

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Agnes Margarethe Molnar



**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE BN-PAGE E COLORAÇÃO  
HISTOQUÍMICA DOS COMPLEXOS I E IV DA CADEIA DE  
TRANSPORTE DE ELÉTRONS EM DIFERENTES MÚSCULOS  
DE RATO**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (s) candidato a) Agnes Margarethe Molnar e aprovada pela Comissão Julgadora 18/08/2000 Lucia

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

**Orientador: Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva**

**Co-orientador: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo**

2000

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	M738p
V.	Ex
TOMBO BC/	42634
PROC.	16/278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$ 11,00
DATA	11/10/00
N.º CTD	

CM-00146955-8

318 10 276958

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**Molnar, Agnes Margarethe**

Padronização da técnica de BN-Page e coloração histoquímica dos complexos I e IV da cadeia de transporte de elétrons em diferentes músculos de rato/Agnes Margarethe Molnar. ---Campinas, SP. [s.n.], 2000 90f. ilus.

Orientadora: Lucia Pereira da Silva

Co-orientadora: Denise Vaz de Macedo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Eletroforese. 2. Músculos. 3. Mitocondria. I. Silva, Lucia Pereira da. II. Macedo, Denise Vaz de. III. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. IV. Título.

~~M788p~~

M738p

Campinas, 18 de agosto de 2000

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva  
(IB- UNICAMP - Orientador)



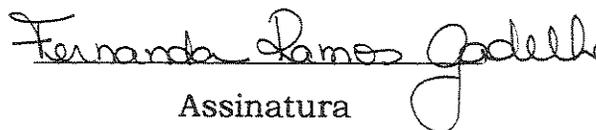
Assinatura

Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos  
(IB- UNICAMP)



Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha  
(IB- UNICAMP)



Assinatura

Prof. Dr. José Camilo Novello  
(IB- UNICAMP)

Assinatura

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

"Quando nada parece ajudar  
eu vou ver o cortador de pedra  
martelando, cortando sua rocha  
cem vezes, sem que uma só  
rachadura apareça. No entanto,  
na centésima primeira martelada a  
pedra se abre em duas, e eu sei  
que não foi aquela que conseguiu  
mas, todas que vieram antes."

(Jacob Rüs)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais.... a ela, Dalva pelo apoio, carinho e sábias conversas... a ele, Sandor que apesar de não poder acompanhar o final desta etapa, esteve sempre presente no coração e na memória.

Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva pela árdua e paciente discussão.

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo pelos momentos de descoberta da Bioquímica e discussão deste trabalho.

Profa. Dra. Fernanda R. Gadelha, Prof. Dr. Hernandez F. Carvalho e Prof. Dr. José Camilo Novello pela contribuição no exame de qualificação.

Aos meus queridos amigos do LABEX pela força e paciência: Cláudio, Neto, Leo, Soraya, Marcela, Leandro e em especial Armindo.

Aos colegas do departamento por terem compartilhado dessa experiência de forma tão rica e agradável, em especial à Dani e ao Eduardo.

Ao Clément, para mim a melhor definição de amigo e companheiro....uma lição de amor e carinho.

As amigas Thaís, Lígia, Silvia, Flávia, Carol e todos aqueles que estão sempre no apoio espiritual e moral.

A minha irmã Eva..... por todas as emoções!!

A Mary por sempre dar uma mãozinha quando precisei e pelo grande apoio.

Ao Leonardo, Daniel, Paulinho e Mateus pela ajuda nos momentos de correria.

Ao Laboratório de Enzimologia e Química de Proteínas pelo apoio técnico.

A Andreia e Marina pela ajuda burocrática e paciência.

A CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

*A realização deste trabalho se deu graças a colaboração  
da Profa. Dra. Federica Dabbeni-Sala  
(Università di Padova- Italy)*

## **ÍNDICE**

<b>ABREVIACÕES.....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>iv</b>
<b>INTRODUÇAO.....</b>	<b>1</b>
<b>FONTES DE ATP PARA O TRABALHO MUSCULAR.....</b>	<b>2</b>
Fontes anaeróbicas de ATP .....	3
Fontes aeróbicas de ATP e a mitocôndria.....	4
<b>CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS.....</b>	<b>8</b>
Complexo I.....	8
Complexo II.....	10
Complexo III.....	12
Citocromo c.....	12
Complexo IV.....	13
Complexo V (ATP sintetase).....	15
<b>CLULAS MUSCULARES E SUAS CARACTERÍSTICAS.....</b>	<b>17</b>
<b>ADAPTAOES INDUZIDAS POR CONDIOES ESPECIAIS.....</b>	<b>21</b>
Exercício Físico.....	21
Doenças que afetam as funes mitocondriais .....	23
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIAIS E MTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>DISCUSSAO.....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Principais etapas do metabolismo.....	3
<b>Figura 2.</b>	Esquema da membrana interna da mitocôndria.....	7
<b>Figura 3.</b>	Reações de transferência de elétrons do complexo I até coenzima Q.....	8
<b>Figura 4.</b>	Esquema da topologia e função do complexo I.....	9
<b>Figura 5.</b>	Representação esquemática do complexo II.....	10
<b>Figura 6.</b>	Esquema da entrada de elétrons pelo complexo II.....	11
<b>Figura 7.</b>	Esquema da reação de transferência de elétrons do complexo III.....	12
<b>Figura 8.</b>	Esquema do complexo IV.....	14
<b>Figura 9.</b>	Esquema das reações da cadeia de transporte de elétrons.....	15
<b>Figura 10.</b>	Estrutura do complexo V.....	16
<b>Figura 11.</b>	Estrutura morfo-funcional de músculo esquelético e seus níveis de organização.....	17
<b>Figura 12.</b>	Esquema da preparação da amostra.....	31
<b>Figura 13.</b>	Gel de eletroforese em poliacrilamida (BN-Page) submetido à coloração Com Coomassie Blue.....	40
<b>Figura 14.</b>	Correlação entre enzima CS/área do complexo V em músculo SO.....	41
<b>Figura 15.</b>	Correlação entre enzima CS/área do complexo V em músculo GV.....	42
<b>Figura 16.</b>	Correlação entre enzima CS/área do complexo V em músculo GB.....	42
<b>Figura 17.</b>	Correlação entre enzima CS/área do complexo V em músculo ST.....	44
<b>Figura 18.</b>	BN-Page com coloração por Coomassie Blue e histoquímica dos complexo I e IV.....	45
<b>Figura 19.</b>	Triplicata de BN-Page com coloração por Coomassie e histoquímica.....	47
<b>Figura 20.</b>	Razão entre a área do complexo I e do complexo V dos diferentes músculos.....	50
<b>Figura 21.</b>	Razão entre a área do complexo IV e do complexo V dos diferentes músculos.....	51

## ***ÍNDICE DE TABELAS***

<b>Tabela 1.</b> Doenças relacionadas à mitocôndria.....	25
<b>Tabela 2.</b> Atividade da enzima citrato sintase (A) e dosagem de proteínas (B) .....	38
<b>Tabela 3.</b> Razão complexo I/V (A) e razão complexo IV/V (B).....	48
<b>Tabela 4.</b> Tipagem de fibras de ratos Sprague-Dawley e razões I/V e IV/V.....	52
<b>Tabela 5.</b> Tipagem de fibras de ratos Wistar.....	52

## **ABREVIACÕES**

**ADP:** Adenosina difosfato

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BN-Page:** "Blue native polyacrylamide gel electrophoresis"

**CK:** Creatina quinase

**CoQ:** Coenzima Q

**COX:** Citocromo c oxidase

**CP:** Cadeia pesada

**CPM:** Cadeia pesada de miosina

**CS:** Citrato sintase

**CTE:** Cadeia de transporte de elétrons

**DAB:** Diaminobenzidina

**DNA:** Ácido desoxiribonucléico

**DPOC:** Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

**DTNB:** Ácido 5,5- ditiobis (2-nitrobenzóico)

**EROS:** Espécies reativas de oxigênio

**FAD<sup>+</sup>:** Flavina adenina dinucleotídeo

**FADH<sub>2</sub>:** Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

**FMN:** Flavina mononucleotídeo

**GB:** Gastrocnêmio branco

**GLUT-4:** Transportador de glicose específico de células musculares e adipócitos

**GV:** Gastrocnêmio vermelho

**MOPS:** Ácido (3-[n-morfolino]) propano sulfônico

**mtDNA:** DNA mitocondrial

**NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

**NBT:** NitroBlue tetrazólio

**OAA:** Oxaloacetato

**PC:** Fosfocreatina

**PMSF:** Fluoreto de fenil metil sulfonil

**SO:** Sólido

**ST:** Semitendinoso

**tRNA:** RNA transportador (ácido ribonucleico)

## RESUMO

O BN-Page ("Blue Native Polyacrylamide gel electrophoresis") é uma técnica desenvolvida para análise de proteínas de membrana. Associada à coloração histoquímica, essa técnica permite análise e caracterização dos complexos enzimáticos da cadeia de transporte de elétrons. A grande vantagem dessa técnica é a utilização de uma pequena quantidade de tecido (30mg) permitindo análise das atividades das enzimas acima especificadas, sem a necessidade do isolamento de mitocôndrias.

Dessa forma, esse método pode ser utilizado no estudo de diversas alterações que podem ser induzidas por condições especiais, dentre as quais: o exercício físico, a DPOC e doenças que afetam a função mitocondrial (Parkinson, Alzheimer etc).

O objetivo desse trabalho foi a padronização da técnica de BN-Page associada à coloração histoquímica específica dos complexos I e IV da cadeia de transporte de elétrons em músculo esquelético de rato. Os músculos utilizados foram o sóleo, o gastrocnêmio (porção vermelha e branca) e o semitendinoso.

A atividade das enzimas foi medida através de densitometria óptica usando a banda referente ao complexo V isolado por eletroforese e corado com Coomassie Blue como padrão interno.

Nossos resultados indicaram uma boa resolução dos géis e uma correlação ótima entre a atividade da enzima citrato sintase (conhecida como marcador de quantidade de mitocôndria) e a área/intensidade da banda referente ao complexo V, indicando que essa também pode ser utilizada como marcador de conteúdo mitocondrial. A atividade do complexo I e IV dos músculos mais oxidativos (sóleo e gastrocnêmio vermelho) apresentou uma variação bem pequena e uma correlação linear com a área do complexo V. Já nos músculos mais glicolíticos houve maior variação na atividade de ambos complexos e sua correlação com o complexo V foi menor.

## SUMMARY

BN-PAGE (Blue Native Polyacrylamide gel electrophoresis) is a technique developed for the analysis of membrane proteins. This technique added to the histochemical staining enables the analysis and characterization of the activity of the enzymatic complexes of the mitochondrial electron transport chain. A key advantage of this technique is the small quantity of tissue required (30 mg) for homogenate extraction, allowing the use of this analysis for tissues from different species, including human.

This method can be used for protein defects characterization in mitochondrial myopathies such as Leber's disease, Parkinson and Alzheimer diseases among other pathologies such as COPD (chronic obstructive pulmonary disease) and biochemical adaptations induced by physical exercise.

The aim of this work was the standardization of this technique using histochemical staining for Complexes I and IV of the electron-transport chain in four rat skeletal muscles (soleus, red and white gastrocnemius and semitendinosus).

The enzyme activity was measured by optical density (Image master 1D – Pharmacia Biotech) using the Blue stained complex V area obtained from BN-Page as an internal standard. Its good resolution and the good correlation between its area/intensity and citrate synthase activity indicates that complex V is a good quantitative marker of mitochondrial content. The activity of complex I and IV of oxidative muscles (soleus and red gastrocnemius) presented a narrow range of values and a close linear correlation with complex V. On the other hand, the glycolytic muscles (white gastrocnemius and semitendinosus) presented a wide range in their enzyme activity of both complexes and had a little correlation.

## ***INTRODUÇÃO***

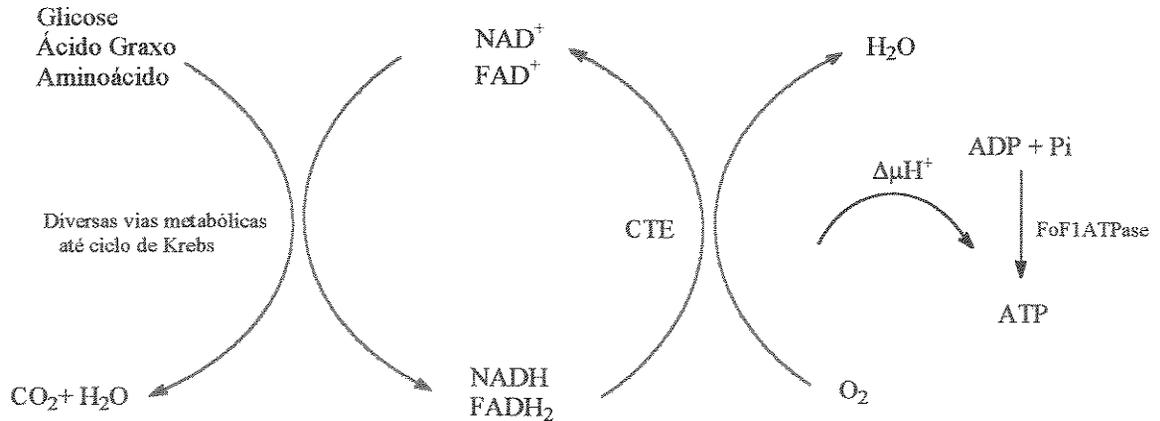
---

## **FONTES DE ATP PARA O TRABALHO MUSCULAR**

Todo movimento que realizamos, desde o piscar dos olhos até a corrida de maratona, depende de um componente estrutural do corpo humano denominado músculo. Do total da massa corporal de um indivíduo, 30 a 45 % são constituídos de massa muscular (Lee, 1995). Existem diferentes tipos de músculos: cardíaco (estrutura do coração) e liso (estrutura do aparelho digestivo), de contração involuntária e o esquelético, de contração voluntária (Willmore & Costill, 1994). O músculo esquelético é muito importante quando tratamos do exercício físico, pois são suas adaptações estruturais e os aspectos que o envolvem (flexibilidade, força e resistência) que deverão ser considerados quando um programa de treinamento é proposto.

Assim, o músculo é o órgão essencial para a motricidade e utiliza somente ATP como fonte de energia para realizar, não somente o processo de contração muscular “per se”, como também reagir aos impulsos nervosos e garantir as reações do metabolismo, necessárias para a manutenção de sua atividade. O fornecimento constante de ATP para as células musculares vem de reservas que, dependendo da intensidade e duração da atividade realizada podem ser metabolizadas na presença ou ausência de O<sub>2</sub>. Assim, existem três processos comuns, produtores de energia para a formação do ATP nos músculos esqueléticos, dois anaeróbicos e um aeróbico.

A principal forma de produção de ATP pelos organismos vivos ocorre pelo metabolismo oxidativo, que utiliza como fonte energética qualquer um dos principais combustíveis celulares (carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos), conforme mostrado de maneira geral na Figura 1. Nesse sistema, o ATP é formado nas mitocôndrias, a partir do acoplamento do funcionamento entre o ciclo de Krebs (CK) e a cadeia de transporte de elétrons (CTE), que permitem o processo de fosforilação oxidativa do ADP.



**Figura 1.** Principais etapas do metabolismo aeróbico (adaptado de Marzzoco & Bayardo, 1999).

Desta forma, a via aeróbia é recrutada no repouso, em atividades de longa duração (mais que 3 minutos até horas, como maratona e triathlon) e também durante as pausas, na recuperação de esforços intensos. Ela mantém uma razão ATP/ADP de uma forma lenta e prolongada, pois são muitas reações químicas envolvidas até a utilização do  $O_2$  pelas mitocôndrias e produção do ATP, como explicada adiante.

### ***FONTES ANAERÓBICAS DE ATP***

Qualquer esforço maior do organismo em relação à situação anterior pode causar “déficit” temporário de  $O_2$  para as células musculares. Isto acontece, por exemplo, no início de qualquer atividade física ou em exercícios de explosão, de curtíssima duração. Para esta reposição rápida de ATP temos uma reserva energética, encontrada principalmente nos músculos esqueléticos e cardíaco, chamada fosfocreatina (PC). Desta forma ATP é repostado através de uma única reação, reversível, catalizada pela enzima creatina quinase (CK):



Apesar desse sistema não ser capaz de prover grandes quantidades de energia, tem a capacidade de ressintetizar ATP de forma extremamente rápida, funcionando como um tampão energético, extremamente sensível a alterações nas concentrações intracelulares de ATP e ADP.

