell *et al.*, 2001). A triagem protéica em larga escala, possibilitada pela análise proteômica, permite a execução de estudos sobre expressão protéica impossíveis de serem realizadas utilizando-se somente as técnicas clássicas de biologia molecular, as quais possibilitam a análise da expressão de somente uma ou poucas proteínas, em certo momento (Vercauteren *et al.*, 2007).

Vercauteren e colaboradores (2007) apontam três vantagens fundamentais da abordagem proteômica em relação às técnicas mais tradicionais. Primeiro, as técnicas utilizadas nessa abordagem permitem a análise de milhares de proteínas simultaneamente, em inúmeros tecidos ou organelas, sob diversas condições fisiológicas. Segundo, não são impostas limitações referentes às proteínas analisadas em relação às suas funções celulares ou ao seu papel específico em vias de transdução de sinais. Assim, esses estudos permitem a investigação de proteínas ou populações de proteínas que não são previamente relacionadas a certas condições fisiológicas, permitindo a descoberta de novos mecanismos moleculares. Além disto, estudos proteômicos não são limitados a proteínas que já foram previamente caracterizadas, eles permitem a investigação de conexões entre certas condições fisiológicas e novas proteínas. Terceiro, a alta sensibilidade das tecnologias proteômicas permite estudos de triagem em larga escala utilizando uma pequena quantidade de proteína (Vercauteren *et al.*, 2007).

Parece determinante que os campos da genômica e da proteômica direcionam novas iniciativas de pesquisa. Várias novas abordagens ômicas têm surgido (transcriptômica, fosfoproteômica, secretômica e metabolômica), as quais são fundamentais para a elucidação do papel funcional dos genes e de seus produtos, contribuindo para o entendimento do envolvimento destes em fenótipos

biologicamente relevantes, relativos ou não a doenças (Baldwin, 2000; McGregor e Dunn, 2006).

Visando tal contribuição, é necessária uma evolução constante das tecnologias proteômicas para lidar com questões como, por exemplo, o controle e a regulação das funções, localizações e interações protéicas, em células e tecidos (Jensen, 2006). De acordo com Aldred e colaboradores (2004), analisar o proteoma de uma amostra biológica requer não somente tecnologia especializada, mas também perícia por parte do pesquisador. Uma abordagem proteômica básica é composta pelas seguintes etapas: preparo das amostras, separação das proteínas, aquisição de imagens e identificação das proteínas (Lam *et al.*, 2006).

A eletroforese bidimensional (2DE) é uma das técnicas utilizadas para separação de misturas protéicas complexas (Macri e Rapundalo, 2001). Esta técnica foi desenvolvida há mais de 30 anos por O'Farrell (1975) e Klose (1975), sendo, desde então, aperfeiçoada. Basicamente, pela 2DE as proteínas são separadas em duas etapas (dimensões): 1ª dimensão (IEF - focalização isoelétrica), nesta as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (propriedades de carga) sob condições desnaturantes; seguida pela 2ª dimensão (SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio), onde a separação ocorre de acordo com sua massa molecular relativa (McGregor e Dunn, 2006; Görg *et al.*, 2004).

Um dos maiores desafios na análise por 2DE é o quão bem resolvidas estão as proteínas e quantas estão visíveis (Aldred *et al.*, 2004). Dependendo do tamanho do gel e do gradiente de pH utilizado, a 2DE pode resolver mais de 5000 proteínas simultaneamente, e pode-se detectar <1 ng de proteína por *spot* (Görg *et al.*, 2004). Assim, a 2DE tem a capacidade de analisar simultaneamente mudanças na expressão de centenas a milhares de proteínas, permanecendo incomparável como uma abordagem de expressão protéica aberta (McGregor e Dunn, 2006).

Após a revelação do gel bidimensional, uma imagem digital do perfil protéico é produzida e a análise das imagens dos diferentes perfis é executada utilizando-se software especializado, que é capaz de quantificar o tamanho e a intensidade dos *spots* protéicos (Lam *et al.*, 2006). Os estudos proteômicos tipicamente envolvem a comparação das imagens de géis entre grupos experimentais distintos para a identificação de expressão protéica diferencial, e, uma vez detectados os *spots* protéicos de interesse, estes serão então processados para posterior identificação protéica (Lam *et al.*, 2006), a qual será realizada por análise de espectrometria de massas (MS).

Constantemente melhorados, os métodos de MS são amplamente utilizados em estudos proteômicos (Pietrowska e Widłak, 2012). A proteômica baseada em MS se tornou um importante componente da pesquisa clínica e biológica (Apweiler *et al.*, 2009). A MS é uma metodologia que está evoluindo rapidamente, neste método as proteínas ou peptídeos tornam-se espécies carregadas que podem ser separadas com base em sua razão massa/carga ( $m/z$ ) (Loscalzo, 2003).

É evidente que uma única tecnologia proteômica não é capaz de resolver todas as enormes dificuldades analíticas relacionadas à identificação, quantificação e caracterização de um proteoma complexo, dada a enorme faixa de abundância relativa de proteínas e a necessidade de identificação das modificações pós-traducionais que ocorrem nos resíduos de aminoácidos (Rotilio *et al.*, 2012). Deve-se optar pelo uso das variadas tecnologias disponíveis para que as análises proteômicas executadas consigam contribuir para o melhor entendimento dos processos estudados.

Vários são os campos de pesquisa que utilizam análises proteômicas para aprofundar o conhecimento acerca de suas questões específicas, dentre estes o cardiovascular (Garnero, 2009; Moore e Weeks, 2011; Ghidoni *et al.*, 2011; Zong *et al.*, 2012). Estudos proteômicos aplicados à pesquisa cardiovascular estão evoluindo rapidamente e prospectam que novas descobertas irão ocorrer à medida que a



comunidade científica adotar e utilizar a análise proteômica em seus estudos (Van Eyk, 2011). O primeiro estudo a utilizar uma abordagem proteômica para análise de tecido cardíaco data do fim da década de 90 (Arnott *et al.*, 1998). Desde então, houve um aumento contínuo do número de publicações (no *PubMed*) de estudos cardiovasculares que utilizaram essa abordagem (Van Eyk, 2011).

A incorporação de novas tecnologias e a aplicação coordenada das variadas abordagens proteômicas disponíveis, poderão ajudar a desvendar as complexas modificações no proteoma nos cenários de doenças cardiovasculares (Arrell *et al.*, 2001). Essas abordagens têm sido fundamentais para o descobrimento de novos mecanismos patofisiológicos de doenças cardiovasculares, envolvendo interações proteína-proteína e modificações pós-traducionais (Suzuki e Nagai, 2007). As análises proteômicas realizadas em tecido cardíaco, tanto de pacientes humanos quanto de modelos animais experimentais, estão fornecendo novas percepções acerca dos mecanismos envolvidos em disfunções cardíacas (McGregor e Dunn, 2006). Dessa forma, a proteômica está se tornando integrada e incorporada à pesquisa cardiovascular, e assim, impactará em novas descobertas (Van Eyk, 2011).

Essa estratégia também vem sendo utilizada para a pesquisa na área da fisiologia do exercício para melhor compreensão dos efeitos do exercício físico sobre tecidos específicos. Estes estudos emergiram dada a necessidade de se investigar mais profundamente os mecanismos em nível molecular das adaptações fisiológicas promovidas pelo exercício. No início da última década, Baldwin (2000) já apontava a proteômica como um campo emergente de pesquisa que poderia contribuir para o avanço do entendimento acerca dos mecanismos envolvidos nas adaptações orgânicas ao exercício físico. O estudo pioneiro que utilizou a abordagem proteômica para analisar os efeitos do exercício físico foi desenvolvido por Yuan e colaboradores (2004), que demonstraram o efeito do exercício físico voluntário sobre o proteoma do soro de camundongos.

Desde então, foram realizados diversos estudos sobre desempenho físico utilizando a abordagem proteômica. Utilizando esta abordagem, os efeitos do exercício físico foram investigados em diferentes modalidades, como corrida (Boluyt *et al.*, 2006) e natação (Sun *et al.*, 2008), em diferentes intensidades de exercício (Guelfi *et al.*, 2006; Burniston, 2008) e analisando diferentes tipos de tecidos (Ding *et al.*, 2006; de Moraes *et al.*, 2008; Burniston, 2009). Como a aquisição de amostras de humanos é um fator limitante, já que geralmente envolve procedimentos invasivos como biópsias (Petritz *et al.*, 2012b), poucos estudos investigaram alterações proteômicas em humanos, tendo como exemplos os estudos de Holloway e colaboradores (2009) e Yang e colaboradores (2010).

A necessidade de aplicar as tecnologias proteômicas no estudo da fisiologia do exercício é apontada como fundamental para o desenvolvimento desta área de conhecimento e pode aumentar o entendimento sobre os efeitos do exercício físico em mamíferos (Brooks, 2007; Hittel *et al.*, 2007; Petritz *et al.*, 2012b).

As possibilidades apresentadas pela abordagem proteômica e a importância do estudo acerca da capacidade aeróbica intrínseca ao exercício físico descritas anteriormente, fundamentaram o desenvolvimento desse projeto. O objetivo foi comparar o perfil de expressão protéica do tecido cardíaco de animais com diferentes capacidades aeróbicas intrínsecas, por eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas, visando detectar proteínas diferencialmente expressas, as quais podem desvendar mecanismos moleculares associados ao desempenho físico e contribuir de forma importante para a compreensão dos determinantes da capacidade aeróbica intrínseca.

## **OBJETIVOS**

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Identificar proteínas diferencialmente expressas em tecido muscular cardíaco de ratos com diferente capacidade aeróbica intrínseca por eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Selecionar animais com diferentes fenótipos de capacidade aeróbica intrínseca;
- Obter o padrão protéico bidimensional do ventrículo esquerdo dos animais com diferentes fenótipos de capacidade aeróbica intrínseca;
- Identificar proteínas diferencialmente expressas entre os animais com diferentes fenótipos de capacidade aeróbica intrínseca, por espectrometria de massas;
- Inferir a função biológica das proteínas identificadas por homologia com proteínas previamente caracterizadas, depositadas em banco de dados internacionais.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos

A utilização dos animais para o desenvolvimento deste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, sob registro no CEP, protocolo nº 079/2011.

#### 3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram: bicarbonato de amônio e acetonitrila grau HPLC da Merck S.A. (Brasil); ácido fórmico, ácido trifluoracético (TFA), Coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250) e coquetel inibidor de proteases (para células de mamíferos e extratos de tecidos) da Sigma-Aldrich (EUA); anfólitos (Bio-Lyte 3-10), uréia, tiras com gradiente linear de pH imobilizado (IPG *strip* - Immobilized pH gradient), 3-([3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), dithiothreitol (DTT) e padrão de peso molecular para SDS-PAGE (Broad Range) da Bio-Rad Laboratories Inc. (EUA); tiouréia, hidroximetil aminoetano (Tris), glicerol, iodoacetamida, glicina, kit de dosagem de proteína (2-D Quant Kit) e tampão de reidratação (Destreak) da GE Healthcare (Reino Unido); sodium dodecyl sulfate (SDS) da J.T. Baker (EUA); solução de acrilamida-bis (Acrylamide/Bis Solution – 37,5:1 (30%T, 2.6%C)) da Serva Electrophoresis (Alemanha); agarose da BioAmérica Inc (EUA); matriz  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) da Aldrich, (EUA); e tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade) da Promega (EUA). As soluções utilizadas foram preparadas com água purificada em sistema Milli-Q.

#### 3.3 Animais

Foram utilizados ratos Fischer com dez semanas de idade, pesando  $252,0 \pm 2,7$  g no início dos procedimentos experimentais. Os animais (83 ratos), provenientes do Biotério da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcelo Eustáquio da Silva. Os animais foram

mantidos em gaiolas de polipropileno (cinco por caixa) com dimensões de 58 x 49 x 20 cm, e com acesso à água e ração *ad libitum* em ciclo claro/escuro de 12 h. Todos os experimentos seguiram as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal.

### **3.4 Protocolos experimentais**

A figura 1 mostra o fluxograma das etapas experimentais utilizadas.

#### **3.4.1 Protocolo de medida da capacidade intrínseca ao exercício**

A medida da capacidade intrínseca ao exercício foi realizada de acordo com protocolo de Koch e Britton (2001), com algumas modificações. A avaliação foi baseada na distância total percorrida (DTP) pelos animais em um teste de corrida contínua progressivo até a fadiga, em esteira específica para roedores (Insight, EP 131, Brasil). Na semana anterior aos testes (semana 1), os animais foram familiarizados à esteira por cinco dias consecutivos em seções de 5 min/dia (5° de inclinação e estímulo elétrico de 150V de corrente alternada e 3mA<sup>1</sup>) com velocidades de  $\approx$  11; 11; 13; 13; 15 m/min, nos respectivos dias.

Durante a semana de familiarização, as velocidades e o tempo de exposição à esteira foram utilizados de modo a não produzirem modificação mensurável na capacidade aeróbica (Baldwin *et al.*, 1977; Dudley *et al.*, 1982). Os animais que não se adaptaram à esteira foram excluídos do estudo. Os animais que foram considerados aptos (conseguiram correr por cinco minutos em velocidade de 15 m/min no último dia de adaptação) foram submetidos ao teste de corrida contínua progressivo até a fadiga (exaustão) durante cinco dias consecutivos (velocidade inicial da esteira de  $\approx$  12 m/min, 5° de inclinação, estímulo elétrico de 150V de corrente alternada e 3mA) a partir do primeiro dia da semana de testes (semana 2). A velocidade da esteira era gradativamente aumentada em  $\approx$  2m/min a cada 2 min. A exaustão foi definida quando, pela terceira vez consecutiva, o rato não

---

<sup>1</sup> Dado retirado de Dantas (2008).

