

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



FERNANDA LORENZI LAZARIM

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE SORO DE RATOS EM
DIFERENTES SITUAÇÕES DE EXERCÍCIO E UMA
EXPERIÊNCIA DE PESQUISA EM ENSINO**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FERNANDA LORENZI LAZARIM
[assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo.

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

L457a	<p>Lazarim, Fernanda Lorenzi Análise proteômica de soro de ratos em diferentes situações de exercício e uma experiência de pesquisa em ensino / Fernanda Lorenzi Lazarim. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadora: Denise Vaz de Macedo. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Proteoma de soro. 2. Eletroforese bidimensional. 3. Rato - Exercícios. 4. <i>Overtraining</i>. 5. Bioquímica – Estudo e ensino. I. Macedo, Denise Vaz de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Serum proteomic analysis of rats in different exercise situations and an experience in teaching research.

Palavras-chave em inglês: Serum proteome; Two-dimensional electrophoresis; Rats - Exercises; Overtraining; Biochemistry – Study and teaching.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Denise Vaz de Macedo, Bayardo Batista Torres, Richard Hemmi Valente, Foued Salmen Espindola, Sandro Massao Hirabara.

Data da defesa: 28/08/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 28 de Agosto de 2009.

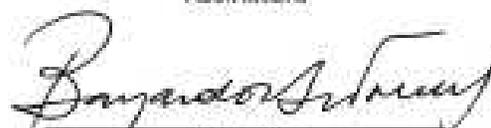
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra . Denise Vaz de Macedo
(Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Bayardo Batista Torres



Assinatura

Prof. Dr. Richard Hemmi Valente



Assinatura

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola



Assinatura

Prof. Dr. Sandro Massao Hirabara



Assinatura

Profa. Dra. Eneida de Paula

Assinatura

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello

Assinatura

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, ***Sônia e Luiz***, pelo amor e apoio em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, meu guia, fonte de sabedoria e meu maior refúgio.

A minha **FAMÍLIA**, Sônia, Luiz, Fábio, Kalel, Wisen, Heloísa, James e Heloá, pelo carinho e companheirismo nas alegrias e tristezas.

A **professora Denise**, por acreditar na menina que aos 17 anos bateu em sua porta. Pelas oportunidades, pelos ensinamentos, pela confiança ao longo desta caminhada e pelos sonhos realizados. Mas, sobretudo pela amizade construída.

Aos meus **AMIGOS**, que sempre estão na torcida pelo meu crescimento pessoal e profissional e que tornam minha vida mais bela com suas presenças. Em especial à **Elis, Mirtes e Rose**, que me viram sorrir e chorar em vários momentos e me deram fôlego para continuar.

A **Ana Maria**, cujo empenho profissional foi indispensável para a realização deste trabalho e acima de tudo pela amizade e longas conversas de almoço.

Aos **AMIGOS DO LABEX**, que tornaram a caminhada agradável e enriquecedora pela convivência e discussões.

Não me esqueço dos primeiros passos e a estes devo um agradecimento muito especial aos meus mestres **Armindo, Neto, Nilcéia, Agnes, Claudio, Neusinha e Soraia**, que muito me ensinaram e despertaram em mim a vontade de prosseguir.

Aos meus queridos alunos, **Átila e Michelli**, que me ajudaram em toda padronização dos experimentos e tiveram paciência para aprender com os muitos erros no início deste trabalho.

Aos **queridos alunos**, cujos questionamentos e incessante vontade de aprender deram um sentido maior aos meus estudos.

Ao **Richard e ao pessoal do Laboratório de Toxinologia da FIOCRUZ**, que me acolheram possibilitando a identificação das proteínas e conclusão do trabalho.

Aos **membros da banca** pela valiosa participação na avaliação deste estudo e pelas contribuições enriquecedoras.

RESUMO

A resposta adaptativa decorrente de um programa de treinamento está relacionada a um intenso processo de síntese protéica, cujo efeito cumulativo de várias sessões de exercício leva a alterações fenotípicas do músculo e aumento de rendimento em capacidades biomotoras diversas. Para isso é necessário um tempo adequado de recuperação entre os estímulos. Um processo contínuo de treinamento intensificado sem o tempo de recuperação adequado é denominado *overtraining*. Este pode culminar em basicamente dois estados diferenciados em relação ao desempenho: *overreaching* funcional (FOR), com manutenção ou mesmo melhora de desempenho após o descanso, e *overreaching* não funcional (NFOR), caracterizado pela queda no desempenho por tempo prolongado. A visualização das alterações agudas e crônicas do perfil protéico tanto de células como de fluidos pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos nos estados FOR e NFOR, e possibilitar a identificação de marcadores que auxiliem na detecção desses estados. Nesse contexto a análise proteômica pode ser uma ferramenta bastante útil, pois permite separar, quantificar e identificar o perfil protéico de tecidos e fluidos biológicos. A presente tese está dividida em duas partes: pesquisa (Parte I) e ensino (Parte II), que refletem as experiências vividas desde a iniciação científica, sendo igualmente relevantes para minha formação acadêmica. A Parte I é constituída por três capítulos cujo objetivo principal foi investigar as alterações agudas e crônicas decorrentes do exercício físico no perfil protéico do soro de ratos através da análise proteômica. O capítulo 1 apresenta uma revisão sobre os mecanismos moleculares envolvidos na resposta adaptativa ao treinamento, as proteínas do soro, as técnicas utilizadas na análise proteômica e sua aplicabilidade nas pesquisas com exercício. O capítulo 2 apresenta as alterações agudas no perfil proteico do soro de ratos submetidos a um exercício exaustivo de média duração em esteira, 3 e 24 horas após o estímulo. As proteínas diferencialmente expressas 24 horas após o exercício corresponderam a proteínas de fase aguda sintetizadas em resposta à instalação de um processo inflamatório, indicando que a geração de microtraumas e a inflamação são partes integrantes da resposta aguda ao exercício. O capítulo 3 apresenta as alterações no perfil proteico do soro de ratos submetidos a um protocolo de indução ao *continuum* treinamento-*overtraining*, desenvolvido recentemente no nosso laboratório, e que produz animais nos estados FOR e NFOR. As proteínas diferencialmente expressas indicam um quadro antiinflamatório nos animais do grupo FOR e alterações protéicas que favoreceram os processos adaptativos envolvidos na biogênese mitocondrial e regeneração do tecido danificado. Também apresentaram melhora no perfil lipídico. O grupo NFOR apresentou alterações de proteínas de fase aguda indicando um processo inflamatório instalado e alterações de algumas proteínas que podem ter prejudicado o desencadeamento da resposta adaptativa, resultando na queda da *performance*. A Parte II da tese apresenta uma proposta de atividade prática, aplicada num curso de especialização com enfoque em bioquímica para alunos de Educação Física e Nutrição. Essa atividade consiste na discussão dos conceitos de Índice Glicêmico e Carga Glicêmica a partir de dados obtidos pelos próprios alunos. Utilizamos essa aula para a introdução ao estudo das vias de síntese e integração metabólica no estado alimentado.

Palavras-Chave: proteoma de soro, eletroforese bidimensional, treinamento físico, *overtraining*, ensino de bioquímica.

ABSTRACT

The adaptive response to a training program is related to an intensive process of protein synthesis, which cumulative effect of multiple sessions of exercise leads to muscle phenotypic alterations and increases different physical capacities. For such adaptation an appropriate time for recovery between stimuli is required. A continuous process of intensified training without adequate recovery time is called overtraining. It can result in basically two different states concerning *performance*: functional overreaching (FOR), with maintenance or even improvement of *performance* after the recovery period, and non-functional overreaching (NFOR), characterized by *performance* decrement for a prolonged period. The visualization of acute and chronic changes on the protein profile of both cells and fluids may help one to understand the mechanisms involved on FOR and NFOR states, and it can enable the identification of biomarkers helping to detect these states. Within this context the proteomic analysis can be an interesting tool as it enables to separate, identify and quantify the protein profile of tissues and biological fluids. This work is divided in two parts: research (Part I), and education (Part II), which represent the experiences that I have been living since my scientific initiation and therefore, both are relevant for my education. Part I consists of three chapters in which the main goal is to investigate the acute and chronic changes in response to exercise in serum proteins profile of rats by proteomic analysis. Chapter 1 presents a review of the molecular mechanisms involved in the adaptive response to training, serum proteins, the techniques used in proteomics analysis and its applicability on exercise research. Chapter 2 presents the acute changes in serum protein profile of rats submitted to an exhaustive exercise of average duration on a treadmill, 3 and 24 hours after the stimulus. The proteins differently expressed 24 hours after the exercise were the acute-phase protein synthesized in response to installation of the inflammatory process, indicating that the generation of micro trauma and inflammation are parts of the acute response to the exercise. Chapter 3 reveals the changes in the serum protein profile of rats, submitted to an exercise protocol developed recently in our laboratory, to induce the animals through the *continuum* training-overtraining, leading the animals to the FOR and NFOR states. The differently expressed proteins indicate an anti-inflammatory process in the animals that were in the FOR group and protein changes which favored the adaptive processes involved in mitochondrial biogenesis and the complete recovery of tissue damage, as well as the improvement on the lipid profile. The NFOR group presented changes of acute phase proteins indicating the installation of an inflammatory process and alterations in some proteins that may have impaired the development of the adaptive response, which results in *performance* decrement. Part II of this work shows a proposal for a practical activity implemented in a specialization course with focus on Biochemistry for Physical Education and Nutrition students. This activity consists in the discussion of the Glycemic Index and Glycemic Load concepts through data obtained by the students. This class is used to introduce the study of synthesis pathways and metabolic integration in the fed state.

Key-words: serum proteome, two-dimensional electrophoresis, physical training, overtraining, biochemistry teaching.

SUMÁRIO

PARTE I: PESQUISA	1
CAPÍTULO 1	2
Resumo	3
Introdução	4
Mecanismos moleculares envolvidos na resposta adaptativa intramuscular ao exercício	5
Proteínas do soro	13
Análise Proteômica	15
Eletroforese bidimensional	16
Espectrometria de massas	20
Aplicação da análise proteômica na pesquisa com exercício	22
Perspectivas	25
Referencias Bibliográficas	26
CAPÍTULO 2	33
Resumo	34
Introdução	35
Materiais e Métodos	36
Resultados	41
Discussão	50
Referencias Bibliográficas	53
CAPÍTULO 3	56
Resumo	57
Introdução	58
Materiais e Métodos	59
Resultados	62
Discussão	77
Referencias Bibliográficas	82
PARTE II: ENSINO	87
CAPÍTULO 4	88
Resumo	89
Introdução	90
Estrutura e desenvolvimento da prática	91
Resultados e Discussão	94
Referencias Bibliográficas	99
CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
ATIVIDADES COMPLEMENTARES DESENVOLVIDAS	103
ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal	107

PARTE I: PESQUISA

CAPÍTULO 1

PROTEOMA DO EXERCÍCIO: APLICABILIDADE NA CIÊNCIA DO ESPORTE

RESUMO

Os benefícios gerados pela prática regular de exercícios na promoção da saúde e prevenção de doenças crônico-degenerativas estão relacionados à capacidade das nossas células se adaptarem em resposta à atividade física. A resposta adaptativa é determinada pelo tipo, volume e frequência de aplicação dos estímulos, que ativam vias de sinalização distintas, a transcrição de genes específicos e posterior síntese protéica. O treinamento de *endurance* envolve a ativação de enzimas como AMPK, MAPK e proteínas dependentes de Ca^{2+} , que sinalizam a síntese de proteínas envolvidas no metabolismo oxidativo e biogênese mitocondrial. Já o treinamento resistido está relacionado à ativação da enzima mTOR, inibição da transcrição de genes relacionados à atrofia e aumento da síntese de proteínas contráteis, com aumento da massa muscular. Os mecanismos moleculares envolvidos no processo adaptativo ao nível proteico ainda não são totalmente compreendidos. Neste contexto, a proteômica pode ser uma ferramenta útil, pois permite separar, quantificar e identificar o perfil proteico de tecidos e do sangue, que reflete o estado fisiológico dos tecidos. A utilização da análise proteômica na ciência do esporte está no início. Ainda são poucos os estudos que se preocupam em desvendar os mecanismos moleculares envolvidos nos processos adaptativos e não-adaptativos decorrentes do exercício físico. Os objetivos dessa revisão são discutir as vias de sinalização protéica ativadas em resposta aos treinamentos resistido e de *endurance*, apresentar as proteínas mais abundantes no soro, os princípios e técnicas envolvidas na análise proteômica e apontar perspectivas futuras dentro da fisiologia do esforço.

Palavras-Chave: Proteoma; Eletroforese Bidimensional; Exercício Físico; Ciência do Esporte.

INTRODUÇÃO

A prática regular de atividade física está associada a diversos benefícios para a saúde e prevenção de doenças crônicas degenerativas como doenças cardiovasculares^{1,2}, osteoporose³, diabetes^{4,5}, dislipidemias⁶, obesidade⁷, câncer^{8,9}, hipertensão^{10,11} e depressão¹².

Tais benefícios estão relacionados à capacidade de adaptação das diversas células do nosso organismo em resposta ao estímulo do exercício. A resposta adaptativa está relacionada à ativação da transcrição de genes e posterior síntese protéica, que irão conferir às células características únicas e melhores do que as detectadas anteriormente¹³. O fenótipo adaptativo resultante é determinado pelo tipo, volume, intensidade e freqüência do treinamento aplicado, que ativarão vias de transdução de sinal específicas, gerando características fenotípicas distintas^{14,15,16}.

Hamilton e Booth¹⁷ ao realizarem uma retrospectiva em relação às pesquisas com exercício no último século mostraram que o avanço do conhecimento ao nível molecular das respostas adaptativas ao exercício, se deve à aplicação e melhoria das técnicas de biologia molecular. Já neste século, diversos trabalhos mostraram alterações da expressão de diferentes genes, assim como a ativação de várias vias de transdução de sinal em resposta a diferentes tipos de exercícios^{18,19,20,21,22,23,24,25}.

É inegável que estes estudos contribuem para o aumento do conhecimento na área, mas ainda permanecem grandes lacunas na compreensão dos mecanismos adaptativos como um todo. Ainda não sabemos como as vias de sinalização interagem entre si. Quais os níveis de ativação das enzimas-chave envolvidas na transdução do sinal? Qual o nível de alteração no perfil proteico decorrente da ativação gênica? Qual interação destas proteínas permite que as adaptações geradas consigam prevenir o desenvolvimento de diversas doenças crônico-degenerativas, ou mesmo auxiliar no seu tratamento atenuando os sintomas?

Estas, entre outras questões, exigem uma visão mais ampla do que está ocorrendo dentro das células e que se refletem nos fluidos biológicos. Neste contexto, uma técnica interessante para auxiliar na busca por estas respostas é a proteômica. A análise proteômica permite separar, quantificar e identificar em larga escala o perfil proteico de tecidos e fluidos biológicos, possibilitando uma visão mais global do que está ocorrendo em diferentes situações fisiológicas ou patológicas²⁶.

Através da análise proteômica é possível caracterizar o fluxo de informações desencadeado por proteínas que controlam a transcrição de diversos genes em diferentes processos biológicos. É possível saber também quais as modificações pós-traducionais que ocorrem em tais proteínas^{27,28}.

Apesar de seu grande potencial, a análise proteômica ainda é pouco aplicada na pesquisa com exercício. Até março de 2009 apenas seis trabalhos foram publicados nesta área^{29,30,31,32,33,34}.

A presente revisão apresenta uma compilação dos mecanismos moleculares envolvidos nas vias de sinalização proteica em resposta aos treinamentos de *endurance* e resistido, as principais proteínas constituintes do soro, além dos princípios e técnicas utilizadas na análise proteômica. Apresenta ainda algumas aplicações desta técnica na ciência do esporte.

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA ADAPTATIVA INTRAMUSCULAR AO EXERCÍCIO

O estímulo do exercício físico gera um distúrbio da homeostase celular que ativa proteínas, quinases e fosfatases, envolvidas em vias de sinalização intracelulares. Estas, por sua vez, ativam a transcrição de genes específicos e posterior síntese de proteínas.

O processo adaptativo ao treinamento físico sistematizado é decorrente de um efeito cumulativo da ativação destas vias a cada sessão de treino no decorrer do tempo. Todas as diferentes vias são estimuladas durante o exercício e permanecem ativadas por poucas horas (2-3 horas) após o término da atividade. Já o processo de síntese protéica pode permanecer estimulado por mais de 24 horas, sendo influenciado em grande parte pela disponibilidade de nutrientes^{35,36}. Assim, para que a resposta adaptativa seja positiva é necessário um tempo de recuperação adequado (Figura 1).

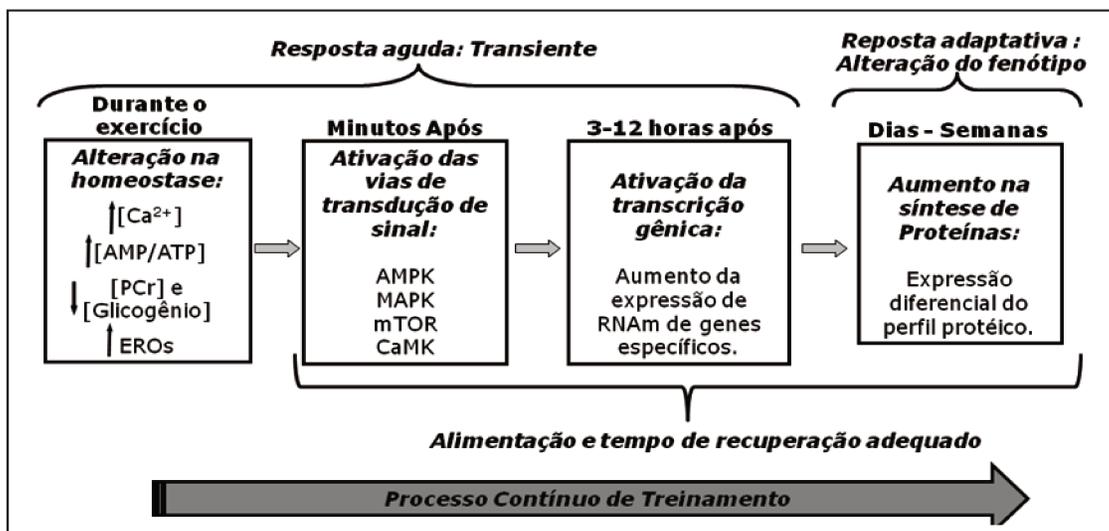


Figura 1: Esquema representativo de uma linha do tempo na qual acontecem as alterações celulares decorrentes do treinamento que levam à uma resposta adaptativa. Adaptado de Hood³⁷. [Ca²⁺] – concentração de cálcio; [AMP/ATP] – razão das concentrações de Adenosina Monofosfato e Adenosina Trifosfato; [PCr] – concentração de Fosfocreatina; EROs – Espécies Reativas de Oxigênio; AMPK – proteína quinase ativada por AMP; MAPK – proteína quinase ativada por mitógenos; mTOR – *mammalian target of rapimycin* ; CaMK – cálcio/calmodulina quinase; RNAm – RNA mensageiro.

O fenótipo adaptativo resultante será determinado pelo tipo, frequência, intensidade e volume de treino aplicado. A manipulação dessas variáveis desencadeará respostas distintas devido ao tipo de fibras recrutadas, magnitude de microtraumas gerados na musculatura, respostas hormonais distintas, magnitude de alterações nas concentrações de metabólitos e o tempo de duração destas alterações.

Dentre os estímulos ativadores das vias de transdução de sinal encontram-se o próprio estresse mecânico (gerador de uma série de microtraumas que instalam uma resposta inflamatória local para o reparo); o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} ; a alteração do estado redox celular (aumento na produção de espécies reativas de oxigênio – EROs); as alterações hormonais; a diminuição da concentração de ATP e os substratos energéticos como glicogênio e fosfocreatina²³.

O mecanismo preciso envolvido em cada via de ativação e suas respectivas sinalizações bem como a interação entre estas vias em resposta ao tipo de exercício ainda não são totalmente compreendidos. Tentaremos abaixo compilar os resultados de diversos estudos relacionados aos possíveis mecanismos moleculares envolvidos na adaptação ao treinamento de *endurance* e ao treinamento resistido.

Treinamento de Endurance

A principal adaptação na musculatura propiciada pelo treinamento de *endurance* (intensidade moderada e longa duração) é a melhora na capacidade oxidativa, decorrente de um aumento no número de mitocôndrias e melhora da utilização de ácidos graxos como substrato energético.

O aumento do número de mitocôndrias, processo conhecido como biogênese mitocondrial, envolve a ativação da transcrição de genes tanto do DNA mitocondrial quanto do DNA nuclear. Os processos de fusão e fissão das mitocôndrias existentes também são de extrema importância tanto para a biogênese mitocondrial como para a manutenção da arquitetura desta organela^{38,39}.

Uma enzima-chave na regulação destes processos é a PGC1 α (*proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α*). Essa enzima parece desempenhar um papel central nos processos adaptativos envolvidos no treinamento de *endurance*. Já foram relatados aumentos tanto do conteúdo de RNAm quanto do conteúdo proteico desta enzima em resposta a este tipo de exercício^{38,40,41}. Os estímulos relacionados à esta ativação incluem aumento nas concentrações de Ca^{2+} intracelular e a ativação das enzimas AMPK e MAPK.

Evidências indicam que a PGC1 α é uma das responsáveis pela regulação de vias que levam à fusão de mitocôndrias, sendo que a ativação das mesmas já foi relatada após um teste de 10 km em bicicleta⁴².

Outro ponto chave regulado pela PGC1 α é a ativação do fator de transcrição NRF 1 e 2 (*nuclear respiratory factor 1 e 2*). Diversos trabalhos mostraram um aumento na expressão de NRF1 e NRF2 em resposta ao exercício de *endurance*^{43,44}. A ativação dos NRFs parece estar relacionada ao aumento da transcrição do fator de transcrição mitocondrial A (*Tfam*), responsável pela ativação da transcrição e replicação do DNA mitocondrial, e diversos fatores que ativam a transcrição de proteínas mitocondriais no DNA nuclear (*NEMPs*), incluindo os fatores de transcrição mitocondrial TFB1M e TFB2M⁴⁴.

A PGC1 α ativa também a PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*), responsável pela regulação da expressão de vários genes relacionados a enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos^{45,46}. Diversos estudos mostraram a ativação desta via em resposta ao exercício de *endurance*. Especula-se também a participação da mesma na conversão de fibras rápidas para fibras lentas^{47,48}.

A enzima AMPK é sensível ao estado energético da célula. Um aumento na razão AMP/ATP leva a uma maior ligação do AMP a esta enzima, tornando-a mais sensível a ação de diversas quinases como cálcio/calmodulina quinase (CaMK), STRAD (*Ste-related adapter protein*), MO25 (*mouse protein 25*) e LBK1, sendo dessa forma ativada. Esta ativação estimula a captação de glicose pelas células, devido à migração dos transportadores de glicose (GLUT4) para a membrana. A AMPK também estimula a oxidação de gordura através da inibição da enzima acetilCoA carboxilase. Esta enzima é responsável pela formação de malonilCoA, um efetor alostérico negativo da enzima carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), envolvida em um dos passos limitantes da degradação de ácidos graxos: seu transporte para dentro da mitocôndria⁴⁹.

A AMPK também está envolvida na ativação da transcrição de genes das enzimas do ciclo de Krebs, proteína desacopladora 3 (UCP3), GLUT4, PGC1 α , hexoquinase e citocromo c^{14,50}.

O aumento do Ca²⁺ intracelular ativa algumas proteínas quinases sensíveis ao cálcio como calcineurina e cálcio/calmodulina (CaMK). A CaMK fosforila diretamente a PGC1 α , e também promove o aumento da sua síntese, inibindo a HADC (*histone deacetylase*). Quando inibida, a HADC permite que o fator de transcrição MEF2 (*myocyte enhancing factor 2*) se ligue a região promotora do gene da PGC1 α , aumentando sua expressão. A CaMK ativa também o fator de transcrição CREB (*cAMP response element binding protein*), envolvido na ativação da transcrição de genes relacionados ao tipo de fibra. A calcineurina, por sua vez, ativa o fator de transcrição

NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), também envolvido na expressão de proteínas contráteis⁵¹.

A MAPK representa uma família de proteínas compostas por quatro proteínas sinalizadoras: ERK1 e ERK 2, MAPKp38 e JNK. Um dos principais estímulos para ativação das MAPKs é o aumento de EROs proporcionado pelo exercício de *endurance*. As proteínas ERK 1 e 2 estão envolvidas no aumento da oxidação de gorduras, inibindo a enzima acetilCoA carboxilase e ativando a enzima lipase hormônio sensível. Além disto, aumentam a captação de ácidos graxos pela célula, recrutando mais proteínas transportadoras (CD36) para a membrana. A MAPKp38 também é ativada pela CaMK, e ativa diretamente a PGC1 α e o fator de transcrição MEF2. A JNK ativa genes relacionados a *c-jun* e *c-fos* envolvidos nos mecanismos de apoptose, proliferação celular, inflamação. Por estas funções especula-se sobre sua participação no reparo da célula muscular⁵².

Devido ao processo de biogênese mitocondrial envolver tanto a ativação da transcrição do DNA nuclear quanto mitocondrial, um importante passo deste processo é o transporte das proteínas do citosol para a matriz mitocondrial. Este passo envolve o funcionamento das translocases presentes na membrana externa (TOM) e membrana interna (TIM) mitocondrial, além da HSP70. Um prejuízo neste mecanismo, como observado em algumas patologias, parece relacionado a um funcionamento inadequado das mitocôndrias, levando a uma ineficiência na produção de energia^{53,54}. Embora em pequena quantidade, alguns trabalhos apresentaram evidências de que o exercício melhora a maquinaria de transporte presente na membrana mitocondrial, favorecendo o processo de biogênese mitocondrial^{38,55}.

A Figura 2 esquematiza as principais vias envolvidas na resposta adaptativa ao treino de *endurance* conhecidas até o momento e suas possíveis interações.

Treinamento Resistido

A principal adaptação decorrente do treinamento resistido é o aumento da massa muscular e melhoria no recrutamento neural, que levam a um aumento na produção de força muscular.

O aumento da massa muscular é decorrente de dois mecanismos: hipertrofia das células existentes (aumento da secção transversa da fibra muscular) e hiperplasia (aumento do número de fibras musculares)⁵⁶.

Para a reorganização da célula muscular é necessário que a taxa de síntese protéica supere a taxa de degradação⁵⁷. Assim, seria esperado que o exercício ativasse as vias de transdução de sinais para gerar um aumento na síntese de proteínas contráteis, e ao mesmo tempo inibisse as vias intracelulares que sinalizam atrofia. A ativação e a inibição destas vias, aliadas a alimentação adequada, produzem um balanço nitrogenado positivo, necessário para que ocorra o anabolismo⁵⁸.

As principais vias envolvidas nestes processos são as cascatas desencadeadas pela insulina e fatores de crescimento como IGF1. Diversos estudos já mostraram que a atividade contrátil leva a um aumento na quantidade de receptor para IGF1 e também uma maior liberação deste hormônio pela musculatura, que atua de forma parácrina e autócrina^{59,60}.

O IGF1 ativa a proteína PI3K (*fosfoinositol 3 kinase*), que leva à ativação da proteína quinase B (PKB) ou AKT. Uma vez ativa, a PKB é capaz de fosforilar as enzimas GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*), FOXO (*forkhead transcription factor*) e TSC2 (*tuberin*), inativando-as⁶¹.

A inativação da GSK3 β proporciona um aumento no processo de tradução de diversas proteínas, devido ao aumento na atividade do fator de iniciação eIF2 (*eucaryotic initiation factor 2*), envolvido na ligação do RNA transportador (RNAt) à subunidade 40S do ribossomo⁶².

A fosforilação da proteína FOXO promove sua saída do núcleo da célula, impedindo a ativação de fatores de transcrição que sinalizam a síntese de proteínas envolvidas na atrofia muscular⁶³. A atrofia está relacionada a uma alta taxa de degradação das proteínas contráteis da célula muscular.