A outra via de ressíntese de ATP que não utiliza oxigênio é a glicólise anaeróbia. Durante esforços de alta intensidade, de aproximadamente 3 minutos, a glicólise anaeróbia é responsável por até 80% do ATP necessário. Esta via envolve dez reações químicas, onde a quebra parcial da molécula de glicose ou do glicogênio muscular (glicogenólise) proporciona a formação de ATP, também de forma rápida, além de produzir lactato no final do processo:



### ***FONTE AERÓBICA DE ATP E A MITOCÔNDRIA***

As organelas responsáveis pela maior parte da produção da energia requerida por nossas células são as mitocôndrias. Razão de muitas pesquisas e indagações, as mitocôndrias já completaram seu cinquentenário de descoberta. Abundantes em vários tecidos e algumas vezes fácil de purificar essa organela foi recentemente motivo de um prêmio Nobel, concedido à pesquisa que definiu os princípios fundamentais do metabolismo energético celular (Kibertis, 1999). A mitocôndria é a única organela das células animais que possui seu próprio DNA (mtDNA), responsável pela codificação de treze polipeptídeos, dois RNAs ribossômicos e todos os tRNA transportadores, necessários para tradução de seu RNA mensageiro (Bentlage *et al.*, 1995). Além da produção de ATP, ela também está envolvida em processos como apoptose ou “morte celular programada” (Wallace, 1999), produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), além de ter um papel fundamental em adaptações

provocadas pelo exercício físico (Holloszy, 1967; Davies, 1981) e envelhecimento (Ames, 1995). Desta forma, para o entendimento dos diversos processos nos quais a mitocôndria está envolvida é preciso o estudo dos constituintes fundamentais que definem sua estrutura e de seus mecanismos funcionais.

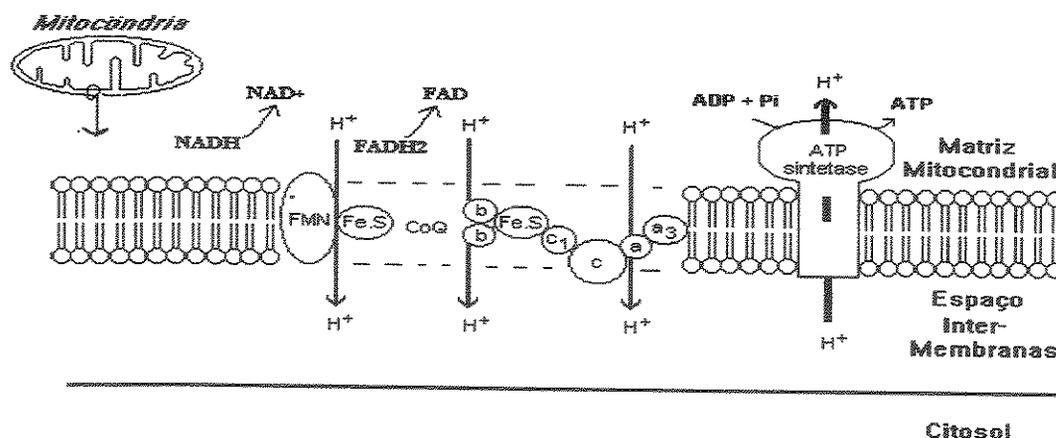
As mitocôndrias são organelas envoltas por duas membranas, uma externa e outra interna, que diferem entre si não só na composição lipídica e protéica, como principalmente na função exercida dentro da célula. Ambas possuem um alto grau de ácidos graxos poliinsaturados nos dois maiores grupos de fosfolípidios (fosfatidilcolina e fosfatidietanolamina) que, medidos em relação à quantidade de proteína, constituem aproximadamente 75 % dos fosfolípidios totais. Em menor proporção aparecem a cardiolipina com 18 % e o colesterol com 3 % (Cullis & Hope, 1985).

A membrana externa, é rica em porinas, que somam 1 % das proteínas mitocondriais totais, sendo altamente permeável. Isto confere ao espaço intermembrânico uma composição iônica próxima do meio citosólico. Ao contrário, a membrana interna é altamente seletiva, sendo permeável somente a  $O_2$ ,  $H_2O$  e  $NH_3$ . Quaisquer outros metabólitos, para atravessar a membrana interna e chegar à matriz mitocondrial precisam de transportadores específicos (Haworth & Hunter, 1980). É esta característica da membrana interna que confere às mitocôndrias o papel de produtoras de energia nas células. Desta forma, a membrana mitocondrial interna é rica em proteínas envolvidas no metabolismo celular, correspondendo a aproximadamente 80 % dos componentes dessa membrana. Os cerca de 20 % de lípidios presentes são constituídos principalmente de cardiolipina (Daum, 1985).

Os componentes da cadeia respiratória das mitocôndrias e o sistema de fosforilação oxidativa têm um papel fundamental na geração de ATP a partir de nutrientes como carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos (Cooper, 1992). Ou seja, a oxidação de grande parte dos substratos por

enzimas  $\text{NAD}^+$  e FAD-específicas do ciclo de Krebs e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos resulta na presença constante de NADH e  $\text{FADH}_2$  na matriz mitocondrial de células eucariontes (Cramer & Knaff, 1991). Por sua vez, ambas coenzimas na sua forma oxidada existem em concentrações baixas, devendo, portanto, ser constantemente reoxidadas para não haver prejuízo na produção aeróbica de ATP. A reoxidação das coenzimas NADH e  $\text{FADH}_2$ , ocorre através das proteínas da cadeia de transporte de elétrons. Ou seja, com a reoxidação das coenzimas, elétrons são transferidos através dos componentes da cadeia, de acordo com os potenciais de óxido-redução ( $\Delta E$ ). O potencial redox da cadeia respiratória varia de -320 (complexo I) até 380 mV (complexo IV). Tais reações geram uma variação de energia livre ( $\Delta G$ ) negativa, possibilitando o bombeamento de prótons para o espaço intermembranas em três sítios específicos, complexos I, III e IV (Cramer & Knaff, 1991; Saraste, 1999). Portanto, os complexos I, III e IV são reconhecidos como sítios de translocação de prótons através da membrana interna da mitocôndria (Cramer & Knaff, 1991).

A volta específica de prótons pela enzima  $\text{F}_0\text{F}_1$  ATPase (ATP sintetase), também localizada na membrana mitocondrial interna é termodinamicamente favorável e é imprescindível para a liberação do ATP formado (Mitchell, 1961) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema da membrana interna da mitocôndria, mostrando a formação do  $\Delta\mu\text{H}^+$  e a entrada de prótons pela enzima *FoF1-ATP sintetase*, imprescindível para a síntese de ATP (adaptado de Marzocco & Torres, 1999).

Desta forma, a produção de ATP está intimamente ligada à formação de um gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ), conhecido como força proton motriz e que possui dois componentes: um elétrico ( $\Delta\psi$ ), com carga negativa no interior das mitocôndrias e outro químico ( $\Delta\text{pH}$ ), alcalino na matriz. Esses componentes estão relacionados entre si de acordo com a equação (Cramer & Knaff, 1991):

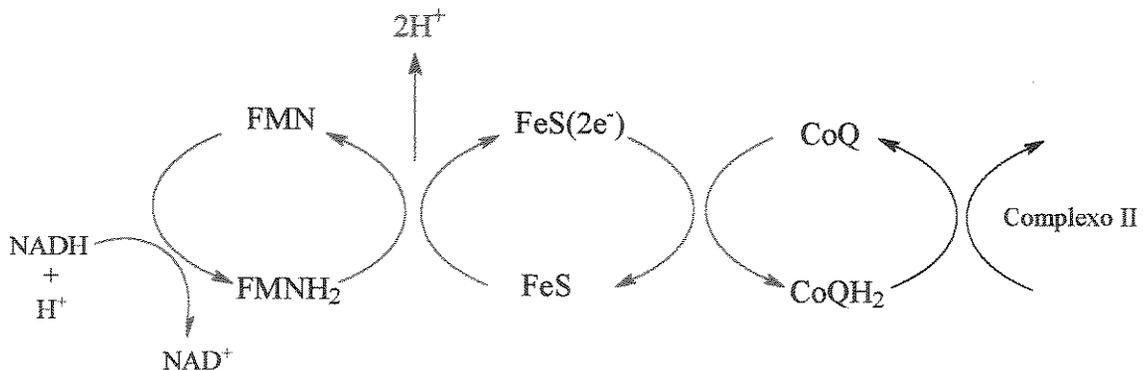
$$\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\psi - 60\Delta\text{pH}$$

## CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é constituída de proteínas e um composto lipídico, a coenzima Q. Os componentes protéicos foram separados em quatro complexos. Alguns autores incluem a enzima ATP sintetase como um quinto complexo (Cooper *et al.*, 1992; Zerbetto *et al.*, 1997), mas este não participa do transporte de elétrons e sim da translocação de prótons para dentro da matriz mitocondrial, permitindo dessa forma a liberação do ATP produzido.

### **COMPLEXO I**

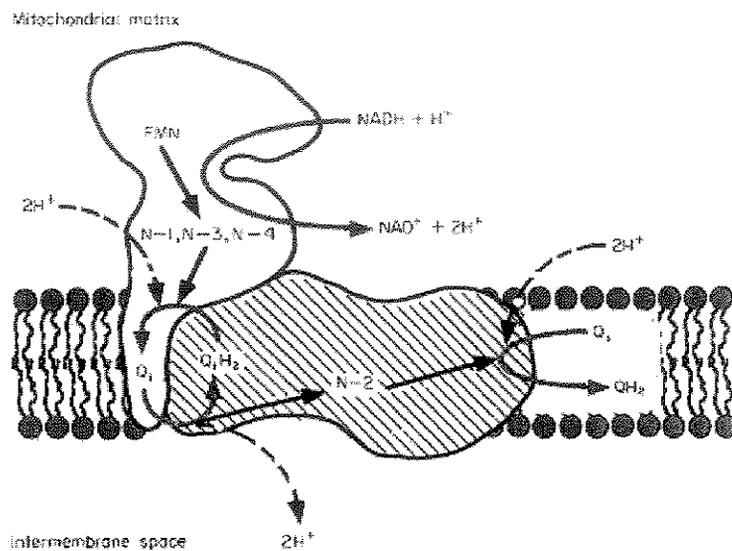
O complexo I (*NADH-CoQ redutase*) é constituído por flavina mononucleotídeo (FMN) e proteínas Fe-S. De acordo com as reações abaixo, a reoxidação do NADH fornece elétrons que reduzem os componentes do complexo I. Este complexo é reoxidado pela coenzima Q,:



**Figura 3.** Reações de transferência de elétrons no Complexo I (*NADH-CoQ redutase*) até a coenzima Q (adaptado de Saraste, 1999).

Conforme mostrado na Figura 4, o complexo I (*NADH/Coenzima Q redutase*) é o maior componente protéico da membrana interna da mitocôndria, apresentando massa molecular de cerca de 750 kDa (Schagger, 1991) e uma estrutura em formato de L, com dois domínios principais (um hidrofóbico e outro hidrofílico) (Cooper *et al.*, 1992; Saraste,

1999). É composto de pelo menos 26 subunidades (Cooper *et al.*, 1992) e contém 7 dos 13 polipeptídeos codificados pelo mtDNA. Muitas dessas subunidades têm seu papel ainda desconhecido, mas acredita-se que algumas delas estejam envolvidas na ligação de desidrogenases do ciclo de Krebs ao complexo I. Acredita-se também que suas subunidades formam uma camada hidrofóbica, que protege a parte hidrofílica do complexo (FMN, proteínas Fe-S e moléculas de quinona) (Cramer, 1991; Cooper *et al.*, 1992; Saraste, 1999).

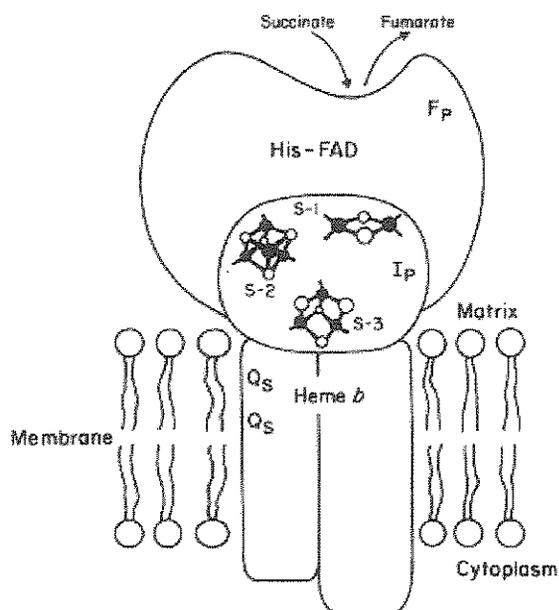


**Figura 4.** Esquema da topologia e função dos dois domínios da NADH desidrogenase (Complexo I). FMN refere-se à flavina mononucleotídeo, N-1, N-2, N-3 e N-4 aos centros ferro-enzofre,  $Q_1$  refere-se à quinona interna e  $Q_2$  à ubiquinona-substrato. A parte branca corresponde à enzima e a parte sombreada ao fragmento hidrofóbico. As setas pontilhadas referem-se aos substratos e coenzimas, setas preenchidas ao caminho dos elétrons e as setas tracejadas ao caminho dos prótons (Hofhaus *et al.*, 1991).

## COMPLEXO II

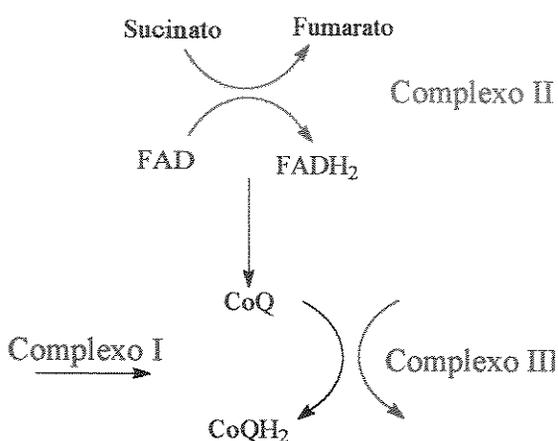
O complexo II (Succinato/Coenzima Q redutase) é estruturalmente mais simples que o complexo I e está melhor caracterizado (Singer *et al.*, 1995).

Sua massa molecular é de aproximadamente 130 kDa. Podemos observar pela Figura 5 que este complexo é constituído de uma parte periférica (exposta na direção da matriz mitocondrial), da qual fazem parte um domínio hidrofílico, constituído por uma flavoproteína e uma subunidade protéica ferro-enxofre (contendo 2Fe-2S, 4Fe-4S e 3Fe-4S). O domínio membranar é constituído de dois polipeptídeos ligados a grupos heme (citocromos  $b_{560}$ ), os quais ligam as subunidades catalíticas à ubiquinona-CoQ (Hagerhall, 1997).



**Figura 5.** Representação esquemática da topologia da succinato desidrogenase e citocromo b no complexo II, mostrando FAD ligado covalentemente, centros ferro-enxofre (S-1, S-2, S-3) na subunidade Ip (heme b) do complexo e um par de moléculas ubiquinona ligadas à subunidade (Cramer, 1991).

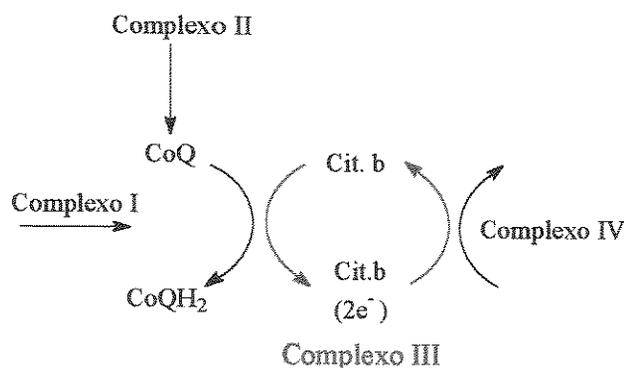
Nesse complexo, o succinato (intermediário do ciclo de Krebs) é oxidado a fumarato, transferindo elétrons para a coenzima FAD, que então se reduz a FADH<sub>2</sub> e, através do citocromo b, seus elétrons também são transferidos para a CoQ. Desta forma, os elétrons provenientes dos complexos I e II são transferidos para a coenzima Q, molécula altamente lipofílica, que permite sua mobilidade na fase lipídica da membrana e sua transferência para os citocromos bc<sub>1</sub> (complexo III). Seguem abaixo as reações que envolvem o complexo II da cadeia de transporte de elétrons:



**Figura 6.** Esquema da entrada de elétrons pelo complexo II da cadeia de transporte de elétrons (adaptado de Saraste, 1999).

### COMPLEXO III

O Complexo III (citocromo  $bc_1$ ), de massa molecular aproximada de 500 kDa, é constituído por uma proteína ferro-enxofre e pelos citocromos b e  $c_1$ . Possui 11 subunidades, mas apenas 3 possuem os centros redox (Saraste, 1999). As subunidades-chave são o citocromo b (que possui oito hélices transmembranares com dois heme ligados –  $b_l$  e  $b_h$ ), uma proteína Fe-S ligada à membrana (conhecida como centro tipo Rieske –  $Fe_2S_2$ ) e o citocromo  $c_1$ , também ligado à membrana (Saraste, 1999). Esse complexo recebe elétrons da CoQ, os quais são transferidos ao citocromo c. O mecanismo responsável pela transferência de elétrons e bombeamento de prótons para fora da matriz mitocondrial é conhecido como “ciclo Q” e envolve a oxidação da coenzima Q através de duas etapas que envolvem a semiquinona como intermediário estável (Saraste, 1999).