acompanhava a velocidade da esteira e permanecia em contato com a grade de choque por pelo menos dois segundos (Hussain *et al.*, 2001). O tempo decorrido em cada estágio até a fadiga, e a velocidade da esteira em cada estágio e no momento da fadiga foram utilizados para determinar a DTP pelo animal em cada teste diário, de acordo com a equação:

$$DTP = 2v_1 + 2v_2 + \dots + tv_f$$

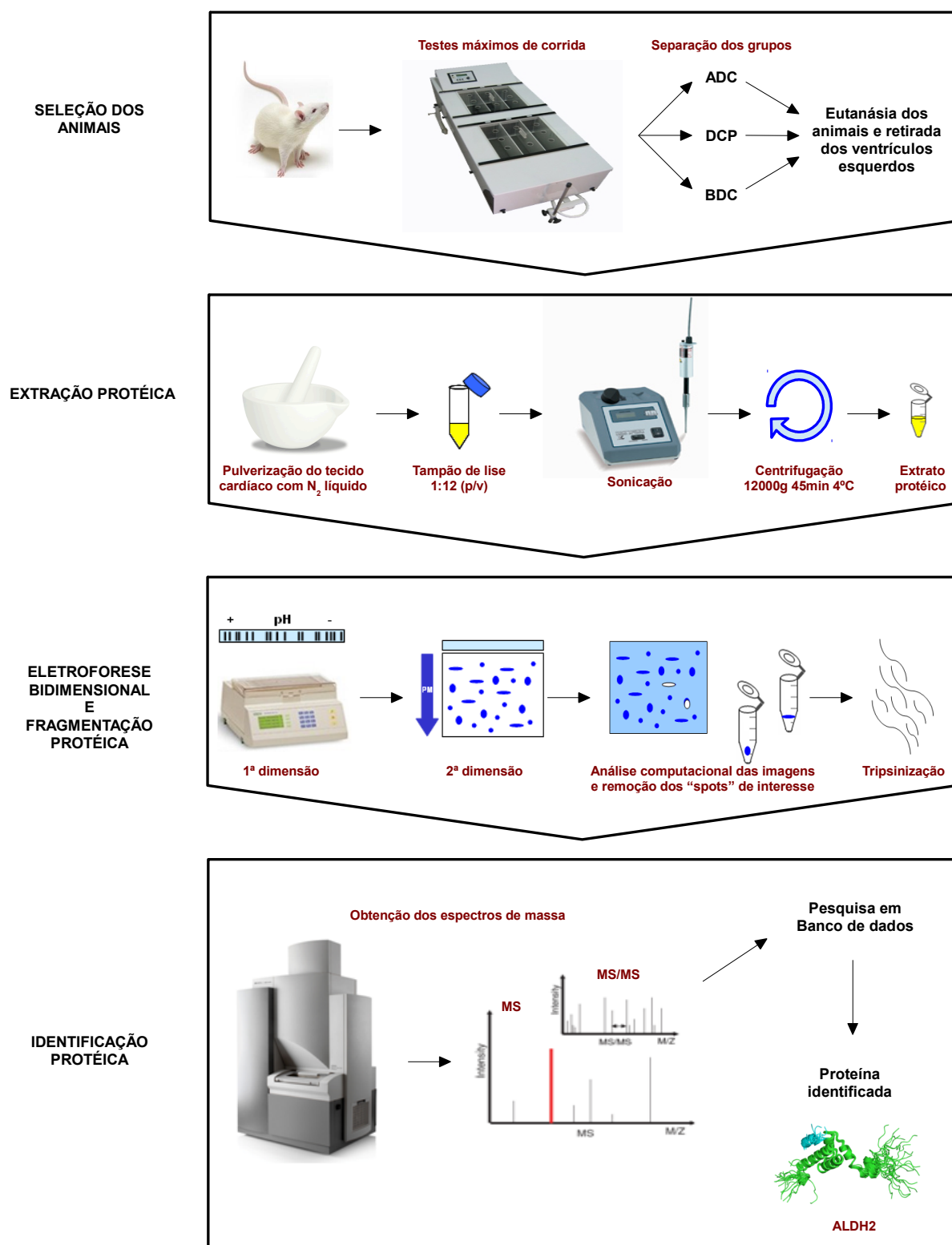
- DTP = distância total percorrida
- $v_1, v_2$  = velocidades nos estágios 1 e 2
- $v_f$  = velocidade no estágio final
- $t$  = tempo de duração do estágio final

A melhor DTP alcançada dentre os cinco dias foi considerada como o mais próximo de sua capacidade aeróbica intrínseca ao exercício de corrida (Hussain *et al.*, 2001), sendo este o valor o utilizado para construção de um histograma de distribuição. A velocidade da esteira rolante foi aferida por um tacômetro digital portátil de contato (Instrutherm, TD-706, Brasil).

#### **3.4.2 Seleção dos animais com diferente capacidade intrínseca ao exercício**

Para seleção dos animais e definição dos grupos quanto à capacidade aeróbica intrínseca, foi construído um histograma com a distribuição das DTP, considerando-se somente a melhor DTP de cada um dos animais, de acordo com Koch e Britton (2001). A partir do histograma, três grupos experimentais foram selecionados: ratos com baixo desempenho de corrida (BDC), ratos com desempenho de corrida padrão (DCP) e ratos com alto desempenho de corrida (ADC). Para ser incluído nos grupos BDC e ADC, a DTP do animal deveria ser, respectivamente, menor e maior do que um desvio-padrão da média da população. Para a inclusão no grupo DCP, o valor da DTP do animal não deve ser maior ou menor que um desvio-padrão da média da população. Os critérios para determinação dos grupos foram baseados em estudos anteriores (Koch e Britton, 2001, Britton e Koch, 2001)





**Figura 1** – Fluxograma das etapas experimentais utilizadas neste estudo, para a análise proteômica.

### **3.4.3 Sacrifício dos animais e coleta de amostras**

Duas semanas após o término dos testes, os animais (em jejum de doze horas) foram pesados, anestesiados com uma mistura de ketamina (30mg/kg) e xilazina (3mg/kg) e sacrificados por meio da guilhotina. Após a decaptação, amostras de sangue foram coletadas e o coração foi rapidamente removido, lavado 4 X com solução salina a 4°C, com posterior lavagem em água milli Q a 4°C para remoção do sangue circulante. O excesso de solução de lavagem foi removido por contato com papel de filtro. Em seguida, os átrios e tecidos adjacentes foram removidos e a massa restante do coração (ventrículos) foi rapidamente mensurada. O ventrículo esquerdo (VE) foi separado do direito, pesado e alocado em criotubo, o qual foi imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado a -80°C até o momento da análise.

### **3.4.4 Dosagens bioquímicas**

Para determinação de parâmetros bioquímicos, amostras de sangue foram coletadas conforme o item 3.4.3. As dosagens de triacilglicerol, colesterol, proteína total e albumina foram realizadas utilizando amostra de soro e para a dosagem de glicose foi utilizada amostra de plasma. Para obtenção do plasma, as amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo fluoreto de sódio (Labor import). As dosagens foram realizadas em aparelho automatizado (Cobas 6000 Analyzer, Roche Diagnostics, AS) segundo as instruções de kits comerciais.

### **3.4.5 Obtenção do extrato protéico dos ventrículos esquerdos**

Para extração das proteínas das amostras de ventrículo esquerdo, foi utilizada a metodologia descrita por Burniston (2009), com algumas modificações. Alíquotas de  $\approx$  100 mg do ventrículo esquerdo de seis animais de cada grupo selecionado (BDC, DCP e ADC) foram agrupadas (*pools*) para extração protéica. Os *pools* resultantes foram pulverizados utilizando-se grau e pistilo de porcelana sob atmosfera de nitrogênio líquido. Ao pó resultante foi adicionado tampão de lise (8 M de uréia, 2 M de tiouréia, 40 mM de Tris, 4% (p/v) de CHAPS, 0,2% de anfólitos e 1% (v/v) de

coquetel inibidor de proteases na proporção de 1:12 (p/v). Posteriormente, o material foi submetido à sonicação (3 ciclos de 15 segundos, 15 Hz, com intervalos de 1 minuto, em banho de gelo) usando um sonicador ultrassônico. Para remoção do material insolúvel do lisado celular, o homogenato foi centrifugado a 12.000 g por 45 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram alíquotados e armazenados a -80°C para posterior análise. O conteúdo protéico das amostras foi determinado utilizando o kit de dosagem de proteína 2-D Quant Kit, conforme especificações do fabricante.

### **3.4.6 Eletroforese bidimensional (2DE)**

As amostras protéicas dos *pools* de ventrículo esquerdo dos animais dos grupos BDC, DCP e ADC, foram submetidas à eletroforese bidimensional. Foram obtidos nove géis, três replicatas para cada grupo.

#### **3.4.6.1 Focalização isoelétrica (1ª dimensão)**

Amostras de 1000 µg de proteínas solúveis (obtidas conforme o item 3.4.5) foram diluídas em tampão de reidratação (Destreak) contendo 0,2% de anfólitos, para um volume final de 350 µL. As soluções resultantes foram transferidas para uma bandeja de reidratação, e sobre estas foram colocadas as IPG *strips* desidratadas (17 cm, pH 3-10 NL) durante 30 minutos. Posteriormente as IPG *strips* carregadas com as amostras foram alocadas adequadamente no sistema IEFCell (Bio-Rad) a 20°C com corrente máxima de 50 mA/gel. A programação utilizada foi: reidratação ativa (50 V por 12 horas a 20°C) e focalização isoelétrica (1ª etapa: 300 V por 3 horas; 2ª etapa: aumento gradual da voltagem, por rampa rápida, até 10.000 V em 2 horas; 3ª etapa: acúmulo de 60.000 Vh; 4ª etapa: 500 V por 5 horas), seguindo especificação do fabricante para *strips* de 17 cm.

#### **3.4.6.2 Redução e alquilação das proteínas eletrofocalizadas**

As proteínas eletrofocalizadas nas IPG *strips* foram reduzidas e alquiladas. Esse processo foi realizado pela incubação seqüenciada das *strips* com: DTT (10 mg/mL), e posteriormente iodoacetamida (25 mg/mL), em tampão de equilíbrio (50 mM Tris-

HCl pH 8,8, 6 M de uréia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e 0,002% de azul de bromofenol) por 15 minutos cada à temperatura ambiente.

#### **3.4.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida - (2ª dimensão)**

A segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE, utilizando o sistema Protean II XL (Bio-Rad) e seguindo o método descrito por Laemmli (1970). As IPG *strips* contendo as proteínas reduzidas e alquiladas foram transferidas para a superfície do gel de poliacrilamida (12%), as quais foram seladas com solução de agarose 0,5% preparada no tampão de corrida (tampão Tris/Glicina/SDS, pH 8,8). A eletroforese foi conduzida a 16 mA/gel por 30 minutos e, em seguida, a 24 mA/gel até o término da corrida.

Decorrido o tempo da eletroforese, o gel foi retirado da placa e submetido à coloração pelo método Coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250) de acordo com Neuhoff e colaboradores (1988) com algumas modificações. Inicialmente o gel foi incubado três vezes (30 minutos cada) com solução 2% de ácido ortofosfórico em etanol 30%, em seguida lavado três vezes (10 minutos cada) com solução 2% de ácido ortofosfórico. Posteriormente o gel foi incubado por 30 minutos em solução ácido ortofosfórico/sulfato de amônio/etanol (2%:12%:18%), e em seguida corado durante 5 dias pela adição de Coomassie G-250 na solução acima para concentração final 0,01% do corante. O excesso do corante foi removido do gel com solução de etanol 20%.

#### **3.4.7 Aquisição, processamento e análise das imagens**

Para obtenção das imagens, os géis bidimensionais foram digitalizados utilizando scanner ImageScanner III (*GE Healthcare Life Sciences*) no modo de transmissão calibrado. Foram obtidos três géis bidimensionais para cada *pool* dos grupos selecionados, perfazendo um total de nove imagens. As imagens foram analisadas pelo software Image Master 2D Platinun v 7.05 (*GE Healthcare Life Sciences*). A autenticidade de cada *spot* foi validada por inspeção visual e editada quando

necessário.

Após normalização da intensidade de cada *spot* em % do volume total dos *spots*, utilizando a equação descrita abaixo, foram realizadas as análises quantitativas para a identificação de *spots* com diferença de expressão protéica.

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^n Vol_s} \times 100$$

- $Vol$  = área da base do pico do *spot* (a 75% do cume) x intensidade do *spot*
- $Vol_s$  é o volume do *spot* s em um gel contendo n *spots*

### 3.4.8 Identificação das proteínas com diferença de expressão entre os grupos.

#### 3.4.8.1 Digestão das proteínas, extração dos peptídeos e análise por espectrometria de massas

As frações dos géis contendo os *spots* de interesse, selecionados conforme item acima, foram manualmente removidas do gel, com auxílio de pipetas Pasteur de plástico, e descoradas por 3 lavagens de 15 minutos com 400  $\mu$ L de solução de acetonitrila 50% (v/v) em bicarbonato de amônio 25mM pH 8,0, sob agitação. Após a remoção do descorante, as frações dos géis foram tratadas com 200  $\mu$ L de acetonitrila, até a opacificação do gel. Em seguida este solvente foi removido da amostra por concentrador a vácuo (Concentrador Plus, Eppendorf). As frações foram reidratadas com 10  $\mu$ L de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 20 ng/ $\mu$ L de tripsina (Golden) e mantidas por 30 minutos em banho de gelo para incorporação da solução. Para manter as frações úmidas durante a hidrólise trípica, 20  $\mu$ L de solução de bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados, e a mistura foi incubada por 14 horas a 37°C.

Em seguida, a solução não incorporada ao gel foi recolhida e as frações do gel

foram submetidas a duas lavagens sucessivas com 30  $\mu\text{L}$  de solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% (30 minutos cada, sob agitação), para completa remoção dos fragmentos trípticos. As soluções foram agrupadas e o volume resultante foi reduzido até aproximadamente 10  $\mu\text{L}$ , por concentração a vácuo. Posteriormente, as amostras obtidas foram dessalinizadas em micro coluna Zip-Tip (resina C18; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA) equilibrada com solução 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). Os fragmentos da hidrólise enzimática foram eluídos da resina com 6  $\mu\text{L}$  de solução 50% de acetonitrila, contendo 0,1% de TFA (Vergote *et al.*, 2005).

Como controle negativo e positivo para as análises, foram utilizados, respectivamente, uma fração do gel destituída de *spot* protéico e o *spot* protéico correspondente à albumina bovina (BSA) do padrão de peso molecular. Alíquotas de 0,5 e 1,0  $\mu\text{L}$  de cada solução dos fragmentos trípticos dessalinizados foram aplicadas em placa *anchorship* 600 (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA) e em seguida co-cristalizadas com 0,25  $\mu\text{L}$  de solução saturada da matriz 5 mg/mL de CHCA em acetonitrila 70%/TFA 0,1%) à temperatura ambiente. Os espectros de massas foram obtidos em sistema MALDI-TOF/TOF – Autoflex III™, softwares FlexControl™ e FlexAnalysis™ (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA), operando no modo positivo/refletor. A calibração externa do modo MS foi realizada utilizando a mistura de peptídeos *Peptide Calibration Standard II* (bradicinina  $m/z = 757,39$ ; angiotensina II  $m/z = 1046,54$ ; angiotensina I  $m/z = 1296,68$ ; substância P  $m/z = 1347,73$ ; bombesina  $m/z = 1619,82$ ; substrato da renina  $m/z = 1758,93$ ; ACTH (1-17)  $m/z = 2093,08$ ; ACTH (18-39)  $m/z = 2465,19$ ; e somatostatina (28)  $m/z = 3147,47$ ) da Bruker Daltonics, Bilerica (EUA). Os sinais dos íons mais intensos foram selecionados como precursor para aquisição do MS/MS. As análises por espectrometria de massas foram realizadas pela Dra. Simone da Fonseca Pires, no Núcleo de Biomoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, Belo Horizonte – MG.