Os proteassomos são macromoléculas envolvidas na degradação de proteínas. Nos eucariotos representam o principal mecanismo de degradação protéica, incluindo as proteínas contráteis actina e miosina. Para serem degradadas via proteassomos, as proteínas sofrem ubiquitinação, reação catalisada por uma família de enzimas chamadas ubiquitina ligases. No caso da musculatura, as enzimas MAFBx e MuRF já foram identificadas como as principais sinalizadoras da degradação das proteínas contráteis⁶⁴.

A fosforilação da TSC2 impede que ela iniba a mTOR (*mammalian target of rapamycin*). A mTOR está envolvida na fosforilação de duas proteínas chaves no controle da síntese proteica: 4E-BP (*4E binding protein*) e S6K1 (*70KDa S6 protein kinase*).

A fosforilação da S6K1 e sua consequente ativação leva à hiperfosforilação da proteína ribossomal S6, que está associada ao aumento da tradução de RNA mensageiros de proteínas ribossomais e fatores de alongamento, favorecendo o processo de síntese proteica. A fosforilação da 4E-BP faz com que esta proteína se desligue do fator de iniciação eIF4B, permitindo o início da tradução¹⁵.

Outro processo importante para o aumento da massa muscular é a ativação de células satélites. Estas células são, na verdade, mionúcleos que estão localizadas na lamina basal da célula muscular em estado quiescente. Quando ativadas, as células satélites podem inserir mais núcleos na fibra muscular existente, podem se agrupar e dar origem a uma nova fibra muscular assim como voltar a ficar quiescentes⁶⁵.

Os estímulos associados à ativação das células satélites incluem a própria ruptura do sarcolema devido ao estresse mecânico gerado pelo exercício, rápida elevação de Ca^{2+} , ativando a calcineurina⁵¹, sinalização via citocinas (IL6), devido à instalação de um processo inflamatório⁶⁶ e diminuição na concentração de miostatina⁶⁷.

A Figura 3 esquematiza as vias envolvidas na resposta adaptativa ao treino resistido e suas possíveis interações.

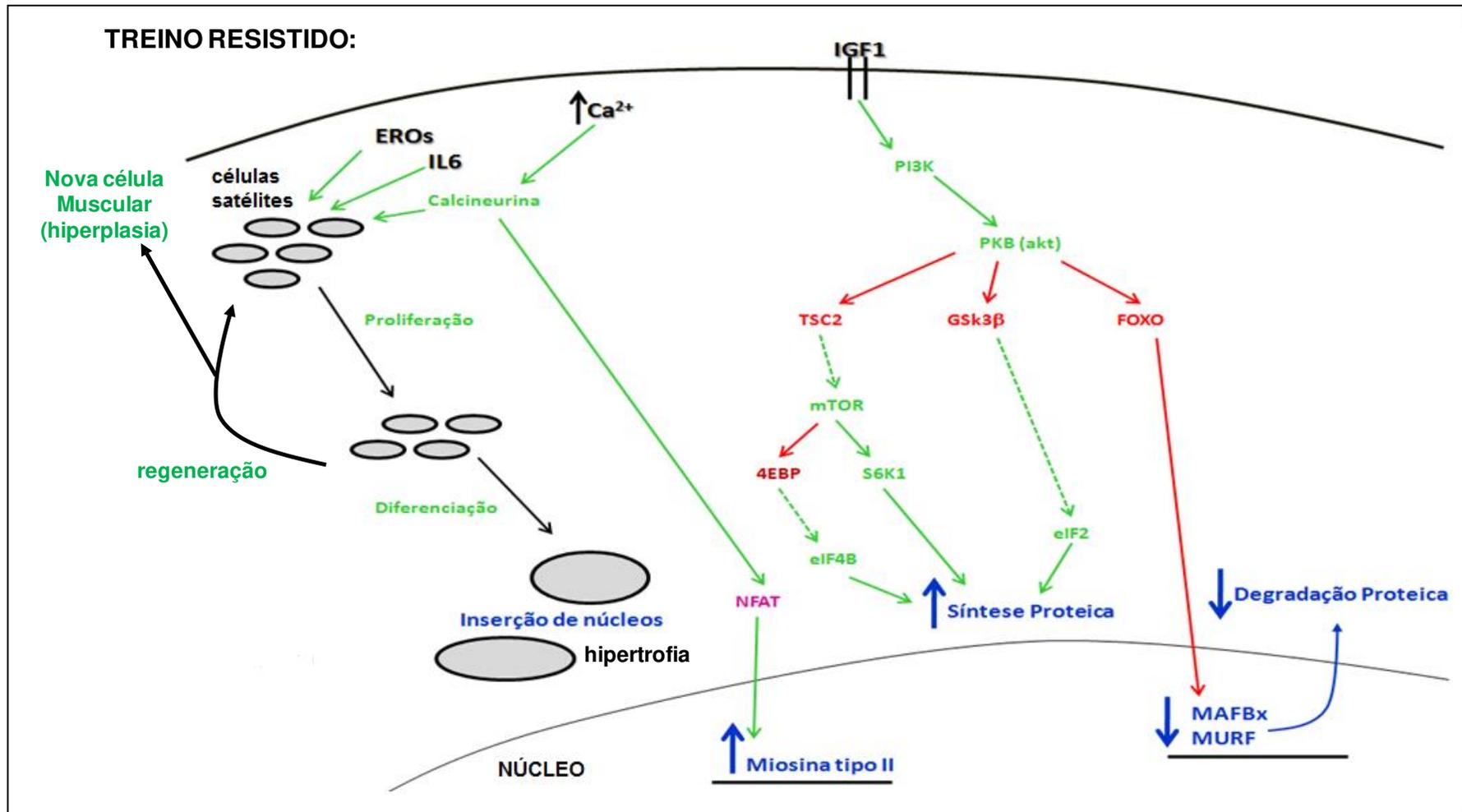


Figura 3: Esquema representativo das vias adaptativas em resposta ao treinamento resistido. Preto: estímulo do exercício; verde vias ativadas; vermelho vias inibidas; azul resposta adaptativa. Aumento de cálcio ativa a calcineurina que sinaliza a síntese de miosina do tipo II. A calcineurina, o aumento de EROs e IL6 ativam a proliferação de células satélites que podem se diferenciar e inserir novos núcleos à fibra muscular (hipertrofia) ou se regenerar voltando a compor o pool de células satélites daquela fibra ou se agrupar e dar origem a uma nova fibra muscular (hiperplasia). IGF1 (fator de crescimento semelhante a insulina) produzido pela própria musculatura ao se ligar a seu receptor ativa a proteína quinase B (PKB ou akt) que inibe a TSC2, GSK3β e FOXO. A inibição da TSC2 ativa a mTOR que favorece o processo de tradução estimulando a síntese proteica. A inibição da GSK3β ativa o fator de iniciação (eIF2) favorecendo o processo de tradução e conseqüentemente a síntese proteica. A inibição da FOXO inibi a transcrição de genes relacionados à atrofia (MAFBx e MURF) diminuindo o processo de degradação proteica.

PROTEÍNAS DO SORO SANGUÍNEO

O sangue reflete o estado fisiológico de todos os tecidos. Ou seja, contém proteínas ou fragmentos de proteínas com funções distintas, cujas concentrações são alteradas em situações diversas como doenças, desnutrição, gravidez, traumas, infecções^{68,69}. O acesso e visualização dessas proteínas no soro e sua correlação com o que está ocorrendo nos tecidos em diversas situações poderiam indicar alvos proteicos úteis para serem utilizados no diagnóstico de doenças, assim como no monitoramento de seu tratamento⁷⁰.

No caso do exercício físico, a correlação das proteínas séricas com as alterações proteicas que ocorrem na musculatura também poderia ser uma ferramenta útil para o acompanhamento dos efeitos do treinamento.

As concentrações das diversas proteínas no soro variam desde milimolar, para proteínas abundantes como a albumina e imunoglobulinas até femtomolar, para as menos abundantes, que também representam fragmentos de proteínas dos diversos tecidos⁷¹.

Dentre as proteínas abundantes encontram-se também as chamadas proteínas de fase aguda, que são sintetizadas pelo fígado em resposta à inflamação. As proteínas de fase aguda são classificadas como positivas e negativas, de acordo com a alteração de sua concentração: aumento e diminuição, respectivamente. Dentre as proteínas de fase aguda positivas encontram-se: α 1-antitripsina, α 1-glicoproteína ácida, haptoglobina, ceruloplasmina, fator de complemento 4(C4), fator de complemento 3 (C3), α 2-macroglobulina e proteína C reativa (PCR). Dentre as proteínas de fase aguda negativas encontram-se a albumina, pré-albumina (ou transtirretina), proteína ligadora de retinol (PLR) e transferrina⁷².

A Tabela 1 apresenta estas proteínas e suas principais funções.

Tabela1: Proteínas de Fase Aguda Positivas e Negativas (adaptado de Tietz⁶⁸).

PROTEÍNA	MEIA-VIDA	FUNÇÃO	COMENTÁRIOS
Proteína Ligadora de Retinol (PLR)	12 horas	Transporte de vitamina A	Reduzida após disfunção hepatocelular; reduzida com dano tecidual extenso.
Pré-Albumina	48 horas	Transporte de hormônios da tireóide e vitamina A (complexada com a PLR)	Reduzida após disfunção hepatocelular; reduzida com dano tecidual extenso.
Albumina	15-19 dias	Manutenção da pressão osmótica; transporte de hormônios, ácidos graxos, drogas, bilirrubina, íons metálicos, fosfolipídios	Aumenta na desidratação. Diminui na inflamação, doenças renais, hepáticas, má nutrição e edemas.
α 1-Antitripsina	4 dias	Inibidor de protease (especialmente elastase)	Aumenta em casos de inflamação aguda

α 1-Glicoproteína Ácida	5 dias	Função obscura; liga-se a drogas e hormônios	Aumenta principalmente na inflamação gastrointestinal.
Haptoglobina	2 dias	Liga-se à hemoglobina para preservação de ferro	Diminui em caso de hemólise. Aumenta com infecções, queimaduras.
α 2-Macroglobulina	5 dias	Inibidor de enzimas proteolíticas em geral	Responde lentamente a inflamação
Ceruloplasmina	4-5 dias	Oxidante-Antioxidante, transporte de cobre	Aumenta na inflamação e necrose tecidual.
Transferrina	7 dias	Transporte de ferro	Aumenta quando as reservas de ferro estão reduzidas. Reduzidas em condições de perda protéica e inflamação.
Fator de Complemento 3 (C3)	2 dias	Fator do sistema de complemento (ação inflamatória, eliminação de antígenos)	Respondem tardiamente a inflamação
Fator de Complemento 4 (C4)	2 dias	Fator do sistema de complemento (ação inflamatória, eliminação de antígenos)	Respondem tardiamente a inflamação
Proteína C reativa (PCR)	13-16 horas	Defesa não -específica de agentes infecciosos; remoção de restos celulares	Responde rapidamente a inflamação

Outra classe de proteínas abundantes no soro é a das imunoglobulinas. As imunoglobulinas reconhecem antígenos, e iniciam os mecanismos que os destroem e removem do organismo. Existem 5 isoformas de imunoglobulinas denominadas A, D, E, G e M com função e concentrações distintas, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Descrição das isoformas de imunoglobulina (adaptado de Tietz⁶⁸).

Imunoglobulina	Função	Concentração(em relação ao total de imunoglobulinas)	Meia - Vida
A	Neutraliza vírus, enzimas e toxinas. Ativa sistema de complemento.	10 - 15%	4-6 dias
D	Receptor de superfície para o antígeno	1%	3 dias
E	Ativa reação alérgica	traços	2 dias
G	Principal anticorpo. Neutraliza vírus, bactérias e fungos.	70 - 75%	21 dias
M	Ativa o sistema de complemento e macrófagos	5 - 10%	5 dias

Rotineiramente a separação das proteínas descritas acima é feita em gel de agarose, sendo utilizada para o diagnóstico de diversas condições como inflamações crônicas, hepatopatia crônica, síndrome nefrótica, enteropatia com perda protéica, disproteinemias dentre diversas outras patologias⁷³. O padrão de eletroforese destas proteínas apresenta seis regiões distintas.

Embora possam ser detectadas alterações drásticas por este método, as modificações de cada proteína podem ser mascaradas, visto que em uma região há a presença de mais de uma proteína. Além disto, muitas destas proteínas possuem variantes genéticas com massas moleculares próximas, mas afinidade por seu ligante distinta, gerando respostas fisiológicas diferentes. Isto resulta em alterações sutis e, portanto não detectáveis por este método⁷⁴. Assim, para a identificação deste tipo de alterações os métodos de separação mais sensíveis como eletroforese capilar ou eletroforese bidimensional apresentam um grande potencial.

ANÁLISE PROTEÔMICA

Um dos objetivos mais ambiciosos da ciência foi atingido recentemente com o seqüenciamento de diversos genomas, incluindo o genoma humano⁷⁵. No entanto, embora hoje sejamos capazes de ler a seqüência genética humana, ainda não conseguimos estabelecer todas as correlações entre essa informação e os diversos mecanismos fisiológicos ou patológicos que ocorrem no nosso organismo. Isto se deve ao fato da informação na seqüência gênica indicar apenas um estado estático das células enquanto que a resposta celular às mais diversas situações representa um estado dinâmico.

A análise dos níveis de RNAm (transcriptoma) representa uma parte importante da compreensão da tradução da informação genética em proteínas funcionais no nosso organismo. Indica quais genes estão ativos ou inibidos em determinada situação. Contudo, é difícil traçar uma correlação entre níveis elevados de RNAm e síntese de determinadas proteínas devido à meia vida do RNAm (que pode durar de poucos minutos até algumas horas); aos *splicings* que ocorrem no transcrito primário após a transcrição; a ativação ou não da tradução do RNAm para a síntese protéica e a ocorrência de modificações pós-traducionais¹³. Devido a estes fatores, a integração entre aumento da transcrição (síntese de RNAm) e tradução (estabilidade e eficiência na síntese protéica), assim como as mudanças pós-traducionais ainda são pouco compreendidos.

A análise proteômica surge neste contexto como o elo entre a informação genética e seu produto - as proteínas. Ou seja, o proteoma fornece o "cenário" dos mecanismos moleculares envolvidos em processos fisiológicos e patológicos⁷⁶.

O termo proteômica foi introduzido inicialmente em 1994, sendo inicialmente definido como o complemento proteico do genoma⁷⁷. Posteriormente, chegou-se à definição mais ampla de que trata da caracterização em larga escala do conjunto de proteínas expresso numa célula ou tecido em um determinado momento e sob determinada condição^{78,79}. A análise proteômica permite a separação, quantificação e identificação das proteínas expressas por uma célula, assim

como a detecção de modificações pós-traducionais sofridas por cada proteína e possíveis interações proteína-proteína.

A função das mais diversas proteínas está estreitamente ligada a sua localização celular e ao contexto fisiológico em que é expressa. As interações entre as proteínas em uma célula e entre células e fluidos (como o sangue, por exemplo) podem caracterizar o fluxo de informações de uma via de sinalização envolvida nos diversos mecanismos biológicos^{80,81}. Assim, a possibilidade gerada pela análise proteômica, de acesso e visualização do "circuito" proteico presente tanto em células e tecidos como em fluidos biológicos (que conectam o meio intra e extracelular) permite a compreensão e comparação dos mecanismos moleculares envolvidos em diferentes condições: sadio, doenças e/ou exercício físico^{82,83}.

A análise do nível de expressão protéica e a busca por biomarcadores (*protein expression proteomics*) em diferentes situações fisiológicas são os objetivos mais comuns das pesquisas nas mais diversas áreas.

Para atender a esses objetivos, a caracterização de determinado proteoma requer métodos analíticos sensíveis para separar, detectar, quantificar e identificar as proteínas e as possíveis modificações pós-traducionais. Uma abordagem amplamente utilizada é a eletroforese bidimensional aliada à espectrometria de massas.

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2DE)

Apesar de ser uma técnica antiga, introduzida por Klose e O'Farrel na década de 70^{84,85}, a 2DE sofreu diversos avanços^{83,86} que possibilitaram uma melhor resolução e reprodutibilidade dos géis. Por permitir a separação e visualização de diversas proteínas ao mesmo tempo, a 2DE é a técnica mais utilizada para separação das proteínas na análise proteômica.

Preparação da Amostra de Soro para 2DE

A preparação da amostra é um passo crucial para a obtenção de um bom gel bidimensional e a subsequente análise das proteínas. Tanto a quantidade de proteínas presente na amostra quanto a qualidade de amostra são fatores determinantes na reprodutibilidade dos géis e na fidedignidade dos *spots* observados. Por isto, a preparação da amostra deve ser a mais simples e rápida possível para evitar a deterioração das proteínas presentes.

Embora seja uma amostra rica e de fácil acesso, a análise proteômica de soro ou plasma é considerada uma das mais difíceis devido aos desafios únicos que apresenta⁸⁷. A principal dificuldade encontrada é a existência de proteínas extremamente abundantes tais como albumina,

fibrinogênio, imunoglobulinas etc. Devido ao tamanho dos spots que geram, elas representam um problema, uma vez que dificultam o aparecimento de proteínas menos abundantes no gel⁸⁸. Como o potencial desta amostra para o diagnóstico de diversas doenças é grande, diferentes técnicas têm sido utilizadas para fracionar, previamente à eletroforese bidimensional, a amostra de soro e ter acesso às proteínas menos abundantes.

Muitos trabalhos utilizam métodos como precipitação, centrifugação, cromatografia por afinidade e kits comerciais para remoção tanto de albumina como imunoglobulinas^{89,90,91,92,93}. Embora de baixo custo, fácil manuseio e eficiente na remoção de albumina, alguns destes estudos têm mostrado que a falta de especificidade destes kits levam a remoção de outras proteínas além da albumina e imunoglobulinas, além da depleção não ser completa. É importante ressaltar ainda que devido a sua função fisiológica como carreadora, a remoção da albumina implica na remoção de moléculas a elas ligadas como citocinas e hormônios⁹⁴.

O uso de colunas de imuno-afinidade como MARS e MIXED 12 estão cada vez mais acessíveis. São colunas de HPLC com anticorpos policlonais para as 6-12 proteínas mais abundantes do plasma capazes de remover cerca de 85-95% das mesmas, respectivamente. Embora o aumento no número de proteínas visualizadas não seja significativo, este método minimiza a separação inespecífica das demais proteínas, e tem mostrado boa reprodutibilidade^{95,96,97,98}.

Técnicas mais sofisticadas, porém menos acessíveis, como *Higher Dimensional Separation* (Hi-D) também têm apresentado resultados interessantes quanto ao número de proteínas identificadas e o acesso a proteínas de baixo peso molecular e proteínas menos expressas⁹⁹.

Separação das proteínas

A 2DE baseia-se na combinação de duas técnicas de separação em gel de poliacrilamida: focalização isoelétrica (Primeira Dimensão - 1D) e SDS PAGE (Segunda Dimensão - 2D), conforme ilustra a Figura 4.

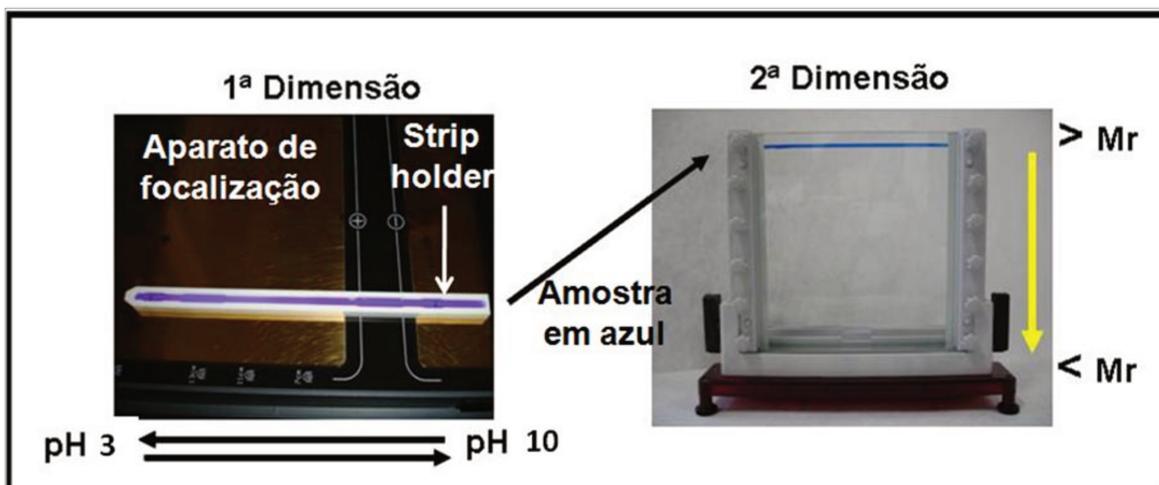


Figura 4: Esquema da 2DE. **1ª Dimensão:** *strip holder* no aparelho de focalização isoelétrica que separa as proteínas pelo seu ponto isoelétrico. **2ª Dimensão:** o gel da primeira dimensão é acoplado ao gel da segunda dimensão (SDS PAGE) e as proteínas são separadas por massa molecular (M_r).

A primeira dimensão ou focalização isoelétrica (IEF) separa as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI). Para isto, a amostra é adicionada a um gel de poliacrilamida contendo um gradiente de pH. Quando a corrente elétrica é aplicada as proteínas tendem a migrar até o seu ponto isoelétrico, no qual sua carga líquida é zero.

O desenvolvimento de géis (*strips*) com gradiente de pH imobilizado (*Immobilized pH gradient - IPG*) permitiu uma maior reprodutibilidade dos géis, uma vez que o estabelecimento do gradiente de pH não é uma tarefa laboratorial trivial. Além disto, a disponibilidade de *strips* com diferentes intervalos de pH, varrendo a faixa de 2,5 até 12, e diferentes tamanhos (7 – 24 cm) vêm possibilitando uma melhora na resolução dos géis. Faixas mais amplas (3-10) permitem a visualização de cerca de 1000 – 3000 *spots* por gel¹⁰⁰. *Strips* com faixas mais estreitas permitem a visualização de proteínas menos abundantes, melhora a resolução de isoformas e permite trabalhar especificamente com faixas ácidas ou básicas^{100,101}.

Após a focalização, o segundo passo é a solubilização das proteínas contidas no gel da primeira dimensão em tampão com SDS e a sua separação através da técnica de SDS PAGE, que separa as proteínas de acordo com sua massa molecular. Com isso, é possível separar proteínas de massa molecular idêntica que diferem no valor de seus pIs, ou proteínas com valores de pI semelhantes mas que apresentam massas moleculares distintas.

A segunda dimensão pode ser feita na horizontal ou na vertical, de acordo com a proposta de Laemmli¹⁰². Com os aparelhos de hoje, a corrida vertical permite a realização de vários géis ao mesmo tempo, aumentando a reprodutibilidade dos experimentos¹⁰³.

O uso de gel de concentração de acrilamida em gradiente na 2DE também possibilitou melhora na resolução em uma determinada faixa de massa molecular, favorecendo a visualização de regiões específicas do gel, principalmente das proteínas de baixa massa molecular¹⁰⁰.

O uso de diferentes tampões de corrida também propiciou melhora da separação de determinadas regiões do gel¹⁰⁴.

Visualização do Mapa Bidimensional – Métodos de Coloração

Após a separação pela 2DE, as proteínas são visualizadas no gel através de diversos métodos de coloração disponíveis, como mostrado na Figura 5.

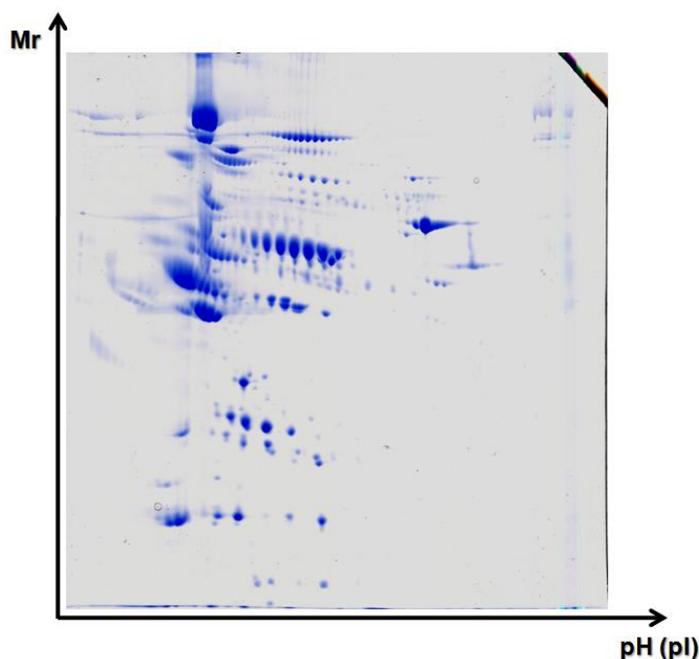


Figura 5: Visualização de um gel bidimensional de soro corado com *Coomassie Blue*.

O método mais comum é a coloração com *Coomassie Brilliant Blue*. Os métodos que utilizam este corante são fáceis, de baixo custo e ao mesmo tempo apresentam uma boa linearidade e são compatíveis com a espectrometria de massas¹⁰⁵. O maior problema desta coloração é a sua baixa sensibilidade. Adaptações do protocolo original, com a utilização de *Coomassie* em dispersões coloidais têm apresentado uma sensibilidade maior que o método tradicional¹⁰⁶.

Embora um pouco mais complexos, os métodos de coloração com prata são bastante utilizados devido à sua alta sensibilidade. Quantidades inferiores a 1ng de proteína podem ser

detectadas no gel. Um dos grandes problemas desta coloração é a sua inespecificidade e difícil reprodutibilidade¹⁰⁷.

Os métodos de coloração por fluorescência são os mais sensíveis, apresentam boa reprodutibilidade, são mais específicos e compatíveis com a espectrometria de massas. Contudo, estes métodos possuem um custo elevado devido ao valor dos fluoróforos e à necessidade de aparelhos específicos para aquisição da imagem¹⁰⁷.

Embora o custo seja elevado, a utilização da fluorescência vem crescendo, principalmente devido ao desenvolvimento da técnica 2D DIGE (*Two-dimensional differential gel electrophoresis*), que permite o processamento e comparação de três amostras em um único gel através de 3 fluoróforos distintos (Cy2, Cy3 e Cy5), aumentando a reprodutibilidade dos experimentos¹⁰⁸.

Análise da Imagem

Uma vez obtidos os géis é possível, através da análise da imagem, detectar proteínas diferencialmente expressas entre grupos. Para isto, diversos programas de computador especializados neste tipo de análise estão disponíveis no mercado. Tais programas permitem a detecção dos *spots* e sua quantificação (mensurações de volume, área, intensidade etc.), estimativas sobre pI e massa molecular, além de oferecer testes estatísticos para a análise dos resultados¹⁰⁹.

Embora os programas de análise de imagem estejam melhorando continuamente, esta ainda não é uma tarefa trivial. Devido a variações experimentais, a completa automação do processo ainda não é possível¹¹⁰.

Outro grande desafio para esta área é a análise estatística dos resultados obtidos. Os programas apresentam poucas opções de testes, sendo o mais comum o teste *t* que, na maioria das vezes não se aplica ao conjunto de dados, seja devido ao fato do desenho experimental apresentar poucas amostras e/ou replicatas ou porque os valores não apresentam uma distribuição paramétrica. Assim, a ocorrência de resultados falsos positivos é grande^{111,112}.

Uma vez detectados os *spots* diferencialmente expressos, o próximo passo é identificar a proteína através da espectrometria de massas.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A maioria dos métodos que possibilitaram a identificação de proteínas separadas em 2DE de forma rápida, conclusiva e com sensibilidade foram desenvolvidos apenas na década de 90¹¹³. Os principais fatores que possibilitaram o surgimento destes métodos foram avanços na técnica de espectrometria de massas, disponibilidade de seqüências genômicas completas e desenvolvimento

de programas computacionais para correlação dos dados obtidos por espectrometria de massas com os bancos de dados de seqüências genômicas completas e banco de proteínas.