**Figura 7.** Esquema da reação de transferência de elétrons do complexo III (adaptado de Saraste, 1999).

### Citocromo c

O citocromo c da cadeia respiratória mitocondrial possui características em sua estrutura que permitem sua mobilidade através da membrana e que são relevantes para o mecanismo de transferência de elétrons no qual essa molécula está envolvida:

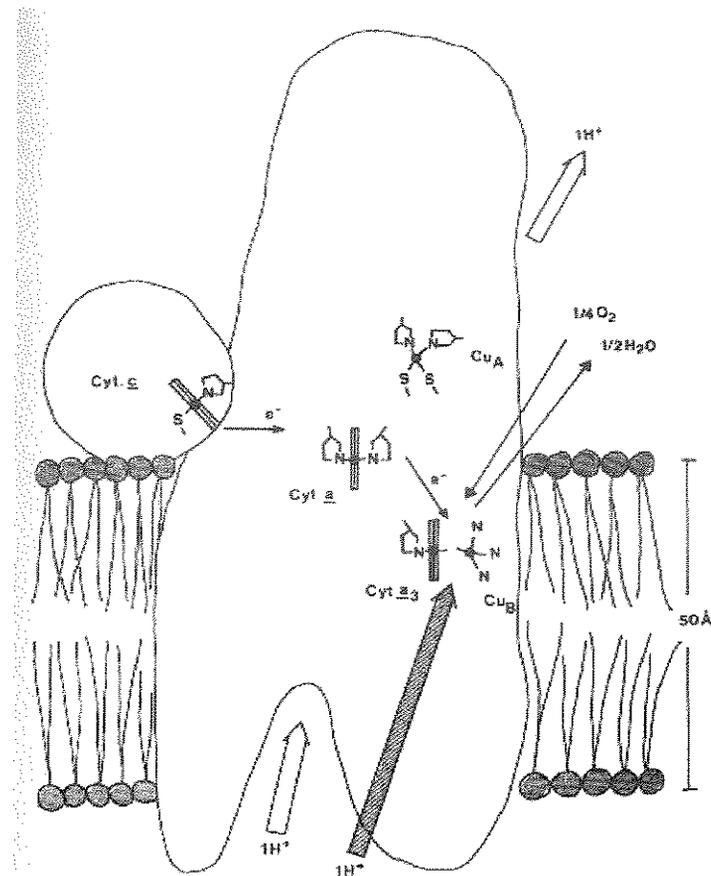
- apresenta-se fracamente ligado à membrana

- é hidrossolúvel
- exposição de uma borda heme para o solvente;
- uma distribuição de cargas altamente positiva, conservada por toda borda heme exposta, devido aos resíduos de lisina que lá se encontram (Cramer & Knaff, 1991).

Modificações químicas específicas nos resíduos de lisina do citocromo c podem causar uma diminuição na interação da molécula do citocromo com as enzimas que interagem com ela (oxidase e redutase) prejudicando, assim, o transporte de elétrons (Brautigan, 1978).

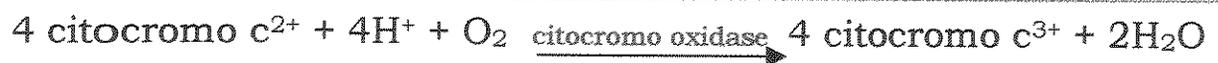
#### **COMPLEXO IV**

O complexo IV (citocromo c oxidase, ferrocitocromo c /O<sub>2</sub> oxidoreductase) é o carreador final da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. Possui um duplo papel: como redutor de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O e como bomba de prótons no final da cadeia respiratória. Esse complexo proteico pode conter 2 a 3 subunidades em procariontes e 9 a 13 subunidades em eucariontes. É uma metaloproteína de multi-subunidades, podendo conter em mitocôndrias de mamíferos quatro centros redox, duas moléculas de heme a, dois íons cobre (Cu<sub>a</sub> e Cu<sub>b</sub>) e cerca de 12 a 13 polipeptídeos [Cramer & Knaff, 1991]. As três subunidades maiores são codificadas pelo mtDNA, enquanto as restantes são codificadas pelo DNA nuclear. Dentre as três subunidades maiores, duas estão envolvidas na ligação de íons cobre com os grupos heme (a e a<sub>3</sub>) e acredita-se que a outra subunidade tenha o papel de facilitar a translocação de prótons (Cramer & Knaff, 1991). A subunidade II (Cu<sub>a</sub>) é a primeira a receber elétrons do citocromo c, que são transferidos para o citocromo a da subunidade I e então para o citocromo a<sub>3</sub>/Cu<sub>b</sub> da mesma subunidade. Esse complexo possui uma massa molecular de aproximadamente 200 KDa (Shagger & Jagow, 1991).

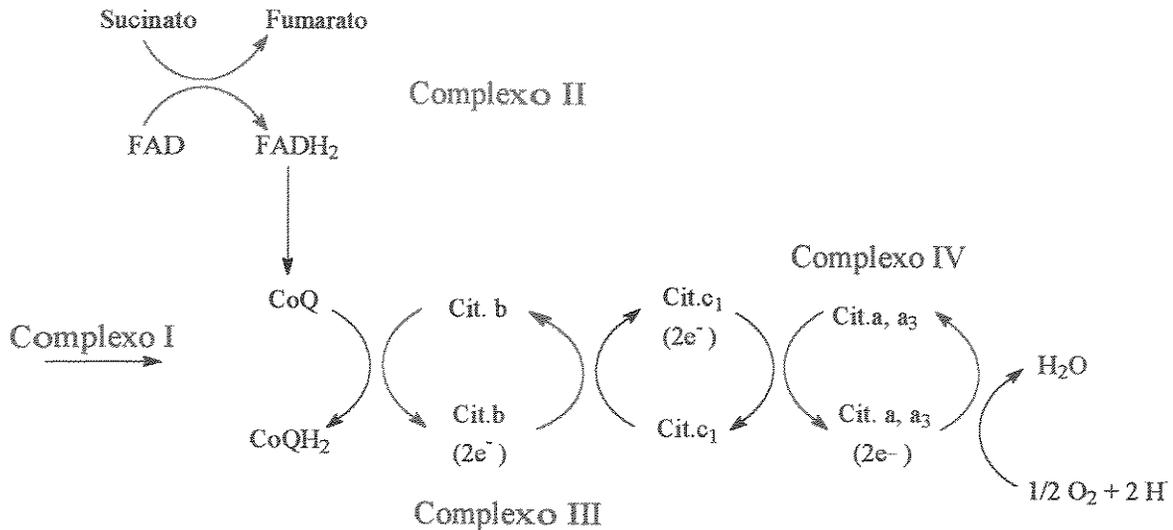


**Figura 8.** Esquema do complexo IV (citocromo c oxidase) mostrando o grupamento heme a e Cu<sub>a</sub> ligado aos sítios. O citocromo c liga-se a um sítio específico do lado citoplasmático transferindo elétrons para Cu<sub>a</sub> e heme a que são transferidos para sítios de reação heme a<sub>3</sub>/Cu<sub>b</sub> onde acontece a redução do oxigênio (Cramer & Knaff, 1991).

A citocromo c oxidase catalisa a oxidação de quatro moléculas reduzidas de citocromo c e a concomitante redução de uma molécula de O<sub>2</sub>, conforme reação descrita abaixo:



Segue abaixo as reações que envolvem todos os complexos da cadeia de transporte de elétrons:

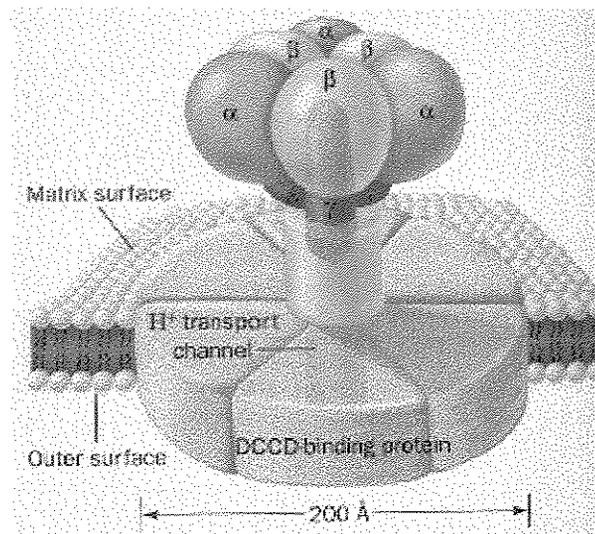


**Figura 9.** Esquema das reações da cadeia de transporte de elétrons (adaptado de Saraste, 1999).

### COMPLEXO V (ATP sintetase)

A ATP sintetase ( $F_1F_o$ -ATPase) é uma proteína de membrana com múltiplas sub-unidades e sua estrutura é a mais complexa da membrana interna da mitocôndria. É uma enzima funcionalmente reversível, que pode sintetizar ATP e liberá-lo, usando a força próton motriz ou pode, também, hidrolisar ATP. A Figura 6 mostra que esta enzima possui duas grandes estruturas:  $F_o$  (canal de prótons, sensível à oligomicina), que é uma proteína transmembranar insolúvel em água, composta por aproximadamente 10 subunidades e  $F_1$  (componente catalítico), que é uma proteína hidrossolúvel e encontra-se localizada no lado da membrana voltado para a matriz mitocondrial, sendo composta por cinco subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ) (Saraste, 1999).

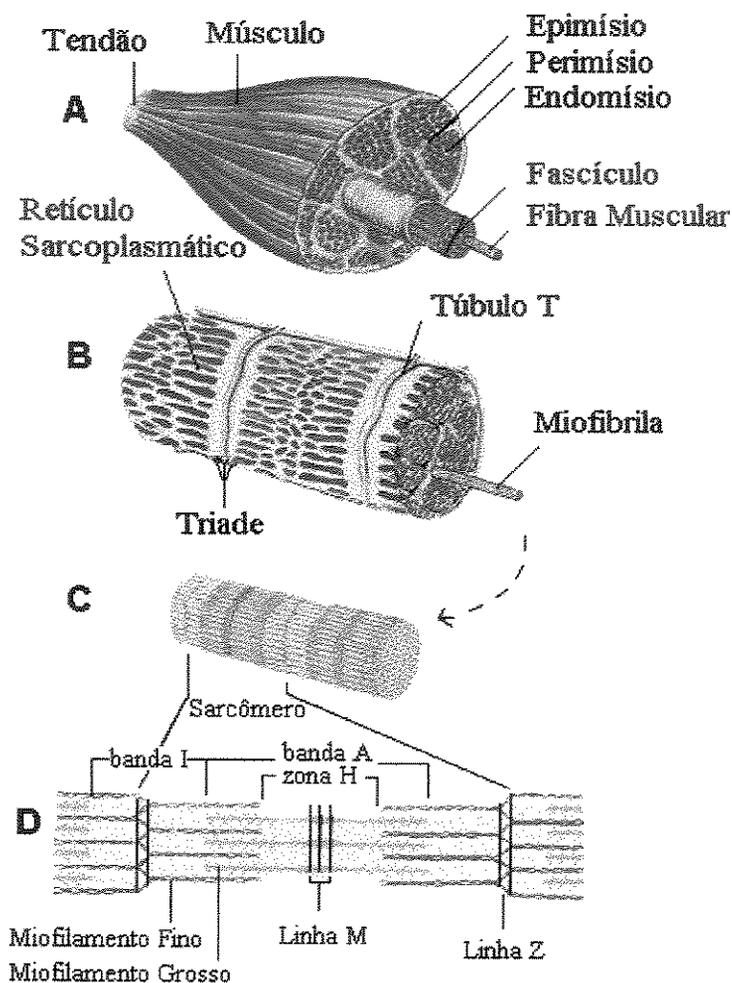
A energia livre proveniente do gradiente de prótons gerado através da passagem de elétrons pelos complexos da cadeia respiratória é necessária para a liberação do ATP sintetizado pela fosforilação de ADP. Através de mudanças conformacionais do complexo ATP sintetase o ATP pode ser liberado. Essa enzima possui uma massa molecular de aproximadamente 600 kDa (Schagger & Jagow, 1991).



**Figura 10.** Estrutura do Complexo V (ATP sintetase) com suas duas unidades funcionais  $F_0$  (canal de prótons) e  $F_1$  (formação de ATP e liberação) (Voet *et al.*, 1999).

## CÉLULAS MUSCULARES E SUAS CARACTERÍSTICAS

Uma célula muscular simples é denominada fibra muscular (Willmore & Costill, 1994). As fibras musculares podem ter um diâmetro de 10 a 80 $\mu$ m. A Figura 7 mostra a estrutura morfo-funcional do músculo esquelético.



**Figura 11.** Estrutura morfo-funcional de músculo esquelético e seus níveis de Organização. A) Músculo esquelético, fascículo e fibra muscular B) Retículo Sarcoplasmático, Túbulo T e miofibrila C) Sarcômero D) Organização Molecular dos filamentos de actina e miosina (retirado de Thibodeau & Patton, 1996).

A membrana da fibra muscular é denominada sarcolema e seu citoplasma de sarcoplasma. No sarcoplasma da célula muscular encontram-se as miofibrilas, unidades contrácteis da fibra muscular; os túbulos transversos (Túbulos T), responsáveis pela transmissão dos impulsos nervosos do sarcolema para a miofibrila, o retículo sarcoplasmático, que contém um estoque do íon cálcio, indispensável para o mecanismo de contração muscular e outras organelas, como as mitocôndrias.

As miofibrilas são elementos contrácteis, que possuem unidades funcionais básicas chamadas sarcômeros. Cada sarcômero possui os filamentos proteicos responsáveis pela contração muscular: o complexo troponina-tropomiosina e a actina, constituintes do filamento fino e a miosina, constituinte do filamento grosso (Gunning & Hardeman, 1991). Os filamentos de actina deslizam sobre os filamentos de miosina causando assim a contração muscular. Esse é um processo que depende de diversos fatores como, impulso nervoso, liberação de  $Ca^{++}$  e ATP.

A miosina é uma das proteínas miofibrilares predominantes no músculo esquelético, desempenhando um papel crucial na contração muscular, pois é essa molécula que possui atividade ATPásica. Sua molécula possui três diferentes tipos de cadeias polipeptídicas: um tipo de cadeia pesada (aproximadamente 200 kDa), constituindo a porção globular da molécula, que hidrolisa ATP e se liga à actina e dois tipos diferentes de cadeias leves (aproximadamente 20 kDa), constituindo a cauda da molécula. Existem também nas suas cadeias dois pontos de articulação, um deles situado entre a cadeia e a cauda e o outro situado na porção média da cauda até as porções globulares. Após esta região está a fração pesada (meromiosina pesada) da molécula, obtida por hidrólise com tripsina.

Os músculos, apesar de serem constituídos de células com características gerais semelhantes, apresentam diferenças morfológicas e funcionais que garantem sua alta plasticidade. Isto, pelo fato de

expressarem diferentes conjuntos de genes de isoformas de cadeia pesada (CP) de meromiosina. Essas isoformas possuem diferentes atividades ATPásicas. Assim, o ritmo de trabalho das pontes cruzadas, com seu respectivo consumo de energia varia consideravelmente com o tipo de fibra muscular, determinada pela expressão de diferentes isoformas de CP (Trybus, 1994).

Assim, as fibras musculares foram inicialmente classificadas em lentas ou rápidas, com base na reação histoquímica da mATPase (ATPase da miosina). Partindo-se da velocidade da hidrólise do ATP pode-se relacionar a velocidade da enzima miosina ATPase com a velocidade de contração muscular (Talmadge & Roy, 1993; Brooke *apud* Harrison, 1996). De uma maneira geral, as principais características funcionais e morfológicas dos dois diferentes tipos de músculo são:

(A) Músculo de contração rápida:

fenótipo: branco;

funcionalidade: movimentos rápidos de grande força e repetitivos;

fonte de energia: carboidratos;

forma de produção de energia: glicolítica (aeróbica e anaeróbica);

fibra predominante: tipo IIa e IIb;

(B) Músculo de contração lenta:

fenótipo: vermelho;

funcionalidade: movimentos lentos;

fonte de energia: carboidratos e lipídeos;

forma de produção de energia: oxidativa (aeróbica);

fibra predominante: tipo I

Até o presente, nos músculos de mamíferos adultos foram caracterizadas histoquimicamente, funcionalmente e bioquimicamente algumas categorias básicas de fibras musculares:

- ❖ Fibras do Tipo I – São compostas de uma isoforma de CPM (CPMI) que hidrolisa ATP lentamente, sendo capaz de uma contração de baixa intensidade, lenta e prolongada. É também chamada de fibra

oxidativa pois seu metabolismo é aeróbico, contendo grandes quantidades de mioglobina e de mitocôndrias. Sua atividade glicolítica é moderada, dessa forma utilizando melhor os ácidos graxos como fonte de energia (em particular os extra musculares). São muito resistentes à fadiga, característica essencial para o trabalho de fundo durante um treinamento de resistência.