#### 3.4.8.2 Pesquisa em banco de dados

Os espectros de massas obtidos de cada *spot* protéico (MS e MS/MS) foram combinados pelo software BioTools (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA) e posteriormente investigados nos bancos de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não redundante (NCBIInr), por meio do software MASCOT® (www.matrixscience.com). Os parâmetros de busca utilizados no MASCOT® foram: *Rattus* como taxonomia; peptídeos tripticos com ausência de um único fragmento; ausência de restrições no peso molecular da proteína; oxidação da metionina e carbamidometilação da cisteína como modificações variável e fixa, respectivamente; valores de massa monoisotópica; carga do peptídeo 1+; e tolerância de 0,8 Da na massa do MS e do MS/MS. Score global do MASCOT® correspondente à significância estatística de  $\alpha < 0,05$  foi utilizado para validação da identificação das proteínas, quando estas apresentavam homologia com *Rattus norvegicus*. A categorização funcional das proteínas identificadas foi realizada por meio das anotações dos processos biológicos e funções moleculares obtidas nos bancos de dados do “Gene Ontology” (GO) e PANTHER (Thomas *et al.*, 2003) para *Rattus norvegicus*.

#### 3.5 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise de fatores para determinação dos grupos foi realizada com auxílio do software Image Master 2D Platinun v 7.05, utilizando os nove géis como fatores. As demais análises foram feitas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Os valores dos parâmetros bioquímicos, de DTP, de peso corporal, do peso do coração e da relação peso do coração/peso corporal dos grupos ADC, DCP e BDC, foram comparados através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Tukey. Os valores de volume normalizado dos *spots* dos grupos ADC e BDC foram analisados por meio de teste *t* não pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## ***RESULTADOS***

---



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Seleção dos animais com diferente capacidade intrínseca ao exercício

Dos 83 animais submetidos à familiarização, dez foram excluídos por não terem se adaptado à esteira, e os 73 animais aptos foram submetidos à seleção. Após o processo de seleção, o melhor desempenho de cada animal nos cinco dias testados foi considerado para a construção do histograma de distribuição das DTP (Figura 2). A DTP média da população estudada foi de  $504,0 \pm 24,7$ m, sendo o desvio-padrão correspondente a 211,1m. Considerando os critérios de Koch e Britton (2001) descritos nos itens 3.4.1 e 3.4.2, nove animais (12,3% dos animais testados) obtiveram valor de DTP < 293,0m e foram incluídos no grupo BDC. O grupo DCP foi composto por ratos que tiveram valores de DTP entre 293,0 e 715,1m, correspondendo a 55 animais testados (75,4%). O animais incluídos no grupo ADC apresentaram uma DTP entre 715,1 a 1270 metros, que correspondeu a 12,3% dos animais testados - 9 animais.

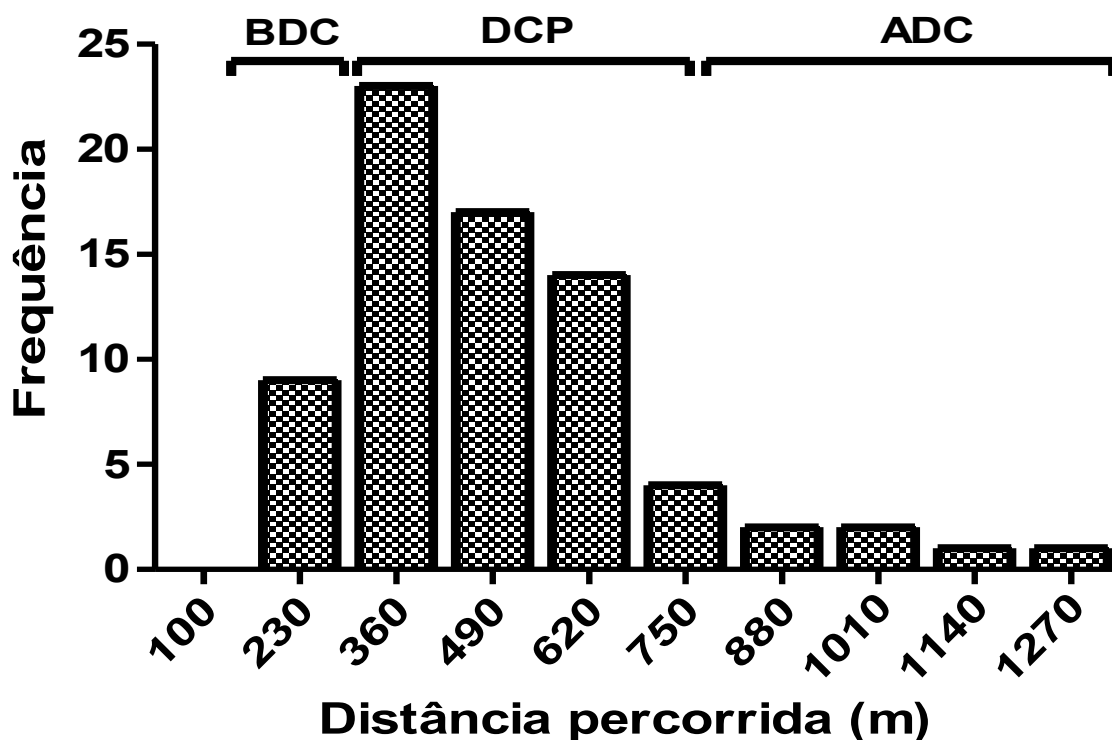
### 4.2 Características dos grupos selecionados

A tabela 1 apresenta algumas características morfológicas e de desempenho físico dos três grupos selecionados. Como pode ser observado os valores de DTP são estatisticamente diferentes entre os grupos selecionados. Os valores da DTP média dos grupos BDC, DCP e ADC foram respectivamente  $270,17 \pm 5,27$ ;  $471,1 \pm 15,4$  m e  $939,4 \pm 58,0$  m. O desempenho de corrida dos animais do grupo ADC foi aproximadamente 3,5 X maior que o alcançado pelos animais do grupo BDC.

Não foram observadas diferenças significativas no valor médio do peso corporal, do peso do coração e da relação peso do coração/peso corporal. Esses valores foram respectivamente  $266,3 \pm 9,0$  g;  $748,0 \pm 33,4$  mg e  $2,42 \pm 0,05$  mg para o grupo BDC,  $264,3 \pm 3,6$  g;  $793,8 \pm 35,6$  mg e  $2,56 \pm 0,09$  mg para o grupo DCP e  $251,2 \pm 6,1$  g;  $720,8 \pm 18,0$  mg e  $2,35 \pm 0,05$  mg para o grupo ADC

### 4.3. Análise dos parâmetros bioquímicos

A tabela 2 mostra os resultados da análise de parâmetros bioquímicos dos grupos selecionados. Como pode ser observado, não houve diferença estatística na concentração sanguínea de triacilglicerol, colesterol, proteínas totais e albumina. Entretanto, observa-se que os animais do grupos BDC apresentaram uma concentração média de glicose ( $180 \pm 37$ ) estatisticamente inferior aos outros dois grupos,  $214 \pm 32$  e  $219 \pm 25$  para DCP e ADC, respectivamente.



**Figura 2** – Histograma de distribuição das distâncias totais percorridas em teste máximo de corrida em esteira rolante (n = 73 ratos). BDC = Baixo desempenho de corrida (9 ratos). DCP = Desempenho de corrida padrão (55 ratos). ADC = Alto desempenho de corrida (9 ratos).

#### 4.4 Análise comparativa dos géis bidimensionais dos extratos proteicos de VE

Foram feitos 9 géis bidimensionais para a análise proteômica comparativa (Figura 3), sendo 3 repetições para cada *pool* obtido do VE de seis animais de cada grupo. Alíquotas de 1000 µg foram eletrofocalizadas e posteriormente resolvidas em gel SDS-PAGE 12%. A análise das imagens dos géis pelo software Image Master 2D Platinun v 7.05, detectou aproximadamente 500 *spots* protéicos por gel. O número de *spots* variou de 484 a 491; 541 a 591 e 503 a 571 para os grupos BDC, DCP e ADC respectivamente (Figura 3).

A reprodutibilidade dos géis em relação ao número total, posição relativa e intensidade dos *spots* protéicos, dentro de cada grupo foi avaliada pela análise de correlação por meio do *scatter plot*. Os resultados desta análise (Tabela 3) mostram que os géis obtidos apresentam uma alta reprodutibilidade dentro de cada grupo.

A análise de fatores (Figura 4) foi utilizada como ferramenta para a delimitação dos grupos a partir das imagens obtidas dos géis. Nesta figura, os géis são representados pelos vetores em azul e os *matches* são representados pelas cruces vermelhas. A proximidade entre os vetores indica que estes, provavelmente, pertencem ao mesmo grupo ou população. A distância entre vetores e, principalmente, seu posicionamento em quadrantes distintos, indica maior probabilidade de diferença entre esses vetores (géis). Como mostra a figura 4, as linhas representativas dos géis das amostras dos grupos ADC e BDC agrupam-se em quadrantes diferentes, o que demonstra que há maior probabilidade de diferença no perfil protéico destas amostras. Os vetores do grupo DCP se distribuíram em dois quadrantes distintos, entre os vetores dos grupos BDC e ADC. Isso indica que os géis do grupo DCP apresentam perfil protéico intermediário entre os grupos BDC e ADC e parecem não definir um grupo distinto dos demais. Considerando este resultado, a continuidade das análises dos perfis protéicos foram realizadas somente com os géis obtidos das amostras dos grupos BDC e ADC.

**Tabela 1 – Características dos animais dos grupos BDC, DCP e ADC.** Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

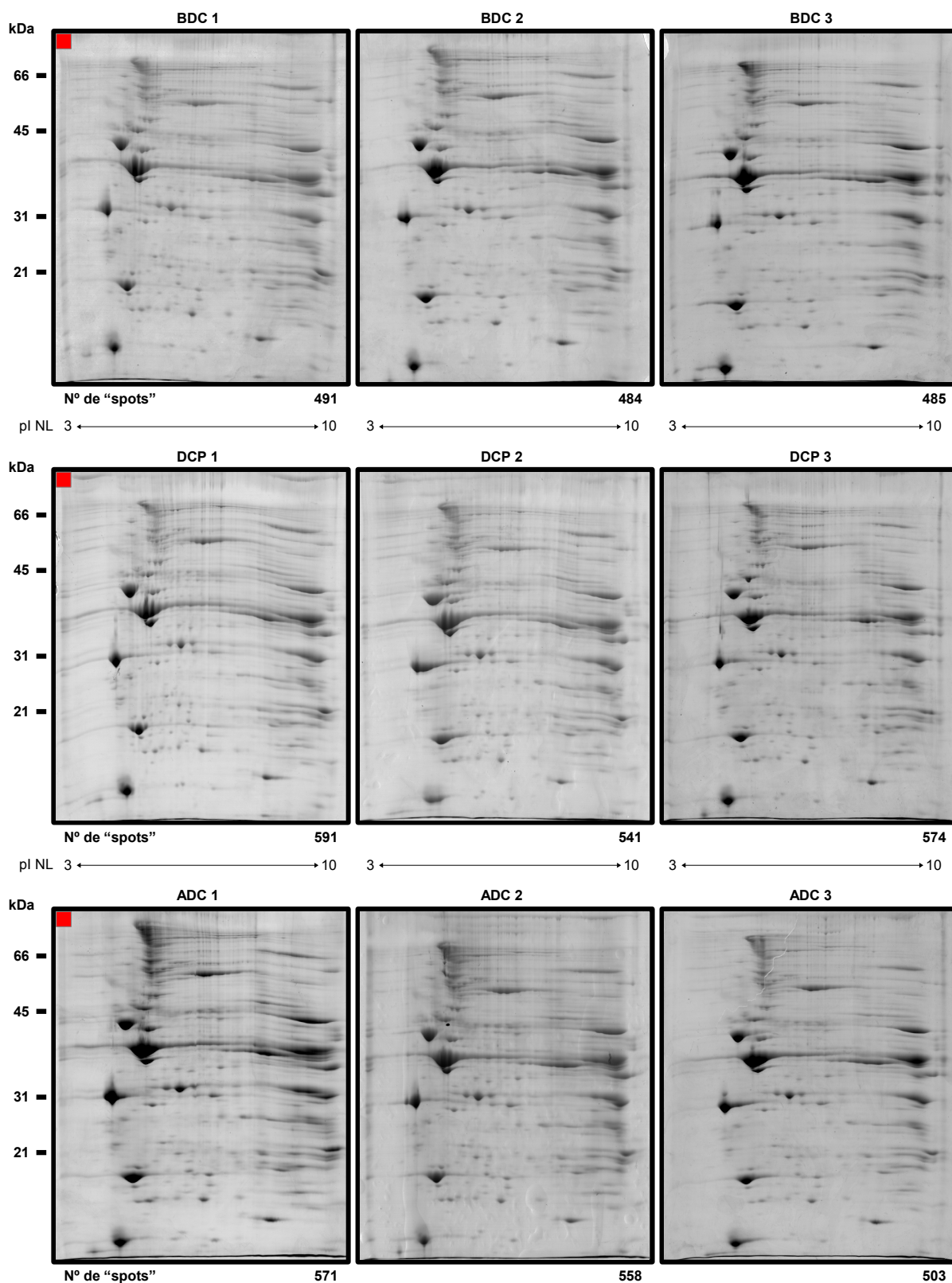
Características	BDC	DCP	ADC
	Baixo desempenho de corrida	Desempenho de corrida padrão	Alto desempenho de corrida
<b>Distância total percorrida (m)**</b>	270,17 $\pm$ 5,27	471,08 $\pm$ 15,41*	939,36 $\pm$ 57,99* <sup>§</sup>
<b>Peso corporal (g)**</b>	266,3 $\pm$ 9,0	264,3 $\pm$ 3,6	251,2 $\pm$ 6,1
<b>Peso do coração (mg)</b>	748,0 $\pm$ 33,4	793,83 $\pm$ 35,6	720,83 $\pm$ 18,0
<b>P<sub>coração</sub>/P<sub>corporal</sub> (mg/g)</b>	2,42 $\pm$ 0,05	2,56 $\pm$ 0,09	2,35 $\pm$ 0,05

Distância percorrida = distância total percorrida em teste máximo de corrida em esteira rolante. Peso corporal = peso corporal total dos animais no dia de seu melhor desempenho em teste máximo de corrida. P<sub>coração</sub>/P<sub>corporal</sub> = razão entre o peso do coração e o peso corporal total dos animais, no dia em que foram sacrificados (n = 6 animais de cada grupo). Os símbolos \* e <sup>§</sup> indicam diferença (p<0,05) em relação aos grupos BDC e DCP, respectivamente. \*\* n = 9, 55 e 9 animais para os grupos BDC, DCP e ADC, respectivamente.

**Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos séricos dos animais dos grupos selecionados (BDC, DCP e ADC).**

Parâmetro	Unidade	BDC (n = 8)	DCP (n = 9)	ADC (n = 8)	Intervalos de referência e média
<b>Glicose</b>	mg/dL	*180 ± 37 (174,00)	214 ± 32 (202)	219 ± 25 (220)	173 – 405 (277) <sup>1</sup> / 101 – 146 (123) <sup>2</sup>
<b>Colesterol Total</b>	mg/dL	76 ± 11 (74,00)	77 ± 17 (73,00)	71 ± 5 (69)	61 – 95 (75) <sup>1</sup> / 57 – 93 (75) <sup>2</sup>
<b>Triglicerídeos</b>	mg/dL	88 ± 38 (77,00)	62 ± 23 (59)	87 ± 15 (91)	140 – 589 (319) <sup>1</sup> / 42 – 95 (68) <sup>2</sup>
<b>Proteína Total</b>	g/dL	5,5 ± 0,3 (5,40)	5,6 ± 0,5 (5,55)	5,4 ± 0,3 (5,50)	6,1 – 7,9 (7,1) <sup>1</sup> / 6,2 – 7,4 (6,8) <sup>2</sup>
<b>Albumina</b>	g/dL	3,7 ± 0,1 (3,60)	3,6 ± 0,5 (3,65)	3,6 ± 0,3 (3,70)	3,5 – 4,3 (3,9) <sup>1</sup>

Valores de referência: <sup>1</sup> ratos Fisher machos de 8 a 10 semanas de idade ([www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm\\_rm\\_r\\_CDF\\_Fisher\\_Rat\\_clinical\\_pathology\\_data.pdf](http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_CDF_Fisher_Rat_clinical_pathology_data.pdf)), <sup>2</sup> ratos Fisher machos de idade 105 ± 18 dias e peso de 231 ± 52 g (Gonçalves *et al.*, 2011). Os valores representam a média ± erro padrão da média e mediana. n = número de animais da amostragem. \* = p<0,05 ADC vs BDC.



**Figura 3 – Perfil protéico de amostras de ventrículos esquerdos dos animais dos grupos BDC, DCP e ADC.** Foram focalizadas alíquotas de 1000 µg de proteínas em “IPG *strip*” pI 3-10 não linear (NL) de 17 cm. As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando-se SDS-PAGE 12%. À esquerda dos géis encontram-se os valores que representam a massa molecular de proteínas utilizadas como padrão. (■) Imagens de referência.

**Tabela 3 – Análise de reprodutibilidade das imagens dos géis intragrupos.** As imagens foram relacionadas com a imagem de referência de cada grupo.

Relação entre os géis	Equação	Coefficiente de correlação	Número de “Match”
ADC1 x ADC2	$y = 1,24x - 0,0462$	0,95	396
ADC1 x ADC3	$y = 1,12x - 0,0268$	0,96	390
BDC1 x BDC2	$y = 1,19x - 0,0417$	0,97	413
BDC1 x BDC3	$y = 1,15x - 0,033$	0,98	420
DPC1 x DPC2	$y = 1,16x - 0,0453$	0,94	450
DPC1 x DPC3	$y = 1,2x - 0,0388$	0,97	462

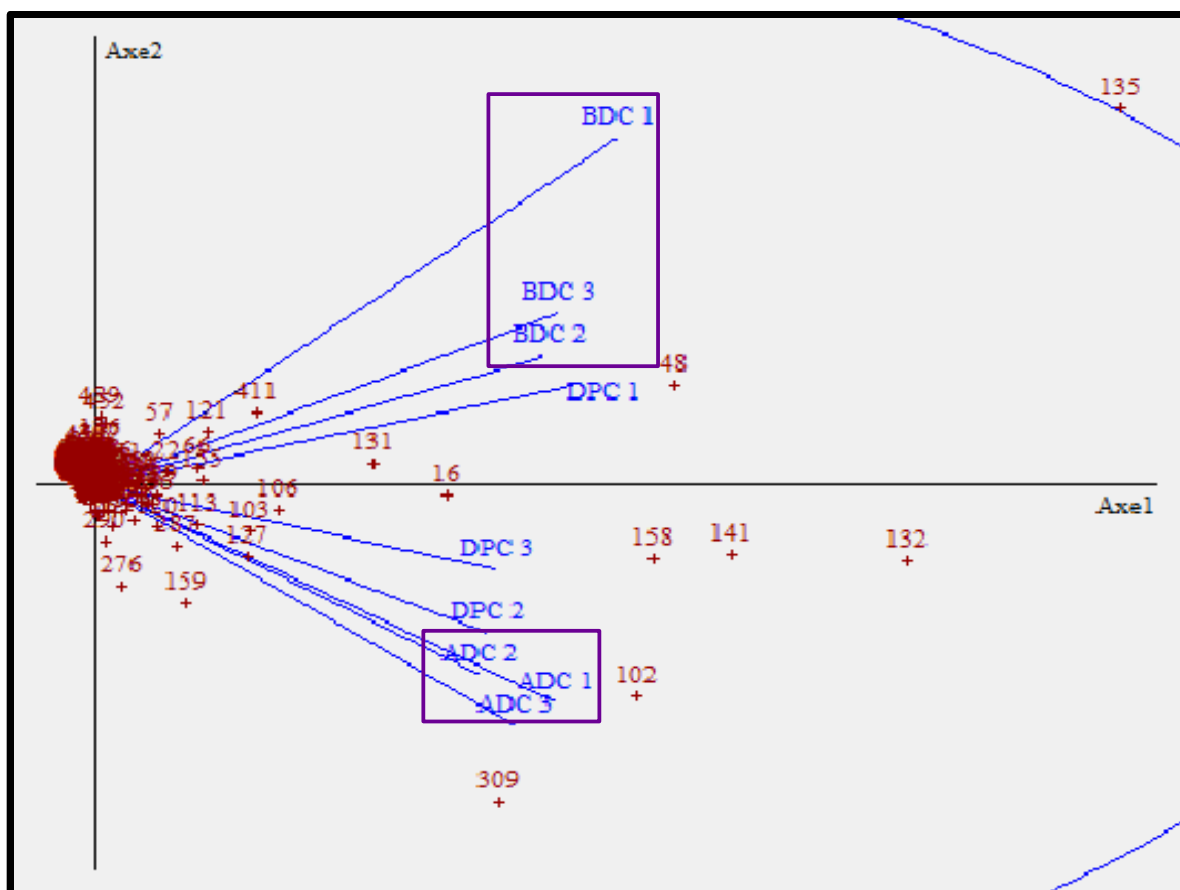
Após as análises pelo software, autenticação por inspeção visual, e normalização dos volumes dos spots, foi realizada a análise quantitativa comparativa. Foram identificados 29 spots que apresentaram diferença de volume significativa entre os grupos (Figura 5). Dentre estes spots protéicos, 17 estavam mais expressos e 12 menos expressos no grupo ADC, quando comparados aos spots do grupo BDC. Os 29 spots protéicos foram retirados dos géis e preparados para a identificação protéica. No adendo foram incluídas figuras dos géis de referência ADC e BDC, mostrando a marcação de todos os spots após correção visual.

#### 4.5 Identificação das proteínas

Dentre os 29 spots com diferença de expressão, 18 foram identificados (65%) utilizando os espectros de massas MS e MS/MS. A figura 6 mostra um esquema representativo das análises para identificação de um spot protéico de interesse.

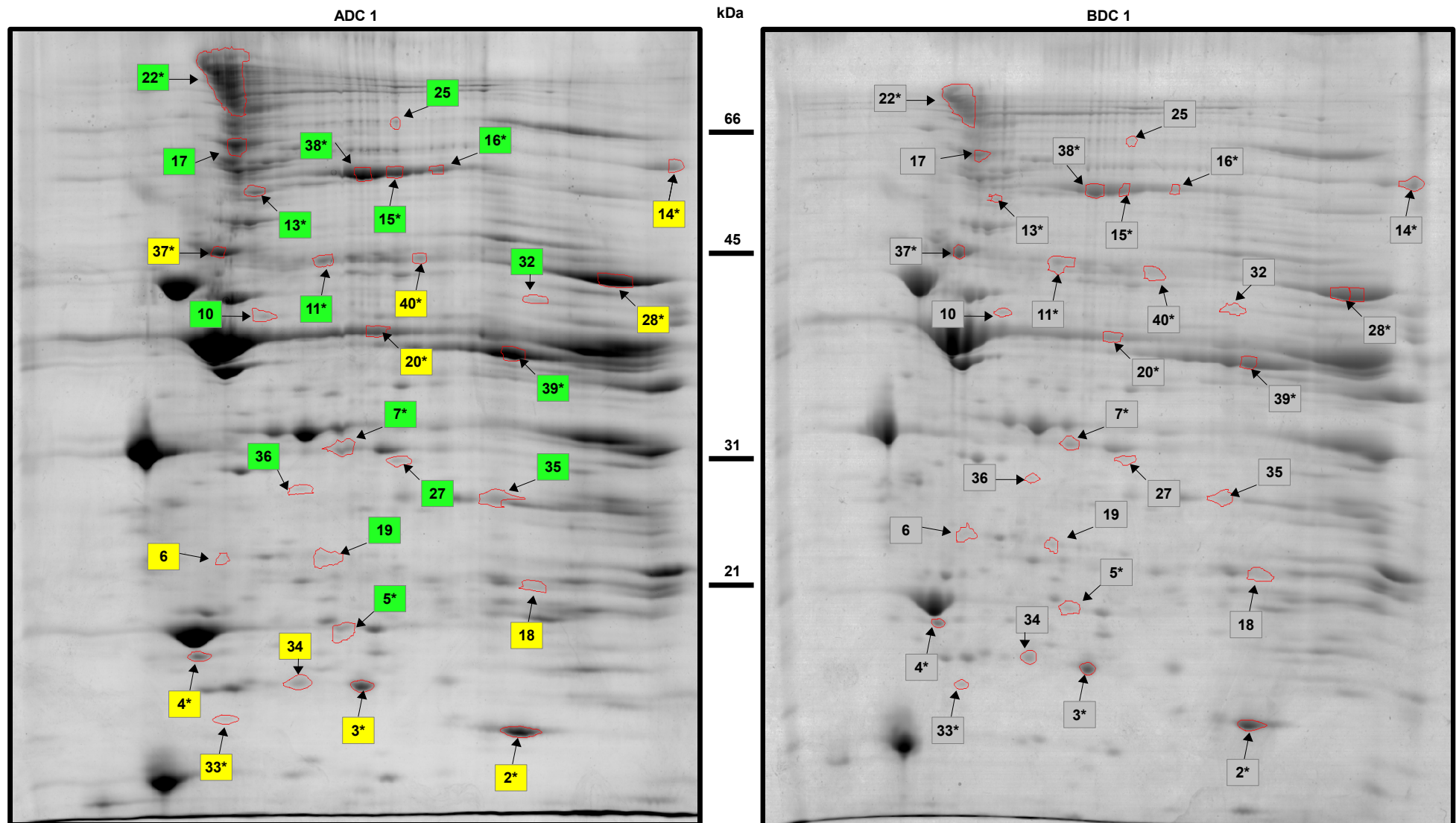
Duas proteínas foram identificadas em mais de um spot. A isoforma  $\alpha$  da miosina de cadeia pesada-6 ( $\alpha$ -MCP) foi identificada em dois spots e em ambos esta proteína foi mais expressa no grupo ADC (1,7 X no spot 22 e 2,5 X no spot 13). A albumina foi identificada em três spots, 15, 16 e 38, sendo estes sempre mais intensos no grupo ADC (2,1 X, 1,5 X e 1,2 X respectivamente). A tabela 4 mostra as proteínas identificadas.

A classificação funcional das proteínas identificadas foi feita a partir das anotações de dois bancos de dados: GENE Ontology (<http://www.geneontology.org/>) e PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). As proteínas identificadas (Tabela 5) pertencem a várias classes funcionais, incluindo metabolismo (carboidratos, lipídeos e fosforilação oxidativa), resposta ao estresse, contração muscular, e estruturais. A tabela 5 também mostra os dados da análise estatística e da alteração do volume normalizado dos *spots* protéicos que apresentaram diferença significativa entre os grupos ADC e BDC, além da localização celular, função molecular e os processos biológicos relacionados às proteínas identificadas.



**Figura 4 – Análise de fatores.** Gráfico de projeção dos géis analisados para delineamento dos grupos experimentais.





**Figura 5 – Comparação do perfil protéico dos géis bidimensionais de referência dos grupos ADC e BDC.** Os *spots* numerados e circundados com linha vermelha são os que apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) de volume entre os grupos. Os retângulos verdes mostram os *spots* com maior expressão e os amarelos mostram os *spots* com menor expressão no grupo ADC em relação ao grupo BDC. (\*) Proteínas identificadas por MS e MS/MS.

**Tabela 4 – Identidade dos spots protéicos diferentemente expressos entre os grupos BDC e ADC, por MS e MS/MS.** Homologia com a taxonomia *Rattus norvegicus*.