A utilização em larga escala da espectrometria de massas nos estudos proteômicos só foi possível devido ao desenvolvimento de técnicas brandas de ionização, tais como ESI (*Electrospray Ionization*) e MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*). Essas duas técnicas permitiram a ionização de moléculas relativamente grandes ou que não resistiam ao calor (como proteínas e peptídeos) e que, por isso, quando submetidas a outros processos de ionização não permaneciam intactas²⁸.

Para serem analisados pela espectrometria de massas os *spots* de interesse são recortados manualmente ou automaticamente (*spot picker*) dos géis. Em seguida, são descorados, lavados e incubados com tripsina (geralmente), obtendo-se um *pool* de peptídeos daquela proteína.

No método MALDI o *pool* de peptídeos é cristalizado junto a uma matriz orgânica ácida, a qual é capaz de absorver a maior parte da energia do laser e transferir apenas parte para a amostra gerando a ionização e dessorção desta última. Matriz e peptídeos ionizados são simultaneamente lançados para dentro do analisador movendo-se de acordo com sua relação entre massa e carga (m/z). O tempo de vôo (TOF) destes peptídeos até alcançarem o detector é mensurado. O resultado é um *spectro* massa/carga (m/z) dos diversos peptídeos constituintes da proteína¹¹⁴.

A Figura 6 mostra um esquema representativo na análise massa e um espectro m/z obtido na análise.

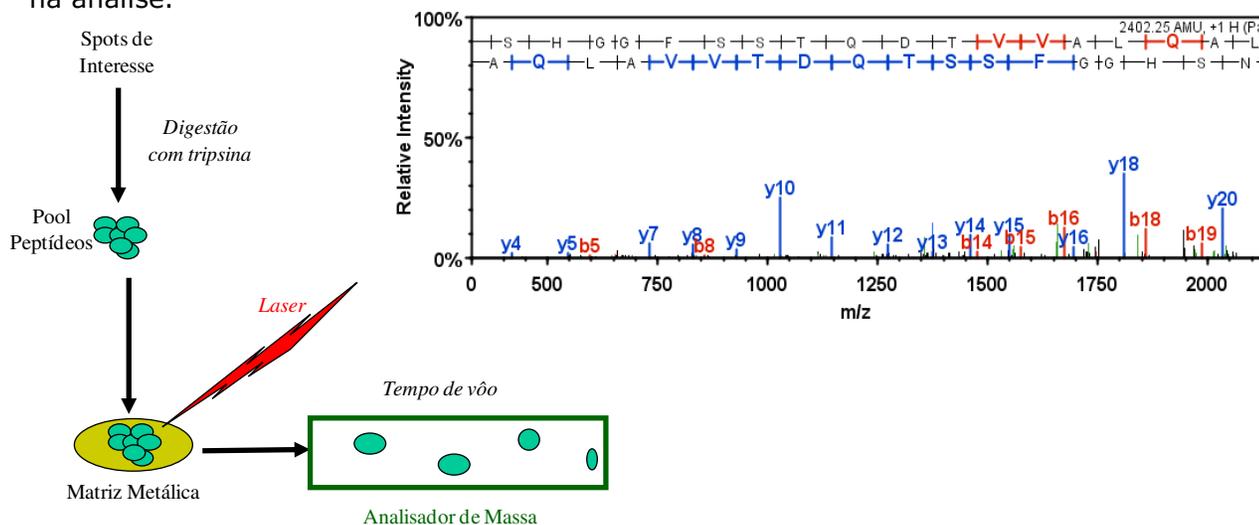


Figura 6: Esquema representativo da análise por espectrometria de massas e do espectro gerado.

A disponibilidade de seqüências genômicas completas possibilitou o desenvolvimento de novas técnicas de identificação de proteínas, como a técnica "*Peptide Mass Fingerprinting*" (PMF). Nesta técnica, a massa dos peptídeos obtida pela espectrometria de massas representa uma "impressão digital" da proteína. Desta forma, os dados obtidos experimentalmente podem ser comparados com massas teóricas obtidas através de uma clivagem *in silico* utilizando-se os bancos de dados genômicos¹¹⁵.

Embora de fácil e rápida aplicação a técnica de PMF apresenta algumas desvantagens. Primeiro pelo fato de diversos genomas ainda não estarem completamente seqüenciados, dificultando a comparação com o banco de dados para a identificação da proteína. Segundo, o fato das modificações pós-traducionais na maioria das vezes alterarem a massa de um peptídeo, podendo assim o peptídeo não corresponder a ele mesmo sem a modificação no banco de dados. Terceiro ainda há a possibilidade de um único *spot* não representar uma única proteína.

Neste contexto, uma nova fragmentação dos peptídeos mais abundantes, chamada MS/MS, permite o sequenciamento parcial do mesmo, permitindo a combinação das massas dos novos fragmentos com a massa do peptídeo intacto para identificação das proteínas. A possibilidade de acesso à estrutura primária da proteína torna esta técnica muito mais fidedigna na sua identificação. Para aplicação do MS/MS é necessária a utilização de aparelhos mais sofisticados como MALDI TOF-TOF, ESI MS-MS e Q-TOF⁸⁶.

Devido aos crescentes avanços na técnica de espectrometria de massas e à alta resolução e sensibilidade dos aparelhos disponíveis já é possível, atualmente, além de identificar os peptídeos, caracterizar as principais mudanças pós-traducionais como fosforilação e glicosilação de proteínas⁸³.

APLICAÇÃO DA ANÁLISE PROTEÔMICA NA PESQUISA COM EXERCÍCIO

Estudos recentes já investigaram o proteoma de músculo esquelético^{116,117,118,119}, assim como alterações no perfil proteico da musculatura em resposta ao crescimento¹²⁰, hipertrofia¹²¹, idade^{122,123}, estimulação elétrica^{124,125} e atrofia¹²⁶.

Embora estes trabalhos tragam informações úteis para a pesquisa com exercício, a aplicação da análise proteômica com o objetivo de investigar as alterações agudas e crônicas no perfil proteico em resposta a atividade física ainda está no seu início. Apenas 6 trabalhos foram encontrados na literatura até março de 2009, sendo dois deles com exercício voluntário (não planejado), um com exercício agudo e três com treinamento sistematizado.

Ding e colaboradores²⁹ investigaram as alterações no padrão de expressão proteica do hipocampo de camundongos que realizaram atividade física voluntária. Os autores encontraram

um aumento na expressão de proteínas envolvidas no metabolismo energético e proteínas relacionadas à plasticidade sináptica do neurônio no grupo exercitado. Dentre as proteínas envolvidas no metabolismo energético encontram-se enzimas da via glicolítica (aldolase C, fosfoglicerato quinase, lactato desidrogenase B), enzimas envolvidas na síntese de ATP (creatina quinase mitocondrial, cadeia beta da ATP sintase) e enzima envolvida no *turnover* de glutamato (glutamato desidrogenase). Já as proteínas relacionadas à plasticidade sináptica encontram-se proteínas do citoesqueleto: α internexina, beta tubulina e as chaperonas: TCP-1, proteína neuronal 22, HSP60, HSP8. Os autores concluíram que um dos possíveis mecanismos pelo qual o exercício físico auxilia na promoção da saúde do cérebro (principalmente nos processos de aprendizagem e memória) seria através da disponibilização de mais energia para o sistema nervoso central e pelo aumento da plasticidade sináptica dos neurônios.

Yuan e colaboradores³⁰ analisaram o soro de ratos normais e mutantes para o gene $CPE^{fat/fat}$, envolvido no desenvolvimento da obesidade, que realizaram exercício físico voluntário em comparação com ratos sedentários. Vinte proteínas apresentaram-se elevadas no grupo mutante quando comparado ao grupo normal nos animais sedentários. Seis delas diminuíram significativamente em decorrência do exercício nos animais mutantes, dentre elas a haptoglobina e a apolipoproteína-A IV. Os autores sugeriram que níveis diminuídos de haptoglobina poderiam estar relacionados com uma diminuição da gordura corporal e controle do peso nos ratos mutantes exercitados, uma vez que níveis aumentados dessa proteína estão associados a grande quantidade de tecido adiposo e futuro ganho de peso. Já a apolipoproteína-A IV estaria envolvida na regulação da ingestão de comida. Outras 14 proteínas estavam mais expressas nos ratos normais exercitados, sendo que as proteínas tipo calicreína (*kallikrein like proteins*) foram as mais expressas. Baseado também em outros estudos, os autores sugeriram que essas proteínas poderiam estar envolvidas no efeito crônico do treinamento, que leva a uma diminuição da pressão arterial no repouso.

Guelfi e colaboradores³¹ analisaram o efeito agudo de uma sessão de exercício de natação de 3 min no músculo gastrocnêmico de ratos imediatamente após e 30 minutos após a realização da atividade. Os autores encontraram alteração na expressão de 4 proteínas dos 61 spots encontrados nos géis. A enzima creatina quinase apresentou-se diminuída imediatamente após a atividade e seus valores retornaram ao normal após 30 minutos de recuperação. As proteínas HSP20, troponina T e adenilato quinase apresentaram-se diminuídas imediatamente após a sessão de exercício mas após 30 minutos de recuperação sua expressão aumentou. Contudo, os autores não discutiram os resultados encontrados, concluindo que o significado fisiológico destas alterações ainda precisa ser investigado.

Boluyt e colaboradores³² verificaram as mudanças no proteoma cardíaco, através da análise da parede do ventrículo esquerdo de ratos submetidos a seis semanas de treinamento intervalado em esteira, comparados com ratos em repouso. Na análise comparativa dos géis, 26 *spots* apresentaram-se diferencialmente expressos, sendo 12 spots detectados exclusivamente nas amostras dos ratos treinados. Dentre as proteínas que estavam mais expressas nos animais treinados foram encontradas enzimas metabólicas envolvidas na via glicolítica, ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons. Dentre as proteínas exclusivamente expressas pelo grupo treinado foi identificada a HSP20. Apoiados em resultados de outros estudos, os autores sugeriram que a HSP20 poderia estar envolvida em um dos mecanismos pelos quais o exercício produz efeitos benéficos, uma vez que ela parece estar relacionada à regulação do mecanismo de contração do músculo cardíaco, promovendo proteção das células cardíacas contra apoptose.

Burniston³³ estudou a alteração no perfil proteico do músculo plantar de ratos submetidos a um treinamento de *endurance* a 70-75% VO_{2max} com duração de 30 minutos e quatro sessões de treino por semana por um período de 5 semanas. Foram encontrados 187 spots nos géis dos grupos controle e treinado e identificadas 80 proteínas correspondentes aos produtos da ativação de 40 genes diferentes. Quinze proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas entre os grupos. As enzimas da via glicolítica lactato desidrogenase A, fosfoglicomutase e β -enolase tiveram sua expressão diminuída enquanto a enzima triose fosfato isomerase teve sua expressão aumentada. Outras proteínas com expressão aumentada foram as enzimas mitocondriais succinato desidrogenase e aconitase; proteínas com função de transporte como transferrina, albumina e mioglobina, além das proteínas estruturais β *crystalinn* e cadeia leve de miosina tipo I. Os autores justificaram a melhora do VO_{2max} dos ratos através de uma melhora na produção de energia pelo metabolismo oxidativo, pelo aumento das proteínas mitocondriais e de transporte, além das alterações estruturais do tipo de miosina. Além disto, os autores encontram 5 *spots* correspondentes à enzima aconitase, mas com pIs diferentes, que tiveram o padrão de expressão diferenciados: aconitase com pI 7,6 e 7,7 diminuíram enquanto que a aconitase com pI 8,0 aumentou sua expressão.

Em outro estudo, este mesmo autor³⁴ analisou o proteoma cardíaco de ratos submetidos a um treinamento de *endurance* a 70-75% VO_{2max} com duração de 30 minutos e quatro sessões de treino por semana por um período de 5 semanas. Foram encontrados 23 spots diferencialmente expressos no grupo exercitado. Proteínas estruturais como α -miosina de cadeia pesada e α -actina cardíaca tiveram sua expressão aumentada. Estes resultados corroboram com outros estudos da literatura que mostraram uma hipertrofia do ventrículo esquerdo em decorrência da prática regular de exercícios de *endurance*, levando a uma melhora do débito cardíaco. Proteínas

envolvidas no metabolismo de gordura como acetilcoenzima A desidrogenase e proteína transportadora de ácidos graxos também tiveram sua expressão aumentada, indicando que um dos benefícios do exercício é aumentar a utilização de ácidos graxos na produção de energia. Além disto, o autor encontrou aumento na expressão da HSP20 e também um aumento da sua forma fosforilada. O autor sugeriu o aumento da fosforilação da HSP20 como sendo um dos mecanismos protetores contra apoptose da célula cardíaca.

PERSPECTIVAS

Apenas saber quais genes estão ativos em decorrência do exercício físico não desvenda os mecanismos envolvidos nos processos adaptativos desencadeados pelo exercício no nível proteico. Nesse sentido, a análise proteômica se apresenta como uma ferramenta muito útil para o entendimento do papel de tais genes na síntese de proteínas, e os mecanismos pelos quais elas alteram o fenótipo dos diversos órgãos e tecidos gerando benefícios.

Esta técnica poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos de interação entre o estímulo gerado pelo exercício para promover adaptação e os mecanismos de diversas doenças crônicas como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. Isto ajudará a entender como os fenótipos produzidos pelo exercício superam ou até mesmo inibem os fenótipos desencadeados por estas doenças.

A análise proteômica poderá contribuir também para esclarecer outro desafio: compreender a relação ótima entre quantidade de treinamento e tempo de recuperação, auxiliando na compreensão tanto dos mecanismos envolvidos nos processos adaptativos como os mecanismos envolvidos no *overtraining*.

A possibilidade de correlacionar as proteínas expressas no músculo de indivíduos treinados com seu aparecimento na corrente sanguínea permitirá selecionar alguns alvos que possam ser monitorados mais facilmente durante o processo de treinamento. Isto auxiliaria os preparadores físicos na modulação correta tanto das cargas de treino quanto do período de recuperação, com o objetivo de alcançar o quadro adaptativo desejado.

Tudo isso ressalta a necessidade de se formar pesquisadores versáteis na área da ciência do esporte, aptos a lidar com essas novas tecnologias, com domínio das áreas de química básica, bioquímica e estatística.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kohl HW. Physical activity and cardiovascular disease: evidence for a dose response. *Med Sci Sports Exerc.* 33:472-83, 2001.
2. Leung FP, Yung LM, Laher I, Yao X, Chen ZY, Huang Y. Exercise, Vascular Wall and Cardiovascular Diseases. An Update (Part 1). *Sports Med.* 38 (12): 1009-1024, 2008.
3. Carter ND, Khan KM, Petit MA, Heinonen A, Waterman C, Donaldson MG, Janssen PA, Mallinson A, Riddell L, Kruse K, Prior JC, Flicker L, McKay HA. Results of a 10 week community based strength and balance training programme to reduce fall risk factors: a randomised controlled trial in 65-75 year old women with osteoporosis. *Br J Sports Med.* 35:348-51, 2001.
4. Cauza E, Hanusch-Enserer U, Strasser B, Ludvik B, Metz-Schimmerl S, Pacini G, Wagner O, Georg P, Prager R, Kostner K, Dunky A, Haber P. The relative benefits of endurance and strength training on the metabolic factors and muscle function of people with type 2 diabetes mellitus. *Arch Phys Med Rehabil.* 86:1527-33, 2005.
5. Gill JMR, Cooper AR. Physical Activity and Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus. *Sports Med.* 38 (10): 807-824, 2008.
6. Couillard C, Després JP, Lamarche B, Bergeron J, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C. Effects of endurance exercise training on plasma HDL cholesterol levels depend on levels of triglycerides: evidence from men of the Health, Risk Factors, Exercise Training and Genetics (HERITAGE) Family Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:1226-32, 2001.
7. Wing RR, Goldstein MG, Acton KJ, Birch LL, Jakicic JM, Sallis JF Jr, Smith-West D, Jeffery RW, Surwit RS. Behavioral science research in diabetes: lifestyle changes related to obesity, eating behavior, and physical activity. *Diabetes Care.* p.117-23. 2001.
8. Lee IM. Physical activity and cancer prevention — data from epidemiologic studies. *Med Sci Sports Exerc.* 35:1823-7, 2003.
9. Thune I, Furberg, AS. Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site-specific. *Med Sci Sports Exerc.* 33:530-50, 2001.
10. Warburton DE, Gledhill N, Quinney A. The effects of changes in musculoskeletal fitness on health. *Can J Appl Physiol.* 26:161-216, 2001.
11. Fagard RH, Cornelissen VA. Effect of exercise on blood pressure control in hypertensive patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 14:12-7, 2007.
12. Dunn AL, Trivedi MH, O'Neal HA. Physical activity dose-response effects on outcomes of depression and anxiety. *Med Sci Sports Exerc.* 587-97. 2001.
13. Cameron-Smith D. Exercise and skeletal muscle gene expression. *Clin Exp Pharm Phys.* 29:209-213, 2002.
14. Winder WW, Taylor EB, Thomson DM. Role of AMP-Activated Protein Kinase in the Molecular Adaptation to Endurance Exercise. *Med. Sci. Sports Exer.* 38(11): 1945-1949, 2006.
15. Bodine SC. mTOR Signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38(11): 1950-1957, 2006.
16. Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med.* 37(9): 737-763, 2007.
17. Hamilton MT, Booth FW. Skeletal muscle adaptation to exercise: a century of progress. *J Appl Physiol.* 88: 327-331, 2000.
18. Yoshioka M, Tanaka H, Shono N, Snyder EE, Shindo M, St-Amand J. Serial analysis of gene expression in the skeletal muscle of endurance athletes compared to sedentary men. *FASEB J.* 17: 1812-1819, 2003.

19. Wittwer M, Billeter R, Hoppeler H, Flück M. Regulatory gene expression in skeletal muscle of highly endurance-trained humans. *Acta Physiol Scand.* 180, 217–227, 2004.
20. Coffey VG, Shield A, Canny BJ, Carey KA, Cameron-Smith D, Hawley JA. Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290: E849–E855, 2006.
21. Koulmann N, Bigard AX. Interaction between signalling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 452: 125–139, 2006.
22. Baar K. Training for endurance and strength: lessons from cell signaling. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38 (11): 1939-1944, 2006.
23. Hawley JA, Hargreaves M, Zierath JR. Signalling mechanisms in skeletal muscle: role in substrate selection and adaptation. *Essays Biochem.* 42: 1-12, 2006.
24. Rafalski K, Abdourahman A, Edwards JG. Early adaptations to training: upregulation of α -myosin heavy chain gene expression. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39(1): 75-82, 2007.
25. Mascher H, Tannerstedt J, Brink-Elfegoun T, Ekblom B, Gustafsson T, Blomstrand E. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294: E43–E51, 2008.
26. Kellner R. Proteomics: concepts and perspectives. *Fresenius J Anal Chem.* 366: 517-524, 2000.
27. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 405(15): 837-846, 2000.
28. Zhu H, Bilgin M, Snyder M. Proteomics. *Annu. Rev. Biochem.* 72:783–812, 2003.
29. Ding Q, Vaynman S, Souda P, Whitelegge JP, Gomez-Pinilla F. Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomics analysis. *Eur J Neurosci.* 24:1265-1276, 2006.
30. Yuan Q, Fontenele-Neto JD, Fricker LD. Effect of voluntary exercise on genetically obese Cpefat/fat mice: quantitative proteomics of serum. *Obes Res.* 12:1179 –1188, 2004.
31. Guelfi KJ, Casey TM, Giles JJ, Fournier PA, Arthur PG. A proteomic analysis of the acute effects of high-intensity exercise on skeletal muscle proteins in fasted rats. *Clin Exp Pharm Physiol.* 33, 952–957, 2006.
32. Boluyt MO, Brevick JL, Rogers DS, Randall MJ, Scalia AF, Li ZB. Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20. *Proteomics.* 6: 3154–3169, 2006.
33. Burniston JG. Changes in the rat skeletal muscle proteome induced by moderate-intensity endurance exercise. *Bioch Biophys Acta.* 1784: 1077-1086, 2008.
34. Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. *Proteomics.* 9: 106–115, 2009.
35. Hawley JA. Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clin Exp Pharm Physiol.* 29: 218 – 222, 2002.
36. Matsakas A, Patel K. Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. *Histol Histopathol.* 24: 209-222, 2009.
37. Hood DA. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 90(3):1137-57, 2001.
38. Irrcher I, Adhihetty PJ, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA, Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by endurance exercise. *Sports Med.* 33 (11): 783-793, 2003.
39. Goffart S, Wiesner RJ. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol.* 2003 Jan;88(1):33-40

40. Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS, Yan Z. Exercise stimulates PGC1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 280:19587-19593, 2005.
41. Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.* 16:1879-1886, 2002.
42. Cartoni R, Léger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Dériaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP. Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol.* 15:349-58, 2005.
43. Fritz T, Krämer DK, Karlsson HK, Galuska D, Engfeldt P, Zierath JR, Krook A. Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPARdelta and UCP3 in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev.* 22(6):492-8, 2006.
44. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol.* 25 (4): 1354-66, 2005.
45. Czubryt MP, Mcanally J, Fishman GI, Olson EN. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:1711-1716, 2003.
46. Luquet et al, 2003 Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M, Grimaldi PA. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J.* 17(15):2299-301, 2003.
47. Lin J, Wu H, Tarr PT, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 418: 797-801,2002.
48. Wang et al, 2004 Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol.* ;2(10):e294, 2004.
49. Hardie DG, Sakamoto K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)* 21:48-60, 2006.
50. Aschenbach et al, 2004 Aschenbach WG, Sakamoto K, Goodyear LJ. 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, metabolism and exercise. *Sports Med.* 34(2):91-103, 2004.
51. Chin ER. The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. *Proc Nutr S.* 63: 279-286, 2004.
52. Kramer HF, Goodyear LJ. Exercise, MAPK, and NF-B signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 103: 388-395, 2007.
53. Koehler CM, Leuenberger D, Merchant S, Renold A, Junne T, Schatz G. Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(5):2141-6, 1999.
54. Tranebjaerg L, Hamel BC, Gabreels FJ, Renier WO, Van Ghelue M. A de novo missense mutation in a critical domain of the X-linked DDP gene causes the typical deafness-dystonia-optic atrophy syndrome. *Eur J Hum Genet.* 8(6):464-7, 2000.
55. Hood et al, 2006 Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol.* 209(Pt 12):2265-75, 2006.
56. Rennie MJ, Wackerhage H, Spangenburg EE, Booth FW. Control of the Size of the Human Muscle Mass. *Annual Review of Physiology.* 66(1): 799-828, 2004.
57. Kumar V, Atherton P, Smith K, Rennie MJ. Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise. *J Appl Physiol.* Jan 22. [Epub ahead of print], 2009.

58. Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J.* 18(9):1025-7, 2004.
59. Adams GR, Cheng DC, Haddad F, Baldwin KM. Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration. *J Appl Physiol.* 96:1613-8, 2004.
60. Kim JS, Cross JM, Bamman MM. Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288 (6): E1110-19,2005.
61. Philippou A, Halapas A, Maridaki M, Koutsilieris M. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 7(3):208-218, 2007.
62. Welsh G I, Miller CM, Loughlin AJ, Price NT, Proud CG. Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett.* 421:125-130, 1998.
63. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117:399-412, 2004.
64. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *PNAS.* 98 (25): 14440-5, 2001.
65. Hawke TJ. Muscle Stem Cells and Exercise Training. *Exerc Sport Sci Rev.* 33 (2): 63-68, 2005.
66. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev.* 84: 209-238, 2004.
67. Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PNAS.* 98 (16): 9306-11, 2001.
68. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Proteínas Plasmáticas. In: Tietz: Fundamentos de química clínica. 6ª edição. Editora Elsevier. Rio de Janeiro. pg 303, 2008.
69. Liotta L A, Ferrari M, Petricoin E. Written in blood. *Nature.* 245: 905, 2003. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 291: 1304-51, 2001.
70. Jacobs JM, Joshua NA, Qian WJ, Liu T, Shen Y, CampII DG, Smith RD. Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. *J Proteom Res.* 4: 1073-1085, 2005.
71. Hortin GL, Jortani SA, Ritchie JC, Valdes R, Chan DW. Proteomics: A new diagnostic frontier. *Clin Chem.* 52: 1218-1222, 2006.
72. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhej Univ.* 6B(11):1045-1056, 2005.
73. Sacher RA, McPherson RA. Proteína do soro ou do plasma. In: Interpretação clínica dos exames laboratoriais. 11ª Edição. Editora Manole. São Paulo. p 480, 2002.
74. Henry JB. Proteínas específicas. In: Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 19ª Edição. Editora Manole. São Paulo. p. 237, 1999.
75. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 291: 1304-51, 2001.
76. Plebani, M. Proteomics: the next revolution in laboratory medicine? *Clin Chim Acta.* 357: 113-22, 2005.
77. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 16:1090-4, 1995.
78. Wilkins, MR et al. From proteins to proteomes: a large scale protein identification by two-dimensional gel electrophoresis and amino acid analysis. *Biotech.* 14: 61-65, 1996.

79. Pennington SR, Wilkins KL, Hochstrasser DF. Proteome research: new frontiers in functional genomics. *Trends Cell Biol.* 7:168, 1997.
80. Schwikowski B, Uetz P, Fields S. A network of protein-protein interactions in yeast. *Nature Biotechn.* 18: 1257-61, 2000.
81. Legrain P, Wojcik J, Gauthier JM. Protein-protein interaction maps: a lead towards cellular functions. *Trends Genet.* 17: 346-352, 2001.
82. Petricoin EF, Liotta LA. Nutritional Proteomics in Cancer Prevention. *The Journal of Nutrition.* 133: 2476-2484, 2003.
83. Liebold BW, Graack HR, Pohl T. Two dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics.* 6: 4688-4703, 2006.
84. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 26: 231-243, 1975.
85. O'Farrel PH. High resolution two-dimensional gel electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021, 1975.
86. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 4:3665-3685, 2004.
87. Veenstra TD, Conrads TP, Hood BL, Avellino AM, Ellenbogen RG, Morrison RS. Biomarkers: Mining the biofluid proteome. *Molecular & Cellular Proteomics.* 4: 409-418, 2005.
88. Shaw MM, Riederer BM. Sample preparation for two dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 3(8):1408-17, 2003.
89. Ahmed N, Barker G, Oliva K, Garfin D, Talmadge K, Georgiou H, Quinn M, Rice G. An Approach To Remove Albumin For The Proteomic Analysis Of Low Abundance Biomarkers In Human Serum. *Proteomics.* 3(10):1980-7, 2003.
90. Fountoulakis M, Juranville JF, Jiang L, Avila D, Röder D, Jakob P, Berndt P, Evers S, Langen H. Depletion of the high-abundance plasma proteins. *Amino Acids.* 27: 249-259, 2004.
91. Colantonio DA, Dunkinson C, Bovenkamp DE, Eyk JEV. Effective removal of albumin from serum. *Proteomics.* 5: 3831-3835, 2005.
92. Chen YY, Lin SY, YeH YY, Hsiao HH, Wu CY, Chen ST, Wang AH. A Modified Protein Precipitation Procedure For Efficient Removal Of Albumin From Serum. *Electrophoresis.* 26(11):2117-27, 2005.
93. Zolotarjova N, Martosella J, Nicol G, Bailey J, Boyes BE, Barrett WC. Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *Proteomics.* 5: 3304-3313, 2005.
94. Granger J, Siddiqui J, Copeland S, Remick D. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics.* 5: 4713-4718, 2005.
95. Cho SY, Lee EY, Lee JS, Kim HY, Park JM, Kwon MS, Park YK, Lee HJ, Kang MJ, Kim JY, Yoo JS, Park SJ, Cho JW, Kim HS, Paik YK. Efficient Prefractionation Of Low-Abundance Proteins In Human Plasma And Construction Of A Two-Dimensional Map. *Proteomics.* 5(13):3386-96, 2005.
96. Gong Y, Li X, Yang B, Ying W, Li D, Zhang Y, Dai S, Cai Y, Wang J, He F, Qian X. Different Immunoaffinity Fractionation Strategies To Characterize The Human Plasma Proteome. *J Proteome Res.* 5(6):1379-87, 2006.
97. Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K, Speicher DW. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics.* 5: 3292-3303, 2005.
98. Björhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics.* 5: 307-317, 2005.