❖ Fibras do tipo II - Apresentam uma contração rápida, breve e intensa. São ricas em glicogênio. Este tipo de fibra pode ser subdividida em três outros grupos, com propriedades metabólicas diferentes (Thomason *et al.*, 1986):

- Fibras IIA compostas de uma isoforma de CPM IIA realizam contração rápida aliada a uma boa resistência à fadiga. Em relação à sua capacidade de oxidação (com talvez um volume mitocondrial idêntico ao das fibras do tipo I, elas utilizam preferencialmente a glicólise aeróbica).
- Fibras IIB, que expressam isoformas CPM IIB tem uma capacidade oxidativa baixa; utilizam preferencialmente a glicólise anaeróbica, com formação de lactato e apresentam baixa resistência à fadiga.
- Fibras IIx ou IId, identificadas mais recentemente. São ricas em enzimas oxidativas e relativamente resistentes à fadiga. Também utilizam preferencialmente a glicólise aeróbica (Winder *et al.*, 1974; Schiaffino *et al.*, 1989; Larsson *et al.*, 1991)

Existem fibras que coexpressam diferentes genes de CPs. São fibras que contém tanto CPI e CPIIa, CPIIa e CPIIX ou CPIIx e CPIIb. Estas fibras híbridas são muito comuns em músculos de ratos, como por exemplo no músculo extensor digital longo, que contém 26% de fibras puramente IIx, 10% de fibras híbridas IIa/IIx e 20% de fibras híbridas IIx/IIb [Schiaffino, 1994].

A presença de diferentes tipos de fibras dentro de um mesmo músculo lhe permite fazer face às suas diversas exigências funcionais: aptidão a utilizar o melhor possível a energia muscular (um fator limitante da performance) e mover-se em condições variáveis, com todos os tipos de fibras atuando simultaneamente, com imbricação dos metabolismos aeróbio e anaeróbio. Quando a intensidade do esforço aumenta, principalmente a velocidade, os diferentes tipos de fibras são sucessivamente recrutados por intermédio do sistema nervoso motor. Desta forma, os neurônios excitam diferentemente as fibras em função do comando do sistema nervoso central, do potencial metabólico assim como do grau de fadiga.

Resumindo, o fato de existirem várias isoformas de CP da miosina confere plasticidade aos músculos, ou seja, significa que as fibras musculares podem alterar suas características fenotípicas em resposta ao exercício, através da reconstrução de miofibrilas com novas CPs, de atividade mais apropriada para a situação. Entretanto, ainda não se conhece bem a influência da atividade física no mecanismo molecular desta regulação, que resulta em expressão diferencial dos genes de miosina em cada tipo de fibra.

## **ADAPTAÇÕES INDUZIDAS POR CONDIÇÕES**

### **ESPECIAIS:**

#### **EXERCÍCIO FÍSICO**

O músculo esquelético utiliza aproximadamente 40% do oxigênio total consumido em repouso, mas em uma situação de exercício físico seu consumo pode chegar até 90% do oxigênio total consumido pelo organismo (Lee, 1995). A demanda energética total durante um exercício aeróbio pode apresentar um aumento de 35 vezes comparada com a do repouso (Astrand & Rodahl, 1997).

Um treinamento de “endurance” (resistência) pode causar mudanças significativas nas atividades de enzimas do metabolismo, no processo de transporte através de membranas, na capilaridade, na sensibilidade a alguns hormônios e também na composição de alguns filamentos contrácteis (Henriksson, 1995). Além disso, verificam-se aumento no número e densidade de mitocôndrias e hipertrofia muscular (Holloszy, 1967; Dudley *et al.*, 1982; Henriksson, 1995).

A utilização de macromoléculas como fonte de energia através de seus metabolismos específicos também pode sofrer adaptações. Assim, verifica-se um aumento na atividade de enzimas oxidativas e enzimas do ciclo de Krebs (Holloszy, 1988; Green *et al.*, 1992) e aumento de proteínas GLUT-4 responsáveis pela captação de glicose pelas células musculares (Henriksson, 1995), facilitando o metabolismo de carboidratos.

Ocorre também um aumento na atividade das enzimas da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e lipases para a mobilização dos triglicérides (Hoppeler *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1992; Chilibeck *et al.*, 1998) permitindo maior metabolização de lipídeos.

Além disso, através do aumento da degradação de aminoácidos a compostos intermediários do ciclo de Krebs também as proteínas podem servir como fonte de energia (Dudley *et al.*, 1982; Goodman & Ruderman, 1982; McArdle *et al.*, 1996).

Booth e Thomason (1991) discutem as adaptações ocorridas em ratos submetidos a um treinamento diário de 2 horas correndo em esteira, qualificado como treinamento aeróbico ou de endurance. Os músculos esqueléticos desses ratos apresentaram um aumento de 100% nas atividades das enzimas da oxidação de ácidos graxos e da cadeia de transporte de elétrons, enquanto que as atividades de algumas enzimas do ciclo de Krebs tiveram um aumento de 50%.

Em outro trabalho, Holloszy (1967) mostrou que enzimas como a citocromo oxidase e NADH desidrogenase sofreram aumentos significativos

em suas atividades após um protocolo de treinamento onde os animais corriam em esteira rolante em um programa de exercício extenuante.

Já Chilibeck *et al.* (1997) mostrou que as enzimas piruvato desidrogenase e palmitilcarnitina transferase sofreram adaptações diferentes em animais submetidos ao treinamento contínuo ou intermitente.

Os diferentes métodos de treinamento podem sinalizar diferentes adaptações no organismo desde diferenças nos níveis enzimáticos até utilização específica de substratos. No caso de um treinamento contínuo (realizado em velocidades submáximas e crescentes) o organismo parece sofrer um efeito adaptativo benéfico, que além do aumento da capacidade oxidativa, apresenta também um aumento na defesa antioxidante dos músculos (Alessio & Goldfarb, 1988). Já um treinamento intermitente (realizado por breves períodos de tempo e alta intensidade) parece levar a um aumento nos danos teciduais (Alessio *et al.*, 1988; Criswell *et al.*, 1993). Por outro lado, resultados recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que comparativamente, o treinamento intermitente foi mais eficiente em aumentar a atividade da enzima citrato sintase que o treinamento contínuo (Smolka *et al.*, 2000).

Fica claro, portanto, que as adaptações bioquímicas ao nível enzimático e tecidual podem nos fornecer informações para a otimização de um treinamento, além de esclarecer as diversas controvérsias quanto às diversas adaptações aos diferentes tipos de treinamento (segue em Anexo I os diferentes protocolos de treinamento).

## **DOENÇAS QUE AFETAM AS FUNÇÕES MITOCONDRIAIS**

A primeira vez em que se falou do envolvimento da mitocôndria em patologias foi em 1964, quando Albert Lehninger escreveu seu livro “The Mitochondrion” (Luft, 1995). Esse foi um dos estudos pioneiros em mitocôndria isolada de seres humanos além, também, de ser um dos primeiros estudos de uma disfunção em organela de célula humana.

Defeitos mitocondriais ocorrem em diversas situações, desde doenças degenerativas, envelhecimento até o câncer. Já se sabe que essas doenças mitocondriais incluem um grande número de problemas clínicos. A grande dificuldade em caracterizar uma doença mitocondrial está no fato de que uma mesma mutação de um mtDNA pode produzir diferentes fenótipos, e por outro lado, mutações diferentes podem produzir fenótipos similares. Dessa forma torna-se mais produtivo a classificação dessas doenças através do defeito genético ao invés de utilizarmos apenas as manifestações clínicas (Peterson, 1995; Wallace, 1999).

Geralmente os tecidos que requerem muita energia, ou seja, necessitam de grandes quantidades de ATP como o coração, sistemas renal, endócrino e principalmente o músculo esquelético são os mais afetados (Luft, 1995; Wallace, 1999;).

Alguns aspectos importantes devem ser observados na fosforilação oxidativa de mitocôndrias que apresentam suas funções afetadas, como, produção de energia prejudicada, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e regulação da morte celular programada (apoptose) (Wallace, 1999).

Esses aspectos no seu conjunto é que conferem às doenças mitocondriais sua grande complexidade; pois entender uma patologia não é apenas identificar a mutação causadora e o defeito na função mitocondrial, mas sim todos os processos relacionados (genéticos e ambientais) que podem contribuir para o fenótipo.

No caso de uma mutação que perturbe a fosforilação oxidativa; ela irá não apenas reduzir a produção de energia, como a inibição da cadeia de transporte de elétrons poderá levar à um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. A produção de EROS aumenta o estresse oxidativo, o qual pode levar à um quadro de apoptose (Wallace, 1999).

Deficiência no complexo I é o problema, ao nível de cadeia de transporte de elétrons, mais frequentemente observado. A predominância

de disfunções no Complexo I sugere que sua estrutura e função sejam facilmente perturbadas (Cooper *et al.*, 1992). A Tabela I mostra algumas doenças que afetam as funções mitocôndriais.

**Tabela 1.** Algumas doenças relacionadas à mitocôndria (Wallace, 1999; Bentlage *et al.*, 1995; Luft, 1995 e Mizuno, 1995)<sup>1</sup>.

Doenças	Complexo Afetado	Causas	Sintomas
Neuropatia óptica De Leber (LHON)	NADH Desidrogenase	Mutação do gene que codifica ND 6	Cegueira repentina causada por lesão do nervo óptico.
Distonia	NADH Desidrogenase	Mutação do gene que codifica ND 6	Disordem dos movimentos, retardo mental, estatura baixa.
Doença de Leigh	Pode afetar diversos Complexos	Mutação do gene que codifica subunidade 6 ATPase e outras	Ataxia, hipotonia, atrofia óptica, oftalmoplegia etc.
MELAS	Complexo I e citocromo c oxidase	Mutação do gene que codifica o tRNA <sup>Leu</sup> entre outras (MTTL1*MELAS3243G)	Estatura baixa, demência em alguns casos e vômitos.
Parkinson	Complexo I	Múltiplos fatores (natureza e fatores genéticos)	Tremores, rigidez muscular, distúrbios posturais, acinesia.
KSS	Deficiência na coenzima Q	Deleção mtDNA	Oftalmoplegia, ataxia, hiperpartireoidismo, estatura baixa, degeneração do pigmento da retina
CPEO	Complexo II e IV	Deleção, rearranjo e duplicação do mtDNA	Miopatia ocular, retinite pigmentosa e disfunção no sistema nervoso central
MERRF	Complexo I e IV	Mutação de ponto no gene que codifica o tRNA <sup>Lys</sup> (MTTL1*MERRF8344G)	Epilepsia, ataxia progressiva, fraqueza e desgaste muscular, surdez e demência

<sup>1</sup> Doença de Leigh, “subacute necrotizing encephalomyopathy”; MELAS, Miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios “stroke-like”; KSS, Síndrome Kearns-Sayre; CPEO, oftalmoplegia externa crônica e progressiva; MERRF, epilepsia do mioclonus e “ragged red fibers.”

Como podemos constatar, são várias as alterações associadas às enzimas mitocondriais e mais especificamente aos complexos da cadeia respiratória, tornando muito importante seu estudo. Embora existam diversos métodos para analisar efeitos do treinamento físico ou disfunções em enzimas mitocondriais de tecido muscular humano, a maioria deles requer grandes quantidades de tecidos, pois dependem do isolamento de suas mitocôndrias. Recentemente foi publicada a técnica de BN-Page ("Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis"), associada à detecção da atividade enzimática específica através de uma técnica que foi denominada coloração histoquímica para cada complexo que mostrou-se bastante satisfatória para este tipo de estudo, pois, além de requerer uma quantidade muito pequena de tecido muscular (30 mg), possibilita não só a quantificação, mas também a análise da atividade das enzimas da cadeia de transporte de elétrons (CTE) pela "coloração histoquímica" dos géis (Zerbetto *et al.*, 1997).

**OBJETIVOS**

---

O objetivo desse trabalho foi padronizar a técnica de extração com o detergente lauril maltosídeo e de separação dos complexos protéicos da cadeia de transporte de elétrons através da técnica de Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (BN- Page) associada à detecção da atividade enzimática através de uma técnica por nós denominada coloração histoquímica. Utilizamos para isso quatro diferentes músculos esqueléticos de ratos Wistar, que variam na sua capacidade oxidativa (sóleo, gastrocnêmio - porções vermelha e branca e semitendinoso).

Nosso laboratório estuda os efeitos do estresse oxidativo induzido por duas situações diferentes, pelo exercício físico, através de ratos correndo em esteira rolante e pela hipóxia crônica, através de análises sanguíneas realizadas em pacientes com doença respiratória obstrutiva crônica (DPOC).

Essa padronização permitirá o estudo das adaptações induzidas por diferentes tipos de treinamento ("endurance" e intermitente)<sup>2</sup> ao nível de cadeia de transporte de elétrons; além de estudos correlacionados a características funcionais do músculo esquelético. Temos portanto o interesse em analisar as adaptações induzidas por esses dois modelos em enzimas da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria em diferentes tipos de músculos.

---

<sup>2</sup> Protocolos de treinamento seguem em anexo I (página 75).

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### **a) Animais**

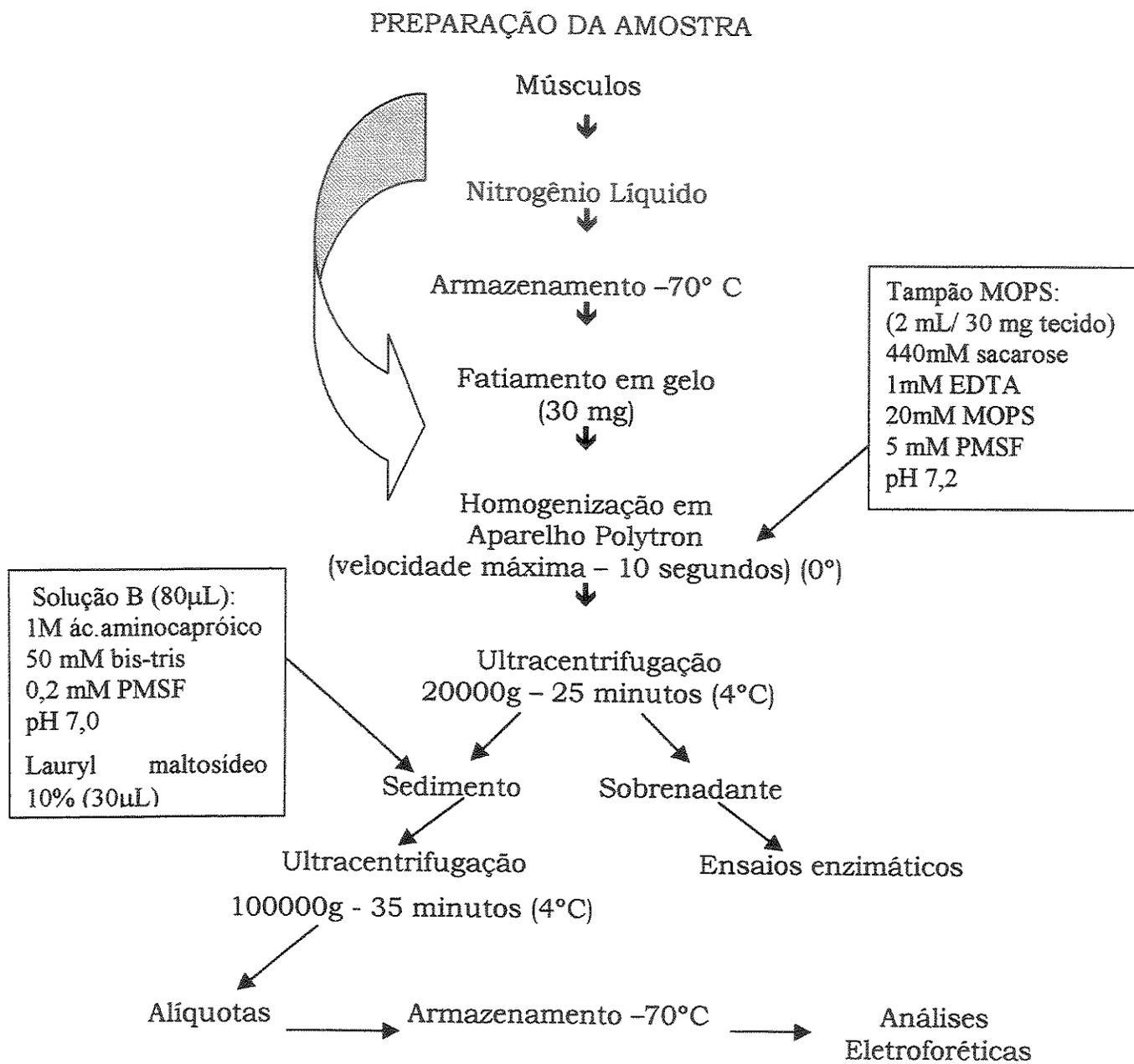
Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, de aproximadamente 2 meses de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp. Durante o período que precedeu o experimento os ratos foram mantidos em ambiente controlado (18-22°C e fotoperíodo invertido de 12 horas), sendo providos de ração e água *ad libitum*.