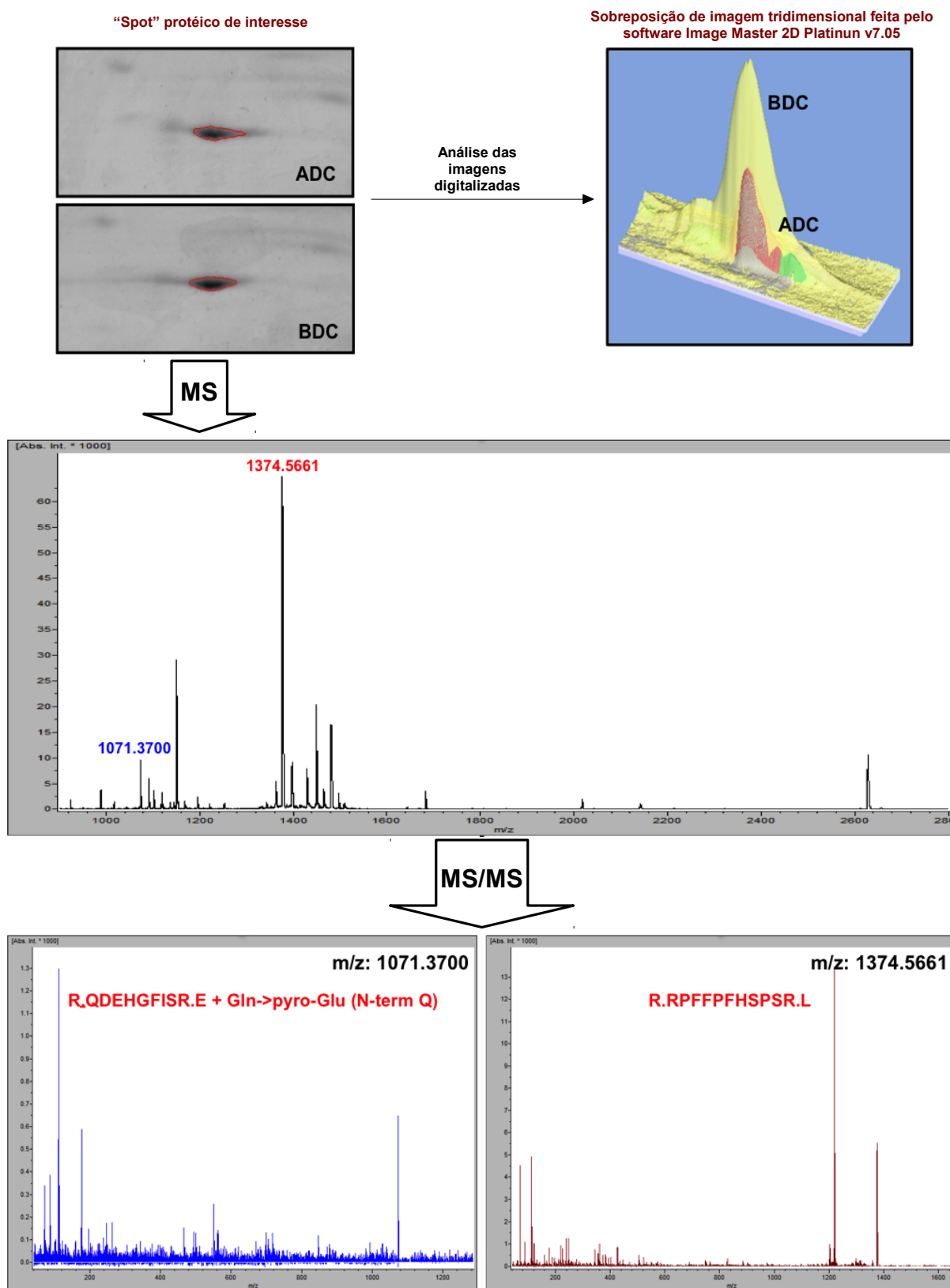
Spot ID <sup>a</sup>	Nome da proteína	Número de acesso <sup>b</sup>	Sequências de peptídeos identificadas	% de cobertura	Mascot – score protéico <sup>c</sup>	pl (teórico)	MM kDa (teórica)
2	α-B cristalina	gi 16905067	RPFPPFHSPSR QDEHGFISR	11	75	6,8	20,1
3	ATP sintase, subunidade d	gi 220904	LASLSEKPPAIDWAYR	10	55	5,8	18,8
4	NADH desidrogenase [ubiquinona], proteína ferro-enxofre 8	gi 157821497	GLGMTLSYLFR.E + Oxidação (M) LLNNGDKWEAEIAANIADYLYR AAPAPAAAPAAPEPERPK	16	70	5,9	24,4
5	Miosina de cadeia leve-1	gi 6981240	ALGQNPTQAEVLR DTGTYEDFVEGLR	22	65	5,0	22,3
7	Malato desidrogenase	gi 15100179	GEFITTQQQR FVEGLPINDFSR	6	60	6,2	36,6
11	Complexo α-cetoglutarato desidrogenase, componente E2 (Q01205)	gi 220659	NDVITVQTPAFAESVTEGDVR DYIDISVAVATPR	7	46	8,2	47,7
13	Miosina de cadeia pesada-6 isoforma α	gi 205576	VVDSLQTSLEDAETR ANDDLKENIAIVER NTLLQAELEELR	9	72	5,4	49,6
14	Enzima trifuncional, subunidade α	gi 148747393	TVLGVPEVLLGILPGAGGTQR K.LTSYAMTIPFVR.Q + Oxidação (M) NLNSEIDNILVNLR	6	45	9,1	83,3
15	Albumina	gi 55628	RHPDYSVSLLLR APQVSTPTLVEAAR	4	48	6,1	70,7
16	Albumina	gi 55628	DVFLGTFLEYYSR RHPDYSVSLLLR	4	47	6,1	70,7
20	α-actina <sup>d</sup>	gi 49864	SYELPDGQVITIGNER QEYDEAGPSIVHR	8	72	5,5	38,0
22	Miosina de cadeia pesada-6 isoforma α	gi 127741	NAYEESLEHLETFKR NTLLQAELEELR ILGADTSVDLEETGR	1	40	5,6	224,2
28	ATP sintase, subunidade α	gi 203055	TGAIVDVPVGDLELLGR EAYPGDVLYLHSR EAYPGDVLYLHSR GIRPAINVGLSVSR	14	162	9,2	58,9
33	Proteína de choque térmico β2	gi 18426864	FESAFSLSHVVSQHQSLGNIR FQAFLDVSHFTPDEVTVR AALSHDGILNLEAPR	18	52	5,3	20,4
37	Desmina	gi 11968118	TFGGAPGFSLGSPLSPVFPR FLEQQNAALAAEVNR FASEASGYQDNIAI RHPDYSVSLLLR	10	89	5,2	53,5
38	Albumina, isoforma CRA_a	gi 149033753	LGEYGFQNAILVR LPCVEDYLSAILNR	8	84	6,7	53,1
39	Creatina quinase tipo M	gi 203480	GYTLPPHCSR SFLVWVNEEDHLR	7	96	7,9	33,4
40	Aldeído desidrogenase 2	gi 14192933	TIPIDGFFSYTR TFVQEDVYDEFVER	5	42	6,6	57,0

<sup>a</sup>Número atribuído ao spot protéico. <sup>b</sup>Código obtido no NCBI GenInfo. <sup>c</sup>Com significância estatística (p<0,05) na homologia e identidade da proteína. <sup>d</sup>Homologia com a taxonomia *Mus musculus*.

**Tabela 5 – Dados das proteínas diferentemente expressas entre os grupos ADC e BDC.**

Spot ID	Nome da proteína (ID da proteína)	ADC <sup>a</sup>	BDC <sup>a</sup>	Alteração do volume do spot <sup>b</sup>	p	Processo Biológico <sup>c</sup>	Função Molecular <sup>c</sup>	Localização Celular <sup>c</sup>
2	α-B cristalina (P23928)	0,637 ± 0,023	0,840 ± 0,025	-1,3	0,0041	Resposta ao estresse	Chaperona	Citoplasma
3	ATP sintase, subunidade d (P31399)	0,264 ± 0,012	0,338 ± 0,017	-1,3	0,0240	Fosforilação oxidativa (síntese de ATP acoplada ao transporte de H <sup>+</sup> )	Transporte de H <sup>+</sup> através da membrana interna da mitocôndria	Membrana interna da mitocôndria (acoplado ao domínio Fo)
4	NADH desidrogenase [ubiquinona], proteína ferro-enxofre 8 (O00217)	0,115 ± 0,001	0,143 ± 0,006	-1,3	0,0111	Fosforilação oxidativa (transporte de elétrons da cadeia respiratória, do NADH para a Ubiquinona).	Oxidoredutase	Mitocôndria (complexo I da cadeia respiratória)
5	Miosina de cadeia leve-1 (P16409)	0,113 ± 0,014	0,070 ± 0,008	+1,6	0,0499	Contração muscular cardíaca	Motora	Miofibrilas Citoplasma
7	Malato desidrogenase (O88989)	0,119 ± 0,005	0,097 ± 0,005	+1,2	0,0338	Metabolismo de carboidratos	Oxidoredutase	Citoplasma
11	Complexo α-cetoglutarato desidrogenase, componente E2 (Q01205)	0,165 ± 0,011	0,113 ± 0,009	+1,5	0,0244	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos Transportador de elétrons e de grupos acilas.	Aciltransferase	Matriz mitocondrial
13	Miosina de cadeia pesada-6 isoforma α (P02563)	0,098 ± 0,009	0,040 ± 0,009	+2,5	0,0091	Contração muscular	Motora ATPásica	Miofibrilas Citoplasma
14	Enzima trifuncional - subunidade α (domínios - enoil-CoA hidratase e 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de ácidos graxos de cadeia longa) (Q64428)	0,069 ± 0,008	0,205 ± 0,036	-3,0	0,0206	Metabolismo de ácidos graxos	Oxidoredutase	Matriz mitocondrial
15	Albumina (P02770)	0,393 ± 0,026	0,184 ± 0,021	+2,1	0,0034	Transporte	Carreadora de ácidos graxos e hormônios	-
16	Albumina (P02770)	0,087 ± 0,006	0,056 ± 0,007	+1,5	0,0241	Transporte	Carreadora de ácidos graxos e hormônios	-
20	α-actina (Q61272)	0,103 ± 0,023	0,278 ± 0,015	-2,7	0,0030	Contração muscular	Motora	Citoplasma
22	Miosina de cadeia pesada-6 isoforma α (P02563)	4,606 ± 0,193	2,702 ± 0,038	+1,7	0,0006	Contração muscular	Motora ATPásica	Miofibrilas Citoplasma
28	ATP sintase - subunidade α (P15999)	0,983 ± 0,300	2,007 ± 0,157	-2,0	0,0389	Fosforilação oxidativa (síntese de ATP acoplada ao transporte de H <sup>+</sup> )	Ligação com ATP e ADP, Atividade de ATP sintase, mecanismo rotacional	Membrana interna da mitocôndria (subunidade do domínio F1)
33	Proteína de choque térmico β2 (O35878)	0,022 ± 0,001	0,033 ± 0,003	-1,5	0,0225	Resposta ao estresse	Chaperona	Citoplasma
37	Desmina (P48675)	0,281 ± 0,025	0,427 ± 0,009	-1,5	0,0052	Componente da morfogênese celular	Citoesquelética	Citoplasma
38	Albumina, isoforma CRA_a	0,684 ± 0,020	0,565 ± 0,026	+1,2	0,0213	Transporte	Carreadora de ácidos graxos e hormônios	-
39	Creatina quinase tipo M (P00564)	1,031 ± 0,038	0,662 ± 0,094	+1,6	0,0219	Biossíntese de fosfocreatina Contração muscular	Transferase (quinase)	Citoplasma
40	Aldeído desidrogenase 2 (P11884)	0,048 ± 0,008	0,093 ± 0,009	-1,9	0,0167	Resposta ao estresse	Oxidoredutase	Mitocôndria

<sup>a</sup> Média ± erro padrão da média do volume normalizado de cada spot nos géis obtidos. <sup>b</sup> Razão entre a média do volume normalizado dos spots com expressão protéica aumentada pela média do volume normalizado dos spots com expressão protéica reduzida. (+) indica maior expressão, enquanto (-) indica menor expressão dos spots do grupo ADC em relação ao BDC. <sup>c</sup> Foram utilizadas as anotações dos bancos de dados do Gene Ontology e PANTHER para a definição dos processos biológicos, das funções moleculares e das localizações celulares.



**Figura 6** – Figura representativa da análise de um *spot* protéico diferencialmente expresso entre os grupos ADC e BDC.

## ***DISCUSSÃO***

---

## 5 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas houve uma transição gradual na investigação na área da ciência do exercício, os estudos passaram de um nível orgânico global para níveis subcelulares/moleculares. O surgimento de diversas tecnologias aplicadas à biologia molecular influenciou essa mudança, principalmente pelo fato de que essas tecnologias se tornaram disponíveis e acessíveis aos pesquisadores voltados para o campo da ciência do exercício. Estudos de genes e seus produtos protéicos são essenciais para o entendimento dos mecanismos envolvidos tanto na resposta ao estresse causado pelo exercício, quanto na capacidade de um indivíduo ter desempenho físico superior a outro.

Atualmente a abordagem mais utilizada para análises protéicas é a proteômica e, como já descrito na introdução, esta abordagem tem sido aplicada à ciência do exercício para investigar, por exemplo, os efeitos de diferentes modalidades e intensidades de exercícios em diversos tecidos, em modelo animal e em humanos.

Por exemplo, Guelfi e colaboradores (2006) investigaram se o perfil protéico do músculo gastrocnêmio seria alterado por um estímulo curto de exercício de alta intensidade e encontraram quatro proteínas diferencialmente expressas pós-exercício: creatina quinase, troponina T, adenilato quinase e proteína de choque térmico de 20 kDa. Já Burniston (2008) analisou as alterações no proteoma do músculo plantar de ratos Wistar para estudar os efeitos crônicos da prática de exercício de resistência. Nesse trabalho os animais foram submetidos a treinamento de corrida (30 min/dia, 4 dias/semana por 5 semanas) em intensidade moderada (70-75%  $VO_{2max}$ ) e, após o treinamento, apresentaram ganho de 14% no  $VO_{2max}$ . A análise proteômica muscular identificou 15 proteínas diferencialmente expressas, envolvidas na glicólise e na beta oxidação, indicando uma adaptação metabólica do proteoma muscular em resposta ao treinamento (Burniston, 2008). Em humanos, Holloway e colaboradores (2009) identificaram 20 proteínas moduladas pelo treinamento intervalado em amostras do músculo vasto lateral de cinco indivíduos

que, após o treinamento, apresentaram ganho de 7% em sua capacidade cardiovascular.

Yuan e colaboradores (2004) compararam o efeito do exercício voluntário (corrida em roda) nos níveis de proteínas séricas em camundongos selvagens e camundongos deficientes de carboxipeptidase E (Cpefat/fat), e encontraram 20 proteínas diferencialmente expressas pós-exercício. Dessas, os autores ressaltam a maior expressão da haptoglobina em camundongos Cpefat/fat e a menor expressão de diversas calicreínas em camundongos selvagens (Yuan *et al.*, 2004). Em humanos, a prática de tai chi chuan por 12 semanas foi capaz de modular a expressão de 18 proteínas séricas, identificadas por eletroforese em gel diferencial (DIGE) seguida de espectrometria de massas utilizando MALDI-TOF/TOF (Yang *et al.*, 2010). Os autores demonstraram um aumento em proteínas envolvidas na proteção de micro angiopatias, que podem ser utilizadas como marcadores dos efeitos benéficos advindos do exercício.

Diversos pesquisadores utilizaram a análise proteômica para identificar, em tecido cardíaco de animais, proteínas diferencialmente expressas que estariam envolvidas em mecanismos adaptativos desencadeados pelo exercício físico. Como exemplo, Boluyt e colaboradores (2006) submeteram ratos a um treinamento intervalado de corrida em esteira (5 vezes por semana) durante seis semanas e identificaram que o perfil protéico dos corações dos ratos treinados apresentou 26 *spots* protéicos com diferença significativa de expressão em relação ao grupo sedentário, e 12 *spots* constavam exclusivamente nos géis do grupo treinado. Dentre as proteínas identificadas, os autores apontam a maior expressão da proteína de choque térmico de 20kDa como um dos principais efeitos do treinamento.

Utilizando a natação como estímulo estressor, Sun e colaboradores (2008) verificaram o efeito de oito semanas de treinamento de alta intensidade, na massa e na expressão protéica ventricular esquerda de ratos. Houve um aumento de 20% na massa ventricular acompanhado pela modulação de 11 proteínas no proteoma dos

ventrículos esquerdos dos animais treinados. De acordo com os autores, a modulação no nível de expressão dessas proteínas (metabólicas e estruturais) pode influenciar de maneira positiva o metabolismo cardíaco, a resposta ao estresse e a função cardíaca de maneira geral (Sun *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, utilizamos a análise proteômica para identificar proteínas diferencialmente expressas em tecido muscular cardíaco de ratos com diferente capacidade aeróbica intrínseca, aferida por teste de corrida contínua progressivo até a fadiga. De acordo com a distância total percorrida (DTP), separamos os animais em três grupos, com fenótipos diferentes: BDC, DCP e ADC (baixo, padrão e alto desempenho de corrida). Os valores de DTP foram significativamente diferentes entre os três grupos selecionados, o que indicou que a estratégia de separação utilizada foi eficaz. Em nosso estudo, o grupo ADC apresentou valores de DTP  $\approx 3,5$  X maior do que o grupo BDC ( $939,4 \pm 58,0$  vs  $270,2 \pm 5,3$ ; ADC vs BDC, respectivamente), valores em conformidade com os encontrados por Hussain e colaboradores (2001) em animais da terceira geração das linhagens HCR e LCR ( $908 \pm 11$  vs  $232 \pm 6$ , HCR e LCR, respectivamente). Estratégias similares de separação foram utilizadas por outros autores (Prímola-Gomes *et al.*, 2009; Quintão-Júnior *et al.*, 2012) que, mesmo baseando-se em um parâmetro distinto (tempo total até a fadiga, TTF) do utilizado em nosso estudo, também encontraram diferenças significativas de desempenho de corrida nos animais com desempenhos alto, baixo e padrão. Embora tenhamos os registros de velocidade máxima atingida no teste e do tempo total até a fadiga dos grupos, optamos por não apresentá-los dada a oscilação apresentada pela esteira durante os aumentos progressivos de velocidade a cada estágio. Essa oscilação foi observada principalmente em velocidades a partir de 30 m/min.