99. Faca V, Pitteri SJ, Newcomb L, Glukhova V, Phanstiel D, Krasnoselsky A, Zhang Q, Struthers J, Wang H, Eng J, Fitzgibbon M, McIntosh M, Hanash S. Contribution of Protein Fractionation to Depth of Analysis of the Serum and Plasma Proteomes. *J Proteome Res.* 6(9):3558-65, 2007.
100. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The Current State Of Two-Dimensional Electrophoresis With Immobilized Ph Gradients. *Electrophoresis.* 21(6):1037-53, 2000.
101. Hoving S, Gerrits B, Voshol H, Müller D, Roberts RC, Van Oostrum J. Preparative Two-Dimensional Gel Electrophoresis At Alkaline Ph Using Narrow Range Immobilized Ph Gradients. *Proteomics.* 2:127-134, 2002.
102. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685, 1970.
103. Beranova-Giorgianni S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strength and limitations. *TrAC.* 22: 273-281, 2003.
104. Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166(2):368-79, 1987.
105. Patton WF. Detection technologies in proteome analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 771(1-2):3-31, 2002.
106. Westermeier R. Sensitive, quantitative, and fast modifications for coomassie blue staining of polyacrylamide gels practical. *Proteomics* 1-2: 61-64, 2006.
107. Patton, W. F. A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis.* 21: 1123-1144, 2000.
108. Chromy BA, Gonzales AD, Perkins J, Choi MW, Corzett MH, Chang BC, Corzett CH, McCutchen-Maloney SL. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins. *J Proteome Res.* 3(6):1120-7, 2004.
109. Dowsey AW, Dunn MJ, Yang GZ. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3: 1567-1596, 2003.
110. Fiévet J, Dillmann C, Lagniel G, Davanture M, Negroni L, Labarre J, de Vienne D. Assessing factors for reliable quantitative proteomics based on two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 4(7):1939-49, 2004.
111. Urfer W, Grozegorczyk M, Jung K. Statistics for proteomics: a review of tools for analyzing experimental data. *Practical Proteomics.* 1(2): 48 - 55, 2006.
112. Biron DG, Brun C, Lefevre T, Lebarbenchon C, Loxdale HD, Chevenet F, Brizard JP, Thomas F. The pitfalls of proteomics experiments without the correct use of bioinformatics tools. *Proteomics.* 6: 5577-5596, 2006.
113. Aebersol, R, Goodlett, D. Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.* 101: 269-295, 2001.
114. Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 337, 11-21, 2003.
115. Henzel WJ, Watanabe C, Stults JT. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom.* 14(9):931-42, 2003.
116. Yan JX, Harry RA, Wait R, Welson SY, Emery PW, Preedy VR, Dunn MJ. Separation and identification of rat skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 1: 424-434, 2001.
117. Capitanio D, Viganò A, Ricci E, Cerretelli P, Wait R, Gelfi C. Comparison of protein expression in human deltoideus and vastus lateralis muscles using two dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 5: 2577-2586, 2005.

118. Gelfi C, Vigano A, De Palma S, Ripamonti M, Begum S, Cerretelli P, Wait D. 2-D protein maps of rat gastrocnemius and soleus muscles: a tool for muscle plasticity assessment. *Proteomics* 6: 321–340, 2006.
119. Nobuaki Okumura N, Hashida-Okumura A, Kita K, Matsubae M, Matsubara T, Takao T, Nagai K. Proteomic analysis of slow- and fast-twitch skeletal muscles. *Proteomics* 5: 2896–2906, 2005.
120. Doherty MK, McLean L, Hayter JR, Pratt JM, Robertson DH, El-Shafei A, Gaskell SL, Beynon RJ. The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics* 4: 2082–2093, 2004.
121. Bouley J, Meunier B, Chambon C, De Smet S, Hocquette JF, Picard B. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics*. 5: 490–500, 2005.
122. Guelfi C, Vigano A, Ripamonti M, Pontoglio A, Begum S, Pellegrino MA, Grassi B, Bottinelli R, Wait R, Cerretelli P. The human muscle proteome in aging. *J. Proteome Res.* 5: 1344–1353, 2006.
123. Piec I, Lustrat A, Alliot J, Chambon C, Taylor RG, Bechet D. Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. *FASEB J.* 19: 1143–1145, 2005.
124. Donoghue P, Doran P, Dowling P, Ohlendieck K. Differential expression of the fast skeletal muscle proteome following chronic low-frequency stimulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1752: 166–176, 2005.
125. Donoghue P, Doran P, Wynne K, Pedersen K, Dunn MJ, Ohlendieck K. Proteomic profiling of chronic low-frequency stimulated fast muscle. *Proteomics* 7: 3417–3430, 2007.
126. Isfort RJ, Wang F, Greis KD, Sun Y, Keough TW, Farrar RP, Bodine SC, Anderson NL. Proteomic analysis of rat soleus muscle undergoing hindlimb suspension-induced atrophy and reweighting hypertrophy. *Proteomics* 2: 543–550, 2002.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO EXAUSTIVO EM ESTEIRA NO PERFIL PROTEICO DE SORO DE RATOS

RESUMO

O acúmulo de respostas agudas desencadeadas após cada sessão de treino leva o organismo a se adaptar positivamente, principalmente se for respeitado o tempo adequado para a recuperação antes da aplicação de novo estímulo. A visualização da resposta aguda no perfil proteico pode auxiliar na compreensão dos mecanismos sinalizadores das respostas adaptativas decorrentes do treinamento físico sistematizado. O objetivo deste trabalho foi investigar através da análise proteômica as alterações no perfil proteico do soro de ratos submetidos a uma sessão de exercício exaustivo em esteira. Dez animais realizaram um exercício incremental em esteira rolante até atingir a exaustão, e foram sacrificados 3h e 24h após o término do teste (n=5/grupo). As amostras de soro foram submetidas à eletroforese bidimensional, e os spots diferencialmente abundantes identificados através de espectrometria de massas. Observamos expressão diferenciada em 14 spots somente no grupo de animais sacrificados 24h após o exercício. As proteínas identificadas foram alfa-1-macroglobulina, haptoglobina, fator de complemento 3, transferrina, proteína ligadora de retinol e ceruloplasmina, correspondem a proteínas de fase aguda. Nossos dados reforçam a teoria de que o processo de geração de microtraumas e a subsequente instalação de um processo inflamatório local são parte integrante do processo adaptativo desencadeado pelo treinamento ao longo do tempo. Reforçam ainda a necessidade de um tempo adequado de recuperação entre os estímulos para que a resposta adaptativa possa ser sempre crescente.

Palavras-Chaves: exercício físico, análise proteômica, soro, proteínas de fase aguda.

INTRODUÇÃO

O exercício físico representa um estresse que gera uma série de microtraumas na musculatura esquelética e desencadeia diversas alterações metabólicas, fisiológicas e hormonais. Estes estímulos sinalizam uma resposta inflamatória local, com o intuito de reparar o tecido danificado. Essa resposta contribui para ativar diversas vias de sinalização de síntese proteica^{1,2}. O efeito cumulativo na expressão gênica leva a alterações fenotípicas do músculo, e aumento de rendimento em capacidades biomotoras diversas. É importante ressaltar, no entanto, que para que a adaptação seja positiva é necessário um tempo de recuperação adequado entre os estímulos.

Estudos mostraram que apenas uma sessão de treino já é capaz de alterar a transcrição de diversos genes na musculatura esquelética³, assim como alterar a concentração de proteínas envolvidas no processo inflamatório na corrente sanguínea⁴. As análises das alterações do nível proteico realizadas por estes estudos se limitaram em investigar poucas proteínas ao mesmo tempo, devido a limitações e o alto custo das técnicas, como imunoblotting e isótopos marcados.

A visualização das alterações do perfil proteico desencadeadas pelo exercício em um panorama mais amplo poderia auxiliar na compreensão dos mecanismos sinalizadores das respostas adaptativas observadas em decorrência do treinamento físico. Neste contexto, a análise proteômica parece uma ferramenta adequada para o mapeamento do perfil proteico tanto de tecidos quanto de fluidos biológicos em diferentes situações de exercício. A eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas permitem a separação, quantificação e identificação de diversas proteínas ao mesmo tempo, possibilitando a visualização das proteínas diferencialmente expressas em situações fisiológicas distintas⁵.

Até julho de 2009 apenas um trabalho utilizou a análise proteômica para investigar as alterações em nível proteico desencadeadas por uma sessão de treino exaustivo de natação no músculo gastrocnêmico de ratos⁶. Não há estudos utilizando a análise proteômica no soro, em resposta ao exercício físico.

O objetivo deste estudo foi investigar através da análise proteômica a alteração do perfil proteico do soro de ratos submetidos a uma sessão de exercício exaustivo de média duração em esteira 3 e 24 horas após o estímulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 20 ratos machos da linhagem Wistar, adquiridos do Centro de Bioterismo da UNICAMP, alimentados com ração e água *ad libitum*. Durante o período de experimento os animais foram mantidos em ambiente com a temperatura controlada entre 18 e 22°C e fotoperíodo de 12 horas com ciclo de luz claro-escuro invertido. Todo o procedimento adotado neste trabalho teve a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP – protocolo 638-1 (anexo).

Protocolo de Exercício Agudo

O protocolo de exercício foi realizado em esteira rolante de acordo com estudos prévios do nosso laboratório⁷.

Todos os animais, com a idade de 45 dias, foram submetidos a duas semanas de adaptação à esteira que consistiu de uma sessão de treino ao dia durante 5 dias a uma velocidade de 12m/min por 10 minutos. Após esta fase, os animais que não eram aptos a correr foram excluídos (n=5) e os demais foram divididos em três grupos (n=5 cada): controle (não realizou atividade); sacrificados 3h após a sessão de exercício (3h); e sacrificados 24h após a sessão de exercício (24h). Após 2 dias da última sessão de adaptação os ratos dos grupos 3h e 24h foram submetidos à sessão de exercício incremental até a exaustão.

O protocolo de exercício está mostrado na Tabela 1. O exercício foi iniciado com os animais correndo em esteira sem inclinação e com velocidade de 12 m/min. A cada 2 minutos foi incrementado 1 m/min até atingir a velocidade de 20 m/min. A partir daí o incremento na velocidade passou a ser de 2 m/min a cada 2 minutos até que o animal atingisse a exaustão. O momento de exaustão foi determinado a partir do momento que os animais permaneciam por mais de 10 segundos próximos a grade eletrificada.

Tabela 1: Protocolo de Exercício Agudo em Esteira.

Tempo (min)	Velocidade (m/min)
Início	12
2	13
4	14
6	15
8	16
10	17
12	18
14	19
16	20
18	22
21	24
24	26

A *performance* dos animais foi determinada a partir do cálculo do trabalho mecânico realizado pelos mesmos. O cálculo do trabalho levou em consideração a massa dos animais e a distância total percorrida no teste. A distância total percorrida é a soma das distâncias percorridas em cada estágio, obtida a partir do cálculo: tempo do estágio x velocidade do estágio. Ao final temos que: *Performance* (Kg*m) = massa x distancia total⁷.

Coleta de Sangue

Todos os cuidados de higiene e assepsia foram tomados para realização do procedimento cirúrgico. Os animais foram anestesiados, via intraperitoneal, com quetamina e relaxante muscular na dose de 10U/100g de peso e 5U/100g de peso, respectivamente. Após a perda dos reflexos da cauda, pálpebra e abdômen foi realizada uma secção na cavidade torácica para a visualização do coração. Cerca de 8 - 10 mL de sangue foram coletados do ventrículo esquerdo. O sangue foi colocado em tubos com gel da vacuette próprios para separação do soro, e em seguida centrifugado a 1800xg por 15 minutos a 4°C. O soro foi guardado a -85°C até ser processado. O animal, após a coleta de sangue, foi sacrificado por deslocamento cervical.

Preparação do soro para eletroforese bidimensional

Retirada de Imunoglobulinas (IgGs): Para retirada das imunoglobulinas foi utilizado um processo cromatográfico com proteína G (Protein G Sepharose™ da GE Healthcare – 0,8x7,0cm). A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,0 e aplicou-se 1 mL de soro a um fluxo de 1mL/min. Depois de aplicado o soro, a coluna foi lavada com 30 mL de tampão de

equilíbrio obtendo-se a primeira fração de soro livre de IgGs. Em seguida, a coluna foi lavada com 30 mL de tampão de eluição (tampão glicina pH 2,8), obtendo-se a fração com IgGs. Todo o procedimento foi acompanhado em espectrofotômetro lendo-se as amostras a 280nm.

Fracionamento da Albumina: A fração de soro livre de IgGs foi então aplicada em uma coluna (0,8x7,0cm) contendo Concanavalina A (ConA Sepharose 4B da Sigma Aldrich) para o fracionamento da albumina, conforme proposto por Rodriguez-Pinheiro e col. (2004)⁸. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 30 mL de tampão de equilíbrio (tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,0), obtendo-se a primeira fração contendo proteínas O-glicosiladas e albumina. O fluxo foi mantido em 0,3mL/min. Em seguida, 30 mL de tampão de eluição (tampão fosfato de sódio 10mM com 0,5M de metil- α -D-manopiranosideo) foi aplicado para obtenção da segunda fração, contendo proteínas N-glicosiladas e livres de albumina. Todo o procedimento foi acompanhado em espectrofotômetro lendo-se as amostras a 280nm.

Todas as frações foram submetidas a diálise (mini dialysis kit, 2mL, 1 KDa cutt of GE Healthcare) contra água *Milli-Q* a 4°C, sob leve agitação por 20 h. Após a diálise, o volume total da amostra foi mensurado e a quantidade de proteína obtida pelo método de Bradford⁹. Em seguida as amostras foram liofilizadas e re-suspensas no mesmo volume em tampão de solubilização [Uréia 7M, Tiouréia 2M, CHAPS 4%(m/v), IPG Buffer (pH 3-10 não linear) 0,5%(v/v) e azul de bromofenol 0,002%(m/v)] para serem submetidas à eletroforese bidimensional.

Eletroforese Bidimensional

Primeira dimensão (focalização isoeétrica): Amostras contendo 300 μ g de proteína foram solubilizadas em 250 μ L de tampão contendo Uréia 7M, Tiouréia 2M, CHAPS 4%(m/v), DTT 40mM, IPG Buffer (pH 3-10 não linear) 0,5%(v/v) e azul de bromofenol 0,002%(m/v). A solução foi agitada por 1 minuto. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de 13 cm com gradiente de pH 3-10 não linear (*strips*). Foram adicionados 2 mL de óleo mineral (Cover Fluid) sobre as *strips* para evitar a evaporação da amostra durante a reidratação. As *strips* foram reidratadas de forma passiva no aparato para a focalização isoeétrica (IPGphor, GE Healthcare) durante 12 horas, em temperatura controlada a 20°. Após a reidratação, a focalização isoeétrica ocorreu da seguinte forma: corrente máxima de 50 μ A/gel, 1 hora a 500V, gradiente até 1000V em 1 hora, gradiente até 8000V em 3 horas e 30 minutos e 50 minutos a 8000V, totalizando 24.500 Vh.

Segunda Dimensão (SDS-PAGE): Após a focalização isoelétrica as *strips* foram reequilibradas com tampão contendo Uréia 6M, Tris-HCl 75mM pH 8,8, glicerol 30%(v/v), SDS 2%(m/v), azul de bromofenol 0,002%(m/v) e Ditiotreitól 1%(m/v) por 15 minutos. O procedimento foi repetido com o mesmo tampão trocando-se o DTT por Iodoacetamina 2,5%(m/v) por mais 15 minutos. Após essa etapa as *strips* foram transferidas para um gel vertical homogêneo de poliacrilamida, conforme descrito por Laemmli¹⁰, com algumas modificações.

O gel foi constituído de 12% Bis-acrilamida (30,0: 0,8), 10% SDS, 1.5 M Tris (pH 8,8), 0,1% persulfato de amônia e 0,005% TEMED. As *strips* foram colocadas sobre o gel em solução de agarose 0,5%. O tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina (25mM Tris-HCl, 192mM glicina e 0,1% SDS). A separação eletroforética das proteínas ocorreu com banho de recirculação ajustado para 4°C em cuba SE 600 (GE Healthcare). O protocolo de corrida utilizado foi 15 mA por gel por 30 minutos, em seguida 45 mA/gel por 4 horas e 30 minutos.

Coloração com Coomassie Blue: Após a corrida os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G250 pelo protocolo proposto por Anderson e colaboradores¹¹. Os géis foram adicionados a uma solução fixadora contendo etanol 50% e ácido fosfórico 3% por 3 horas. Em seguida, foram lavados com água destilada por 20 minutos. Este procedimento foi repetido por 3 vezes. Após a lavagem os géis foram pré-incubados em uma solução contendo metanol 34%, ácido fosfórico 3% e sulfato de amônia 17%. Após 1 hora, 0.053g de Coomassie Brilliant Blue G250 foram adicionados, permanecendo o gel nesta solução sob agitação por 5 dias para coloração.

Deteccção das proteínas diferencialmente expressas

Análise de Imagem: A análise da imagem dos géis foi feita utilizando-se o software ImageMaster 2D Platinum versão 6.0 (GE Healthcare). Os parâmetros para identificação dos spots foram: saliência, área e visão 3D. Após a detecccção automática os spots foram checados manualmente para retirada de artefatos. Para a detecccção dos spots correspondentes nos diferentes géis (*matching*), foram marcadas manualmente 10 proteínas correspondentes em todos os géis como referência para o estabelecimento automático do *matching* pelo software. Após a detecccção automática, os *matching* foram checados manualmente, sendo que para ser considerado *matching* o critério estabelecido foi n-1, ou seja, o spot poderia não aparecer em apenas um dos géis do grupo de animais. No caso de um gel não apresentar o spot, o valor do volume adotado para a análise estatística foi a média dos volumes do mesmo spot presentes nos demais géis do grupo¹².

Análise Estatística: O parâmetro utilizado na análise estatística foi o volume relativo dos spots. Inicialmente os dados foram analisados através do programa SAM (Significance Analysis of MicroArray, Stanford University)¹³. Foram considerados diferencialmente expressos spots que apresentaram um *fold change* maior que 1,5 e *false discovery rate* (FDR) menor que 15%. Os spots selecionados por este critério foram então submetidos ao teste estatístico ANOVA para amostras não pareadas e não paramétrica (*Kruskall-Wallis* com pós teste de *Dunn*). Foram considerados diferencialmente expressos os spots com um valor de $p < 0.05$.

Para os dados de massa corporal foi utilizado o teste estatístico ANOVA para amostras não pareadas e não paramétrica (*Kruskall-Wallis* com pós teste de *Dunn*) e para os dados de tempo de exercício, distância e trabalho foi utilizado o teste de Mann Whitney para amostras não pareadas e não paramétrica. Foram consideradas diferenças significativas um valor de $p < 0.05$. O programa utilizado para realização das análises estatísticas foi GraphPad InStat versão 3.0 (San Diego, CA).

Identificação das Proteínas Por Espectrometria de Massas

Digestão com tripsina: Os spots considerados diferencialmente expressos foram recortados dos géis manualmente. Em seguida, digeridos com tripsina conforme proposto pela literatura¹⁴ com algumas modificações¹⁵, sendo que os procedimentos de redução e alquilação foram realizados durante a 2DE. A solução contendo o pool de peptídeos foi mantida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ser analisada através da espectrometria de massas.

Espectrometria de Massas - MALDI TOF-TOF: A análise foi realizada conforme descrito na literatura¹⁶. Um volume de $0,3\text{ }\mu\text{L}$ de amostra foi misturado com mesmo volume de matriz na placa, deixado para secar à temperatura ambiente, e a análise feita em um espectrômetro *4700 Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Ambos espectros, MS e MS/MS, foram obtidos utilizando um laser com uma frequência de 200-Hz.

Identificação das proteínas por PMF (Peptide Mass Fingerprinting): Os espectros de MS foram extraídos e uma lista contendo os valores de massa monoprótica e monoisotópica foi gerada utilizando o programa *ABI Analyst* versão 1.1. Os valores de massa obtidos foram recalibrados através do programa *PeakErazor* e os picos correspondentes à tripsina e queratina foram removidos. As buscas foram feitas através dos programas: *MS-FIT*^{17,18}, *PROFOUND*¹⁸ e *Mascot*¹⁹. Os parâmetros utilizados na busca foram: Base de dados (NCBIInr); Taxonomia

(Rodentia); Enzima (tripsina); Número de clivagens perdidas permitido (duas); Modificações constantes (Cys carbamidometilada); Modificações possíveis (Met oxidada); Erro (50 ppm).

A identificação da proteína foi considerada positiva quando o resultado encontrado por pelo menos dois dos três programas eram os mesmos. O parâmetro considerado para uma boa identificação foi *PMF Score*²⁰ maior que 79. O *PMF score* corresponde $[(HR \times 100) + MC + (ELDP \times 10)]$, onde HR (*Hit ratio*) = número de massas identificadas/ número de massas submetidas; MC (*Mass coverage*) = (% seqüência da proteína/100) x (massa da proteína em kDa); e ELDP (*Excess of limit-digested peptide*) = (número de peptídeos identificados sem ausência de clivagem) - (número de peptídeos contendo pontos que não foram clivados).

Identificação por MS/MS: Os espectros MS/MS foram analisados utilizando o programa Mascot (Matrix Science, London, UK; version 1.9.05). A busca foi feita utilizando-se a base de dados NCBIInr, restrito a Rodentia, assumindo a digestão com tripsina e perda de duas clivagens. Foi determinada uma tolerância de 0,30 Da para massa dos íons-fragmento e 0,60 Da para os precursores. Oxidação de metionina e modificação por iodoacetamina foram especificadas como modificações variáveis e constantes, respectivamente. A opção de *decoy* (despiste) foi utilizada e os resultados foram gerados para $p < 0.01$. Peptídeos identificados com *ion score* individual inferior a 30 foram descartados.

O programa Scaffold (versão 2-04-00, Proteome Software Inc., Portland, OR) foi utilizado para validar os resultados obtidos por MS/MS e a identificação da proteína. A identificação do peptídeo foi aceita considerando uma probabilidade maior que 95% de acordo com o algoritmo *Peptide Prophet*²¹. A identificação da proteína foi aceita com uma probabilidade maior que 95% e com pelo menos 2 peptídeos identificados. As probabilidades foram obtidas utilizando o algoritmo *Protein Prophet*²². As proteínas que possuíam peptídeos similares que não puderam ser diferenciados apenas por MS/MS foram agrupadas satisfazendo o princípio da parcimônia.

RESULTADOS

Dados da massa corporal e performance do exercício

A Tabela 2 apresenta os valores em média e desvio padrão da massa corporal, e o tempo, distância percorrida e trabalho realizado pelos animais dos grupos controle, 3h e 24h.

Tabela 2. Média e desvio padrão da massa corporal dos animais, tempo, distância e trabalho realizado no exercício.

	Massa Corporal (g)		Trabalho (Kg*m)		Tempo (min)		Distancia (m)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Controle	295.80	34.01						
3 horas	317.51	16.54	203.90	35.10	32.10	4.39	656.00	133.71
24 horas	289.18	16.63	157.70	36.46	28.26	3.44	555.40	124.20

Não houve diferença significativa nos valores de massa corporal entre os grupos. Em relação aos dados de desempenho não foi detectada diferença significativa em nenhum dos parâmetros analisados, indicando que o esforço realizado pelos animais dos grupos 3h e 24h foi similar.

Análise das proteínas diferencialmente expressas no soro

A Figura 1 apresenta o perfil dos géis bidimensionais representativos obtidos para as amostras de soro dos ratos na fração sem IgGs e sem albumina (A) e na fração sem IgGs com albumina (B).

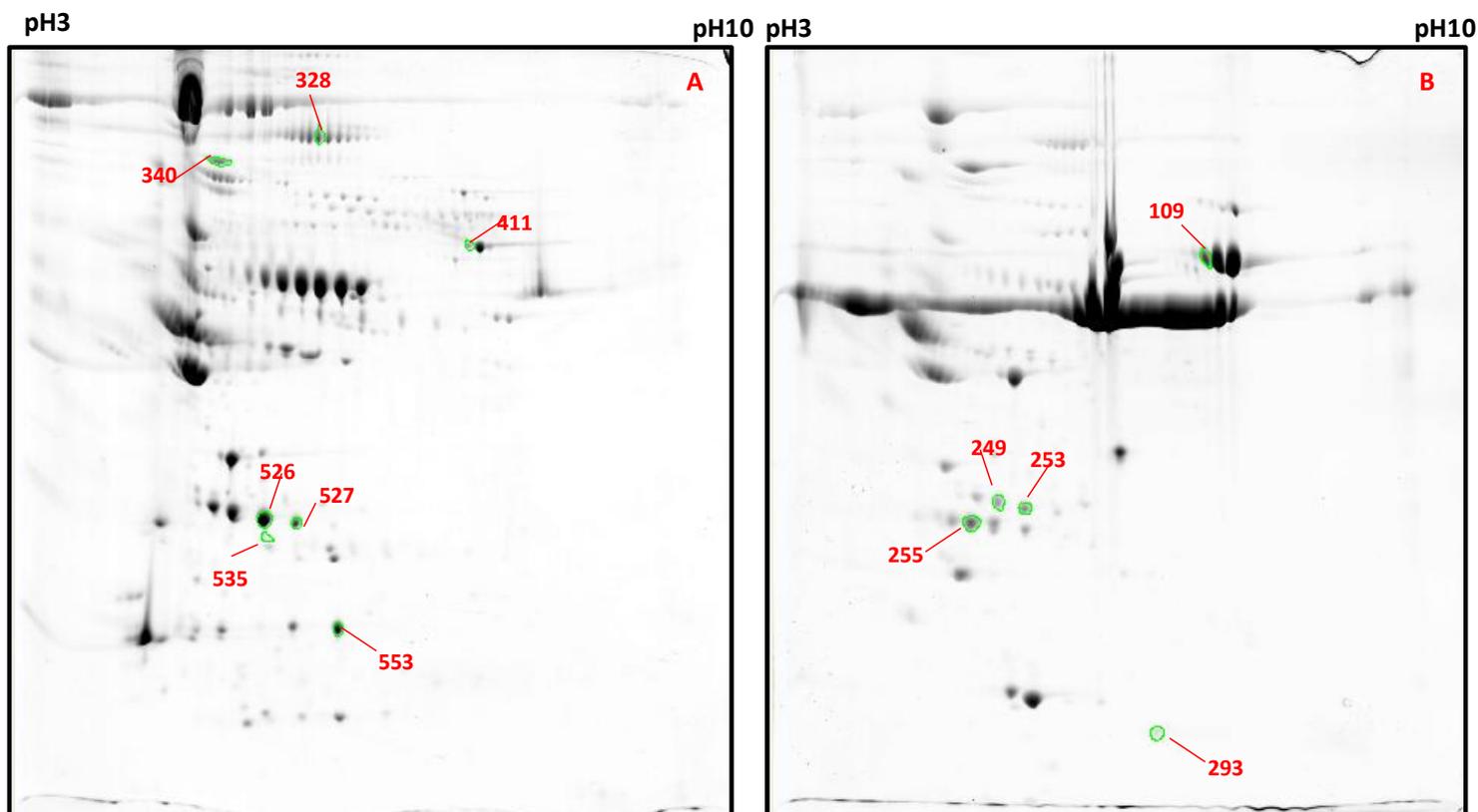


Figura 1. Gel bidimensional (pH 3-10; 12% com 300 μ g de proteínas corado com Coomassie Blue Colloidal) de um rato do grupo 3h, representativa dos géis obtidos nos grupos. A - Fração sem albumina e sem IgG e B - Fração sem IgG e com albumina. Os números representam o SPOT ID das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos.