### **b) Preparação e extração da amostra**

Para preparação das amostras foram utilizados os músculos sóleo, gastrocnêmio (porções vermelha e branca) e semitendinoso. Após os animais terem sido anestesiados com hidrato de cloral (10%), os músculos foram extraídos e colocados sobre um papel de filtro para retirada de vestígios de gordura e tecido conjuntivo. Após esse procedimento, os músculos foram imersos em nitrogênio líquido e conservados a - 70°C, até os ensaios serem conduzidos, ou foram utilizados imediatamente para obtenção do homogenato. Após a extração dos músculos os animais foram sacrificados.

O método utilizado para preparação do homogenato foi uma versão modificada daquele originalmente descrito por Zerbetto et al (1997), onde 30 mg de músculo foram cortados em pequenos pedaços e então imersos em 2 mL de meio contendo MOPS 20mM, sacarose 440mM, EDTA 1mM e PMSF 5mM, pH 7,2. Logo após, os músculos foram homogeneizados em aparelho tipo Polytron (em velocidade máxima por 10 segundos), à temperatura de 0°C. O homogenato foi então submetido a uma ultracentrifugação (20,000 x g por 20 minutos), para sedimentação do material desejado (membranas, mitocôndrias e de células rompidas) e o sobrenadante, contendo proteínas solúveis foi utilizado para ensaios da atividade da enzima citrato sintase. O sedimento foi ressuspensão em 30 µL do detergente lauril maltosídeo (10 %) e 80 µL de solução contendo ácido aminocapróico (1M) e bis-tris (50mM) , pH 7,0. Após esse tratamento

a solução foi novamente submetida a uma ultracentrifugação (100,000 x g por 35 minutos). O detergente lauryl maltosídeo é do tipo não-iônico e possui a característica de solubilizar proteínas de membrana sem afetar suas formas e cargas nativas. Todos os procedimentos de extração da amostra foram efetuados a 4°C. A dosagem de proteína foi feita segundo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovina como padrão.



**Figura 12.** Esquema de preparação da amostra.

### ***c) Eletroforese em gel de poliacrilamida***

As análises de eletroforese seguiram o protocolo descrito por Zerbetto et al (1997). O gel de empacotamento (“stacking gel”) na concentração de 3 % de acrilamida, enquanto para o gel de separação (“running gel”) foi feito um gradiente de poliacrilamida de 5% a 11%. Os géis foram preparados, utilizando-se uma solução-estoque de acrilamida 48% (Sigma, EUA) e N-N-metilenobisacrilamida (Sigma, EUA) 1,5 %, diluídas em água deionizada e mantidas em temperatura ambiente em frasco escuro. As eletroforeses foram feitas em aparelho Miniprotean Biorad (1 X 70 X 82 mm). Cada 10 $\mu$ L de amostra extraída foram corados com 1 $\mu$ L Coomassie Blue G 5%, diluído em ácido aminocapróico 1M, dos quais 5 $\mu$ L foram aplicados no gel em cada “slot”. Os tampões de corrida utilizados foram: Tricina (0,5M), Bis-Tris (0,15M) e Coomassie Blue (0,02%) pH 7,0, diluído 1:10 para o catôdo e Bis-Tris (0,5M) pH 7,0 diluído 1:10 para o ânodo. Feita a aplicação das amostras, iniciou-se a corrida com uma voltagem de 100V até a amostra atravessar o gel de empacotamento, quando então o tampão do catôdo corado com Coomassie blue foi trocado por outro tampão idêntico mas sem corante e a voltagem passou a 170 V. Após 2 horas de corrida mudou-se a voltagem para 350V até o final da corrida.

### ***d) Coloração por Coomassie Blue***

Ao término da corrida, os géis foram imersos em solução fixadora contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético glacial durante 30 minutos. Depois de removida a solução fixadora os géis foram imersos em solução corante contendo 0,025% de Coomasie Blue e 10% de ácido acético glacial durante 60 minutos. Após a coloração, o Coomasie Blue foi removido com solução descorante contendo 10% de ácido acético por 12 horas.

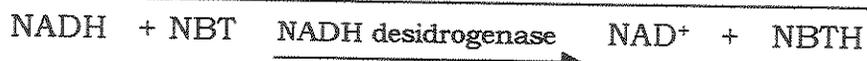
**e) Coloração Histoquímica (Detecção da atividade enzimática)**

Imediatamente após o final da corrida de eletroforese os géis foram submetidos às reações de coloração para os complexos enzimáticos I e IV.

*Complexo I (E.C. 1.6.99.3 – NADH desidrogenase)*

Para a coloração histoquímica do Complexo I incuba-se o gel à temperatura ambiente por um período de 12 horas, numa solução contendo Tris-HCl (2mM) pH 7,0, 1mg/mL de NADH e 2,5 mg de Nitrobluetetrazolio (NBT) diluída 1:10 em água deionizada gelada.

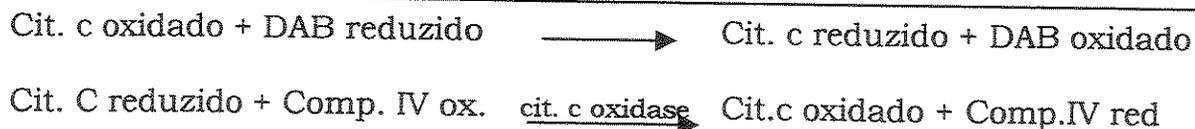
A reação de coloração deve-se à redução do corante NBT o qual torna-se violeta, podendo ser visualizado no gel.



*Complexo IV (E.C. 1.9.3.1 - Citocromo c oxidase)*

Para a coloração histoquímica do Complexo I incuba-se o gel à temperatura ambiente por um período de 12 horas, numa a solução contendo 5 mg de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), 10 mg de citocromo c, 0,76 mg de sacarose, 9 mL de tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 e 0,05mL da enzima catalase. O citocromo c deve ser adicionado à solução momentos antes do início da reação.

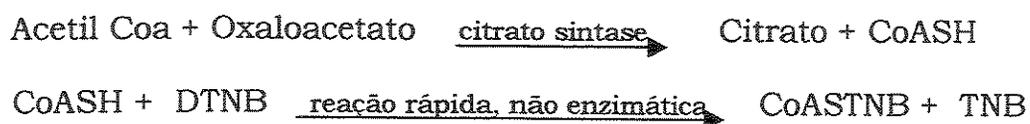
A coloração ocorre porque o DAB é polimerizado durante sua oxidação, produzindo um pigmento de coloração marrom-avermelhada.



Após as reações específicas de coloração os géis foram fixados em solução contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético glacial por 30 minutos e então foram armazenados em solução contendo 10% de ácido acético glacial. Ambos os métodos de coloração histoquímica foram baseados no método de Dubowitz (1985).

**f) Determinação da atividade da enzima Citrato Sintase (E.C. 4.1.37)**

A citrato sintase (CS) é uma enzima intramitocondrial do ciclo de Krebs, que catalisa a condensação do oxaloacetato (OAA) com acetil-Coa, dando início ao ciclo com a formação de citrato. Medimos sua atividade pelo método proposto por SRERE (1969). O meio de reação continha 0.1 mL de DTNB (1mM), 0,03 mL de acetil Coa (10mM) e volume do homogenato muscular correspondente a 50 µL. A reação foi iniciada acrescentando-se 0.05 mL de OAA (10mM), completando com água o volume na cubeta. A reação foi seguida a 412 nm em espectrofotômetro Beckman DU 640, acompanhando a formação de TNB, segundo as seguintes reações:



Para o cálculo da velocidade da reação enzimática usamos a fórmula:

$A = E \cdot c \cdot l$ ; onde A é a absorbância da amostra,  $E = 13.600 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$ , c é a concentração de TNB e l é o caminho óptico da cubeta. A leitura das absorbâncias em um determinado intervalo de tempo nos permitiu determinar a sua diferença e nos forneceu a velocidade da reação enzimática catalisada pela enzima citrato sintase.

### ***g) Análise densitométrica***

As bandas dos complexos I e IV coradas histoquimicamente e as bandas com a coloração Coomassie Blue foram analisadas usando-se “Sharp-Scanner” para obtenção da imagem e programa Image Master 1D-Elite (Amershan Pharmacia, Uppsala, Suécia) com filtro vermelho, o qual apresentou melhor resolução. Cada gel teve a área e a intensidade de cada banda quantificada usando-se os parâmetros idênticos de resolução, luz e brilho; além de possuírem sempre uma mesma amostra como padrão interno, para que pudéssemos obter valores expressos em unidades arbitrárias.

### ***h) Análises estatísticas***

Todos os resultados estão expressos como média e desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa “Origin Microcal Software” versão 5.0. Valores de probabilidade ( $p$ )  $< 0.05$  e ( $r$ )  $> 0.90$  foram considerados significativos. Para análise comparativa entre grupos foi utilizado o teste Anova considerando significativo ( $p$ )  $< 0,05$ .

**RESULTADOS**

---

Para qualquer padronização de método de eletroforese em poliacrilamida inicialmente é necessário normalizar a quantidade de amostra a ser aplicada no gel. Como no caso deste trabalho utilizamos quatro músculos com diferentes quantidades de mitocôndria tomamos como parâmetro a atividade da enzima citrato sintase, pois já é conhecido na literatura que sua atividade é proporcional à fração de mitocôndrias encontradas nos diferentes músculos (Henrickson, 1995).

Para cada músculo foram feitas dosagens da atividade da enzima citrato sintase após centrifugação a 20000 x g e a dosagem de proteínas obtida após extração com lauryl maltosídeo conforme dados mostrados na Tabela 2 (A) e (B), respectivamente.

Podemos observar que as amostras apresentam praticamente a mesma quantidade de proteína mas que a atividade da enzima citrato sintase varia muito entre elas. Assim, os resultados expressos na Tabela 2 mostram que não há uma correlação entre a atividade da enzima citrato sintase e dosagem de proteínas mitocondriais.

Como esperado, os músculos mais oxidativos (sóleo e gastrocnêmio vermelho) apresentam mais que o dobro de atividade que os músculos mais glicogenolíticos (gastrocnêmio branco e semitendinoso), mostrando claramente as diferenças no número de mitocôndrias em cada músculo.

**Tabela 2.** Atividade da enzima citrato sintase (A) e da dosagem de proteínas (B) em diferentes músculos de ratos<sup>2</sup>.

(A) Atividade da enzima citrato sintase (nmol/min/mg tecido)				
Músculo	Sóleo*	Gastrocnêmio		Semitendinoso
		Vermelho**	Branco	
Média	855	1173	346	427
Número	9	7	6	7
Variação	738-1006	1053-1323	273-451	317-511

\*  $p < 0,001$  para grupo sóleo comparado com os demais grupos.

\*\*  $p < 0,001$  para o grupo gastrocnêmio vermelho comparado com o grupo gastrocnêmio branco e semitendinoso.

(B) Dosagem de proteína (mg/mL)				
Músculo	Sóleo	Gastrocnêmio		Semitendinoso
		Vermelho	Branco	
Média	14,40	15,21	12,44	13,15
Número	9	7	6	7
Variação	12,4-16,5	11,8-16,8	10,7-13,6	11,5-14,8

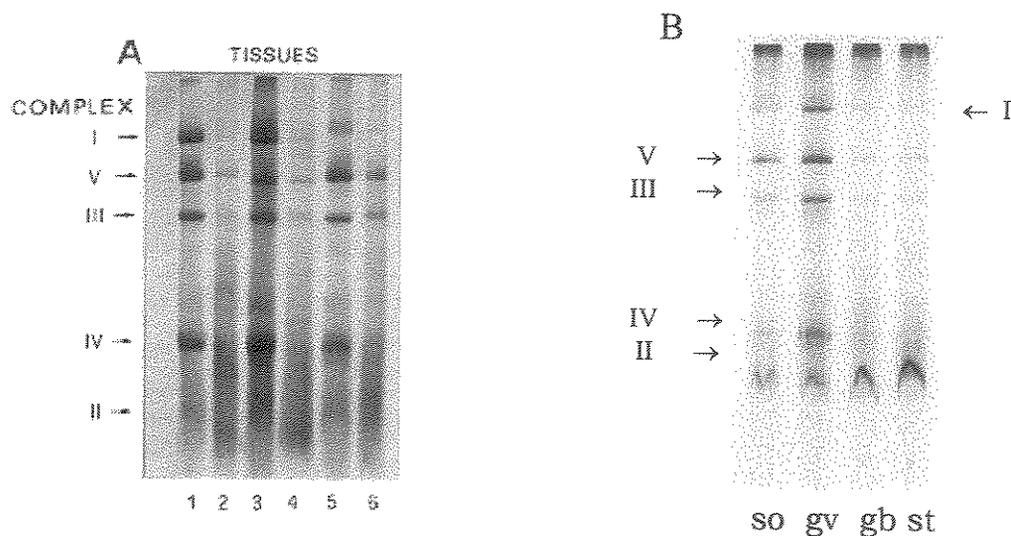
<sup>2</sup> A atividade da citrato sintase bem como a dosagem de proteínas foram medidas no homogenato extraído após a primeira ultracentrifugação sendo usados os seguintes métodos respectivamente : Srere (1969) e Bradford (1976).

Para que obtivéssemos um parâmetro para normalização de quantidade de amostra aplicada, era necessário obter a correlação entre a atividade da citrato sintase (enzima da matriz mitocondrial) e a área/intensidade de algum complexo da cadeia de transporte de elétrons separado por eletroforese BN-Page. Havendo uma linearidade entre a atividade da CS e área do complexo poderíamos descartar a dosagem de proteínas como normalização de quantidade de amostra aplicada no gel.

Antes de estudarmos a correlação era necessário padronizar a quantidade ideal (volume) de amostra a ser aplicada nos géis para que as colorações fossem reprodutíveis.

A Figura 13 mostra o gel com 5 $\mu$ L de cada amostra após coloração com Coomassie Blue, tendo sido observado que usando-se um volume de 5 $\mu$ L de amostra para cada "slot", obtinha-se uma boa separação e coloração definida das bandas, o que foi considerado como coloração ideal.

Podemos observar a posição de cada complexo enzimático da cadeia de transporte de elétrons baseado em padrões de referência, como mostra a Fig. 13 (Schagger & Jagow, 1991 e Zerbetto *et al.*, 1997).



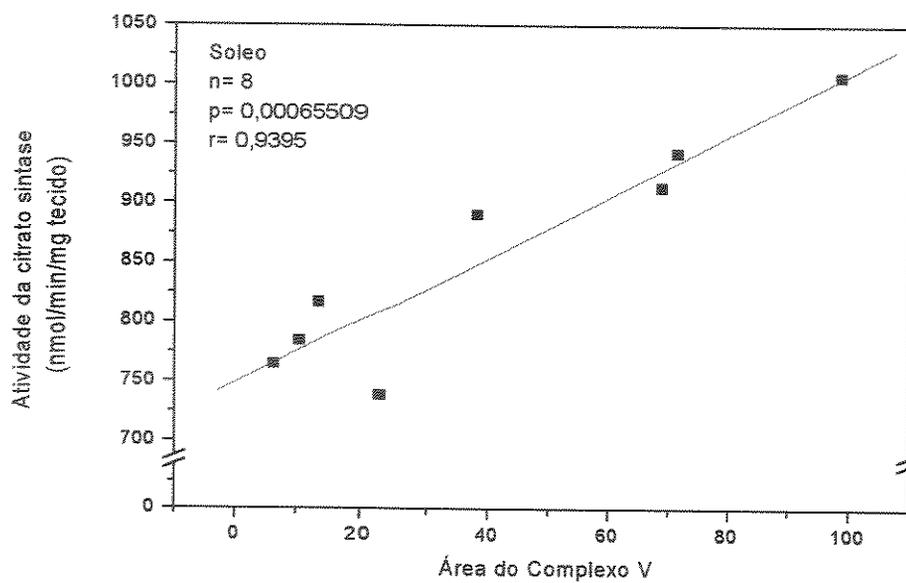
**Figura 13.** **A.** Gel de eletroforese utilizado como padrão para identificação dos complexos enzimáticos em diversos tecidos (1) coração de boi (2) músculo esquelético de boi (3) coração de rato (4) músculo esquelético de rato (5) coração humano (6) músculo esquelético de humano. (Zerbetto *et al.*, 1997) **B.** Gel de eletroforese em poliacrilamida (BN-Page) submetido a coloração com Coomassie Blue indicando as posições dos complexos da cadeia de transporte de elétrons correspondente a 5 $\mu$ L da amostra (so) sóleo (gv) gastrocnêmio vermelho (gb) gastrocnêmio branco (st) semitendinoso.

Após normalização da quantidade de amostra a ser aplicada nos géis para padronização, estabelecemos qual seria a banda (complexo) ideal para a correlação com a atividade da CS.