Também devido às limitações de infra-estrutura, não foi possível mensurar o consumo máximo de oxigênio dos animais dos grupos selecionados neste trabalho. Prímola-Gomes e colaboradores (2009), utilizando uma estratégia de separação similar à utilizada em nosso trabalho, observaram que os animais com alta



capacidade de corrida apresentaram maior  $VO_{2max}$  em relação aos animais com desempenho padrão. Considerando os resultados obtidos por estes autores, nós acreditamos que os grupos selecionados em nosso estudo (ADC, DCP e BDC) também podem apresentar diferenças no consumo máximo de oxigênio.

Os valores de peso corporal, peso do coração e da relação peso do coração/peso corporal não apresentaram diferença significativa entre os grupos separados neste trabalho, o que pode indicar que esses parâmetros não influenciaram na determinação da capacidade aeróbica intrínseca desses grupos. De maneira similar, Prímola-Gomes e colaboradores (2009) não encontraram diferenças significativas nestes mesmos parâmetros morfológicos entre animais com alto desempenho e desempenho padrão de corrida.

Previamente à análise proteômica, avaliamos o perfil bioquímico sérico dos animais dos diferentes grupos. Não foi observada diferença nos níveis de triacilglicerol, proteínas totais, albumina e colesterol, nos animais dos diferentes grupos (Tabela 2). Entretanto, apesar da glicemia dos animais do grupo BDC ser significativamente inferior a do ADC, os níveis de glicose destes animais ainda se encontravam dentro dos limites da normalidade para estes animais. Contudo, Burniston e colaboradores (2011) não encontraram diferença na glicemia dos ratos da 22ª geração das linhagens LCR e HCR.

O mapa proteômico produzido neste trabalho é consistente com investigações prévias de ventrículo esquerdo de ratos. Neste trabalho nós utilizamos o corante Coomassie Blue G-250 para revelação dos *spots* protéicos, e consegue-se visualizar  $\approx 500$  *spots* nas amostras analisadas. Burniston e colaboradores (2011), usando os corantes *Cy Dye* para revelação, conseguiram resolver este tecido em 957 *spots* protéicos. Esta diferença pode ser justificada pela maior sensibilidade deste corante. De acordo com Vercauteren e colaboradores (2007), a sensibilidade dos corantes *Cy Dye* é aproximadamente 100 X maior do que a do Coomassie Blue G-250.

Como já foi descrito nos resultados, dentre os *spots* detectados na análise das imagens dos géis bidimensionais, 29 apresentaram expressão diferenciada entre os grupos ADC e BDC. Desses, 18 foram identificados com sucesso por espectrometria de massas (MS e MS/MS), os quais consistiam produto de 16 genes. O produto de dois genes foi identificado em mais de um *spot*: a isoforma  $\alpha$  da miosina de cadeia pesada-6 ( $\alpha$ -MCP) foi identificada em dois, e a albumina foi identificada em três *spots*. A diversidade de produtos gênicos oriundos de um único gene pode ser devida principalmente aos *splicing* alternativos dos transcritos e às modificações co- e pós-traducionais das proteínas.

A análise proteômica revelou que a seleção dos animais quanto à sua capacidade aeróbica intrínseca está associada, principalmente, com modulações nas proteínas envolvidas na contração muscular, mais expressas nos animais ADC, e proteínas envolvidas na resposta ao estresse, mais expressas nos animais BDC. A maior expressão de proteínas relacionadas ao estresse apresentada pelo grupo BDC, está de acordo com o encontrado por Burniston e colaboradores (2011), entretanto, os autores avaliaram o perfil protéico do VE da 22<sup>a</sup> geração de ratos LCR e HCR. As diferenças na expressão protéica encontradas por estes últimos autores, estão de acordo com as diferenças na expressão de genes cardíacos associadas com a capacidade aeróbica intrínseca (Bye *et al.*, 2008), entretanto a análise proteômica gerou novas informações. Estes dados reforçam o potencial da análise proteômica para a compreensão de mecanismos moleculares pertencentes a um fenótipo.

Como descrito acima e mostrado na tabela 5, a análise proteômica demonstrou que os VE de ratos dos grupos BDC e ADC apresentam diferenças na expressão de proteínas envolvidas na contração muscular cardíaca, como  $\alpha$ -MCP, miosina de cadeia leve-1 (MCL-1),  $\alpha$ -actina e creatina quinase do tipo M (CKMM).

Já é bem estabelecido que a força contrátil muscular é gerada pela interação de duas proteínas distintas, miosina e actina, que estão arranjadas em forma de

filamentos que sofrem interações transientes cíclicas, deslizando uns sobre os outros, produzindo contração. Juntas, essas duas proteínas constituem mais de 80% da massa protéica muscular. A miosina é constituída por duas cadeias pesadas (220 kDa), a extremidade carboxi-terminal destas cadeias apresentam um formato alongado, e a região amino terminal é um domínio globular. À cada uma das regiões globulares estão associadas duas cadeias leves (20 kDa). A cadeia pesada (MCP) possui um sítio de hidrólise de ATP numa subunidade denominada S1, a qual é o domínio motor que torna a contração muscular possível, e as cadeias leves (MCL) parecem modular a atividade dessa enzima. No coração, são expressas duas isoformas de MCP, denominadas  $\alpha$  e  $\beta$ , e o tipo de isoforma expressa influencia diretamente o desempenho contrátil miocárdico (Herron e McDonald, 2002), sendo que a  $\alpha$ -MCP exibe maior velocidade de deslizamento sobre o filamento de actina (Harris *et al.*, 1994), maior atividade ATPásica (Litten *et al.*, 1982) e pode aumentar o desempenho contrátil do cardiomiócito de maneira significativa, levando a um maior volume sistólico (Herron e McDonald, 2002).

A actina (42 kDa) é uma proteína globular encontrada em praticamente todas as células eucarióticas e, além de seu envolvimento na contração muscular, apresenta várias outras funções, como estabelecimento e manutenção de junções celulares e do formato da célula. Em células musculares, moléculas de actina globular (actina G) se associam e formam um longo polímero, a actina filamentar (actina F). O filamento fino da miofibrila consiste do conjunto entre actina F e as proteínas troponina e tropomiosina.

A creatina quinase (CK) compreende uma família de cinco isoenzimas e tem papel central na transdução de energia em tecidos com demandas energéticas elevadas, como músculo esquelético, cérebro e coração. Nas células cardíacas, três formas (CKMM, CKMB e CKBB) encontram-se no citoplasma e uma isoforma (mitocondrial sarcomérica, CKmi) está localizada nas mitocôndrias. O papel da CK é catalisar a transferência reversível de um radical fosfato entre a creatina e a molécula de ATP. A

CKmi está ligada à superfície exterior da membrana mitocondrial interna e funcionalmente acoplada à adenina nucleotídeo translocase (ATP/ADP translocase), permitindo a transfosforilação de ATP à fosfocreatina. Parte da CKMM citosólica está associada estruturalmente com as miofibrilas, com o retículo sarcoplasmático, e com membranas sarcolemas (locais de acoplamento excitação-contração) (Wyss *et al.*, 1992). Estas enzimas usam a fosfocreatina localmente para refosforilação de ADP produzida por ATPases, fornecendo energia suficiente para a cinética contrátil normal ou para recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Wyss *et al.*, 1992).

A maior expressão da  $\alpha$ -MCP, da MCL-1 e da CKMM, detectadas no VE dos ratos ADC é consistente com a alta capacidade aeróbica destes animais, pois parece haver um aumento, tanto da unidade motora da contração, quanto da manutenção constante da taxa de ATP/ADP, pela maior expressão da CKMM. Diversos estudos têm demonstrado que a ausência da atividade da CK pode estar associada com o declínio da força muscular e produção de energia durante atividade repetitiva (Dahlstedt *et al.*, 2000). Além disto, semelhante aos nossos dados, tem sido demonstrado que a expressão da miosina de cadeia leve está aumentada em músculo esquelético (plantar) de ratos submetidos a treinamento de corrida (Burniston, 2008) e que a expressão aumentada do gene da isoforma atrial desta proteína, em resposta ao treinamento de corrida, pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo aumento da função contrátil cardíaca (Diffie *et al.*, 2003).

Entretanto, foi observado que os ratos BDC apresentam expressão maior da  $\alpha$ -actina quando comparado com os animais ADC. Nossos dados são insuficientes para justificar o aumento desta proteína contrátil nestes animais. Um aumento da expressão dessa proteína já foi associado ao remodelamento cardíaco desadaptativo (Petritz *et al.*, 2012a).

Com relação às proteínas envolvidas no metabolismo energético, foi observado que enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (malato desidrogenase) e no

ciclo dos ácidos tricarboxílicos (componente E2 da  $\alpha$ -cetoglutarato) tiveram expressão maior no grupo ADC. O aumento de expressão destas enzimas também foi observado respectivamente em tecido cardíaco de ratos pós treinamento de corrida por seis semanas (Burniston, 2009), e no músculo esquelético de ratos submetidos a cinco dias de treinamento intervalado de alta intensidade de natação (Yamaguchi *et al.*, 2010). Burniston e colaboradores (2011) demonstraram que ratos HCR apresentavam robusto aumento da abundância de enzimas envolvidas na beta oxidação e os LCR aumento das enzimas do metabolismo de aminoácidos. Estes autores também descreveram um pequeno aumento da expressão de outras enzimas do transporte de elétrons nos animais HCR, e sugeriram que os animais da linhagem HCR apresentam maior capacidade de produção de energia (Burniston *et al.*, 2011).

Entretanto, nós demonstramos que a expressão da subunidade alfa da enzima trifuncional, composta pelos domínios enoil-CoA hidratase e 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, enzimas envolvidas na  $\beta$  oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, foi três vezes menor no grupo ADC. E que subunidades de dois complexos da cadeia respiratória apresentaram expressão aumentada nos animais BDC; (i) duas da ATPsintase (complexo V), uma do domínio estrutural F1 (a subunidade d) e a outra do domínio Fo (subunidade  $\alpha$ ) e (ii) proteína Fe-S 8, da NADH desidrogenase (complexo I). A ATPsintase, localizada na membrana interna mitocondrial, catalisa a formação de ATP a partir de ADP e Pi, acoplada ao fluxo de prótons do espaço intermembranoso para a matriz mitocondrial. As proteínas Fe-S, participam da transferência de um elétron em cada átomo de Fe do arranjo Fe-S. Burniston e colaboradores (2011) também encontraram um aumento da expressão da subunidade alfa do complexo V em animais da 22<sup>a</sup> geração da linhagem LCR. Nós acreditamos que o aumento pontual de expressão de subunidades dos complexos da cadeia respiratória, encontrados no VE de ratos BDC, não está relacionado com a produção de energia, visto que estes animais apresentam uma menor capacidade de corrida (Quintão-Júnior *et al.*, 2012).

Também foi observada uma maior expressão da albumina nos ratos ADC, o que está de acordo com estudos proteômicos de tecido muscular esquelético, realizados tanto com animais submetidos a treinamento de corrida contínua (Burniston, 2008) quanto em humanos submetidos a seis semanas de treinamento intervalado de corrida (Holloway *et al.*, 2009).

Burniston e colaboradores (2011), como já citado anteriormente, utilizando um sistema mais sensível para revelação dos *spots* protéicos do que o utilizado neste trabalho, demonstraram que o VE de ratos LCR da 22<sup>a</sup> geração, apresentavam menor abundância de enzimas da beta oxidação, e da cadeia respiratória, sugerindo que a menor expressão destas enzimas poderia estar associada com um maior estresse oxidativo nestes animais. Estes autores demonstraram um aumento da expressão de enzimas antioxidantes, (catalase, aldeído desidrogenase e glutathione S-redutase), e também proteínas de resposta ao estresse (proteínas de choque térmico) neste tecido.

Semelhante ao observado por esses autores, nossos resultados, também demonstraram que os ratos BDC apresentam elevado estresse no tecido cardíaco, pois foi demonstrado maior expressão (90%) da aldeído desidrogenase 2 mitocondrial (ALDH-2), e de 30 e 50%, respectivamente, nas proteínas de resposta ao estresse  $\alpha$ -B cristalina (Cryab) e proteína de choque térmico  $\beta$ 2 (HSP $\beta$ 2).

Proteínas de resposta ao estresse compreendem várias classes, entre elas enzimas antioxidantes, e proteínas de choque térmico de baixo peso molecular (sHSPs). As primeiras atuam destruindo espécies reativas de oxigênio e as segundas representam uma família de proteínas com atividade semelhante às chaperonas, que favorece a sobrevivência da célula em seu ambiente, protegendo-as de uma gama de condições de estresse

Embora a aldeído desidrogenase seja melhor conhecida pelo seu papel na oxidação

do acetaldeído para ácido acético no metabolismo de etanol, a ALDH-2 é considerada enzima de defesa contra produtos de peroxidação lipídica (Chen *et al.*, 2010). Neste papel, estas enzimas catalisam a remoção de aldeídos reativos, tais como o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e do malondialdeído (MDA) do organismo. A ALDH2 é uma enzima tetramérica que é expressa em abundância no fígado e no pulmão, e também está presente em órgãos que necessitam de alta capacidade de produção de energia por fosforilação oxidativa, como o cérebro e o coração. (para melhor revisão, ver Chen *et al.* 2010). A ALDH2 é considerada uma molécula com papel cardioprotetor (Budás *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). Chen e colaboradores (2008) demonstraram que um aumento na fosforilação desta enzima, está positivamente correlacionada com a cardioproteção, e sua atividade catalítica está inversamente correlacionada com a gravidade do dano cardíaco induzido por isquemia.

A nossa seleção também demonstrou que o fenótipo BDC apresenta maior expressão das proteínas HSP $\beta$ 2 e Cryab. Em 2008, Noble e colaboradores revisaram a ativação da resposta de proteínas de choque térmico ao exercício físico. O exercício conduz ao estresse por múltiplos fatores, entre eles o aumento da temperatura intramuscular; o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs); e a diminuição nos níveis de ATP, situações as quais induzem a expressão dessas proteínas. Estas proteínas apresentam relevantes papéis fisiológicos, como cardioproteção, proteção do músculo esquelético e manutenção de sistemas de sinalização, entre outros (para uma melhor revisão ver Noble *et al.*, 2008).