Foram analisados 62 spots na fração sem albumina e sem IgG (A), e 30 spots na fração sem IgG e com albumina (B). O coeficiente de variação do volume relativo dos spots dos três grupos foi inferior a 30%. Esta variação representa tanto a variação experimental quanto a variação biológica, e se apresenta dentro da faixa de 20 -30% já descrita na literatura para análise proteômica²³.

Do total de spots analisados foram detectados 7 e 5 proteínas diferencialmente expressas na fração sem albumina e sem IgG (figura 1A) e na fração sem IgG e com albumina (figura 1B), respectivamente. As proteínas identificadas através da espectrometria de massas representam proteínas de fase aguda do processo inflamatório tais como alfa-1-macroglobulina, haptoglobina, fator de complemento 3, transferrina, proteína ligadora de retinol e ceruloplasmina.

A Figura 2 mostra o boxplot referente ao volume relativo dos spots 328, 526 e 527 na fração sem IgG e sem albumina (Figura 1A) e 249 e 253 da fração sem IgG e com albumina (Figura 1B), identificados como a proteína alfa-1-macroglobulina.

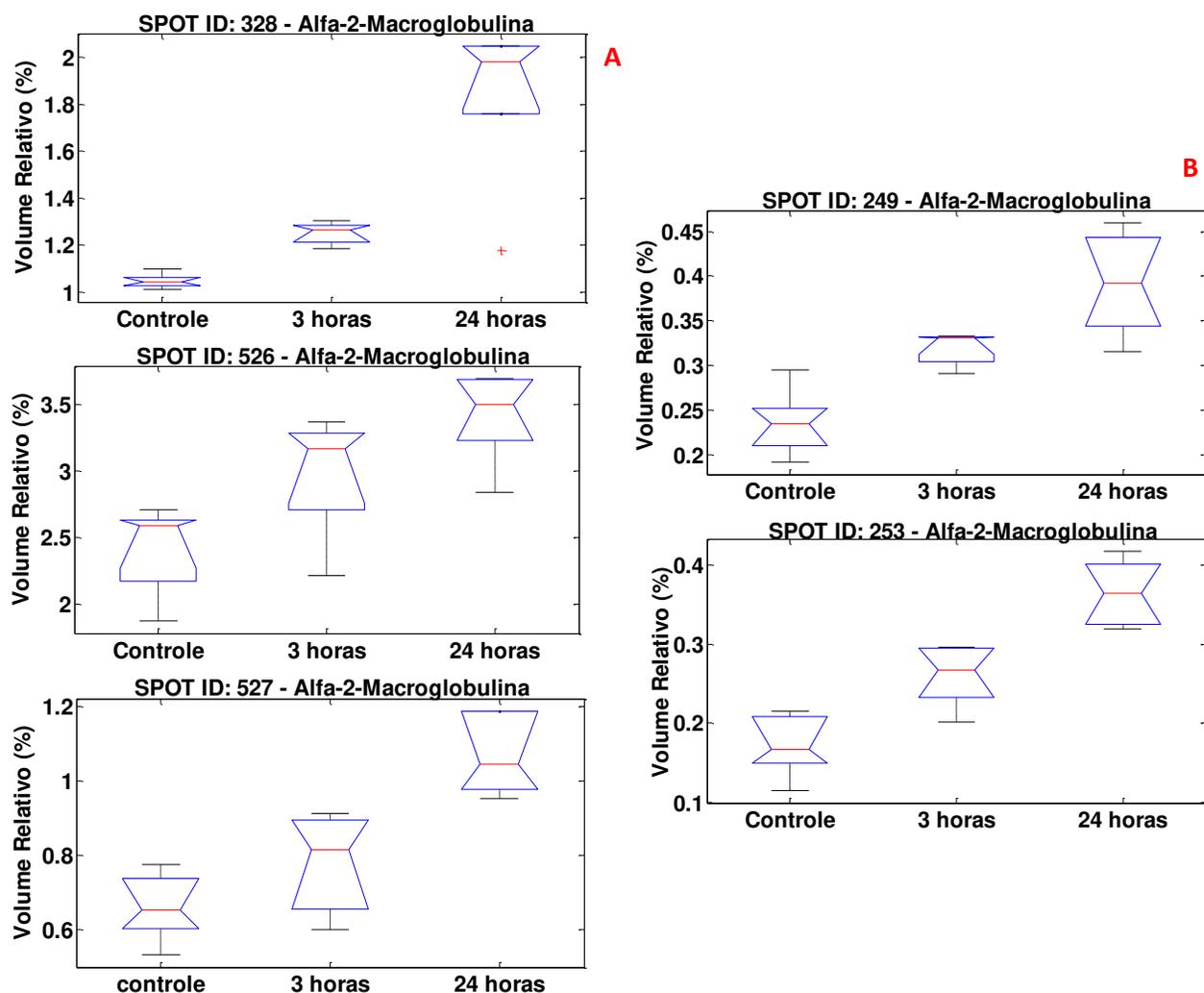


Figura 2. Boxplot do volume relativo dos spots 328, 526 e 527 (2A – fração sem albumina - figura 1A) e dos spots 249 e 253 (2B – fração com albumina - figura 1B), identificados como alfa 1 macroglobulina. Em todos os spots o grupo 24 horas apresentou alteração significativa em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

Podemos observar um aumento significativo da alfa-1-macroglobulina no grupo 24h quando comparado ao grupo controle em todos os spots analisados. No grupo 3h observou-se uma tendência de aumento em relação ao controle, contudo, sem diferença estatística.

A Figura 3 mostra o boxplot referente ao volume relativo do spot 411 na fração sem IgG e sem albumina (Figura 1A) e do spot 109 da fração sem IgG e com albumina (Figura 1B), identificados como a proteína transferrina.

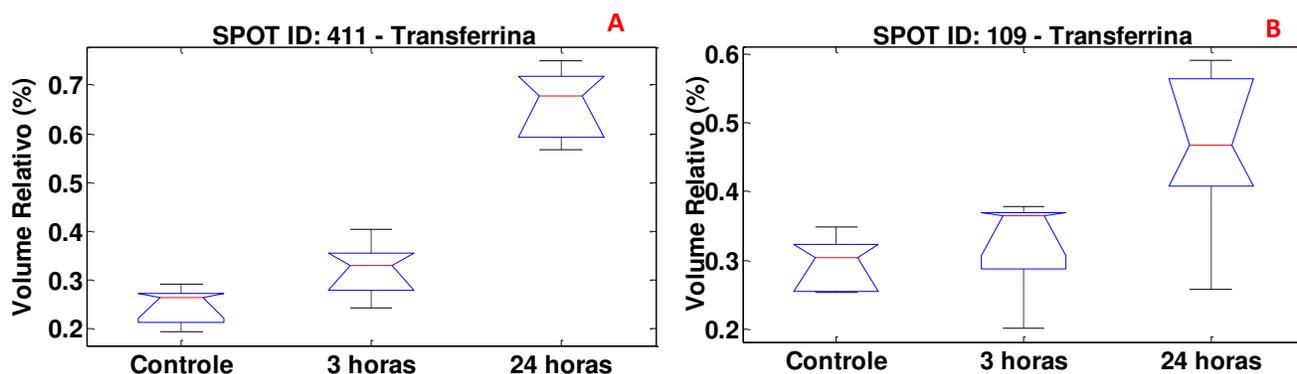


Figura 3. Boxplot do volume relativo dos spots 411 (3A – fração sem albumina figura 1A) e 109 (3B - fração com albumina – figura 1B) identificados como transferrina. Em ambos spots o grupo 24 horas apresentou alteração significativa em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

Não observamos diferenças entre os grupos controle e 3h na concentração da transferrina. Apenas o grupo 24h apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo controle para ambos os spots analisados.

A Figura 4 mostra o boxplot referente ao volume relativo do spot 535 na fração sem IgG e sem albumina (Figura 1A) e do spot 255 da fração sem IgG e com albumina (Figura 1B), identificados como haptoglobina.

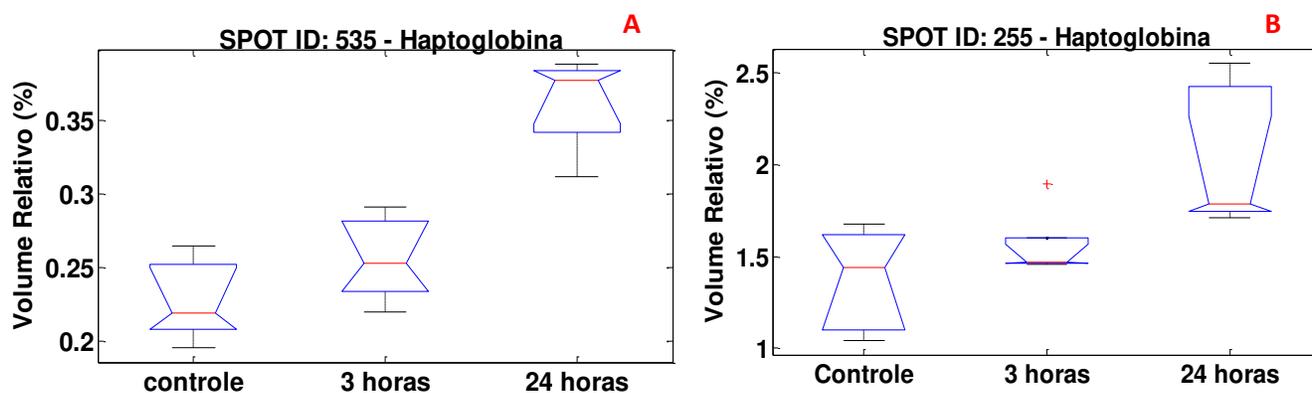


Figura 4. Boxplot do volume relativo dos spots 535 (4A – fração sem albumina: figura 1A) e 255 (4B – fração com albumina: figura 1B) identificados como haptoglobina. Em todos os spots o grupo 24 horas apresentou alteração significativa em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

Podemos observar um aumento na concentração da proteína haptoglobina no grupo 24h quando comparado com o grupo controle em todos os spots analisados. Não observamos diferenças significativas entre o grupo controle e 3h.

A Figura 5 mostra o boxplot referente ao volume relativo dos spots 340 e 553 na fração sem IgG e sem albumina (Figura 1A) e do spot 293 da fração sem IgG e com albumina (Figura 1B), identificados como ceruloplasmina, fator de complemento 3 e proteína ligadora de retinol, respectivamente.

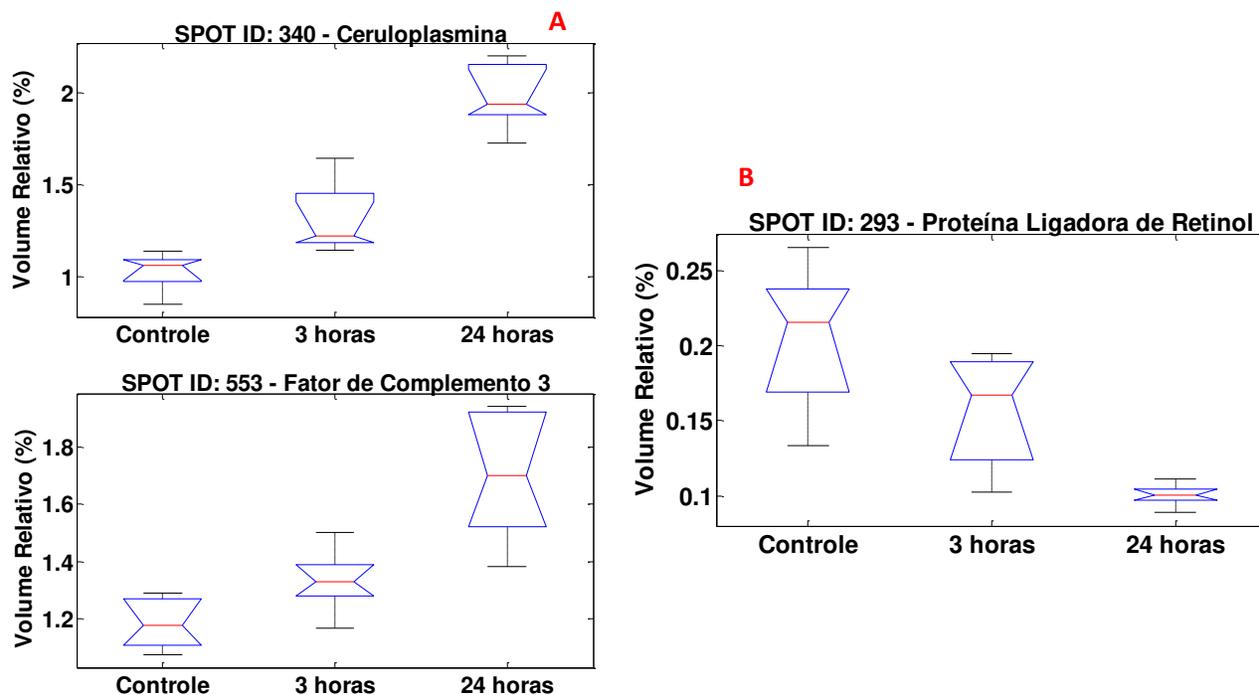


Figura 5. Boxplot do volume relativo dos spots 340 e 553 (5A – fração sem albumina: figura 1A) identificados como ceruloplasmina e fator de complemento 3, respectivamente e do spot 293 (5B – fração com albumina: figura 1B) identificado como proteína ligadora de retinol. Em todos os spots o grupo 24 horas apresentou alteração significativa em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

As proteínas ceruloplasmina e fator de complemento 3 apresentaram o mesmo comportamento, aumentando sua concentração no grupo 24h. Ao contrário, a proteína ligadora de retinol apresentou uma queda tanto no grupo 3h quanto no grupo 24h quando comparados ao controle. Contudo, apenas a diminuição do grupo 24h foi significativa.

As Tabelas 3 e 4 mostram os dados referentes a identificação das proteínas pelas técnicas de PMF, e os peptídeos obtidos por MS/MS na frações sem albumina e com albumina, respectivamente. A Figura 6 mostra os espectros MS/MS obtidos para a proteína fator de complemento 3 (spot 553).

Tabela 3: Parâmetros referentes à identificação das proteínas por PMF e MS/MS na fração sem albumina.

Spot ID	Nome da Proteína	Gi	PMF Score (>79)	TIC (%)	Protein Score (>66)	Peptídeos identificados por MS/MS	Modificação	Mr Peptídeo Esperado	Mr Peptídeo Calculado	Mascot Ion Score	Massa (kDa)		pI	
											Teórica	Observada	Teórico	Observado
340	Ceruloplasmina	49048530	321	92,1	271	ELISVDTEQSNFYLR		1813,9700	1812,9600	63,10	120.667	122.377	5,4	5,1
411	Transferrina	1854476	175	78,4	185	LPEGTTYEEYLGAEYLQAVGNIR KPVDDQYEDcYLAR KPVTEFATcHLAQAPNHVVVSR LYLGHSYVTAIR GDKDcTGNFcLFR ASDSSINWNNLK DcTGNFcLFR WcALSHQER	C(+57) C(+57) 2 x C(+57) 2 x C(+57) C(+57)	2586,3884 1656,8351 2461,3916 1392,8158 1589,7488 1348,7058 1289,5967 1186,5890	2585,3806 1655,8273 2460,3838 1391,8080 1588,7410 1347,6980 1288,5889 1185,5812	60,07 66,57 51,27 75,42 61,95 46,46 63,58 51,80	76.365	77.123	6,9	6,9
535	Haptoglobina	60097941	176	79,8	105	ScAVAEYGVYVR	C(+57)	1373,7100	1372,7021	60,33	38.564	38.664	6,1	5,8
553	Fator de Complemento 3	15813861	182	50,8	110	SGIPIVTSPIYIHFTEK NVDGTAFFVIFGVQDEDKK TVVIVIETPDGVPIKR VELKPGDNLNVNFHLR TIYTPGSTVIFYR		1788,0554 1982,0895 1736,1167 1865,0980 1404,7850	1787,0476 1981,0817 1735,1089 1864,0902 1403,7772	64,90 93,85 68,40 93,85 87,97	187.930	23.894	9,1	6,1
328	Alfa-1-macroglobulina	81872093	—	—	73	QLNYQHSDGSYSTFGDR GSIFNSGSHVLPLEQ GK IHFLLNEDALK AEQGAYLGPLPYK		1974,9403 1769,9795 1312,7703 1406,7808	1973,9325 1768,9717 1311,7625 1405,7730	88,41 51,08 59,92 46,80	168.480	166.768	6,5	5,8
526	Alfa-1-macroglobulina	81872093	—	—	197	YNILPEAEAGEAPFTLK TEVNTNHVLIYIEK mVSGFIPVKPSVK VNTLPLNFDK	O (+16)	1791,9724 1672,9369 1404,8218 1160,6549	1790,9646 1671,9291 1403,8140 1159,6471	68,12 57,41 49,98 51,11	45.000	43.278	6,5	5,8
527	Alfa-1-macroglobulina	81872093	—	—	106	YNILPEAEAGEAPFTLK TEVNTNHVLIYIEK VSGSGcVYLQTSLK QQNSHGGFSSTQDTVVALQALSK VNTLPLNFDK	C (+57)	1791,9567 1672,9254 1498,7853 2403,2593 1160,6504	1790,9489 1671,9176 1497,7775 2402,2515 1159,6426	75,27 59,03 50,19 66,96 42,94	45.000	42.278	6,5	5,9

Spot ID - identificação do spot no gel (Figura 1 A); **Gi** - número de acesso da proteína no banco de dados do NCBI; **PMF Score** - parâmetro proposto por Stead 2006²⁰ que indica a fidedignidade da identificação; **TIC** - Percentagem da corrente iônica total dos peptídeos que deram *match* na análise por PMF; **Protein Score** - parâmetro do software Mascot que representa confiança de $p < 0.05$ na identificação da proteína; **Massa molecular teórica (Mr Teórica) e pI teórico (pI Teórico)** valores obtidos do banco de dados; **Massa molecular observada (Mr observada) e pI observado (pI observado)** - valores obtidos através da análise de imagem. * proteína não identificada pelo programa MS-FIT.

Tabela 4: Parâmetros referentes à identificação das proteínas por PMF e MS/MS na fração com albumina.

Spot ID	Nome da Proteína	gi	PMF Score (>79)	TIC (%)	Protein Score (>66)	Peptídeos identificados por MS/MS	Modificação	Mr Peptídeo Esperado	Mr Peptídeo Calculado	Mascot Ion Score	Massa Teórica (KDa)	Massa Observada (KDa)	pI Teórico	pI Observado
293	Proteína Ligadora de Retinol	158187535	80	64,2	113	LQNLDTGcADSYSFVFSR FSGLWYAIK	C(+57)	2080,0090 1155,6459	2079,0012 1154,6381	120,39 54,43	23.220	24.561	5,7	6,2
109	Transferrina	1854476	175	88,3	170	LPEGTTYEEYLGAEYLQAVGNIR KPVdqYEDcYLAR KPVTEFATcHLAQPNHVVVSR LYLGHsYVTAIR GDKDcTGNFcLFR ASDSSINWNNLK DcTGNFcLFR WcALSHQER	C(+57) C(+57) 2 x C(+57) 2 x C(+57) C(+57)	2586,3884 1656,8351 2461,3916 1392,8158 1589,7488 1348,7058 1289,5967 1186,5890	2585,3806 1655,8273 2460,3838 1391,8080 1588,7410 1347,6980 1288,5889 1185,5812	60,07 66,57 51,27 75,42 61,95 46,46 63,58 51,80	76.365	77.123	6,9	6,9
255	Haptoglobina	60097941	161	86,5	113	ScAVAEYGVVYR SVVDIGLIK	C(+57)	1373,6765 943,5852	1372,6687 942,5774	63,87 45,15	38.564	38.922	6,1	5,7
553	Fator de Complemento 3	15813861	182	26,2	110	SGIPIVtSPYQIHFTK NVDGTAFVIFGVQDEdKK TVVIVIEtPDGVPIKR VELKPGDNLNvNFHLR TIYtPGStVFYR		1788,0554 1982,0895 1736,1167 1865,0980 1404,7850	1787,0476 1981,0817 1735,1089 1864,0902 1403,7772	64,90 93,85 68,40 93,85 87,97	187.930	23.894	9,1	6,1
249	Alfa-1-macroglobulina	81872093	—	—	88	YNILPEAEGEAPtLK TEVNTNHVLIYIEK mVSGFIPVKPSVK VNTLPLNFdK	O (+16)	1791,9724 1672,9369 1404,8218 1160,6549	1790,9646 1671,9291 1403,8140 1159,6471	68,12 57,41 49,98 51,11	45.000	43.278	6,5	5,8
253	Alfa-1-macroglobulina	81872093	—	—	81	YNILPEAEGEAPtLK TEVNTNHVLIYIEK VSGSGcVYLtSLK QQNSHGGSStQDtVVALQALSK VNTLPLNFdK	C (+57)	1791,9567 1672,9254 1498,7853 2403,2593 1160,6504	1790,9489 1671,9176 1497,7775 2402,2515 1159,6426	75,27 59,03 50,19 66,96 42,94	45.000	42.278	6,5	5,9

Spot ID - identificação do spot no gel (Figura 1 B); **Gi** - número de acesso da proteína no banco de dados do NCBI; **PMF Score** – parâmetro proposto por Stead 2006²⁰ que indica a fidedignidade da identificação; **TIC** – Percentagem da corrente iônica total dos peptídeos que deram *match* na análise por PMF; **Protein Score** – parâmetro do software Mascot que representa confiança de p<0.05 na identificação da proteína; **Massa molecular teórica (Mr Teórica) e pI teórico (pI Teórico)** valores obtidos do banco de dados; **Massa molecular observada (Mr observada) e pI observado (pI observado)** – valores obtidos através da análise de imagem. * proteína não identificada pelo programa MS-FIT.

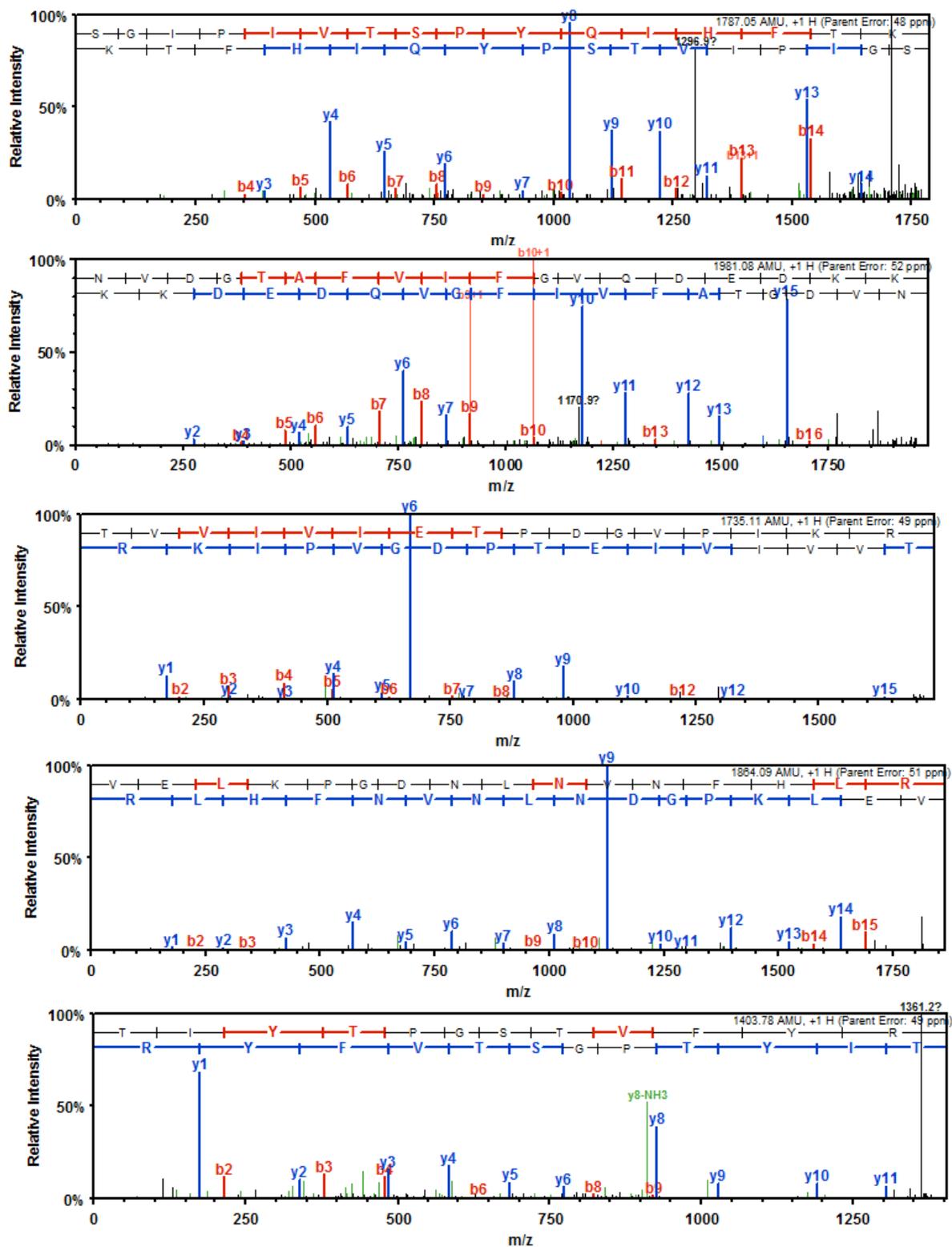


Figura 6: Espectros MS/MS referente aos peptídeos identificados da proteína fator de complemento 3 (spot 553).

DISCUSSÃO

Este trabalho investigou através da análise proteômica quais as proteínas diferencialmente expressas no soro de animais que realizaram um exercício exaustivo em esteira rolante 3h e 24h após a realização do esforço. Esse é o primeiro estudo a utilizar análise proteômica de soro de ratos para investigar os efeitos decorrentes do exercício no perfil proteico. Obtivemos proteínas diferencialmente expressas em ambas as frações de soro, livre de IgGs e albumina e livre de IgGs com albumina, permitindo um quadro mais exato da resposta ao estresse de uma única sessão de exercício exaustivo de média duração.

As 12 proteínas diferencialmente expressas no grupo 24h foram identificadas através da espectrometria de massas e correspondem as proteínas: alfa-1-macroglobulina, haptoglobina, fator de complemento 3, transferrina, ceruloplasmina e proteína ligadora de retinol. Dessas, apenas a última apresentou uma diminuição na concentração.

A função da proteína ligadora de retinol está relacionada ao transporte de vitamina A para os tecidos^{24,25}. Embora esta proteína não seja muito analisada em estudos que usam exercício como modelo experimental, diversos trabalhos sugerem sua atuação como uma proteína de fase aguda negativa^{26, 28}, corroborando com os resultados observados neste estudo.

As outras proteínas diferencialmente expressas cujas concentrações apresentaram-se elevadas fazem parte de um conjunto de proteínas envolvidas na resposta de fase aguda decorrente da instalação de um processo inflamatório. As proteínas de fase aguda são produzidas pelo fígado, principalmente pela sinalização da interleucina 6 (IL6), e aparecem na corrente sanguínea algumas horas após o início da inflamação²⁸. São classificadas como proteínas de fase aguda positiva: proteína C reativa (PCR), alfa1-glicoproteína ácida, amilóide sérica A, haptoglobina, fibrinogênio, alfa-2-macroglobulina, alfa1-antitripsina e ceruloplasmina. O aumento na concentração dessas proteínas no soro dos ratos indica a instalação de um processo inflamatório em decorrência do esforço realizado.