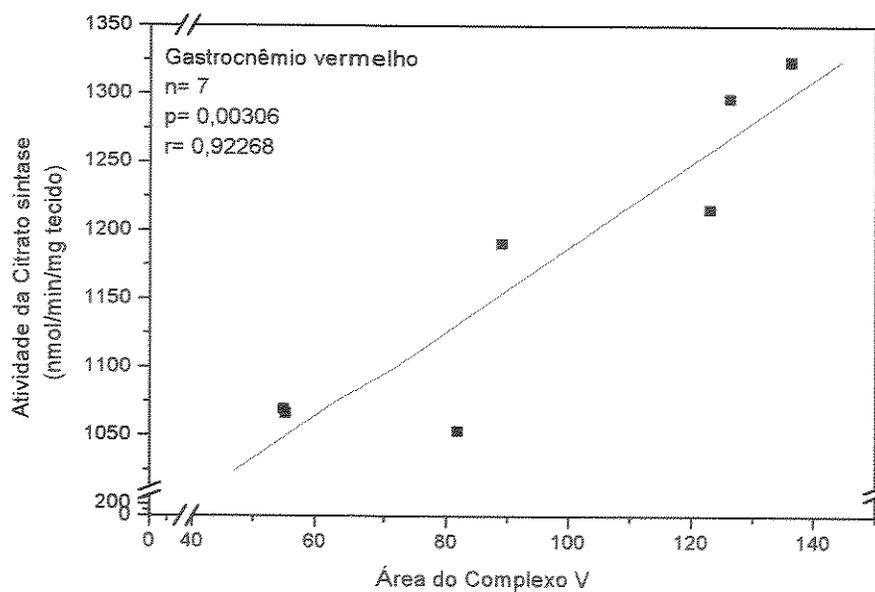
Baseado na coloração ideal obtida e no trabalho publicado por Zerbetto *et al.* (1997) no qual é mostrada uma correlação usando-se o complexo III e sugerido também o uso do complexo V, selecionamos o complexo V como a banda a ser utilizada como padrão interno e para a análise da correlação área do complexo V.

A correlação entre a atividade da enzima citrato sintase nos quatro diferentes músculos e a área da banda correspondente ao complexo V corado com Coomassie Blue é linear, conforme mostrado nas Figuras 14 a

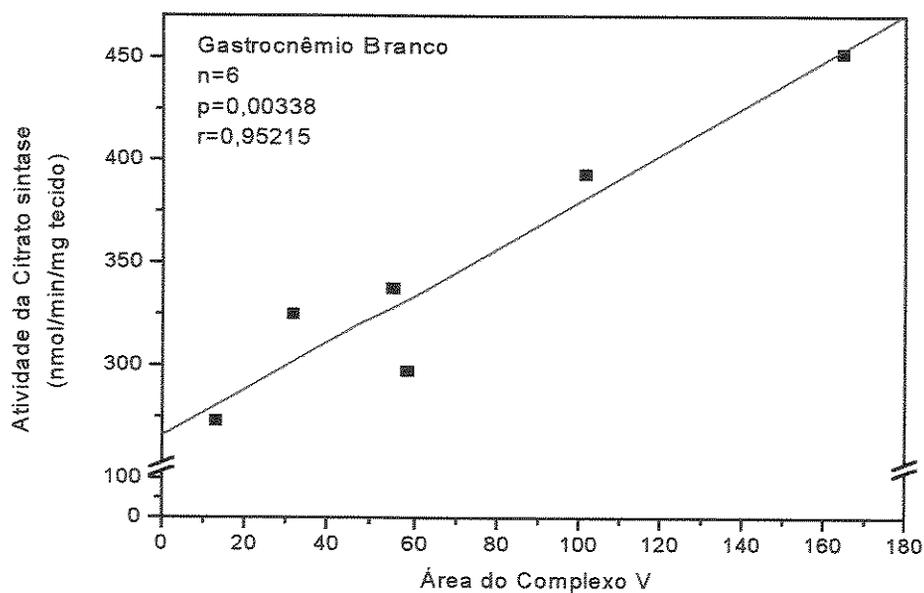
17. Estes dados mostram que o complexo V pode também ser utilizado com marcador de quantidade de mitocôndrias nas amostras.



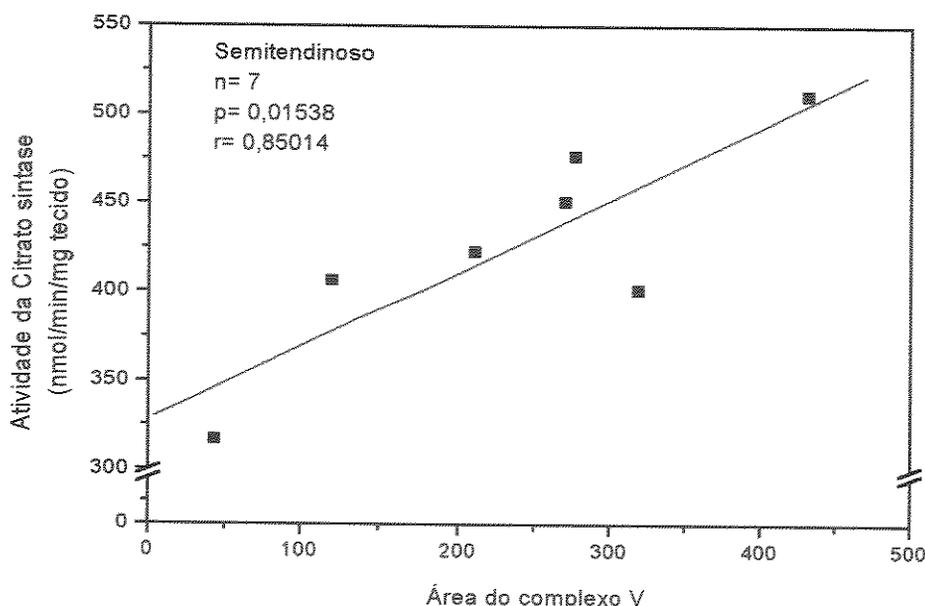
**Figura 14.** Correlação entre a atividade da enzima citrato sintase e área/intensidade do complexo V de músculo sóleo de rato.



**Figura 15.** Correlação entre a atividade da enzima e a área/intensidade do complexo V de músculo gastrocnêmio vermelho de rato.



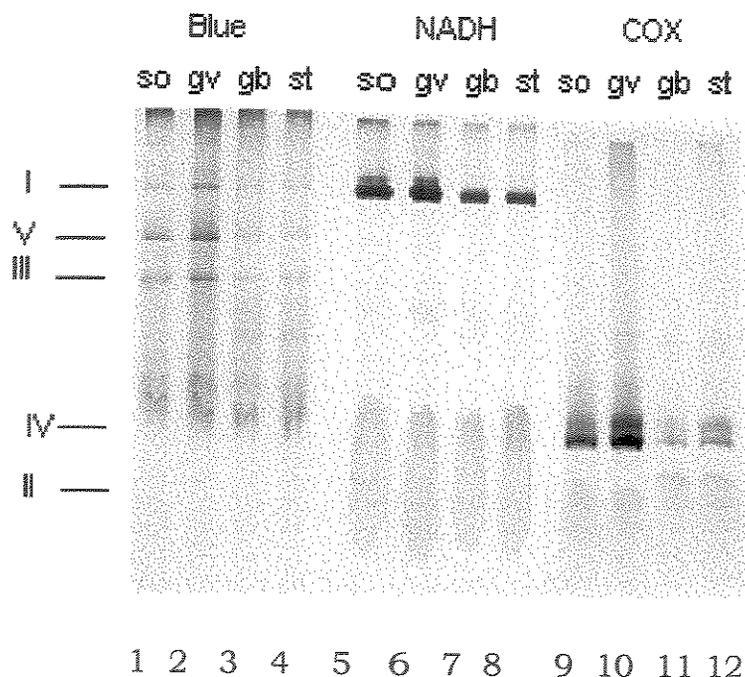
**Figura 16.** Correlação entre a atividade da enzima citrato sintase e a área/intensidade do complexo V de músculo gastrocnêmio branco de rato.



**Figura 17.** Correlação entre a atividade da enzima citrato sintase e a área/intensidade do complexo V de músculo semitendinoso de rato.

Ainda era necessária a padronização da coloração histoquímica específica para que pudéssemos obter uma relação entre a área do complexo V e as áreas dos complexos I e IV corados histoquimicamente.

Na figura 18 são comparados os géis corados por Coomassie Blue e através de coloração histoquímica específica para os complexos I e IV. Podemos observar que a posição dos complexos I e IV, evidenciada pela coloração histoquímica, corresponde à mesma banda detectada em Coomassie Blue, mostrando a especificidade da coloração histoquímica e o padrão ideal de coloração. O complexo IV aparece corado com duas bandas, fato que se deve à existência de uma forma monomérica e outra dimérica da enzima (Schagger & Jagow, 1991).

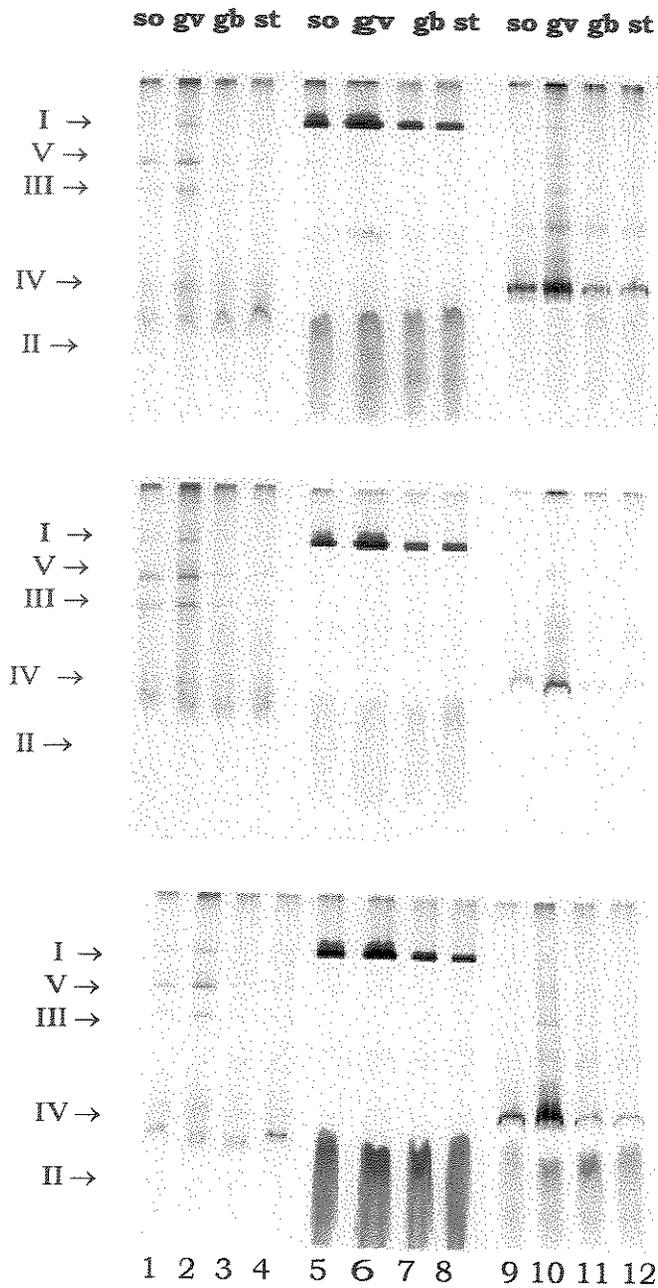


**Figura 18.** BN-Page com coloração por Coomassie Blue e coloração histoquímica para os complexos I e IV da CTE. so (sôleo), gv (gastrocnêmio vermelho), gb (gastrocnêmio branco) e st (semitendinoso).

Para cada amostra foram realizadas três corridas de eletroforese para que pudéssemos testar a reprodutibilidade das análises e padronização da técnica, conforme mostrado na Figura 19. Observa-se que os músculos que possuem características mais oxidativas apresentam uma coloração histoquímica mais intensa, provavelmente devido a um maior número de mitocôndrias.

A coloração histoquímica do complexo IV (citocromo c oxidase – COX) apresentou as maiores variações, como mostra a Figura 19 (triplicata da mesma amostra). Além disso nos músculos com características mais glicolíticas (porção branca do gastrocnêmio e semitendinoso) também houve maior dificuldade na coloração do complexo IV por Coomassie Blue e pelo corante histoquímico específico.

A quantidade de amostra (5 $\mu$ L) padronizada para coloração com Coomassie Blue foi a mesma usada na coloração específica dos complexos I e IV.



**Figura 19.** Triplicata eletroforética de uma amostra de músculo de rato realizada em três dias diferentes e tratadas com a mesma coloração. As linhas 1, 2, 3 e 4 correspondem à coloração por Coomassie Blue, as linhas 5, 6, 7 e 8 à coloração histoquímica do complexo I (NADH desidrogenase) e as linhas 9, 10, 11 e 12 à coloração histoquímica do complexo IV (COX).

Para determinarmos a atividade de cada um dos complexos em relação ao número de mitocôndrias existente, expressamos as áreas dos complexos corados histoquimicamente em valores relativos à área do complexo V, corado com Coomassie Blue para cada músculo, obtendo as razões mostradas na tabela 3.

**Tabela 3.** Valores quantitativos da atividade das enzimas NADH desidrogenase (complexo I) e Citocromo c oxidase (complexo IV) de músculo esquelético de rato obtidos a partir da razão entre a atividade da enzima e o correspondente padrão interno (complexo V). Os valores de p e r foram calculados por avaliação estatística de linearidade com  $p < 0,05$ .

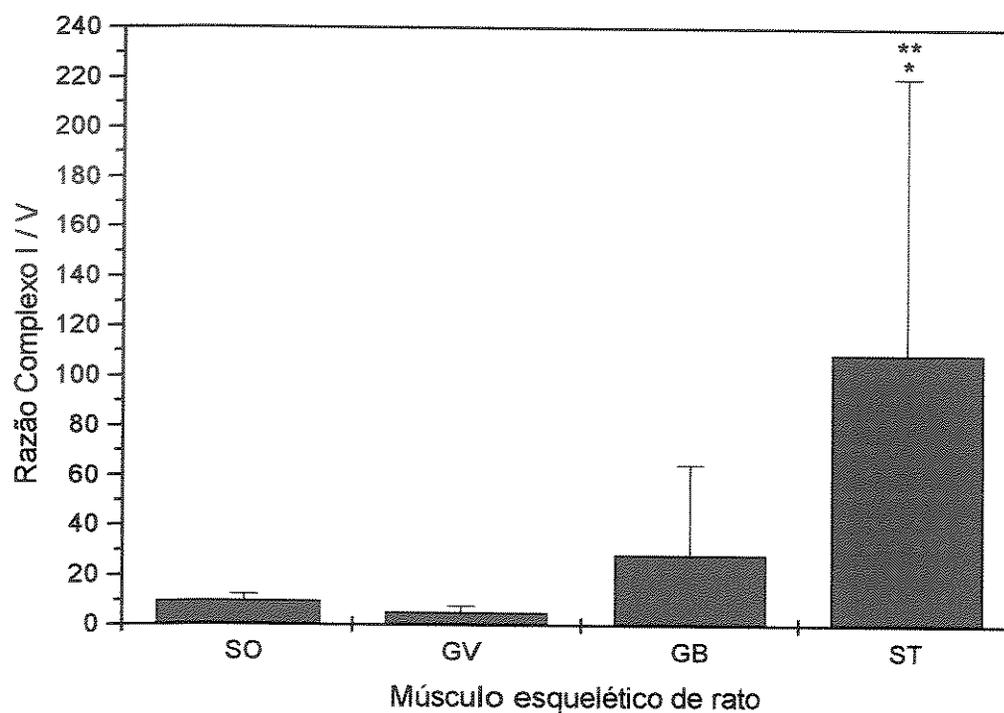
(A) Razão Complexo I/V				
Músculo	Sóleo	Gastrocnêmio Vermelho	Gastrocnêmio Branco	Semitendinoso
Média	9,8	5,3	28,5	109,1
Número	6	10	4	4
Variação	4,8-12,7	2,8-8,6	5,3-82,0	43,7-275,4
p	0,0123	<0,0001	0,1077	0,0085
r	0,9077	0,9373	0,8922	0,9914

(B) Razão Complexo IV/V				
Músculo	Sóleo	Gastrocnêmio Vermelho	Gastrocnêmio Branco	Semitendinoso
Média	2,6	2,9	31,8	2,0
Número	6	8	7	7
Variação	1,0-3,0	1,2-5,7	7,6-88,5	0,29-3,38
p	0,0006	0,0005	0,0437	0,0109
r	0,9797	0,9387	0,7679	0,8697

Os valores mostrados foram obtidos através da análise densitométrica das áreas e intensidade dos complexos I e IV corados histoquimicamente e do complexo V corado com Coomassie Blue, este último utilizado como padrão interno. Dessa forma a técnica de BN-Page em conjunto com a coloração histoquímica específica dos géis, nos permitiu obter informações quantitativas em relação às atividades dos complexos da cadeia de transporte de elétrons.