A HSP $\beta$ 2 e a Cryab são evolutivamente relacionadas e apresentam distribuição e interações intracelulares distintas com outras sHSPs (Ishiwata *et al.*, 2012). A Cryab é um membro da família das sHSPs que, embora tenha sido originalmente classificada como uma proteína do cristalino, está presente em altas concentrações no músculo cardíaco e no esquelético, e em baixas concentrações no cérebro, na pele e no rim. Esta sHSP tem propriedades de chaperona e de anti-agregação, ligando-se à desmina e à actina citoplásmica, e contribuindo para a manutenção da

integridade do citoesqueleto (Maloyan *et al.*, 2005). De maneira similar às outras chaperonas e às sHSPs, a Cryab pode se ligar a proteínas desenoveladas promovendo seu remodelamento, o que impede sua desnaturação e agregação (Noble *et al.*, 2008). Durante a isquemia a Cryab se liga aos componentes do sistema contrátil, provavelmente para protegê-los da desnaturação (Maloyan *et al.*, 2005).

Outra proteína também mais expressa nos animais BDC foi a desmina. A desmina, juntamente com a tubulina e a actina, pertence ao grupo de proteínas citoesqueléticas e é a principal proteína músculo-específica do filamento intermediário tipo III. Embora sua função nos cardiomiócitos não seja totalmente clara, parece que a desmina desempenha funções mecânicas, estruturais e regulatórias (Pawlak *et al.*, 2009). A desmina tem papel essencial na manutenção da citoarquitetura do músculo por formar um arcabouço ao redor do disco Z e por conectar o aparato contrátil sarcomérico ao citoesqueleto sarcolemal, ao núcleo e à mitocôndria (Pawlak *et al.*, 2009). A maior expressão dessa proteína nos animais BDC é consistente com a maior expressão das proteínas de estresse, como também da maior expressão da actina no fenótipo BDC, considerando que, de acordo com Pawlak e colaboradores (2009), o acúmulo anormal de desmina pode perturbar a função das miofibrilas, levando à tensão incomum do sacolema e à uma distribuição atípica das organelas celulares.

Considerando os resultados obtidos por uma abordagem proteômica, este estudo contribuiu para determinar, o perfil protéico do ventrículo esquerdo de ratos com diferente capacidade aeróbica intrínseca, selecionados a partir de teste de corrida em esteira, mas que não passaram por cruzamentos para obtenção de linhagens específicas ou criação de um modelo de doença. O proteoma diferencial desse tecido nos animais ADC e BDC possibilitou identificar proteínas com diferença de expressão, que podem estar associadas com o fenótipo de capacidade aeróbica intrínseca. A identificação das proteínas diferentemente expressas entre os grupos pode sugerir uma maior capacidade contrátil cardíaca dos animais ADC, e que a



baixa capacidade aeróbica intrínseca poderia estar relacionada a uma maior exposição ao estresse, nos corações dos animais BDC.

***CONSIDERAÇÕES FINAIS E  
CONCLUSÕES***

---

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

- A estratégia de seleção adotada neste estudo foi eficaz para separação de ratos com diferente capacidade aeróbica intrínseca;
- Utilizando a abordagem proteômica por eletroforese bidimensional comparativa, foi possível identificar diferenças de expressão protéica em tecido ventricular esquerdo de animais com diferente capacidade aeróbica intrínseca;
- Foram identificados 29 *spots* protéicos diferentemente expressos entre os grupos ADC e BDC. Destes, 18 *spots* protéicos diferentemente expressos foram identificados por espectrometria de massas, 9 mais expressos e 9 menos expressos, no grupo ADC;
- Foram destacadas proteínas envolvidas no processo contrátil do músculo cardíaco no grupo ADC ( $\alpha$ -MCP, MLC-1, CKMM), relacionadas com o fenótipo de alta capacidade aeróbica intrínseca;
- Foram destacadas proteínas envolvidas na resposta ao estresse no músculo cardíaco no grupo BDC (ALDH2, Cryab, HSP $\beta$ 2), relacionadas com o fenótipo de baixa capacidade aeróbica intrínseca;
- Os resultados sugerem uma maior capacidade contrátil cardíaca dos animais ADC, e que a baixa capacidade aeróbica intrínseca poderia estar relacionada a uma maior exposição ao estresse, nos corações dos animais BDC;
- Os resultados obtidos abrem perspectivas para futuras investigações na área da fisiologia do exercício. Temos como metas futuras: (i) validação das proteínas identificadas, utilizando a técnica de *Western blot*, (ii) aperfeiçoamento da técnica, com a utilização de método de maior sensibilidade para detecção protéica; (iii) análise proteômica diferencial de outros tecidos ou fluidos envolvidos direta ou indiretamente no desempenho físico, (iv) análise proteômica e fosfoproteômica de organelas celulares, destes tecidos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRED S, GRANT MM, GRIFFITHS HR. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. **Clin Biochem**. 2004 Nov;37(11):943-52.

APWEILER R, ASLANIDIS C, DEUFEL T, GERSTNER A, HANSEN J, HOCHSTRASSER D, KELLNER R, KUBICEK M, LOTTSPREICH F, MASER E, MEWES HW, MEYER HE, MÜLLNER S, MUTTER W, NEUMAIER M, NOLLAU P, NOTHWANG HG, PONTEN F, RADBRUCH A, REINERT K, ROTHE G, STOCKINGER H, TÁRNOK A, TAUSSIG MJ, THIEL A, THIERY J, UEFFING M, VALET G, VANDEKERCKHOVE J, WAGENER C, WAGNER O, SCHMITZ G. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics. **Cytometry A**. 2009 Oct;75(10):816-32.

ARAB S, GRAMOLINI AO, PING P, KISLINGER T, STANLEY B, VAN EYK J, OUZOUNIAN M, MACLENNAN DH, EMILI A, LIU PP. Cardiovascular proteomics: tools to develop novel biomarkers and potential applications. **J Am Coll Cardiol**. 2006 Nov 7;48(9):1733-41.

ARNOTT D, O'CONNELL KL, KING KL, STULTS JT. An integrated approach to proteome analysis: identification of proteins associated with cardiac hypertrophy. **Anal Biochem**. 1998 Apr 10;258(1):1-18.

ARRELL DK, NEVEROVA I, VAN EYK JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. **Circ Res**. 2001 Apr 27;88(8):763-73.

BALDWIN KM. Research in the exercise sciences: where do we go from here? **J Appl Physiol**. 2000 Jan;88(1):332-6.

BALDWIN KM, COOKE DA, CHEADLE WG. Time course adaptations in cardiac and skeletal muscle to different running programs. **J Appl Physiol**. 1977 Feb;42(2):267-72.

BASSETT DR JR, HOWLEY ET. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. **Med Sci Sports Exerc**. 2000 Jan;32(1):70-84.

BLAIR SN, KAMPERT JB, KOHL HW 3RD, BARLOW CE, MACERA CA, PAFFENBARGER RS JR, GIBBONS LW. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. **JAMA**. 1996 Jul 17;276(3):205-10.

BLAIR SN, KOHL HW 3RD, PAFFENBARGER RS JR, CLARK DG, COOPER KH, GIBBONS LW. Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. **JAMA**. 1989 Nov 3;262(17):2395-401.

BOLUYT MO, BREVICK JL, ROGERS DS, RANDALL MJ, SCALIA AF, LI ZB. Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20. **Proteomics**. 2006 May;6(10):3154-69.

BOUCHARD C, AN P, RICE T, SKINNER JS, WILMORE JH, GAGNON J, PÉRUSSE L, LEON AS, RAO DC. Familial aggregation of VO<sub>2</sub>max response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study. **J Appl Physiol**. 1999 Sep;87(3):1003-8.

BOUCHARD C, LESAGE R, LORTIE G, SIMONEAU JA, HAMEL P, BOULAY MR, PÉRUSSE L, THÉRIAULT G, LEBLANC C. Aerobic performance in brothers, dizygotic and monozygotic twins. **Med Sci Sports Exerc**. 1986 Dec;18(6):639-46.

BOUCHARD C, RANKINEN T, CHAGNON YC, RICE T, PÉRUSSE L, GAGNON J, BORECKI I, AN P, LEON AS, SKINNER JS, WILMORE JH, PROVINCE M, RAO DC. Genomic scan for maximal oxygen uptake and its response to training in the HERITAGE Family Study. **J Appl Physiol**. 2000 Feb;88(2):551-9.

BRITTON SL, KOCH LG. Animal genetic models for complex traits of physical capacity. **Exerc Sport Sci Rev**. 2001;29(1):7-14.

BROOKS GA. Genome, proteome, and transcriptomes: the new systems approach to research. **Exerc Sport Sci Rev**. 2007 Apr;35(2):41-2.

BUDAS GR, DISATNIK MH, MOCHLY-ROSEN D. Aldehyde dehydrogenase 2 in cardiac protection: a new therapeutic target? **Trends Cardiovasc Med**. 2009 Jul;19(5):158-64.

BURNISTON JG. Changes in the rat skeletal muscle proteome induced by moderate-intensity endurance exercise. **Biochim Biophys Acta**. 2008 Jul-Aug;1784(7-8):1077-86.

BURNISTON JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. **Proteomics**. 2009 Jan;9(1):106-15.

BURNISTON JG, KENYANI J, WASTLING JM, BURANT CF, QI NR, KOCH LG, BRITTON SL. Proteomic analysis reveals perturbed energy metabolism and elevated oxidative stress in hearts of rats with inborn low aerobic capacity. **Proteomics**. 2011 Aug;11(16):3369-79.

BYE A, LANGAAS M, HØYDAL MA, KEMI OJ, HEINRICH G, KOCH LG, BRITTON SL, NAJJAR SM, ELLINGSEN Ø, WISLØFF U. Aerobic capacity-dependent differences in cardiac gene expression. **Physiol Genomics**. 2008 Mar 14;33(1):100-9.

CHEN CH, BUDAS GR, CHURCHILL EN, DISATNIK MH, HURLEY TD, MOCHLY-ROSEN D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. **Science**. 2008 Sep 12;321(5895):1493-5.

CHEN CH, SUN L, MOCHLY-ROSEN D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. **Cardiovasc Res**. 2010 Oct 1;88(1):51-7.

COSTILL DL, THOMASON H, ROBERTS E. Fractional utilization of the aerobic capacity during distance running. **Med Sci Sports**. 1973 Winter;5(4):248-52.

DAHLSTEDT AJ, KATZ A, WIERINGA B, WESTERBLAD H. Is creatine kinase responsible for fatigue? Studies of isolated skeletal muscle deficient in creatine kinase. **FASEB J**. 2000 May;14(7):982-90.

DANTAS, EM. **Efeitos do exercício aeróbio sobre o acúmulo de gordura visceral em ratos wistar submetidos a um modelo experimental de obesidade**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

DE MORAES R, VALENTE RH, LEÓN IR, TRUGILHO MR, NÓBREGA AC, PERALES J, TIBIRIÇÁ E. Chronic dynamic exercise increases apolipoprotein A-I expression in rabbit renal cortex as determined by proteomic technology. **Br J Sports Med**. 2008 May;42(5):386-8.



DI PRAMPERO PE. Factors limiting maximal performance in humans. **Eur J Appl Physiol**. 2003 Oct;90(3-4):420-9.

DIFFEE GM, SEVERSEN EA, STEIN TD, JOHNSON JA. Microarray expression analysis of effects of exercise training: increase in atrial MLC-1 in rat ventricles. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2003 Mar;284(3):H830-7.

DING Q, VAYNMAN S, SOUDA P, WHITELEGGE JP, GOMEZ-PINILLA F. Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis. **Eur J Neurosci**. 2006 Sep;24(5):1265-76.

DUDLEY GA, ABRAHAM WM, TERJUNG RL. Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. **J Appl Physiol**. 1982 Oct;53(4):844-50.

ERIKSSEN G. Physical fitness and changes in mortality: the survival of the fittest. **Sports Med**. 2001;31(8):571-6.

GARNERO P. Bone markers in osteoporosis. **Curr Osteoporos Rep**. 2009 Sep;7(3):84-90.

GHIDONI R, BENUSSI L, PATERLINI A, ALBERTINI V, BINETTI G, EMANUELE E. Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: the present and the future. **Neurodegener Dis**. 2011;8(6):413-20.

GONÇALVES SC, OLIVEIRA EC, FERREIRA RT, SAMPAIO AFS, HARAGUCHI FK, SILVA M, CAMERON LC, PEDROSA ML, SILVA ME. Valores de referência de parâmetros bioquímicos séricos de ratos fischer do laboratório de nutrição experimental. **Anais IV COMAN – I CONAN**, Editora UFOP, Universidade Federal de

Ouro Preto – MG, 2011.

GÖRG A, WEISS W, DUNN MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**. 2004 Dec;4(12):3665-85. Review. Erratum in: **Proteomics**. 2005 Feb;5(3):826-7.

GOULET GC, HALONEN NR, KOCH LG, BRITTON SL, ZERNICKE RF, KOZLOFF KM. Osteoblast response to ovariectomy is enhanced in intrinsically high aerobic-capacity rats. **Calcif Tissue Int**. 2011 Apr;88(4):325-35.

GUELFI KJ, CASEY TM, GILES JJ, FOURNIER PA, ARTHUR PG. A proteomic analysis of the acute effects of high-intensity exercise on skeletal muscle proteins in fasted rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 2006 Oct;33(10):952-7.

HARRIS DE, WORK SS, WRIGHT RK, ALPERT NR, WARSHAW DM. Smooth, cardiac and skeletal muscle myosin force and motion generation assessed by cross-bridge mechanical interactions in vitro. **J Muscle Res Cell Motil**. 1994 Feb;15(1):11-9.

HENDERSON KK, WAGNER H, FAVRET F, BRITTON SL, KOCH LG, WAGNER PD, GONZALEZ NC. Determinants of maximal O<sub>2</sub> uptake in rats selectively bred for endurance running capacity. **J Appl Physiol**. 2002 Oct;93(4):1265-74.

HERRON TJ, MCDONALD KS. Small amounts of alpha-myosin heavy chain isoform expression significantly increase power output of rat cardiac myocyte fragments. **Circ Res**. 2002 Jun 14;90(11):1150-2.

HITTEL DS, HATHOUT Y, HOFFMAN EP. Proteomics and systems biology in exercise and sport sciences research. **Exerc Sport Sci Rev**. 2007 Jan;35(1):5-11.

HOLLOWAY KV, O'GORMAN M, WOODS P, MORTON JP, EVANS L, CABLE NT, GOLDSPINK DF, BURNISTON JG. Proteomic investigation of changes in human vastus lateralis muscle in response to interval-exercise training. **Proteomics**. 2009 Nov;9(22):5155-74.

HOWLETT RA, GONZALEZ NC, WAGNER HE, FU Z, BRITTON SL, KOCH LG, WAGNER PD. Selected contribution: skeletal muscle capillarity and enzyme activity in rats selectively bred for running endurance. **J Appl Physiol**. 2003 Apr;94(4):1682-8.

HUSSAIN SO, BARBATO JC, KOCH LG, METTING PJ, BRITTON SL. Cardiac function in rats selectively bred for low- and high-capacity running. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2001 Dec;281(6):R1787-91.