Werling e colaboradores²⁹ caracterizaram algumas alterações nas concentrações plasmáticas das proteínas de fase aguda, mostrando que mudanças mensuráveis são vistas cerca de 4 – 5 horas após o estímulo, permanecendo elevadas por 24 horas e voltam aos níveis basais cerca de 48-72 horas, dependendo da magnitude do trauma. Nossos dados confirmam essa cinética. As alterações visualizadas após 3h após o exercício foram muito tênues, sendo que somente 24h após o estímulo houve aumento significativo na concentração destas proteínas.

A maioria dos estudos com exercício que analisaram a resposta das proteínas de fase aguda se restringe à mensuração das concentrações séricas de PCR. Pouquíssimos trabalhos tentam analisar as alterações das proteínas de fase aguda em seu conjunto, como neste estudo.

Grande parte dos estudos que analisaram as concentrações da PCR após a realização de um exercício exaustivo mostrou aumento desta proteína 24–48h após o estímulo^{4, 30}. No nosso estudo a PCR não foi umas das proteínas diferencialmente expressas, corroborando com outros trabalhos, que também não encontraram diferenças significativas nesta proteína após um treino de futebol de moderada e alta intensidade³¹, 60 minutos de corrida em ambiente quente³² e após a Volta da Espanha³³.

Cinco spots cujas intensidades apresentaram-se elevadas 24 horas após o término do exercício foram identificados como alfa-1-macroglobulina, uma proteína que pertence à família de proteínas da alfa-2-macroglobulina. Esta família de proteínas atua como inibidora dos quatro tipos de proteases, além de atuar como proteína de fase aguda³⁴. Não é uma proteína usualmente mensurada nos estudos com exercício. No entanto, já em 1969 um estudo mostrou aumento nas concentrações de alfa-2-macroglobulina no soro de atletas em resposta a uma sessão de exercício³⁵. O aumento da alfa-1-macroglobulina pode indicar um maior controle sobre a atividade das proteases que atuam no tecido danificado, impedindo que estas enzimas degradem células íntegras. Esta família de proteínas parece mediar também a atividade de algumas interleucinas, embora esta função precise ser melhor investigada³⁴.

Dois spots foram identificados como haptoglobina, uma proteína cuja principal função é ligar-se à hemoglobina livre, com o objetivo de evitar a perda de ferro devido à lise das hemácias³⁶. Alguns estudos analisaram a concentração de haptoglobina após diversos tipos de exercício e encontraram uma diminuição na concentração desta proteína 24h após o esforço. Contudo, estes estudos mostraram também um aumento de hemoglobina livre no plasma, diminuição do hematócrito e hemoglobina, indicando um quadro de hemólise decorrente do exercício^{37,38,39}. A contagem de hemácias (3h: $8,36 \pm 0,42 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ vs 24h: $8,38 \pm 0,32 \cdot 10^6/\text{mm}^3$), hematócrito (3h: $51 \pm 1\%$ vs 24h: $48 \pm 1\%$) e hemoglobina (3h: $15,90 \pm 0,44\text{g/L}$ vs 24h: $16,21 \pm 0,28\text{g/L}$) dos nossos animais não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, indicando que não houve lise das células vermelhas.

Weight e colaboradores⁴⁰ também encontraram aumento na concentração de haptoglobina 24h após uma maratona. Esse aumento pode estar associado à função antiinflamatória desta proteína na resposta de fase aguda, uma vez que este comportamento parece análogo ao observado em quadros inflamatório desencadeados por algumas doenças^{36,41}.

Muitos trabalhos classificam a transferrina como uma proteína de fase aguda negativa^{28,42}. Nosso estudo mostrou o contrário. Dois spots, identificados como transferrina apresentaram sua concentração aumentada 24h após o esforço. Interpretamos este aumento como uma forma de preservação do ferro. Uma das funções da transferrina é se ligar ao ferro, diminuindo a quantidade deste íon livre no plasma, e conseqüentemente sua oxidação por radicais livres⁴³. Aumentos na concentração de transferrina também foram encontrados após uma corrida de 100 km⁴⁴ e após uma sessão de treino intenso em jogadoras de futebol³¹.

A concentração de ceruloplasmina também se apresentou elevada no soro 24h após o exercício. Além de ser uma das proteínas de fase aguda positiva, esta proteína é a principal forma de transporte do cobre pelo sangue. Outras funções estão relacionadas à regulação dos níveis de ferro e zinco, oxidação de grupos amina e ação antioxidante⁴⁵. Aumentos da ceruloplasmina também já foram relatados em jogadoras de tênis após uma sessão de treino intenso³² e após 60 minutos de corrida em ambiente quente³².

Apenas um spot foi identificado como o fator de complemento 3, cuja concentração estava aumentada 24h após o exercício. Diversos estudos indicaram que uma das funções das proteínas de fase aguda é a ativação do sistema de complemento para auxiliar no processo inflamatório⁴⁶. Níveis aumentados do fator de complemento C3 e C4 já foram observados em decorrência da prática da atividade física^{47,32,33}.

Os dados apresentados nesse estudo, utilizando a análise proteômica do soro de ratos, mostraram claramente uma resposta de fase aguda decorrente da instalação de um processo inflamatório 24 horas após o exercício incremental aplicado. Estes dados reforçam a teoria proposta por Smith¹, de que a geração de microtraumas na musculatura esquelética quando acompanhada de um período de regeneração adequado representa um dos mecanismos envolvidos na resposta adaptativa ao treinamento físico sistematizado. É importante ressaltar que diferente de lesões ou traumas mais severos, o tratamento necessário para a "cura" desses microtraumas consiste apenas de um tempo adequado de recuperação até a realização da próxima sessão de treino.

Compreender melhor as funções e comportamentos das proteínas diferencialmente expressas durante o processo de treinamento poderá contribuir para a correta programação de aplicação de estímulos e descanso. Nesse sentido, a análise proteômica mostrou-se uma ferramenta extremamente útil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Smith LL. Tissue trauma: the underlying cause of *overtraining* syndrome? J. Strength Cond. Res. 18(1):184-191, 2004.
2. Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation. Sports Med. 37 (9): 737-763, 2007.
3. Flück M. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. J Exp Biol. 209: 2239-2248, 2006.
4. Plaisance EP, Grandjean PW. Physical activity and high-sensitivity C-reactive protein. Sports Med. 36 (5): 443-458, 2006.
5. Zhu H, Bilgin M, Snyder M. Proteomics. Annu Rev Biochem. 72:783-812, 2003.
6. Guelfi KJ, Casey TM, Giles JJ, Fournier PA, Arthur PG. A proteomic analysis of the acute effects of high-intensity exercise on skeletal muscle proteins in fasted rats. Clin Exp Pharm Physiol. 33, 952-957, 2006.
7. Hohl R, Ferrareso RLP, Buscariolli R, Lucco R, Brenzikofer R, Macedo DV. Development and characterization of an overtraining animal model. Med Sci Sports Exerc. 41(5): 1155-63, 2009.
8. Rodriguez-Piñeiro AM, Ayude D, Rodriguez-Berrocal JF, Cadena MP. Concanavalin a chromatography coupled to two-dimensional gel electrophoresis improves protein expression studies of the serum proteome. J Chromat B. 803: 337-343, 2004.
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254, 1976.
10. Laemmi UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685, 1970.
11. Anderson NL, Esquer-Blasco R, Hofmann JP, Anderson NG. A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effect studies. Electrophoresis. 12:907-930, 1991.
12. Pedreschi R, Hertog MLATM, Carpentier SC, Lammertyn J, Robben J, Noben JP, Panis B, Swennen R, Nicolai BM. Treatment of missing values for multivariate statistical analysis of gel-based proteomics data. Proteomics. 8, 1371-1383, 2008.
13. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. PNAS. 98(9): 5116-5121, 2001.
14. Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, and Mann M. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. Nature 379: 466-469, 1996.
15. Cunha Bastos VL, Salles JB, Valente RH, Leon IR, Perales J, Dantas RF, Albano RM, Bastos FF, and Cunha Bastos J. Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. Biochimie 89: 1332-1342, 2007.

16. Rocha SL, Neves-Ferreira AG, Trugilho MR, Chapeaurouge A, Leon IR, Valente RH, Domont GB, and Perales J. Crotalid snake venom subproteomes unraveled by the antiophidic protein DM43. *J Proteome Res* 8: 2351-2360, 2009.
17. Pappin DJ, Hojrup P, and Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 3: 327-332, 1993.
18. Zhang W, and Chait BT. ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal Chem* 72: 2482-2489, 2000
19. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, and Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567, 1999.
20. Stead DA, Preece A, and Brown AJ. Universal metrics for quality assessment of protein identifications by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 5: 1205-1211, 2006.
21. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, and Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74: 5383-5392, 2002.
22. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, and Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 75: 4646-4658, 2003.
23. Molloy MP, Brzezinski EE, Hang J, McDowell MT, VanBogelen RA. Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics*. 3: 1912-1919, 2003.
24. Goodman DS. Plasma retinol-binding protein. *Ann N Y Acad Sci.* 348:378-90, 1980.
25. Raghu P, Sivakumar B. Interactions amongst plasma retinol-binding protein, transthyretin and their ligands: implications in vitamin A homeostasis and transthyretin amyloidosis. *Biochim Biophys Acta.* 1703(1):1-9, 2004.
26. Rayssiguier Y, Alexandre-Gouabau MC, Lyan B, Gueux E, Mazur A, Rock E. Inflammation interferes with the assessment of vitamin A status in magnesium deficiency. *Magnes Res.* 21(4):237-9, 2008.
27. Filteau SM. Vitamin A and the acute phase response. *Nutrition* 15: 326-328, 1999.
28. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhej Univ.* 6B(11):1045-1056, 2005.
29. Werling D, Sutter F, Arnold M, Kun G, Tooten PCJ, Gruys E. Characterisation of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide. *Res. Vet. Sci.* 61:252-257, 1996.
30. Kasapis CMD, Thompson PD, FACC MD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers. A systematic review. *J Am C Cardiol.* 45(10): 1563-9, 2005.
31. Fallon KE, Fallon SK, Boston T. The acute phase response and exercise: court and field sports. *Br J Sports Med.* 35(3):170-3, 2001.

32. Romeo J, Jiménez-Pavón D, Cervantes-Borunda M, Wärnberg J, Gómez-Martínez S, Castillo MJ, Marcos A. Immunological changes after a single bout of moderate-intensity exercise in a hot environment. *J Physiol Biochem.* 64(3):197-204, 2008.
33. Semple SJ, Smith LL, McKune AJ, Hoyos J, Mokgethwa B, San Juan AF, Lucia A, Wadee AA. Serum concentrations of C reactive protein, alpha1 antitrypsin, and complement (C3, C4, C1 esterase inhibitor) before and during the Vuelta a España. *Br J Sports Med.* 40(2):124-7, 2006.
34. Myers RP, Ratziu V, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis: a comparison with historical features in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 97(9):2419-25, 2002.
35. Haralambie G. Serum glycoproteins and physical exercise. *Clin Chim Acta.* 26(2):287-91, 1969.
36. Wassell J. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab.* 46(11-12):547-52, 2000.
37. Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Wiegerinck ET, Swinkels DW, Trinder D. Cumulative effects of consecutive running sessions on hemolysis, inflammation and hepcidin activity. *Eur J Appl Physiol.* (In press) 2009.
38. Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Wiegerinck ET, Swinkels DW, Trinder D. Training Surface and Intensity: Inflammation, Hemolysis, and Heparin Expression. *Med Sci Sports Exerc.* (In press) 2009.
39. Yusof A, Leithauser RM, Roth HJ, Finkernagel H, Wilson MT, Beneke R. Exercise-induced hemolysis is caused by protein modification and most evident during the early phase of an ultraendurance race. *J Appl Physiol.* 102(2):582-6, 2007.
40. Weight LM, Alexander D, Jacobs P. Strenuous exercise: analogous to the acute-phase response? *Clin Sci (Lond).* 81(5):677-83, 1991.
41. Sadrzadeh SM e Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol.* 121 Suppl: S97-104, 2004.
42. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 340(6):448-54, 1999.
43. Tuomainen TP, Loft S, Nyyssönen K, Punnonen K, Salonen JT, Poulsen HE. Body iron is a contributor to oxidative damage of DNA. *Free Radic Res.* 41(3):324-8, 2007.
44. Poortmans JR, Haralambie G. Biochemical changes in a 100 km run: proteins in serum and urine. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1;40(4):245-54, 1979.
45. Healy J, Tipton K. Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm* 114: 777-781, 2007.
46. Abe M. Complement activation and inflammation. *Rinsho Byori.* 54(7):744-56, 2006.
47. Smith JK, Chi DS, Krish G, Reynolds S, Cambron G. Effect of exercise on complement activity. *Ann Allergy.* 65(4):304-10, 1990.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE PROTEÔMICA DE SORO DE RATOS SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO DE INDUÇÃO AO *CONTINUUM* TREINAMENTO-OVERTRAINING

RESUMO

A resposta adaptativa decorrente de um treinamento físico é consequência de um processo intenso de síntese protéica que acontece durante o descanso pós-esforço. Quando o tempo para a recuperação está adequado, observa-se aumento do desempenho. Um processo contínuo de treinamento intensificado sem o tempo de recuperação necessário é denominado *overtraining*. Este pode culminar em basicamente dois estados diferenciados em relação ao desempenho: *overreaching* funcional (FOR), com manutenção ou mesmo melhora de desempenho após o descanso, e *overreaching* não funcional (NFOR), caracterizado pela queda no desempenho por semanas ou meses. Recentemente nosso grupo de pesquisa validou um protocolo de indução ao *continuum* treinamento-*overtraining* que induz os animais aos estados adaptado, FOR e NFOR. O objetivo deste trabalho foi identificar através da análise proteômica as alterações no perfil proteico de soro de ratos submetidos a esse protocolo. As amostras de soro de animais dos grupos controle, treinado, FOR e NFOR foram submetidas à eletroforese bidimensional e os spots diferencialmente abundantes foram identificados através da espectrometria de massas. As principais alterações detectadas foram em proteínas de fase aguda e proteínas envolvidas com o transporte de colesterol. O grupo FOR apresentou aumento das proteínas transferrina, pré-albumina e proteína ligadora de retinol, envolvidas na adaptação mitocondrial. Os animais do grupo FOR também apresentaram aumentos nas concentrações das apolipoproteínas A1 e E. Esse aumento poderia ser um dos mecanismos adaptativos envolvidos na melhora do perfil lipídico em resposta ao treino de *endurance*. Já o grupo NFOR apresentou um quadro inflamatório crônico, com diminuição das proteínas transferrina, pré-albumina e proteína ligadora de retinol. Isso pode representar um prejuízo para a produção de energia, o que explicaria a queda de *performance* nesses animais.

Palavras - Chaves: adaptação, *overtraining*, proteoma, soro, biomarcador, proteínas de fase aguda, apolipoproteína.

INTRODUÇÃO

Um programa ou periodização de treinamento é caracterizado por modulações na intensidade, volume e frequência de esforço, com aplicação de estímulos sucessivos ao longo das semanas. O objetivo é sempre induzir um desequilíbrio na homeostasia do organismo e disparar diversas vias de sinalização intracelular, que irão ativar a transcrição de diversos genes e a subsequente síntese protéica. Ou seja, a resposta adaptativa ao exercício é consequência de um aumento na síntese de diversas proteínas, tanto estruturais quanto metabólicas que irão conferir às células musculares uma melhora na capacidade de produção de energia assim como uma maior resistência à fadiga, gerado pelo próprio treino^{1, 2}.

O treinamento de *endurance* melhora o metabolismo oxidativo, aumenta a utilização de gorduras como fonte de energia, aumenta o volume e número de mitocôndrias (biogênese mitocondrial), converte fibras rápidas em fibras lentas, melhora a capilarização e trocas gasosas, além de aumentar a captação de glicose pela musculatura. Melhora ainda o perfil lipídico^{3,4,5}.

As principais vias de sinalização envolvidas no processo adaptativo decorrente do treinamento de *endurance* estão relacionadas à ativação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK), proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e proteínas dependentes de cálcio (como calmodulina quinase e calcineurina)^{6,7,8,9}. Todas essas vias são estimuladas durante o exercício e permanecem ativadas por poucas horas (2-3 horas) após o término da atividade. Já o processo de síntese protéica pode permanecer estimulado por mais de 24 horas, sendo influenciado em grande parte pela disponibilidade de nutrientes^{1,10}. Assim, para que a resposta adaptativa seja positiva é necessário um tempo de recuperação adequado.

Um processo contínuo de treinamento intensificado sem o tempo de recuperação necessário é denominado *overtraining* (OT). De acordo com a proposta do *European College of Sports Science* o OT pode culminar em basicamente dois estados diferenciados em relação ao desempenho: *overreaching* funcional (FOR), com manutenção ou mesmo melhora de desempenho após o descanso, e *overreaching* não funcional (NFOR), caracterizado pela queda no desempenho por semanas ou meses¹¹. O estado NFOR pode vir acompanhado de alterações metabólicas, fisiológicas, imunológicas e comportamentais, o que torna a diferenciação entre este estado e a *síndrome do overtraining* bastante difícil^{12,13}. Recentemente nosso grupo de pesquisa validou um protocolo de indução ao *continuum* treinamento-*overtraining* que induz os animais aos estados adaptado, FOR e NFOR¹⁴.

A análise proteômica permite separar, quantificar e identificar em larga escala o perfil proteico de tecidos e fluidos biológicos, possibilitando uma visão mais global do que está ocorrendo em diferentes situações fisiológicas¹⁵. Poucos trabalhos até o momento aplicaram a

análise proteômica com intuito de investigar as alterações desencadeadas pelo treinamento físico^{16,17,18}.

Boluyt e colaboradores¹⁶ verificaram as mudanças no proteoma cardíaco de ratos submetidos a seis semanas de treinamento intervalado em esteira. Burniston^{17,18} estudou a alteração no perfil proteico do músculo plantar e do músculo cardíaco de ratos submetidos a um treinamento de *endurance* a 70-75% VO_{2max} com duração de 30 minutos e quatro sessões de treino por semana por um período de 5 semanas. Entretanto, o estudo das alterações no perfil proteico do soro decorrentes de um processo adaptativo e no *overtraining* na tentativa de se identificar possíveis biomarcadores para estas situações ainda não foi investigado.

O objetivo do presente trabalho foi verificar através da análise proteômica, a alteração do perfil proteico de soro de ratos submetidos a um protocolo de indução a um *continuum* treinamento-*overtraining*. A associação dos estados FOR e NFOR com a análise do perfil proteico em sangue pode contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesses processos

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 26 ratos machos da linhagem Wistar, adquiridos do Centro de Bioterismo da UNICAMP alimentados com ração e água *ad libitum*. Durante o período de experimento os animais foram mantidos em ambiente com a temperatura controlada entre 18 e 22°C e fotoperíodo de 12 horas com ciclo de luz claro-escuro invertido. Todo o procedimento adotado neste trabalho teve a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP – protocolo 638-1 (anexo).

Protocolo de Treinamento

O protocolo de treinamento foi realizado em esteira rolante de acordo com estudos prévios do nosso laboratório¹⁴.

Todos os animais, com 45 dias de vida, foram submetidos a duas semanas de adaptação à esteira que consistiu de uma sessão de treino ao dia durante 5 dias a uma velocidade de 12m/min por 10 minutos. Após esta fase, os animais que não eram aptos a correr foram excluídos (n=5), 6 animais constituíram o grupo controle (CT) e os demais foram submetidos ao treinamento (n=15).

O treinamento consistiu de um protocolo com o intuito de induzir os ratos a um *continuum* Treinamento - *Overtraining* com duração total de 11 semanas com 5 sessões de treino por

semana. Da primeira à quarta semana houve um aumento progressivo da intensidade e volume de treino com apenas uma sessão ao dia e 24 horas de recuperação entre os treinos. Da quinta à oitava semana houve uma manutenção da intensidade e volume atingidos na quarta semana, com uma sessão de treino ao dia e 24 horas de recuperação entre as sessões. Da nona à décima primeira semana manteve-se o volume e intensidade de treino, aumentando-se o número de sessões de treino para 2, 3 e 4 sessões/dia e diminuindo-se o tempo de recuperação entre as sessões para 4, 3 e 2 horas respectivamente, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Protocolo de Treinamento Contínuo em Esteira.

Semana	Velocidade (m/min)	Tempo (min)	Número de sessões diárias	Tempo de recuperação entre as sessões
1^a	15	20	1	24 horas
2^a	20	30	1	24 horas
3^a	22,5	45	1	24 horas
4^a	25	60	1	24 horas
5^a a 8^a	25	60	1	24 horas
9^a	25	60	2	4 horas
10^a	25	60	3	3 horas
11^a	25	60	4	2 horas

Os animais do grupo controle (n=6) foram colocados na esteira três vezes por semana a uma velocidade de 12m/min por 10 minutos durante todo o período de treino. Desta maneira, estes animais sempre tinham um contato com a esteira, pois também seriam submetido ao teste de *performance* ao longo do treinamento.

Cronograma dos Testes de Performance

Todos os testes de *performance* foram realizados 60 horas após a última sessão de treino. Consistiram do protocolo incremental de exercício até a exaustão descrito anteriormente no Capítulo 2. A *performance* dos animais foi determinada a partir do cálculo do trabalho mecânico realizado pelos mesmos¹⁴.

Ao todo foram realizados 6 testes de *performance*: no momento inicial, após a quarta, oitava, nona, décima e décima primeira semana de treino. Ao final, os animais que participaram do treinamento foram divididos nos seguintes grupos: treinado (T, n=6), *overreaching funcional* (FOR, n=5) e *overreaching não-funcional* (NFOR, n=4). Todos os grupos foram sacrificados 60 horas após a realização do teste de *performance*, sendo que os animais dos grupos controle e T

foram sacrificados após a nona semana, e os animais dos grupos FOR e NFOR foram sacrificados após a décima primeira semana.

Separação dos grupos FOR e NFOR

A separação dos grupos FOR e NFOR foi feita a partir da análise dos dados de *performance* nos testes após a nona, décima e décima primeira semana de treinamento, conforme proposto por Hohl e colaboradores¹⁴. Esses autores propuseram a análise do coeficiente angular da reta obtida com os valores de *performance* das três últimas semanas de treino. O valor de corte de $\alpha = -15,05$ Kg.m utilizado para separação dos grupos FOR e NFOR foi determinado a partir dos dados de *performance* de um grupo de animais controle ($n=8$) considerando a média do trabalho realizado (-3.26 Kgm) menos um desvio padrão (11.79Kgm). Ou seja, os animais que melhoraram seu desempenho apresentaram $\alpha \geq -15,05$ Kg.m, sendo selecionados para o grupo FOR ($n=5$). Os animais que pioraram seu desempenho apresentaram $\alpha \leq -15,05$ Kg.m, sendo selecionados para o grupo NFOR ($n=4$). A Tabela 2 mostra os valores dos coeficientes angulares dos animais de cada grupo.

Tabela 2: Valores dos coeficientes angulares obtidos para cada animal a partir dos dados de *performance* na nona, décima e décima primeira semana.

Animais	Coefficiente Angular
FOR 1	25.5
FOR 2	78.5
FOR 3	61.5
FOR 4	28.5
FOR 5	-10.5
NFOR 1	-33
NFOR 2	-57
NFOR 3	-140.5
NFOR 4	-49

Obtenção das proteínas diferencialmente expressas:

Todo o procedimento adotado na coleta de sangue, preparação das amostras de soro, eletroforese bidimensional, análises estatísticas e identificação das proteínas diferencialmente expressas seguiram os mesmos procedimentos descritos no capítulo 2 deste trabalho.

RESULTADOS

Análise da Performance e Massa Corporal

A Figura 1 apresenta os valores do trabalho realizado no teste de *performance* pelos animais dos grupos CT, T, FOR e NFOR no momento inicial, após a quarta, oitava, nona, décima e décima primeira semanas.

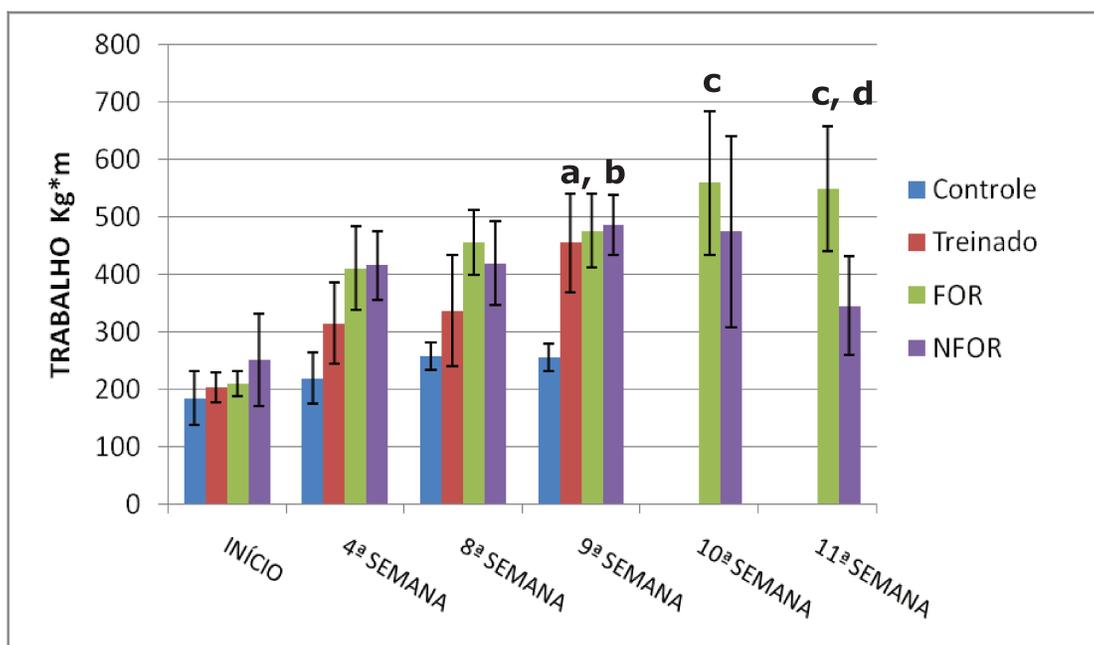


Figura 1. Média e desvio padrão do trabalho realizado no teste de *performance* pelos grupos CT, T, FOR e NFOR no início do treinamento, após a quarta, oitava, nona, décima e décima primeira semana de treino. a – diferença em relação ao grupo CT ($p < 0.05$); b – diferença do grupo em relação ao momento inicial ($p < 0.05$); c – diferença do grupo em relação ao momento inicial ($p < 0.01$); d – diferença em relação ao grupo NFOR na décima primeira semana ($p < 0.05$).

Podemos observar que todos os grupos apresentaram um aumento progressivo da *performance* no decorrer das semanas de treino. Até a nona semana não houve diferenças entre a *performance* dos grupos T, FOR e NFOR. Na décima semana o grupo FOR continuou aumentando seu desempenho enquanto o grupo NFOR apresentou uma queda no rendimento. Na décima primeira semana o grupo FOR apresentou manutenção do rendimento em relação à semana anterior, com desempenho significativamente maior em relação ao grupo NFOR, que continuou com desempenho em queda.

A Tabela 3 apresenta os valores médios da massa corporal dos ratos dos grupos CT, T, FOR e NFOR no momento inicial, após a quarta, oitava, nona, décima e décima primeira semanas de treino.

Tabela 3: Média e desvio padrão da massa corporal (gramas) dos grupos CT, T, FOR e NFOR durante as 11 semanas de treino. a – diferença em relação a CT e T no momento inicial ($p < 0.05$); b – diferença do grupo em relação ao momento inicial ($p < 0.05$).