Podemos observar pela Tabela 3 que em relação ao complexo I, os músculos sóleo e gastrocnêmio vermelho mostraram a melhor correlação linear e uma variação menor, quando comparados aos músculos gastrocnêmio branco e semitendinoso. Assim, entre os músculos mais oxidativos, podemos observar que o músculo sóleo é o que possui a maior atividade do complexo I, enquanto a atividade da COX (complexo IV) parece não ter diferenças em relação ao músculo gastrocnêmio vermelho. Muito embora o estudo de Zerbetto *et al.* (1997) tenha mencionado dificuldades na coloração histoquímica da COX (citocromo c oxidase) para músculo esquelético de rato, em nosso trabalho este tipo de coloração também apresentou correlação linear, principalmente nos músculos oxidativos. Nesta coloração os músculos com características mais glicolíticas (GB e ST) apresentaram valores de  $r < 0,9$ , ou seja, valores não considerados significativos estatisticamente mesmo com  $p < 0,05$ , em algumas vezes.

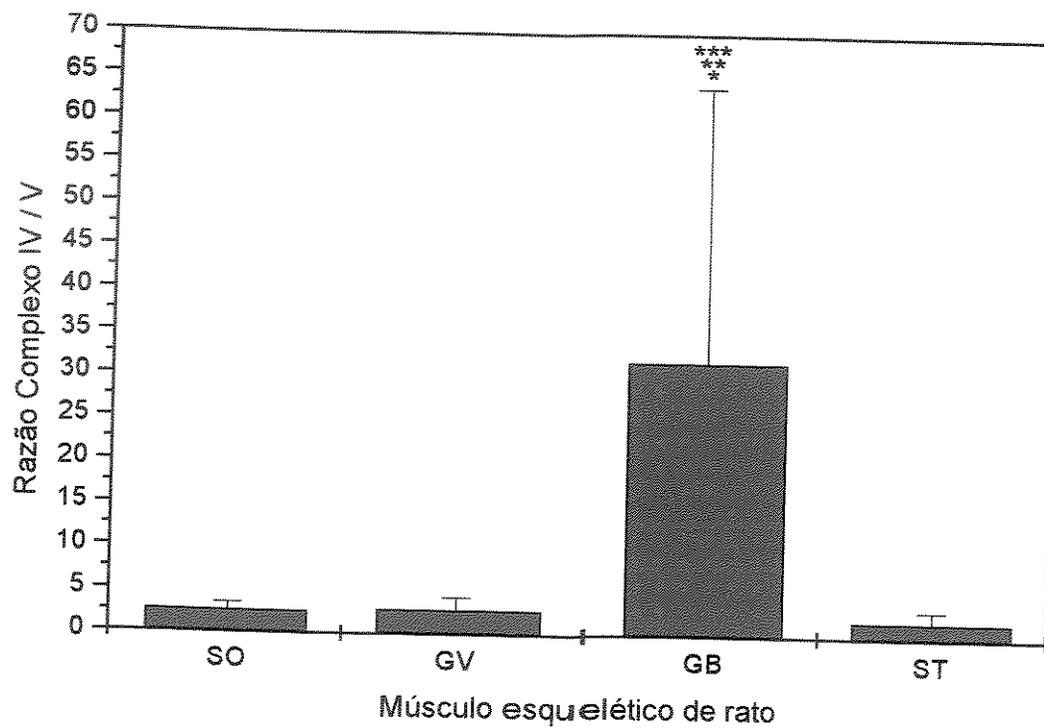
Na razão complexo I/V os músculos mais glicolíticos mostraram uma linearidade melhor e valores significativos de  $p$  e  $r$ ; mas o número de amostras utilizadas para obtenção desses valores foi bem menor do que aquelas utilizadas na razão IV/V. Em ambas razões I/V e IV/V as variações dos valores utilizados para que obtivéssemos as razões foi bem grande, sendo assim as colorações histoquímicas específicas de cada complexo nesses músculos mais glicolíticos ainda apresentam grande dificuldade, como pode ser melhor observado nas figuras 20 e 21.



**Figura 20.** Razão entre a área do complexo I e do complexo V para obtenção de valores quantitativos da atividade de enzimas da CTE (cadeia de transporte de elétrons). GO (n=10;  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,937$ ) SO (n=6;  $p = 0,0123$ ;  $r = 0,907$ ) GB (n=4;  $p = 0,10776$ ;  $r = 0,892$ ) ST (n=4;  $p = 0,0085$ ;  $r = 0,991$ )

\*  $p = 0,005$  comparado com GV

\*\*  $p = 0,014$  comparado com SO



**Figura 21.** Razão entre a área do complexo IV e do complexo V para obtenção de valores quantitativos da atividade de enzimas da CTE (cadeia de transporte de elétrons). GB (n=8;  $p < 0,00054$ ;  $r = 0,938$ ) SO (n=6;  $p = 0,00061$ ;  $r = 0,979$ ) GB (n=7;  $p = 0,0437$ ;  $r = 0,767$ ) ST (n=7;  $p = 0,0109$ ;  $r = 0,869$ )

\*  $p = 0,010$  comparado com GV

\*\*  $p = 0,016$  comparado com SO

\*\*\*  $p = 0,01$  comparado com ST

***DISCUSSÃO***

---

BN-Page é uma técnica eletroforética desenvolvida para separação de proteínas nativas que oferece uma variedade de aplicações: desde a purificação final de proteínas pelo gel (por exemplo: produção de anticorpos), isolamento de proteínas de membrana diretamente a partir de membranas biológicas até a identificação de defeitos em complexos protéicos da cadeia de transporte de elétrons em doenças e em situações especiais.

Apesar de Zerbetto *et al* (1997) terem conseguido uma boa padronização dessa técnica para músculo esquelético de humanos, os resultados obtidos por esse autores quando utilizaram músculo esquelético de rato não foram satisfatórios. No entanto, deve ser ressaltado que nesse trabalho os autores não trabalharam com um determinado músculo isolado. Assim, para nossos objetivos foi extremamente importante introduzir as modificações aqui descritas no procedimento utilizado por Zerbetto *et al.* (1997). Com isso conseguimos resultados bastante satisfatórios tanto pela reprodutibilidade quanto pela qualidade de separação na corrida eletroforética quando utilizamos os músculos sóleo, gastrocnêmio (porções vermelha e branca) e semitendinoso de ratos.

O músculo gastrocnêmio branco foi o que apresentou maior dificuldade na padronização, pois a maioria dos valores de  $p$  e  $r$  não apresentaram correlação estatística. Ainda assim, nesse músculo observamos que ambas as razões complexo I/V e complexo IV/V apresentaram valores altos, sugerindo uma atividade alta destas enzimas em relação ao número de mitocôndrias. Se comprovada, essa seria uma adaptação importante para os músculos que possuem muito pouca mitocôndria.

Nossos dados apresentam correlação com a tipagem de fibras apresentada por Delp e Duan (1996) em ratos Sprague-Dawley, como mostrado na tabela 4 que apresenta as porcentagens de fibras

apresentadas nos músculos por nós utilizados e os dados dos complexos I e IV com relação ao complexo V tomado com padrão:

**Tabela 4.** Tipagem de fibras de músculo esquelético de ratos Sprague-Dawley (Delp e Duan, 1996) e razões obtidas em nosso trabalho (figuras 20 e 21).

	I	IIa	IIb	IIx (d)	Razão I/V	Razão IV/V
SO	86%	6%	0%	8%	9,8	2,6
GV	55%	31%	1%	13%	5,3	2,9
GB	0%	0%	95%	5%	28,5	31,8
ST	3%	5%	74%	18%	109,1	2,0

Muito embora as razões obtidas em nosso trabalho apresentem correlação com a tipagem de fibras obtidas por Delp e Duan (1996), vale lembrar que a linhagem dos animais utilizados não foi a mesma.

Em estudo realizado por Smolka (1999) observou-se que o músculo semitendinoso apresentava CPM predominante do tipo IIb (100%) caracterizando-o como músculo altamente glicolítico. Em nosso trabalho esse músculo apresentou razão complexo I/V alta o que provavelmente indica um número baixo de mitocôndrias mas atividade alta de enzimas da cadeia de transporte de elétrons.

No trabalho citado (Smolka, 1999) a tipagem de fibras nos músculos SO e ST foi a seguinte:

**Tabela 5.** Tipagem de fibras de músculo esquelético de ratos Wistar (Smolka, 1999).

	I	IIa/IIx	IIb
SO	96%	4%	0%
ST	0%	0%	100%

É importante também ressaltar que o número de mitocôndrias dos músculos glicolíticos é muito baixo e é interessante observar que apesar do músculo semitendinoso apresentar 100% de fibras Iib (Smolka, 1999), caracterizando-o como glicolítico, ainda é possível detectar atividade das enzimas mitocondriais. Apesar dessa porcentagem de fibras Iib, ele apresentou uma atividade da CS (citrato sintase) mais elevada que a do músculo gastrocnêmio branco, indicando que ou o músculo semitendinoso não possui 100% de fibras Iib ou o músculo gastrocnêmio branco (tipagem de fibras não determinada), por ser uma porção glicolítica de um grupo muscular misto, apresenta adaptações que diminuem a atividade de suas enzimas glicolíticas e oxidativas, facilitando a alta atividade da porção mais oxidativa.

Juntamente a isso, em trabalho publicado por Howlett e Willis (1998) foi mostrado que em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de coelhos, a atividade da enzima isocitrato desidrogenase (NAD-dependente) (IDH) em fibras do tipo Iib é duas vezes maior que aquela apresentada em fibras do tipo I. Isso pode ainda ser atribuído ao  $K_m$  aparente baixo para ADP apresentado por esta mesma enzima em tecido muscular e mitocôndrias isoladas.

No mesmo trabalho, os autores comparam o homogenato de três diferentes músculos de rato (sóleo, vasto superficial e vasto profundo) em relação à atividade da mesma enzima (isocitrato desidrogenase) normalizada pela atividade da citrato sintase (marcador de quantidade de mitocôndria). O músculo vasto superficial, o qual apresenta 97% de fibras Iib, apresentou atividade da enzima IDH duas vezes maior quando comparado ao músculo sóleo (86% de fibras I). Já o músculo vasto profundo (56% de fibras do tipo Iia) apresentou atividade intermediária entre os outros músculos citados anteriormente.

Assim como no nosso trabalho onde observou-se atividade menor da enzima citrato sintase nos músculos gastrocnêmio branco e semitendinoso

em relação aos músculos sóleo e gastrocnêmio vermelho, outro estudo mostrou que a atividade máxima das enzimas citrato sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase foi menor, enquanto que da isocitrato desidrogenase foi maior em mitocôndrias isoladas do músculo grácil (fibras IIb) em relação ao músculo sóleo de ratos (fibras I) (Jackman & Willis, 1996).

Parece claro que a atividade da citrato sintase (importante marcador de conteúdo mitocondrial) não reflete diretamente a atividade de outras enzimas, já que muitas delas apresentam atividade aumentada em relação à quantidade de mitocôndrias determinadas no tecido.

Neste trabalho observou-se atividade aumentada do complexo I (NADH desidrogenase) nos músculos com características mais glicolíticas o que poderia ser correlacionado com a atividade aumentada da isocitrato desidrogenase (IDH), dos trabalhos citados anteriormente. Como a IDH é uma enzima que catalisa a oxidação de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato com redução de  $\text{NAD}^+$  a NADH, o aumento em sua atividade alteraria a razão  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , o que poderia levar a um aumento na atividade do complexo I.

Em ambos os trabalhos com ratos Wistar e ratos Sprague-Dawley, o músculo sóleo apresentou número de fibras I e IIa maior que os demais músculos, o que sugere um maior número de mitocôndrias. Entretanto usando-se a atividade da citrato sintase como parâmetro de quantidade de mitocôndrias parece que o músculo gastrocnêmio vermelho aparentou ser mais rico em mitocôndrias, porém a razão complexo I/V do músculo sóleo foi maior, sugerindo uma atividade maior desta enzima em relação ao número de mitocôndrias.

A comparação entre o tipo de fibra muscular e sua capacidade oxidativa torna-se um estudo muito relevante para entendermos os

mecanismos de adaptação aos quais as fibras são submetidas durante diferentes programas de treinamento.

Nossos resultados mostram que essa técnica associada à coloração histoquímica permite a identificação dos complexos enzimáticos da cadeia de transporte de elétrons através de suas reações específicas nos diferentes tipos de músculos de ratos, sem a necessidade de isolamento das mitocôndrias. Talvez pelo maior número de mitocôndrias existentes, os músculos mais oxidativos são os que apresentaram resultados mais reprodutíveis. Uma vez padronizada a técnica, objetivo deste trabalho, várias situações especiais que podem induzir alterações em complexos da cadeia de transporte de elétrons poderão ser mais facilmente estudadas, entre elas o estresse induzido pelo exercício físico ou por doenças respiratórias crônicas.

Em estudo realizado por Zerbetto *et al.* (1997) em pacientes com deficiências nas enzimas responsáveis pela fosforilação oxidativa e responsivos à riboflavina foi observado um aumento na atividade dos complexos da cadeia de transporte de elétrons em relação ao número de mitocôndrias após tratamento com riboflavina, demonstrando que essa técnica foi eficaz na detecção de variações nessas atividades. Isso indica que ela também pode ser usada para análise clínica ou para detectar qualquer situação que venha alterar para mais ou para menos a atividade dos complexos mitocondriais.

Já no caso do exercício físico muitas são as alterações bioquímicas e morfológicas que as células musculares apresentam. Dessa forma a técnica de BN-Page juntamente com a coloração histoquímica, também poderá ser aplicada no estudo do aumento da capacidade oxidativa de diferentes músculos submetidos a diferentes métodos de treinamento, além do estudo da especificidade de cada fibra muscular (fibras vermelhas, brancas e mistas).

Alguns trabalhos mostram que há um aumento na porcentagem de fibras vermelhas comparadas com a porcentagem de fibras brancas em músculos de animais e humanos após treinamento (Gollnick *et al.*, 1973). Baldwin e colaboradores (1972) observaram um aumento de 2 vezes na capacidade oxidativa dos três tipos de fibras musculares (I, IIa e IIb) de músculo esquelético de rato depois de um protocolo de treinamento de “endurance”.

O treinamento de “endurance” (ou contínuo) tem sido associado a mudanças na capacidade oxidativa do músculo esquelético bem como na expressão de isoformas de miosina (Gosselin *et al.*, 1992). No entanto, alguns autores atribuem o aumento da capacidade oxidativa dos diferentes tipos de fibras musculares, após um programa de treinamento, ao aumento na área da fibra muscular e não à alteração no tipo de fibra básico do músculo (Gollnick *et al.*, 1973).

Em estudo realizado por Gosselin *et al.* (1992) mostrou-se que o exercício crônico não causou nenhuma mudança na composição de isoformas lentas de CPM em músculos da região costal do diafragma de rato, porém, ao contrário do esperado, houve um aumento na atividade da enzima succinato desidrogenase na fibras musculares de tipo I, IIa e IIb do mesmo músculo.

Aumentos na capacidade oxidativa do músculo esquelético de humanos já foram associados a aumentos na atividade de enzimas da cadeia de transporte de elétrons (NADH desidrogenase, succinato desidrogenase e citocromo c oxidase) após treinamento de endurance (Krieger *et al.*, 1980; Hoppeler *et al.*, 1985; Henrickson, 1995 ; Green *et al.*, 1995). Podem-se também notar aumentos na concentração de citocromo c conforme o tipo de exercício, a intensidade e a predominância do tipo de fibras musculares (Dudley *et al.*, 1982).

Assim como o exercício é responsável pelo aumento da capacidade oxidativa da mitocôndria, ele também é responsável pelo aumento no consumo de oxigênio em cerca de 10-20 vezes (Packer, 1997). Sabe-se que em condições fisiológicas, cerca de 2-5% do oxigênio consumido pode ser utilizado na redução univalente do oxigênio produzindo assim espécies reativas de oxigênio (EROS) (Turrens & Boveris, 1980; Sjondin *et al.*, 1990).

Dessa forma, em uma situação de exercício físico, onde a demanda de oxigênio está aumentada, a produção de EROS também mostra-se aumentada e em uma situação em que o ataque oxidativo ocasionado por EROS, é maior que a defesa do organismo (enzimas antioxidantes, glutathione e vitaminas) estabelece-se um estado de “estresse oxidativo”.

A mitocôndria é o local onde se encontram sítios potenciais de produção de EROS (Sjondin *et al.*, 1990), dentre os quais o complexo I (NADH desidrogenase) e a coenzima Q são os maiores produtores (Takeshige, 1979; Turrens, 1980; Nohl, 1986; Sjondin *et al.*, 1990; Packer, 1997).

Já foi demonstrado que diferentes tipos de exercício físico podem causar produção de EROS, aqueles com a demanda de oxigênio aumentada causam vazamento de elétrons e outros que simulam uma situação de isquemia também podem aumentar a produção de EROS durante a reperfusão (Packer, 1997).

O dano causado pelo ataque de EROS à membrana da mitocôndria pode ocasionar uma perda ou diminuição da atividade de enzimas dos complexos da cadeia de transporte de elétrons, especificamente na citocromo oxidase, como já foi demonstrado por Gollnick *et al.* (1990) e Soussi (1990).