ISHIWATA T, OROSZ A, WANG X, MUSTAFI SB, PRATT GW, CHRISTIANS ES, BOUDINA S, ABEL ED, BENJAMIN IJ. HSPB2 is dispensable for the cardiac hypertrophic response but reduces mitochondrial energetics following pressure overload in mice. **PLoS One**. 2012;7(8):e42118.

JENSEN ON. Interpreting the protein language using proteomics. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2006 Jun;7(6):391-403.

KLISSOURAS V. Heritability of adaptive variation. **J Appl Physiol**. 1971 Sep;31(3):338-44.

KLOSE J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**. 1975;26(3):231-43.

KOBA S, TANAKA H, MARUYAMA C, TADA N, BIROU S, TERAMOTO T, SASAKI J. Physical activity in the Japan population: association with blood lipid levels and effects in reducing cardiovascular and all-cause mortality. **J Atheroscler Thromb.** 2011;18(10):833-45.

KOCH LG, BRITTON SL. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. **Physiol Genomics.** 2001 Feb 7;5(1):45-52.

KOCH LG, BRITTON SL. Aerobic metabolism underlies complexity and capacity. **J Physiol.** 2008 Jan 1;586(1):83-95.

KOCH LG, KEMI OJ, QI N, LENG SX, BIJMA P, GILLIGAN LJ, WILKINSON JE, WISLØFF H, HØYDAL MA, ROLIM N, ABADIR PM, VAN GREVENHOF EM, SMITH GL, BURANT CF, ELLINGSEN O, BRITTON SL, WISLØFF U. Intrinsic aerobic capacity sets a divide for aging and longevity. **Circ Res.** 2011 Oct 28;109(10):1162-72.

KOCH LG, MEREDITH TA, FRAKER TD, METTING PJ, BRITTON SL. Heritability of treadmill running endurance in rats. **Am J Physiol.** 1998 Nov;275(5 Pt 2):R1455-60.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-685. 1970.

LAM L, LIND J, SEMSARIAN C. Application of proteomics in cardiovascular medicine. **Int J Cardiol.** 2006 Mar 22;108(1):12-9

LAMONTE MJ, FITZGERALD SJ, LEVINE BD, CHURCH TS, KAMPERT JB,

NICHAMAN MZ, GIBBONS LW, BLAIR SN. Coronary artery calcium, exercise tolerance, and CHD events in asymptomatic men. **Atherosclerosis**. 2006 Nov;189(1):157-62.

LEE IM, SESSO HD, OGUMA Y, PAFFENBARGER RS Jr. Relative intensity of physical activity and risk of coronary heart disease. **Circulation**. 2003 Mar 4;107(8):1110-6.

LEEPER NJ, MYERS J, ZHOU M, NEAD KT, SYED A, KOJIMA Y, CACERES RD, COOKE JP. Exercise capacity is the strongest predictor of mortality in patients with peripheral arterial disease. **J Vasc Surg**. 2012 Oct 5.

LEVINE BD. .VO<sub>2</sub>max: what do we know, and what do we still need to know? **J Physiol**. 2008 Jan 1;586(1):25-34.

LITTEN RZ 3RD, MARTIN BJ, LOW RB, ALPERT NR. Altered myosin isozyme patterns from pressure-overloaded and thyrotoxic hypertrophied rabbit hearts. **Circ Res**. 1982 Jun;50(6):856-64.

LOSCALZO J. Proteomics in cardiovascular biology and medicine. **Circulation**. 2003 Jul 29;108(4):380-3.

MACRI J, RAPUNDALO ST. Application of proteomics to the study of cardiovascular biology. **Trends Cardiovasc Med**. 2001 Feb;11(2):66-75.

MALOYAN A, SANBE A, OSINSKA H, WESTFALL M, ROBINSON D, IMAHASHI K, MURPHY E, ROBBINS J. Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in alpha-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy. **Circulation**. 2005 Nov 29;112(22):3451-61.

MCGREGOR E, DUNN MJ. Proteomics of the heart: unraveling disease. **Circ Res.** 2006 Feb 17;98(3):309-21.

MOORE JB, WEEKS ME. Proteomics and systems biology: current and future applications in the nutritional sciences. **Adv Nutr.** 2011 Jul;2(4):355-64.

MYERS J, PRAKASH M, FROELICHER V, DO D, PARTINGTON S, ATWOOD JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. **N Engl J Med.** 2002 Mar 14;346(11):793-801.

NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D. e EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9, n.6, Jun, p.255-262. 1988.

NOBLE EG, MILNE KJ, MELLING CW. Heat shock proteins and exercise: a primer. **Appl Physiol Nutr Metab.** 2008 Oct;33(5):1050-65.

NOLAND RC, THYFAULT JP, HENES ST, WHITFIELD BR, WOODLIEF TL, EVANS JR, LUST JA, BRITTON SL, KOCH LG, DUDEK RW, DOHM GL, CORTRIGHT RN, LUST RM. Artificial selection for high-capacity endurance running is protective against high-fat diet-induced insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2007 Jul;293(1):E31-41.

O'FARRELL PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem.** 1975 May 25;250(10):4007-21.

PALPANT NJ, SZATKOWSKI ML, WANG W, TOWNSEND D, BEDADA FB, KOCH LG, BRITTON SL, METZGER JM. Artificial selection for whole animal low intrinsic aerobic capacity co-segregates with hypoxia-induced cardiac pump failure. **PLoS One**. 2009 Jul 1;4(7):e6117.

PAWLAK A, GIL RJ, WALCZAK E, SEWERYNIAK P. Desmin expression in human cardiomyocytes and selected clinical and echocardiographic parameters in patients with chronic heart failure. **Kardiol Pol**. 2009 Sep;67(9):955-61.

PETERSEN KF, BEFROY D, DUFOUR S, DZIURA J, ARIYAN C, ROTHMAN DL, DIPIETRO L, CLINE GW, SHULMAN GI. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. **Science**. 2003 May 16;300(5622):1140-2.

PETRIZ BA, CUNHA VN, VILLETH GR, MEHTA A, ROCHA LA, SILVA ON, ALMEIDA JA, MORAIS PK, SIMÕES HG, FRANCO OL. Effects of acute exercise over heart proteome from monogenic obese (ob/ob) mice. **J Cell Physiol**. 2012a Sep 27.

PETRIZ BA, GOMES CP, ROCHA LA, REZENDE TM, FRANCO OL. Proteomics applied to exercise physiology: a cutting-edge technology. **J Cell Physiol**. 2012b Mar;227(3):885-98

PIETROWSKA M, WIDŁAK P. MALDI-MS-Based Profiling of Serum Proteome: Detection of Changes Related to Progression of Cancer and Response to Anticancer Treatment. **Int J Proteomics**. 2012;2012:926427.

PRÍMOLA-GOMES TN, CAMPOS LA, LAUTON-SANTOS S, BALTHAZAR CH, GUATIMOSIM S, CAPETTINI LS, LEMOS VS, COIMBRA CC, SOARES DD, CARNEIRO-JÚNIOR MA, QUINTÃO-JÚNIOR JF, SOUZA MO, CRUZ JS, NATALI AJ. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. **J**

**Appl Physiol.** 2009 Aug;107(2):593-8.

QUINTÃO-JÚNIOR JF, NATALI AJ, CARNEIRO-JÚNIOR MA, DE CASTRO CA, DRUMMOND LR, LAVORATO VN, FELIX LB, CRUZ JDOS S, PRÍMOLA-GOMES TN. Morphology and contractility in cardiomyocytes of rats with low exercise performance. **Arq Bras Cardiol.** 2012 May;98(5):431-6.

ROTILIO D, DELLA CORTE A, D'IMPERIO M, COLETTA W, MARCONE S, SILVESTRI C, GIORDANO L, DI MICHELE M, DONATI MB. Proteomics: bases for protein complexity understanding. **Thromb Res.** 2012 Mar;129(3):257-62.

SUN B, WANG JH, LV YY, ZHU SS, YANG J, MA JZ. Proteomic adaptation to chronic high intensity swimming training in the rat heart. **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.** 2008 Mar;3(1):108-17.

SUZUKI T, NAGAI R. Cardiovascular proteomic analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** 2007 Aug;855(1):28-34.

THOMAS PD, CAMPBELL MJ, KEJARIWAL A, MI H, KARLAK B, DAVERMAN R, DIEMER K, MURUGANUJAN A, NARECHANIA A. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. **Genome Res.** 2003 Sep;13(9):2129-41.

THYFAULT JP, RECTOR RS, UPTERGROVE GM, BORENGASSER SJ, MORRIS EM, WEI Y, LAYE MJ, BURANT CF, QI NR, RIDENHOUR SE, KOCH LG, BRITTON SL, IBDAH JA. Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury. **J Physiol.** 2009 Apr 15;587(Pt 8):1805-16.



TROXELL ML, BRITTON SL, AND KOCH LG. Selected contribution: Variation and heritability for the adaptational response to exercise in genetically heterogeneous rats. **J Appl Physiol** 94: 1674-1681, 2003.

VAN EYK JE. Overview: the maturing of proteomics in cardiovascular research. **Circ Res**. 2011 Feb 18;108(4):490-8.

VERCAUTEREN FG, ARCKENS L, QUIRION R. Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. **Amino Acids**. 2007 Sep;33(3):405-14.

VERGOTE D, BOUCHUT A, SAUTIÈRE PE, ROGER E, GALINIER R, ROGNON A, COUSTAU C, SALZET M, MITTA G. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. **Int J Parasitol**. 2005 Feb;35(2):215-24.

WAYS JA, CICILA GT, GARRETT MR, KOCH LG. A genome scan for Loci associated with aerobic running capacity in rats. **Genomics**. 2002 Jul;80(1):13-20.

WILKINS MR, SANCHEZ JC, GOOLEY AA, APPEL RD, HUMPHERY-SMITH I, HOCHSTRASSER DF, WILLIAMS KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev**.1996;13:19-50.

WISLØFF U, NAJJAR SM, ELLINGSEN O, HARAM PM, SWOAP S, AL-SHARE Q, FERNSTRÖM M, REZAEI K, LEE SJ, KOCH LG, BRITTON SL. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. **Science**. 2005 Jan 21;307(5708):418-20.

WYSS M, SMEITINK J, WEVERS RA, WALLIMANN T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. **Biochim Biophys Acta**. 1992 Sep 25;1102(2):119-66.

YAMAGUCHI W, FUJIMOTO E, HIGUCHI M, TABATA I. A DIGE proteomic analysis for high-intensity exercise-trained rat skeletal muscle. **J Biochem**. 2010 Sep;148(3):327-33.

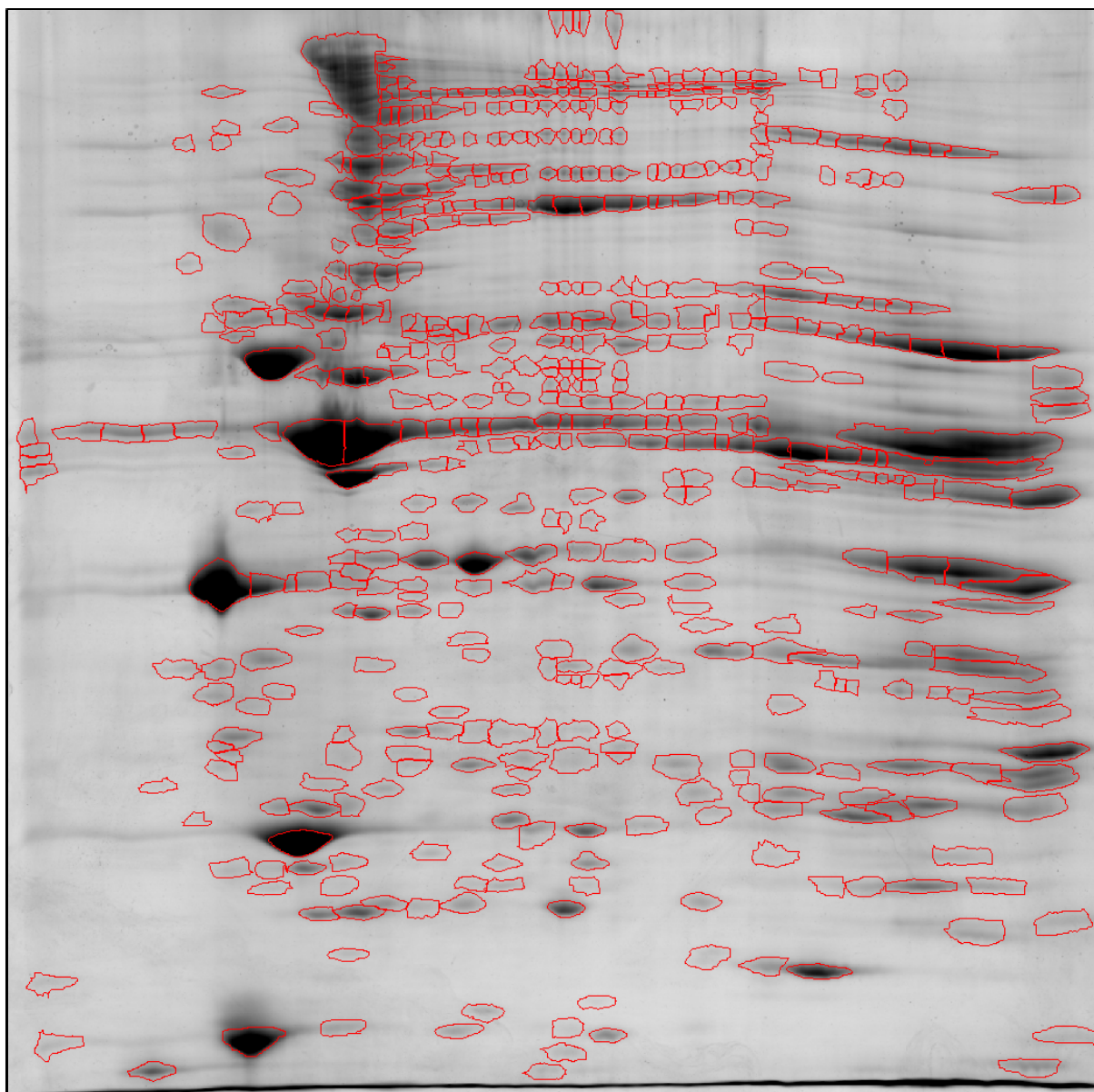
YANG KD, CHANG WC, CHUANG H, WANG PW, LIU RT, YEH SH. Increased complement factor H with decreased factor B determined by proteomic differential displays as a biomarker of tai chi chuan exercise. **Clin Chem**. 2010 Jan;56(1):127-31.

YUAN Q, FONTENELE-NETO JD, FRICKER LD. Effect of voluntary exercise on genetically obese Cpefat/fat mice: quantitative proteomics of serum. **Obes Res**. 2004 Jul;12(7):1179-88.

ZONG J, GUO C, LIU S, SUN MZ, TANG J. Proteomic research progress in lymphatic metastases of cancers. **Clin Transl Oncol**. 2012 Jan;14(1):21-30.

***ADENDO***

---

**ADENDO 1****Gel de referência do grupo ADC**

**ADENDO 2****Gel de referência do grupo BDC**