Grupo	Início		4ª Semana		8ª Semana		9ª Semana		10ª Semana		11ª Semana	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Controle	290.83	25.16	382.79	32.68	414.66 ^b	36.05	416.46 ^b	38.79				
Treinado	293.17	23.07	351.99	26.88	386.73 ^b	25.27	380.71 ^b	24.00				
FOR	331.16	19.09	386.07	20.07	394.86 ^b	34.06	400.53	23.63	392.39	31.91	383.64	18.38
NFOR	351.30 ^a	22.62	394.53	23.58	401.67	26.34	412.31	12.15	405.92	18.41	385.77	24.20

Podemos observar que todos os grupos ganharam massa desde o início do treinamento até a nona semana de treino. Os animais dos grupos FOR e NFOR tiveram uma perda de massa corporal (não significativa), de 17 e 60 gramas, respectivamente a partir da 9ª semana.

Análise do Perfil Proteico do Soro dos Ratos CT, T, FOR e NFOR:

A Figura 2 apresenta o perfil dos géis bidimensionais obtidos para as amostras de soro dos ratos na fração sem IgGs e sem albumina (A) e na fração sem IgGs e com albumina (B).

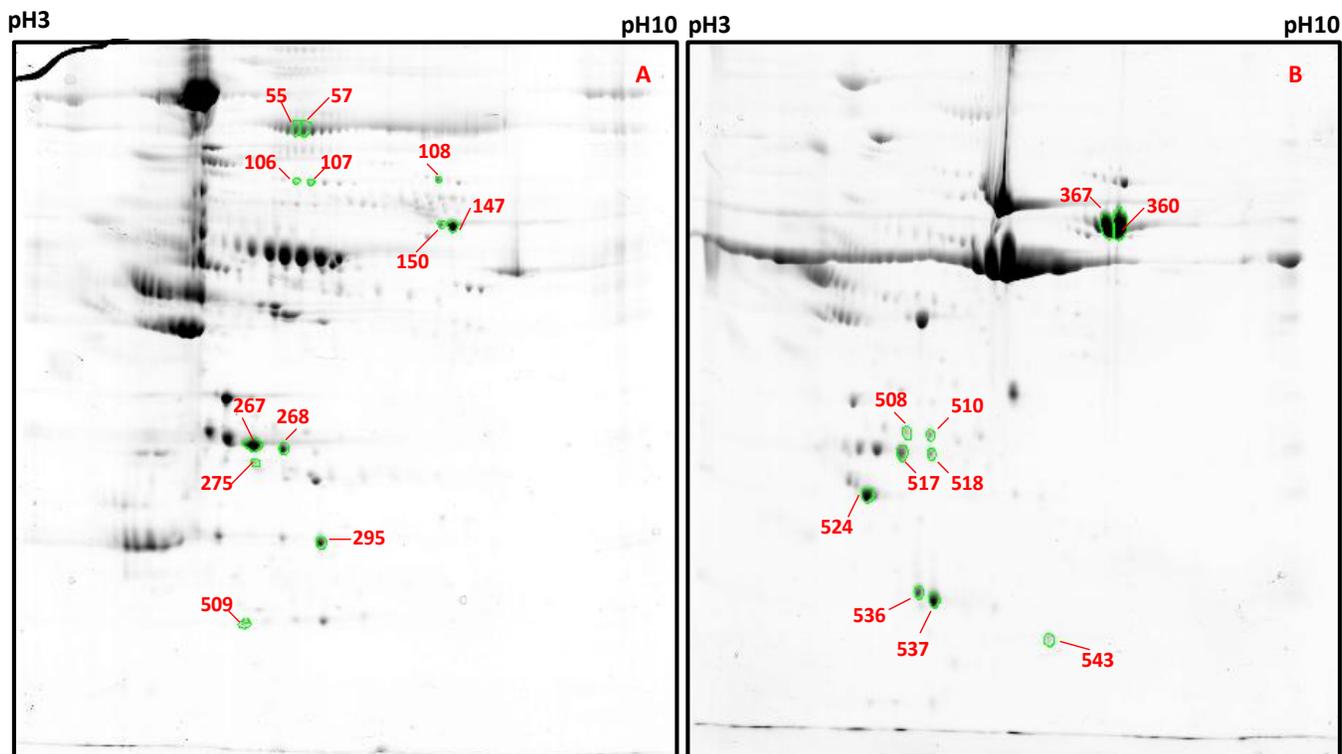


Figura 2. Gel bidimensional (pH 3-10; 12% com 300 µg de proteínas corado com comassie blue colloidal) de uma das amostras de soro de rato treinado, representativo dos géis obtidos nos grupos. A- Fração sem albumina e sem IgGs. B – Fração sem IgGs e com albumina. Os números representam o SPOT ID das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos.

Foram analisados 65 spots na fração sem albumina e sem IgGs (A) e 35 spots na fração sem IgGs e com albumina (B). O coeficiente de variação do volume relativo dos spots dos quatro grupos foi inferior a 30%. Esta variação representa tanto a variação experimental quanto a variação biológica e se apresenta dentro da faixa de 20-30% já descrita na literatura para análise proteômica¹⁹.

Do total de spots analisados foram detectados, respectivamente 12 e 10 proteínas diferencialmente expressas na fração sem albumina e IgGs e na fração sem IgGs e com albumina. As proteínas identificadas através da espectrometria de massas representam proteínas de fase aguda envolvidas no processo inflamatório como alfa-1-macroglobulina, haptoglobina, fator de complemento 3, fator de complemento B, transferrina, e proteínas com função de transporte apolipoproteína A1 e apolipoproteína E, proteína ligadora de retinol e pré-albumina.

Respostas das Proteínas de Fase Aguda

A Figura 3 mostra o boxplot referente ao volume relativo dos spots 55, 57, 267 e 268 na fração sem IgG e sem albumina (Figura 2A) e 508 e 510 da fração sem IgG e com albumina (Figura 2B) identificados como a proteína alfa-1-macroglobulina.

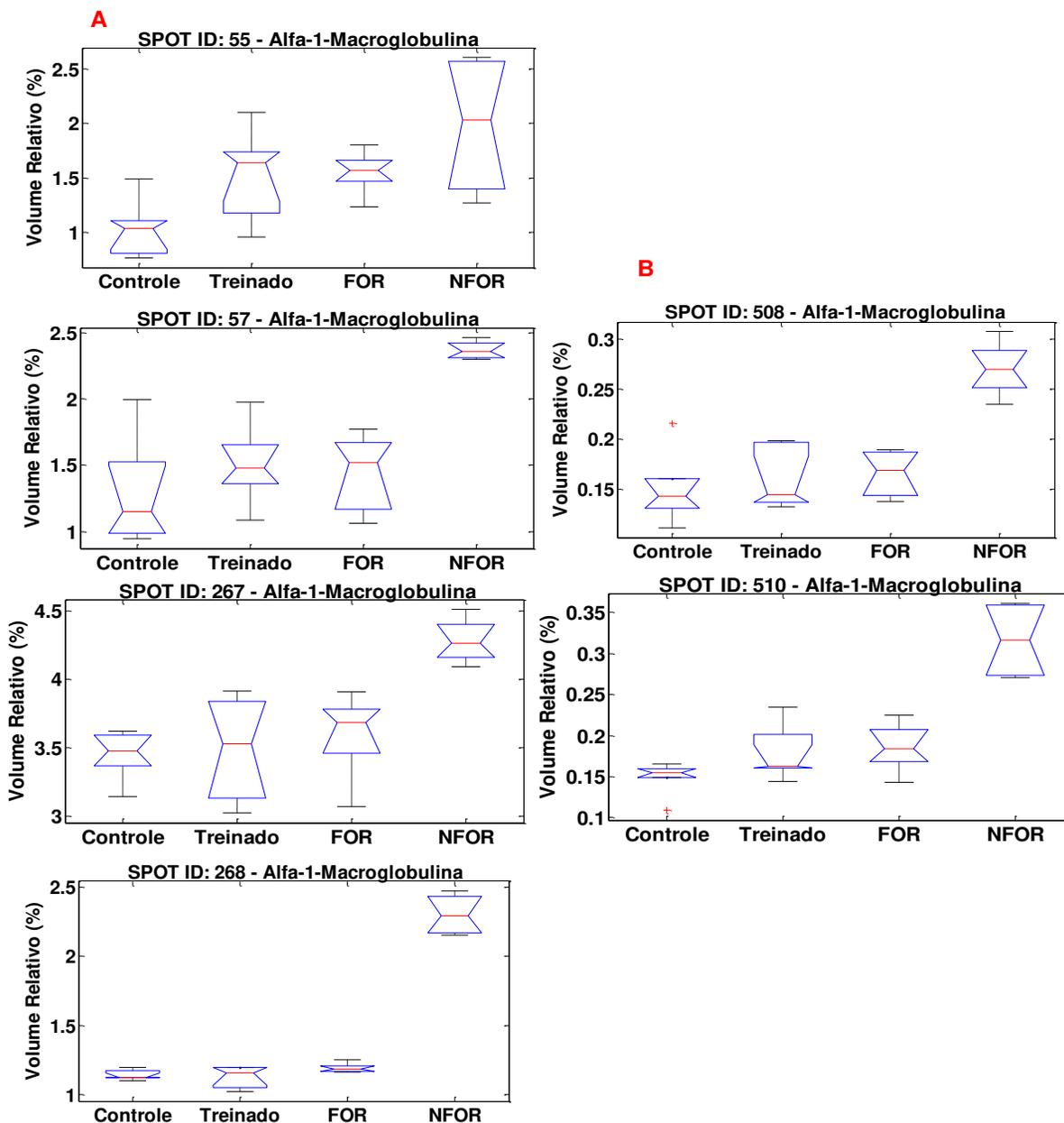


Figura 3. Boxplot do volume relativo dos spots 55, 57, 267, 268 (3A – fração sem albumina: figura 2A), 508 e 510 (3B – fração com albumina: figura 2B) identificados como alfa 1 macroglobulina. Para os spots 55, 57, 267, 268, 508, 510, grupo NFOR estatisticamente diferente do grupo controle. Para o spot 268, NFOR estatisticamente diferente em relação ao grupo treinado.

Não houve diferenças significativas nos spots analisados na expressão da alfa-1-macroglobulina entre os grupos CT, T e FOR. Nos spots 57, 267, 268, 508 e 510 os valores encontravam-se bem próximos. O spot 55 apresentou uma tendência de aumento nos grupos T e FOR, em relação ao grupo CT.

Já o grupo NFOR apresentou aumento da expressão da alfa-1-macroglobulina em todos os spots, sendo que os spots 55, 57, 267, 268, 508 e 510 foram significativamente diferentes em relação ao grupo CT, e o spot 268 foi significativamente diferente também em relação ao grupo T.

A Figura 4 mostra o boxplot referente ao volume relativo dos spots 275 na fração sem IgGs e sem albumina (Figura 2A) e 517 e 518 da fração sem IgGs e com albumina (Figura 2B), identificados como sendo a proteína haptoglobina.

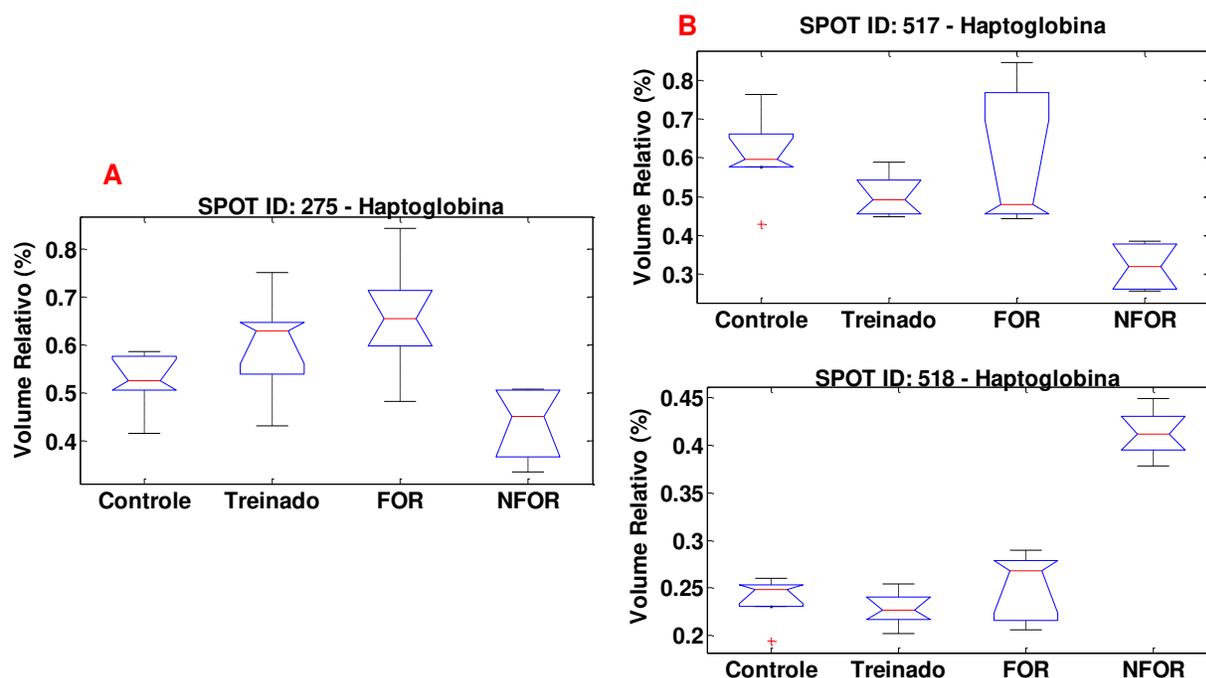


Figura 4. Boxplot do volume relativo dos spots 275 (4A – fração sem albumina: figura 2A), 517 e 518 (4B – fração com albumina: figura 2B) identificados como haptoglobina. Para o spot 275, NFOR estatisticamente diferente do grupo FOR. Para o spot 517, NFOR estatisticamente diferente do grupo controle. Para o spot 518, NFOR estatisticamente diferente do grupo treinado.

Somente o grupo NFOR apresentou uma diminuição significativa na expressão da haptoglobina nos spots 275 e 517 em relação ao grupo FOR e CT, respectivamente. Por outro lado, o spot 518 do grupo NFOR apresentou um aumento significativo desta proteína em relação ao grupo T.

A Figura 5 mostra o boxplot referente ao volume relativo dos spots 147 e 150 na fração sem IgGs e sem albumina (Figura 2A) e 360 e 367 da fração sem IgGs e com albumina (Figura 2B), identificados como sendo a proteína transferrina.

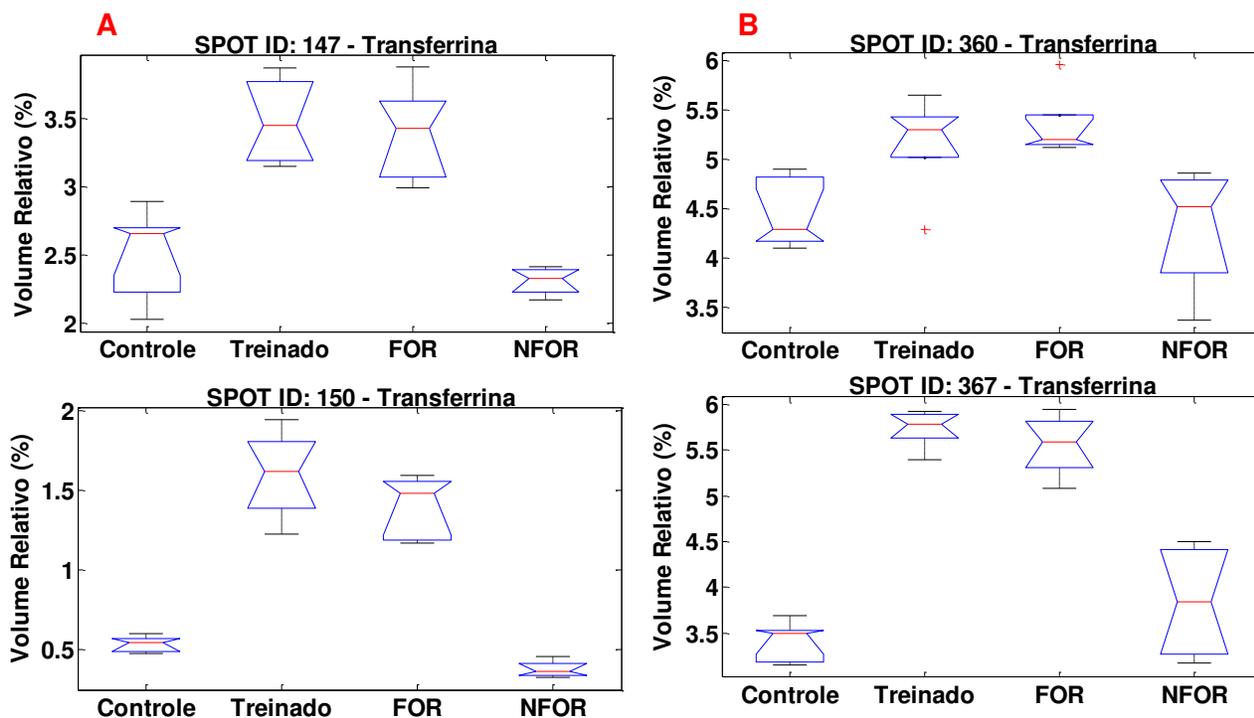


Figura 5. Boxplot do volume relativo dos spots 147, 150 (5A – fração sem albumina: figura 2A), 360 e 367(5B – fração com albumina: figura 2B) identificados como transferrina. Para o spot 147, grupo treinado e FOR estatisticamente diferente do grupo controle e NFOR. Para os spots 150, 360 e 367 grupo treinado e FOR estatisticamente diferente do grupo controle.

Os grupos de animais T e FOR apresentaram aumento significativo na expressão da transferrina quando comparados aos grupos CT e NFOR.

A Figura 6 mostra o boxplot referente ao volume relativo dos spots 106, 107 e 108, identificados como fator de complemento B, e do spot 295, identificados como fator de complemento 3 presentes na fração sem IgGs e sem albumina (Figura 2A).

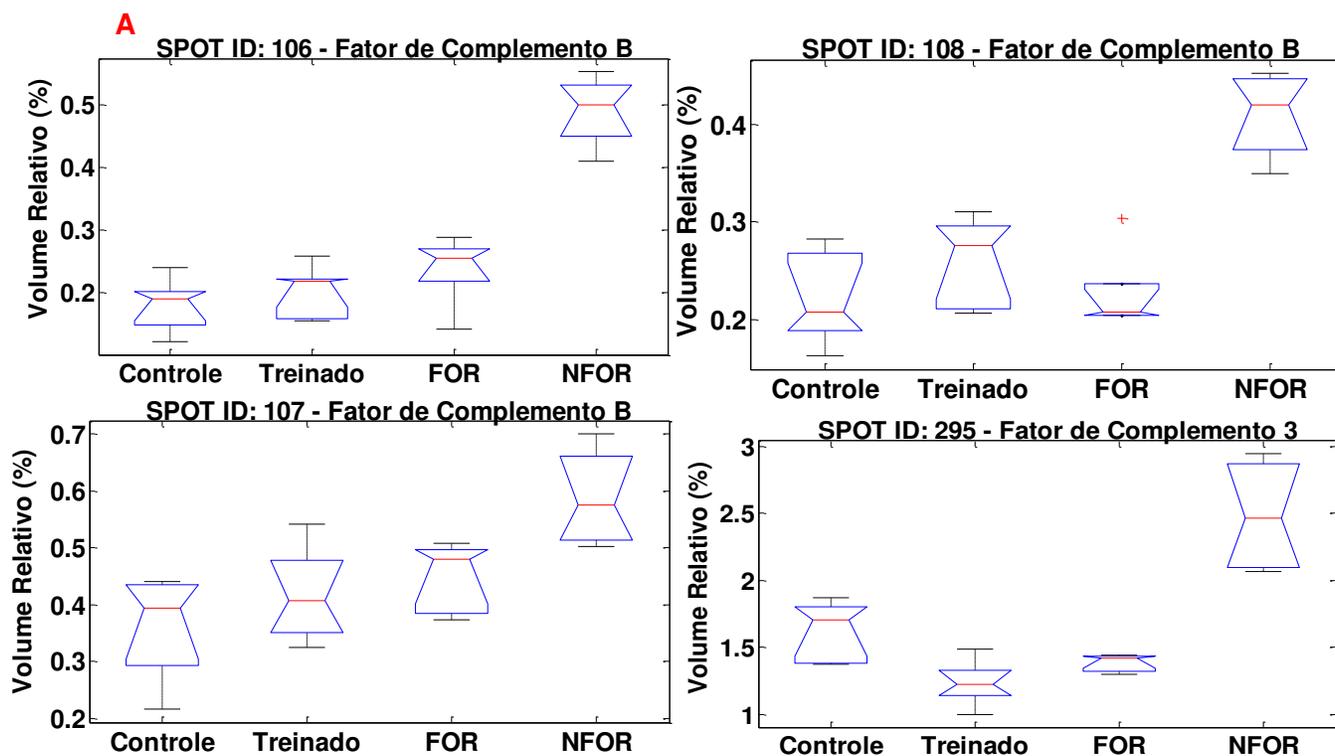


Figura 6. Boxplot do volume relativo dos spots 106, 107 e 108 identificados como fator de complemento B e do spot 295 identificado como fator de complemento 3, presentes na fração sem albumina (figura 2A). Para os spots 106, 107 e 108, NFOR estatisticamente diferente do grupo controle. Para o spot 108, NFOR estatisticamente diferente do grupo FOR. Para o spot 295, NFOR estatisticamente diferente do grupo treinado.

Os spots correspondentes ao fator de complemento B apresentaram aumento significativo no grupo NFOR quando comparado ao grupo controle. O spot identificado como fator de complemento 3 apresentou aumento significativo no grupo NFOR em relação ao grupo treinado.

Proteínas ligadas ao transporte

A Figura 7 mostra o boxplot referente ao volume relativo do spot 509, identificado como pré albumina, e do spot 543, identificado como proteína ligadora de retinol presentes na fração sem IgGs e sem albumina (Figura 1A) e sem IgGs e com albumina (Figura 2B), respectivamente.

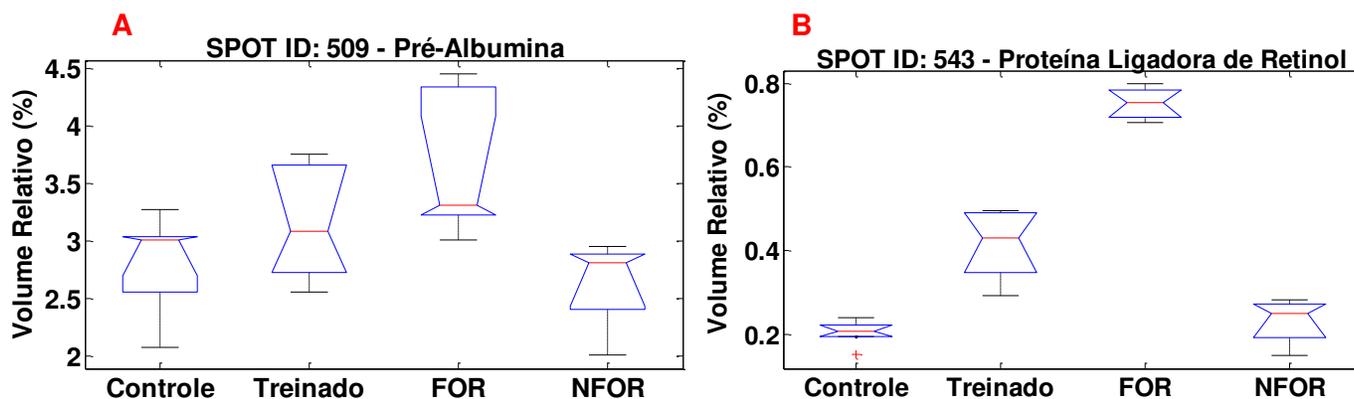


Figura 7. Boxplot do volume relativo do spot 509 identificado como pré-albumina (7A – fração sem albumina: figura 2A) e do spot 543 identificado como Proteína ligadora de retinol (7B – fração com albumina: figura 2B). Para o spot 543, FOR estatisticamente diferente do grupo controle e NFOR. Para o spot 509, FOR estatisticamente diferente do grupo NFOR.

Observamos um aumento significativo na concentração da proteína ligadora de retinol no grupo FOR quando comparado com o grupo CT e NFOR. Para a pré-albumina, o grupo FOR apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo NFOR.

Proteínas ligadas ao transporte de colesterol

A Figura 8 mostra o boxplot referente ao volume relativo dos spots 536 e 537, identificados como apolipoproteína A1 e do spot 524, identificado como apolipoproteína E na fração sem IgG e com albumina (Figura 2B).

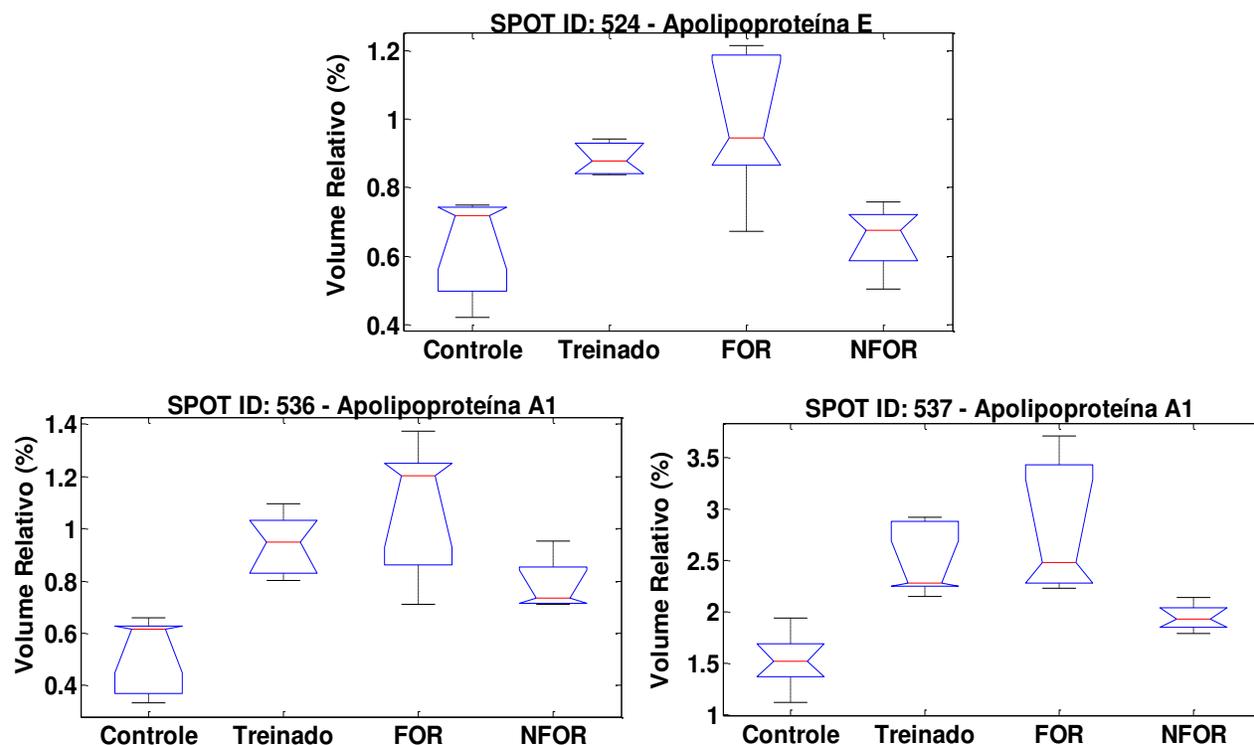


Figura 8. Boxplot do volume relativo do spot 524 identificado como apolipoproteína E e dos spots 536 e 537 identificados como apolipoproteína A1, presentes na fração com albumina (figura 2B). Para os spots 524, 536 e 537, FOR estatisticamente diferente do grupo controle. Para o spot 537, grupo treinado estatisticamente diferente do grupo controle.