Nessas diversas situações de estresse a que pode levar o exercício físico, a utilização de uma técnica como BN-Page, juntamente com a

coloração histoquímica aqui descritas e padronizadas possibilita um estudo global das alterações envolvidas ao nível das atividades dos diferentes complexos da cadeia de transporte de elétrons. Tendo em vista que nosso laboratório está envolvido num amplo estudo do exercício físico e na avaliação de oxigenoterapia como tratamento de pacientes com DPOC, foi extremamente importante a padronização dessa nova técnica.

**CONCLUSÃO**

---

Os dados aqui apresentados mostram que é possível obter uma correlação entre a atividade da enzima citrato sintase, conhecida como ótimo marcador de quantidade de mitocôndrias, e a área/intensidade do complexo V obtido através de BN-Page nos músculos sóleo, porção branca e vermelha do gastrocnêmio e semitendinoso.

Essa correlação linear ( $p < 0,05$  e  $r > 0,85$  nos diferentes músculos) entre citrato sintase e complexo V foi obtida com um número grande de amostras e também possibilitou a utilização do complexo V como marcador da quantidade de mitocôndrias.

Os músculos sóleo e gastrocnêmio vermelho mostraram a melhor correlação linear e uma variação menor, quando comparados aos músculos gastrocnêmio branco e semitendinoso. Observou-se que os músculos que possuem características mais oxidativas apresentam uma coloração histoquímica melhor, provavelmente devido a concentração de enzimas aumentada.

Nossos dados mostram que aparentemente aqueles músculos (gastrocnêmio branco e semitendinoso) que possuem uma quantidade menor de mitocôndrias tem a atividade de seus complexos aumentada em relação aos músculos mais oxidativos.



Esse trabalho teve como objetivo a padronização de uma técnica pouco utilizada para o estudo dos complexos da cadeia de transporte de elétrons. A especificidade dessa técnica é muito maior já que a técnica de métodos espectrofotométricos, pois estes podem detectar outras atividades celulares além das enzimas específicas desejadas.

Existem ainda muitos questionamentos em relação às diferenças na composição, à atividade enzimática específica e aos marcadores de conteúdo protéico das mitocôndrias de diferentes tipos de fibras musculares. E essa padronização nos quatro diferentes músculos esqueléticos de rato abre perspectivas para uma análise das diferenças morfológicas e funcionais dos mesmos; além também do acompanhamento das adaptações oxidativas resultantes de diferentes tipos de treinamento físico (contínuo e intermitente) e de doenças com a DPOC.

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

- ALESSIO, H. M. AND GOLDFARB, A. H. (1988) Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J. Appl. Physiol.* **64**:1333-1336.
- ALESSIO, H. M., GOLDFARB, A. H., CUTLER, R. G. (1988) MDA content increases in fast and slow twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am. J. Physiol.* **255(24)**: C874-C877.
- AMES, B.N., SHIGENAGA, M. K. AND HAGEN, T. M. (1995) Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**:165-170.
- ASTRAND, P. O. AND RODAHL, K. Textbook of work physiology. New York: McGraw Hill. 1986.
- BALDWIN, K. M., KLINKERFUSS, G. H., TERJUNG, R.L., MOLE, P. A. AND HOLLOSZY, J. O. (1972) Respiratory capacity of white, red, and intermediate muscle: adaptative response to exercise. *Am. J. Physiol.* **222(2)**: 373-378.
- BENTLAGE, H., COO, R., LAAK, H., SENEGERS, R., TRIJBELS, F., RUITENBEEK, W., SCHLOTE, W., PFEIFFER, K., GENCIC, S., JAGOW, G. AND SCHÄGGER, H. (1995) Human diseases with defects in oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.*, **227**: 909-915.
- BOOTH, F.W. AND THOMASON, D. B. (1991) Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol. Rev.* **71(2)**: 541-585.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 255-260.

- CHILLIBECK, P. D., BELL, R.P., MARTIN, T.P. (1998) Higher mitochondrial fatty acid oxidation following intermittent versus continuous endurance exercise training. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **76**: 891-894.
- COOPER, J.M., MANN, V.M., KRIGE, D., SCHAPIRA, A.H.V. (1992) Human mitochondrial complex I dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1101**:198-203.
- CRAMER, W. A. AND KNAFF, D.B. Energy Transduction in Biological Membranes: A textbook of Bioenergetics. 1<sup>st</sup> ed. New York: Springer-Verlag. 1991. 579p.
- CRISWELL, D. POWERS, S., DODD, S., LAWLER, J., EDWARDS, W., RENSHLER, K. AND GRINTONS, S. (1993). High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25(10)**: 1135-1140.
- CULLIS, P. R AND HOPE, M. J. Physical properties and functional roles of lipids in membranes, in: Biochemistry of lipids and membranes California- Menlo Park. Dennis E. Vance and Jean F. Vance eds. 1985. p.25-72.
- DAUM, G. (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 822:1-42.
- DAVIES, J.A., PACKER, L., BROOKS, G. A. (1981) Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Arch. Biochem. Biophys.* **209(2)**: 539-554.

- DAVIES, K. J. A., QUINTANILHA, A. T., BROOKS, G. A., PACKER, L. (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **107(4)**: 1198-1205.
- DELP, M. D. AND DUAN, C. (1996) Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J. Appl. Physiol.* **80(1)**: 261-270.
- DUBOWITZ, V. Muscle Biopsy: A practical approach. London: Baillière Tindall, 1985. p.34-36.
- DUDLEY, G.A. WILLIAM, M. A. TERJUNG, R. L. (1982) Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **53(4)**: 844-850.
- GREEN, H. J. HELYAR, M., BALL-BURNETT, M., KOWALCHUK, N., SYMON, S. FARRANCE, B. (1992) Metabolic adaptations to training precede changes in muscle mitochondrial capacity. *J. Appl. Physiol.* **72(2)**: 484-491.
- GREEN, H. J. JONES, S., BALL-BURNETT, M., FARRANCE, B., RANNEY, D. (1995) Adaptations in muscle metabolism to prolonged voluntary exercise and training. *J. Appl. Physiol.* **78(1)**: 138-145.
- GOLLNICK, P. D., ARMSTRONG, B., SALTIN, C., SAUBERT, iv, w., SEMROWICH, W. L. AND SHEPHERD, E. (1973) Effect of training on enzyme activity and fiber composition skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **34(1)**: 107-111.

- GOLLNICK, P. D., BERTOCCI, L. A., KELSO, T.B., WITT, E. H., HODGSON, D. R. (1990) The effect of high-intensity exercise on the respiratory capacity of skeletal muscle. *Pflügers Arch.* **415**: 407-413.
- GOSSELIN, L.E., BETLACH, M., VAILAS, A. C., GREASER, M. L., THOMAS, P. (1992) Myosin heavy chain composition in the rat diaphragm: effect of age and exercise training. *J. Appl. Physiol.* **73(4)**: 1282-1286.
- GOODMAN, M. N. AND RUDERMAN, N. B. (1982) Influence of muscle use on amino acid metabolism. *Exerc. Sport. Sci. Rev.* **10**: 4-26.
- GUNNING, O. AND HARDEMAN, E. (1991) Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *FASEB J*, **5**: 3064-3070.
- HÄGERHÅLL, C. (1997) Succinate: quinone oxidoreductases variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta.* **1320**:107-141.
- HARRISON, A. P., ROWLERSON, A. M. AND DAUNCEY, M. J. (1996) Selective regulation of myofiber differentiation by energy status during postnatal development. *Am. J. Physiol.* **270**: R667-R674.
- HAWORTH, R.H. AND HUNTER, O.R. (1980) Allosteric inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides, *J. Memb. Biol.* **54**: 231-236.
- HENRIKSSON, J. (1995) Effect of training and nutrition on the development of skeletal muscle. *J. Sports Sci.* **13**: S25-S30.

- HOFHAUS, G., WEISS, H. AND LEONARD, K. (1991) Electron Microscopic Analysis of the peripheral and Membrane Parts of Mitochondrial NADH Dehydrogenase (Complex I). *J. Mol. Biol.* **221**: 1027-1043.
- HOLLOSZY, J. O. (1967) Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **242(9)**: 2278-2282.
- HOPPELER, H., HOWALD, H., CONLEY, K., LINDSTEDT, S. L., CLAASSEN, H., VOCK, P. AND WEIBEL, E. R. (1985) Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **59(2)**: 320-327.
- HOWLETT, R. A. AND WILLIS, W. T. (1998) Fiber-type-related differences in the enzymes of a proposed substrate cycle. *Biochim. Biophys. Acta* **1363**: 224-230.
- JACKMAN, M. R. AND WILLIS, W. T. (1996) Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **270**: C673-C678.
- KADENBACH, B., BARTH, J. AND AKGÜN, R., FREUND, R., LINDER, D. AND POSSEKEL, S. (1995) Regulation of mitochondrial energy generation in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1271**:103-109.
- KIBERTIS, P.A. (1999) Mitochondria make a comeback. *Science*, **283**:1475.
- KRIEGER, D.A., TATE, C. A., McMILLIN-WOOD, J. AND BOOTH, F. W. (1980) Populations of rat skeletal muscle after exercise and immobilization. *J. Appl. Physiol.* **48(1)**:23-28.

- KUIPERS, H. (1998) Training and overtraining: an introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* **30(7)**:1137-1139.
- LARSSON, L., EDSTROM, L., LINDERGREN, B., GORZA, L. AND SCHIAFFINO, S. (1991) Myosin heavy chain composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am. J. Physiol.* **261**: (Cell Physiol. 30): C93-C101.
- LEE, C. P. (1995) Biochemical studies of isolated mitochondria from normal and diseased tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* **1271**: 21-28.
- LUFT, R. (1995) The development of mitochondrial medicine. *Biochim. Biophys. Acta*, **1271**:1-6.
- MARZZOCO, A. e TORRES, B. B. Bioquímica Básica, 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara- Koogan S. A., 1999. 360p.
- McARDLE, W.D., KATCH, F. I. AND KATCH, V. L. Exercise Physiology: energy, nutrition, and human performance. 4<sup>th</sup> ed. :Williams & Wilkins. 1996.
- MITCHELL, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* **191**: 144-148.
- MIZUNO, Y., IKEBE, S., HATTORI, N., NAKAGAWA-HATORI, Y., MOCHIZUKI, H., TANAKA, M. AND OZAWA, T. (1995) Role of mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1271**: 265-274.

NEUGEBAUER, J. A guide to the properties and uses of detergents in Biology and Biochemistry. Calbiochem. 5<sup>a</sup> ed. 1988. 62p.

NOHL, H. AND JORDAN, W. (1986) The mitochondrial site of superoxide formation. *Bioch. Bioph. Reser. Com.* **138(2)**: 533-539.

PACKER, L. (1997) Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J. Sports Sci.* **15**: 353-363.

PETERSON, P.L. (1995) The treatment of mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1271**: 275-280.

SARASTE, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science.* **283**: 1488-1493.

SCHAGGER, H. (1995) Quantification of oxidative phosphorylation enzymes after blue native electrophoresis and two-dimensional resolution: Normal complex I protein amounts in Parkinson's disease conflict with reduced catalytic activities. *Electrophoresis.* **16**:763-770.

SCHAGGER, H. AND JAGOW, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**:223-231.

SCHIAFFINO, S. AND REGGIANI, C. (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **77**: 493-501.

SCHIAFFINO, S., GORZA, L., SARTORE, S., SAGGIN, L., AUSONI, S., VIANELLO, M., GUNDERSEN, K. AND LOMO, T. (1989). Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fiber. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **10**:197-205.

- SELIGMAN, A.M., KARNOVSKY, M.J., WASSERKRUG, H.L. AND HANKER, J. S. (1968) Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J. Cell Biol.* **38**:1-14.
- SRERE, P. A. (1969) Citrate synthase. *Methods enzymol.* **13**:3-5.
- SINGER, T.P., RAMSAY, R.R., ACKRELL, B.A.C. (1995) Deficiencies of NADH and Succinate dehydrogenase in degenerative diseases and myopathies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1271**: 211-219.
- SJÖDIN, B., WESTING, H. Y., APPLE, F.S. (1990) Biochemical Mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* **10(4)**: 236-254.
- SMOLKA, M.B., ZOPPI, C.C., ALVES, A. A., SILVEIRA, L. R., MARANGONI, S., PEREIRA-DA-SILVA, L., NOVELLO, J. C., MACEDO, D. V. (2000) HSP72 as a complementary protection against exercise-induced oxidative stress in the soleus muscle of rats. *Am. J. Physiol.* (in press).
- SMOLKA, M. B. Exercício Físico e expressão da proteína de estresse HSP72 em músculos de rato submetidos a diferentes tipos de treinamento. Campinas:UNICAMP, 1999. 75p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- SOUSSI, B., IDSTRÖM, J. P., SCHERTEN, T., BYLUND-FELLENIUS, A.C. (1990) Cytochrome c oxidase and cardiolipin alterations in response to skeletal muscle ischaemia and reperfusion. *Acta Physiol. Scand.* **138**:107-114.

- TAKESHIGE, K. AND MINAKAMI, S. (1979) NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation. *Biochem. J.* **180**:129-135.
- TALMADGE, R.J. AND ROY, R.R. (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J. Appl. Physiol.* **75(5)**:2337-2340.
- THIBODEAU, G.A. AND PATTON, K. T. *Anatomy & Physiology*. 3<sup>rd</sup>.ed. 1996.
- THOMASON, D. B., BALDWIN, K. M. AND HERRICK, R. E.(1986) Myosin isozyme distribution in rodent hindlimb skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **60(6)**:1923-1931.
- TRYBUS, K. M. (1994) Role of myosin light chains. *J. Muscl. Res. Cell Mot.* **15**: 587-594.
- TURRENS, J. F., BOVERIS, A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **191**: 421-427.
- VOET, D., VOET, J. AND PRATT, C. W. Fundamentals of Biochemistry. 1<sup>st</sup>. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1999. 931p.
- VIRU, M. (1994) Differences in effects of various training regimens on metabolism of skeletal muscles. *J. Sports Med. Physiol. Fit.* **34(3)**:217-227.

- ZERBETTO, E., VERGANI, L., DABBENI-SALA, F. (1997) Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **18**: 2059-2064.
- WALLACE, D.C. (1999) Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science*, **283**:1482-1488.
- WILLMORE, J. H. AND COSTILL, D. L. Physiology of sport and exercise. 1<sup>st</sup>. ed. U.S.A.:Human Kinetics. 1994. 549p.
- WINDER, W. N., BALDWIN, K. M. AND HOLLOSZY, J. O.O.(1974) Enzymes involved in Ketone utilization in different types of muscles: Adaptations to exercise. *Eur. J. Biochem.* **47**: 461-467.



**PROTOSCOLOS DE TREINAMENTO**

- a) Fase I (primeiras 4 semanas): aumento progressivo na intensidade e duração do esforço
- b) Fase II (últimas 4 semanas): manutenção da intensidade e duração do esforço atingidas na 4ª semana.

Semanas	<b>Contínuo</b>		<b>Intervalado</b>			
	Velocidade (m/min)	Tempo (min)	Velocidade (m/min)	Tempo (min)	Pausa (min)	Número de Repetições
1ª	15	20	20	5	2	4
2ª	20	30	30	2,5	1	4
3ª	22,5	45	32,5	2,5	1	6
4ª	25	60	35	2,5	1	6
5ª a 8ª	25	60	35	2,5	1	6



### COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS NACIONAIS

A .A .Alves, T.P.Rigoletto, A .M. Molnar, A .B. Arthur, C.C. Zoppi, P.E.S. Paterniani, D.V. Macedo, L. Pereira-da Silva.(1994) "A suitable procedure to get mitochondria for undergraduate practical courses". XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambú MG.

Arthur,A .B., Molnar,A .M., Zoppi,C.C., Pereira-da-Silva,L., Macedo,D.V. (1995) "A influência dos tipos de exercício físico no grau de peroxidação lipídica". X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Serra Negra SP.

Zoppi,C.C., Molnar,A .M., Stoppa,G., Barros,B.F., Torsoni, M.A., Macedo, D.V. (1996) "Adaptação de enzimas oxidantes e antioxidantes induzida por exercício físico". XI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Caxambú MG.

Molnar, A. M., Alves, A.A., Pereira-da-Silva, L., Dabbeni-Sala, F., Macedo, D.V. (2000) "Standardization of the BN-Page and histochemical staining for complexes I and IV of the electron-transport chain in rat skeletal muscles". XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) Caxambú MG.

### **ATIVIDADES DIDÁTICAS**

Monitora da Disciplina BD 890 (Tópicos em Biologia IV, Bioquímica da Nutrição), 1998. Disciplina eletiva para os alunos de graduação da UNICAMP.

Monitora da Disciplina BD 990b (Tópicos Especiais em Biologia V, Bioquímica da Nutrição) e QBQ 900 (Bioquímica da Nutrição), 2000. Disciplina eletiva de ensino à distância para os alunos de graduação da UNICAMP e USP.