Observamos um aumento significativo na expressão da apolipoproteína E no grupo FOR em relação ao grupo CT. Para o grupo NFOR foi observada uma diminuição desta proteína quando comparado com os grupos T e FOR, porém sem diferença estatística.

Para a apolipoproteína A1, em ambos os spots, observamos um aumento na sua expressão no grupo T, sendo significativo apenas para o spot 537. O grupo FOR, em ambos os casos, apresentou um aumento significativo em relação ao grupo CT. Ao contrário, o grupo NFOR mostrou uma tendência de queda quando comparado ao grupo T e FOR.

A Tabela 4 apresenta um resumo do comportamento das proteínas diferencialmente expressas no soro dos ratos dos grupos treinado, FOR e NFOR.

Tabela 4: Alteração da concentração das proteínas no soro dos animais dos grupos treinado, FOR e NFOR.

PROTEÍNA	FUNÇÃO	CONCENTRAÇÃO NO SORO	
		Grupo T e FOR	Grupo NFOR
Alfa-1-Macroglobulina	PFAP; Atua inibindo proteases.	Não se altera	Aumentada
Haptoglobina	PFAP; ação antioxidante; liga-se à hemoglobina para evitar perda de ferro.	Não se altera	(1 spot) Aumentada (2 spots) Diminuída
Fator de Complemento B	Amplificação do processo inflamatório	Não se altera	Aumentada
Fator de Complemento 3	Amplificação do processo inflamatório	Não se altera	Aumentada
Transferrina	Transporte de ferro.	Aumentada	Diminuída
Proteína Ligadora de Retinol	Transporte de vitamina A	Aumentada	Diminuída
Pré-Albumina	Transporte de hormônio da tireóide.	Aumentada	Diminuída
Apolipoproteína A1	Apolipoproteína do HDL	Aumentada	Diminuída
Apolipoproteína E	Apolipoproteína do HDL, VLDL e LDL	Aumentada	Diminuída

PFAP = proteína de fase aguda positiva; HDL = lipoproteína de alta densidade; LDL = lipoproteína de baixa densidade; VLDL = lipoproteína de muito baixa densidade.

As Tabelas 5 e 6 mostram os dados referentes à identificação das proteínas pelas técnicas de PMF e MS/MS nas frações sem albumina e com albumina respectivamente. A Figura 9 apresenta os espectros MS/MS obtidos para a proteína alfa-1-macroglobulina (spot 267).

Tabela 5: Parâmetros referentes à identificação das proteínas por PMF e MS/MS na fração sem albumina.

Spot ID	Nome da Proteína	Gi	PMF Score (>70)	TIC (%)	Protein Score (>66)	Peptídeos identificados por MS/MS	Modificação	Mr Peptídeo Esperado	Mr Peptídeo Calculado	Mascot Ion Score	Massa Teórica (KDa)	Massa Observada (KDa)	pI Teórico	pI Observado
147	Transferrina	61556986	212	88,8	171	KPVTEFATcHLAQAPNHVVVSR KQVDQYEDcYLAR LYLGHSYVTAIR LPEGTTYEEYLGAEYLQAVGNIR ASDSSINWNNLK GDKDcTGNFcLFR WcALSHQER ADRDQYELLcLDNTR	C(+57) C(+57) 2 x C(+57) C(+57) C(+57)	2461,4036 1656,8356 1392,8186 2586,4100 1348,7048 1589,7483 1186,5875 1881,9619	2460,3958 1655,8278 1391,8108 2585,4020 1347,6970 1588,7405 1185,5797 1880,9541	91,93 67,18 81,27 58,74 45,49 79,24 67,13 57,02	76.396	76.987	7,1	7,05
150	Transferrina	1854476	175	78,4	185	LPEGTTYEEYLGAEYLQAVGNIR KQVDQYEDcYLAR KPVTEFATcHLAQAPNHVVVSR LYLGHSYVTAIR GDKDcTGNFcLFR ASDSSINWNNLK DcTGNFcLFR WcALSHQER	C(+57) C(+57) 2 x C(+57) 2 x C(+57) C(+57)	2586,3884 1656,8351 2461,3916 1392,8158 1589,7488 1348,7058 1289,5967 1186,5890	2585,3806 1655,8273 2460,3838 1391,8080 1588,7410 1347,6980 1288,5889 1185,5812	60,07 66,57 51,27 75,42 61,95 46,46 63,58 51,80	76.365	77.163	6,9	6,8
509	Pré - Albumina	136467	115	79,8	109	TADGSWEFPFASGK ALGISPFHEYAEVVFTANDSGHR		1352,6566 2517,3318	1351,6488 2516,3240	70,93 109,98	15.720	13.849	5,8	5,7
275	Haptoglobina	60097941	176	79,8	105	ScAVAEYGVVVR	C(+57)	1373,7100	1372,7021	60,33	38.564	38.099	6,1	5,8
106	Fator de Complemento B	14902799	148	70,4	111	WDGQTAIcDDGAGYcPNPGIPIGTR AEGISEFYDYDVALIK	2 x C (+57)	2691,2861 1832,9558	2690,2783 1831,9480	58,09 53,76	82.534	86.568	6,1	5,8
107	Fator de Complemento B	14902799	145	67,1	129	AEGISEFYDYDVALIK STGSWSVLQTR		1832,9453 1221,6487	1831,9375 1220,6409	47,09 50,42	82.534	86.671	6,1	5,9
108	Fator de Complemento B	47059181	166	68,0	124	KAEGISEFYDYDVALIK LEDTVTYHcSR	C(+57)	1961,0248 1380,6511	1960,0170 1379,6433	44,55 42,96	85.120	87.021	6,6	6,7
295	Fator de Complemento 3	15813861	182	50,8	110	SGIPIVTSPYQIHFTK NVDGTAFVIFGVQDEDKK TVVIVIETPDGVPIKR VELKPGDNLNVNFHLR TIYTPGSTVFYR		1788,0554 1982,0895 1736,1167 1865,0980 1404,8500	1787,0476 1981,0817 1735,1089 1864,0902 1403,7772	64,90 93,85 68,40 93,85 87,97	187.930	21.159	9,1	6,2

Tabela 5: continuação.

Spot ID	Nome da Proteína	Gi	PMF Score (>70)	TIC (%)	Protein Score (>66)	Peptídeos identificados por MS/MS	Modificação	Mr Peptídeo Esperado	Mr Peptídeo Calculado	Mascot Ion Score	Massa Teórica (KDa)	Massa Observada (KDa)	pI Teórico	pI Observado
55	Alfa-1-macroglobulina	81872093	—	—	216	AESPVFVQTDKPIYKPGQTVK QLNYQHSDGSYSTFGDR IHFLLNEDALK		2332,3490 1974,9629 1312,7568	2331,3413 1973,9551 1311,7490	64,59 54,79 52,14	168.480	165.211	6,5	5,9
57	Alfa-1-macroglobulina	81872093	—	—	73	QLNYQHSDGSYSTFGDR GSIFNSGSHVLPLEQGK IHFLLNEDALK AEQGAYLGPLPYK		1974,9403 1769,9795 1312,7703 1406,7808	1973,9325 1768,9717 1311,7625 1405,7730	88,41 51,08 59,92 46,80	168.480	165.211	6,5	5,9
267	Alfa-1-macroglobulina	81872093	—	—	197	YNILPEAEGEAPFTLK TEVNTNHVLIYIEK mVSGFIPVKPSVK VNTLPLNFDK	O (+16)	1791,9724 1672,9369 1404,8218 1160,6549	1790,9646 1671,9291 1403,8140 1159,6471	68,12 57,41 49,98 51,11	45.000	42.877	6,5	5,8
268	Alfa-1-macroglobulina	81872093	—	—	106	YNILPEAEGEAPFTLK TEVNTNHVLIYIEK VSGSGcVYLQTSLK QQNSHGGFSSTQDTVVALQALSK VNTLPLNFDK	C (+57)	1791,9567 1672,9254 1498,7853 2403,2593 1160,6504	1790,9489 1671,9176 1497,7775 2402,2515 1159,6426	75,27 59,03 50,19 66,96 42,94	45.000	43.340	6,5	5,9

Spot ID - identificação do spot no gel (Figura 2 A); **Gi** - número de acesso da proteína no banco de dados do NCBI; **PMF Score** - parâmetro proposto por Stead 2006²⁰ que indica a fidedignidade da identificação; **TIC** - Percentagem da corrente iônica total dos peptídeos que deram *match* na análise por PMF; **Protein Score** - parâmetro do software Mascot que representa confiança de $p < 0.05$ na identificação da proteína; **Massa molecular teórica (Mr Teórica) e pI teórico (pI Teórico)** valores obtidos do banco de dados; **Massa molecular observada (Mr observada) e pI observado (pI observado)** - valores obtidos através da análise de imagem. * proteína não identificada pelo programa MS-FIT.

Tabela 6: Parâmetros referentes à identificação das proteínas por PMF e MS/MS na fração com albumina.

Spot ID	Nome da Proteína	Gi	PMF Score (>70)	TIC (%)	Protein Score (>66)	Peptídeos identificados por MS/MS	Modificação	Mr Peptídeo Esperado	Mr Peptídeo Calculado	Mascot Ion Score	Massa Teórica (KDa)	Massa Observada (KDa)	pI Teórico	pI Observado
543	Proteína Ligadora de Retinol	158187535	80	64,2	113	LQNLDTGcADSYSFVFSR FSGLWYAIK	C(+57)	2080,0090 1155,6459	2079,0012 1154,6381	120,39 54,43	23.220	23.894	5,7	6,5
367	Transferrina	61556986	212	88,8	171	KPVTEFATcHLAQAPNHVVSR KQVDQYEDcYLAR LYLGHSYVTAIR LPEGTTYEEYLGAEYLQAVGNIR ASDSSINWNNLK GDKDcTGNFclFR WcALSHQER ADRDQYELLcLDNTR	C(+57) C(+57) 2 x C(+57) C(+57) C(+57)	2461,4036 1656,8356 1392,8186 2586,4100 1348,7048 1589,7483 1186,5875 1881,9619	2460,3958 1655,8278 1391,8108 2585,4020 1347,6970 1588,7405 1185,5797 1880,9541	91,93 67,18 81,27 58,74 45,49 79,24 67,13 57,02	76.396	76.987	7,1	7,05
360	Transferrina	61556986	170	88,3	207	LPEGTTYEEYLGAEYLQAVGNIR KQVDQYEDcYLAR GDKDcTGNFclFR LYLGHSYVTAIR WcALSHQER	C(+57) 2 x C (+57) C(+57)	2586,3477 1656,8074 1589,7224 1392,7959 1186,5669	2585,3398 1655,7996 1588,7146 1391,7881 1185,5591	58,3 58,11 45,81 47,81 50,49	76.396	76.226	7,1	7,2
518	Haptoglobina	60097941	144	83,6	118	ScAAVEYGVYVR	C (+57)	1373,6765	1372,6687	63,87	38.564	38.387	6,1	5,9
517	Haptoglobina	60097941	161	86,5	113	ScAAVEYGVYVR	C(+57)	1373,7100	1372,7021	60,33	38.564	38.099	6,1	5,8
524	Apolipoproteína E	37805241	142	58,0	68	LQAEIFQAR ELEEQLGPVAEETR NEVNTmLGQSTEELR	O (+16)	1075,6372 1599,8555 1736,8904	1074,6294 1598,8477 1735,8826	47,99 102,79 46,24	35.764	34.604	5,2	5,5
536	Apolipoproteína A1	6978515	155	47,2	68	WNEEVEAYR FGLYSDQMR QLNLNLLDNWDTLGSTVGR		1195,5880 1116,5597 2129,1758	1194,5802 1115,5519 2128,1680	45,08 53,11 57,43	30.062	28.423	5,5	5,8
537	Apolipoproteína A1	6978515	136	64,2	77	QLNLNLLDNWDTLGSTVGR WNEEVEAYR		2129,1550 1195,5803	2128,1472 1194,5725	53,28 64,42	30.062	27.989	5,5	5,9
508	Alfa-1-macroglobulina	81872093	—	—	88	YNILPEAEGEAPFTLK TEVNTNHVLIYIEK mVSGFIPVKPSVK VNTLPLNFDK	O (+16)	1791,9724 1672,9369 1404,8218 1160,6549	1790,9646 1671,9291 1403,8140 1159,6471	68,12 57,41 49,98 51,11	45.000	42.877	6,5	5,8

Tabela 6: continuação.

Spot ID	Nome da	Gi	PMF	TIC	Protein	Peptídeos identificados	Modificação	Mr Peptídeo	Mr Peptídeo	Mascot Ion	Massa	Massa	pI	pI
510	Alfa-1-macroglobulina	81872093	—	—	81	YNILPEAEGEAPFTLK TEVNTNHVLIYIEK VSGSGcVYLQTSLK QQNSHGGFSSTQDTVVALQALSK VNTLPLNFDK	C (+57)	1791,9567 1672,9254 1498,7853 2403,2593 1160,6504	1790,9489 1671,9176 1497,7775 2402,2515 1159,6426	75,27 59,03 50,19 66,96 42,94	45.000	43.340	6,5	5,9

Spot ID - identificação do spot no gel (Figura 2 B); **Gi** - número de acesso da proteína no banco de dados do NCBI; **PMF Score** - parâmetro proposto por Stead 2006²⁰ que indica a fidedignidade da identificação; **TIC** - Percentagem da corrente iônica total dos peptídeos que deram *match* na análise por PMF; **Protein Score** - parâmetro do software Mascot que representa confiança de $p < 0.05$ na identificação da proteína; **Massa molecular teórica (Mr Teórica) e pI teórico (pI Teórico)** valores obtidos do banco de dados; **Massa molecular observada (Mr observada) e pI observado (PI observado)** - valores obtidos através da análise de imagem. * proteína não identificada pelo programa MS-FIT.

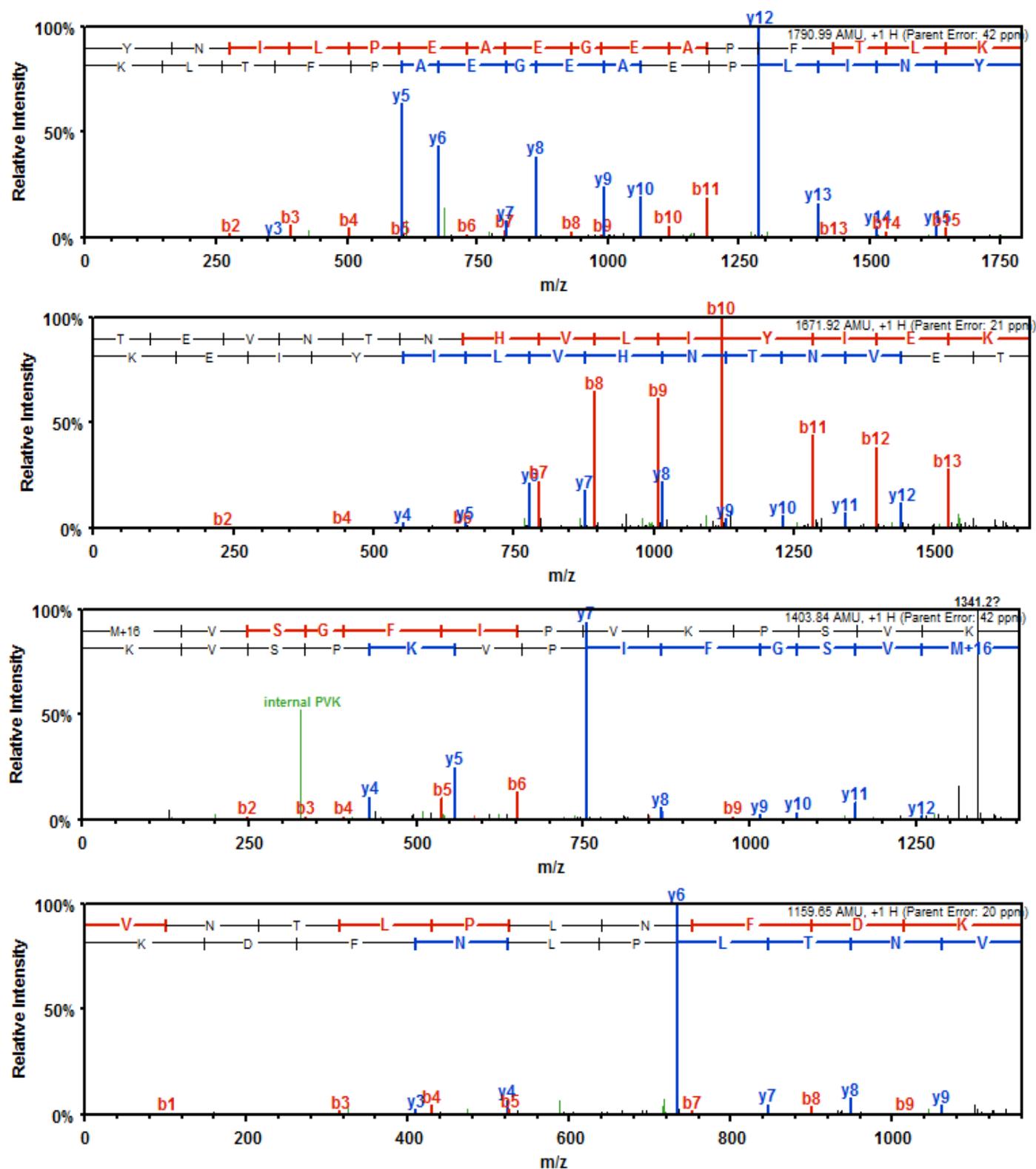


Figura 9: Espectros MS/MS dos peptídeos obtidos para a proteína alfa-1-macroglobulina (spot 267).

DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos as alterações no perfil proteico do soro de ratos submetidos a um protocolo de exercício que induz ao *continuum* treinamento-*overtraining* através da análise proteômica.

Os dados de desempenho dos ratos ao longo das 11 semanas do protocolo e a adoção dos critérios de seleção propostos por Hohl e col.¹⁴ permitiram a obtenção do estado pré-treinamento, representado pelos ratos do grupo Controle (CT), e do *continuum* de treinamento, através de três grupos bem identificados: ratos Treinados (T), representando um estado intermediário de adaptação positiva ao treinamento, com aumento de desempenho (após a 9ª semana de treino) e os grupos FOR, com aumento de desempenho, e NFOR, com diminuição de desempenho após a 11ª semana de treino. Esses dados indicam que o modelo é reproduzível, e permite a investigação de dois estados obtidos através da mesma metodologia.

Através da análise comparativa dos géis 2D verificamos que o perfil proteico do soro dos ratos do grupo treinado e FOR foi diferente quando comparamos com o perfil dos ratos do grupo NFOR.

As proteínas de fase aguda α -1-macroglobulina e um spot referente à haptoglobina, fator de complemento 3 e fator de complemento B estavam significativamente aumentadas e dois spots referentes à haptoglobina apresentaram uma diminuição significativa no grupo NFOR. Estas mesmas proteínas não apresentaram alteração na sua concentração nos grupos treinado e FOR. Já as proteínas relacionadas ao transporte: transferrina, pré-albumina, proteína ligadora de retinol, apolipoproteína A1 e apolipoproteína E apresentaram-se aumentadas no grupo T e FOR e diminuídas no grupo NFOR.

A proteína alfa-1-macroglobulina pertence à família da proteína alfa-2-macroglobulina, que atua como inibidor de proteases, sendo também uma proteína de fase aguda²¹. Não é uma proteína usualmente mensurada nos estudos com exercício. O aumento da alfa-1-macroglobulina pode indicar uma tentativa de controlar a atividade das proteases que atuam no tecido danificado, impedindo que estas enzimas degradem descontroladamente células íntegras. As proteínas pertencentes à família da alfa-2-macroglobulina parecem mediar também a atividade de algumas interleucinas, embora esta função precise ser melhor investigada²¹.

Os fatores de complemento B e C fazem parte do sistema de complemento, que é ativado tanto pelas proteínas de fase aguda como por citocinas, com objetivo de amplificar a resposta inflamatória²². Embora pouco estudado no exercício físico, Smith e col.²³ encontraram uma diminuição nos níveis basais do fator de complemento C3 e C4 em indivíduos treinados.

Um dos spots referentes à haptoglobina, também considerada uma proteína de fase aguda positiva, apresentou-se elevado. A alteração da concentração destas proteínas no soro dos animais do grupo NFOR reforça a hipótese da instalação de um quadro inflamatório sistêmico neste grupo²⁴. Note que os animais foram sacrificados 120 horas após o último estímulo de treino e 60 horas após o teste de desempenho. Segundo Smith²⁵ a instalação do *overtraining* seria decorrente do avanço dos chamados micro traumas adaptativos para um estado crônico e sub-clínico de dano muscular devido ao aumento no volume e intensidade de treino e um tempo inadequado de recuperação. De acordo com esta hipótese, uma secreção crônica de citocinas pró-inflamatórias levaria a instalação de um processo inflamatório crônico que impediria a regeneração do tecido lesado, desencadeando um quadro não adaptativo que levaria a queda de *performance*.

As diminuições da haptoglobina encontradas em dois spots no grupo NFOR podem estar relacionadas a um quadro de hemólise, uma vez que uma das funções desta proteína é se ligar a hemoglobina na tentativa de evitar a perda de ferro e conseqüentemente, um quadro de anemia²⁶.

Diferentes isoformas de haptoglobina já foram identificadas. A alteração destas isoformas frente à aplicação de agentes oxidantes não difere entre si. Contudo, a capacidade de ligação à hemoglobina é diferenciada, sendo que algumas isoformas apresentam mais afinidade que outras²⁷. Esta pode ser uma explicação para o comportamento diferenciado observado para esta proteína.

Alguns estudos com exercício já relataram uma diminuição das concentrações séricas de haptoglobina em virtude do estresse mecânico gerado pela atividade^{28,29,30}. Paralelamente às concentrações diminuídas de haptoglobina estes estudos mostraram uma diminuição do hematócrito, hemácias, hemoglobina e aumento na excreção de bilirrubina. Os hemogramas dos animais FOR e NFOR não apresentaram diferenças significativas para número de células vermelhas (FOR: $8,26 \pm 0,23 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ vs NFOR: $7,26 \pm 0,69 \cdot 10^6/\text{mm}^3$), hematócrito (FOR: $42 \pm 1\%$ vs NFOR: $38 \pm 2\%$) e hemoglobina (FOR: $15,64 \pm 0,51\text{g/L}$ vs NFOR: $13,85 \pm 1\text{g/L}$). Entretanto, os animais do grupo NFOR exibiram valores sempre inferiores quando comparados ao grupo FOR, sugerindo um possível quadro de hemólise nestes animais.

Outro fator importante a ser considerado como causador de hemólise é a instalação de um quadro de estresse oxidativo. Diversos autores já mostraram que um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode levar a um aumento da lise de células vermelhas^{31,32,33}.

É consenso na literatura que atividades físicas intensas levam a um aumento na produção de EROs^{34,35}. Além disto, a própria instalação do processo inflamatório está relacionada ao

aumento na produção de Eros, devido a atividade de neutrófilos e macrófagos no tecido danificado^{36,37}. Especula-se que um quadro de estresse oxidativo também esteja relacionado com o *overtraining*, ampliando os danos às estruturas biológicas e influenciando a queda de *performance*^{37,38,39}.

Margonis e col.⁴⁰ investigaram diversos biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos submetidos a um protocolo de treinamento no qual progressivamente a intensidade e volume de treino eram aumentados e o tempo de recuperação diminuído. Os autores concluíram que o *overtraining* levou a uma alteração significativa dos níveis de estresse oxidativo nos indivíduos e sugeriram que o acompanhamento dos biomarcadores analisados pode servir como mais uma ferramenta para se diagnosticar esta síndrome.

Dados do nosso laboratório^{41,42} com este mesmo protocolo de treinamento mostraram que os ratos adaptados apresentam uma melhora da atividade do sistema de defesa antioxidante e menor ataque de EROs a estruturas biológicas, tanto em sangue quanto no músculo, corroborando com dados da literatura³⁹. Embora esses estudos não tenham analisado a *performance*, aparentemente após a 11ª semana de treinamento houve um aumento nos níveis de estresse oxidativo, detectado pela diminuição na atividade do sistema de defesa antioxidante e aumento do ataque de EROs à proteínas e lipídeos.

Outro mecanismo que pode estar envolvido na formação de EROs no grupo NFOR está relacionado aos níveis diminuídos de transferrina no soro destes animais que propiciam um aumento na quantidade de ferro livre, aumentando a possibilidade de geração de espécies radicalares e seus efeitos deletérios quando acompanhado de uma menor proteção antioxidante.

Além disto, a transferrina consiste um dos meios de transporte de íons ferro pelo sangue. O ferro é um importante co-fator de diversas enzimas mitocondriais, como aconitase e os complexos da cadeia de transporte de elétrons^{43,44}. A diminuição da concentração de transferrina no grupo NFOR pode indicar um menor aporte deste mineral para a musculatura.

A deficiência de ferro está relacionada à uma diminuição na atividade dos complexos da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, prejudicando assim o fornecimento de energia⁴⁵. Diminuições da atividade da enzima citrato sintase no grupo NFOR foi observado no músculo de ratos submetidos a este mesmo protocolo de treinamento¹⁴. Esses dados sugerem que a diminuição do aporte energético devido a um prejuízo na adaptação mitocondrial pode estar relacionado à queda de *performance* observada nos animais NFOR.

Outra alteração proteica observada no grupo NFOR que pode ter acarretado em um prejuízo na adaptação mitocondrial está relacionada às diminuições observadas nas concentrações de pré-albumina e proteína ligadora de retinol.

Os grupos treinado e FOR, por sua vez, apresentaram aumento na concentração das proteínas transferrina, precursor de transferrina, proteína ligadora de retinol e pré-albumina, associado a aumento no desempenho.

Burniston¹⁸ analisou as alterações do perfil proteico no músculo plantar de ratos submetidos a 5 semanas de treinamento de *endurance*. Dentre as proteínas diferencialmente expressas, o autor encontrou um aumento na expressão da enzima aconitase e da própria transferrina. Este dado foi utilizado pelo autor para explicar o aumento da *performance* observado nos animais decorrentes de um melhor fornecimento de energia pela mitocôndria.

Além disto, a ligação do ferro á transferrina diminui os níveis de ferro livre no plasma diminuindo assim a geração de EROs, levando a uma menor incidência dos efeitos deletérios causado pelas espécies radicalares às estruturas biológicas⁴⁶.

A proteína ligadora de retinol e a pré-albumina atuam em conjunto, formando um complexo para transportar vitamina A e hormônios da tireóide⁴⁷. A vitamina A é um importante antioxidante de baixo peso molecular, além de exercer outras funções junto com hormônios na diferenciação celular⁴⁸. O hormônio da tireóide possui diversas funções relacionadas ao desenvolvimento, diferenciação e ao metabolismo celular⁴⁹. Na musculatura esquelética, Everst⁵⁰ demonstrou que este hormônio aumenta a concentração de bombas Na^+/K^+ na membrana da célula. Weitzel e col.⁵¹ mostraram que o hormônio da tireóide está envolvido na regulação da biogênese mitocondrial, via ativação da PGC1 α . Além disto, Hood e col.⁵² verificaram que os níveis de RNAm para as enzimas citocromo c oxidase e citrato sintase apresentam-se aumentados em condições normais e no hipertireoidismo enquanto que o mesmo aumento não foi observado em condições de hipotireoidismo.

Tendo em vista que uma das principais adaptações decorrente do treinamento de *endurance* é a melhora do metabolismo oxidativo e biogênese mitocondrial^{53,54}, justifica-se o aumento encontrado nas concentrações destas proteínas nos grupos T e FOR. Poucos estudos analisaram as alterações da transferrina, proteína ligadora de retinol e pré-albumina em decorrência do treinamento e *overtraining*. Os dados apresentados no presente trabalho dão indícios de que as alterações destas proteínas são parte importante do processo adaptativo.

Por outro lado, a diminuição das proteínas transferrina, pré-albumina e proteína ligadora de retinol observada no grupo NFOR sugere um aporte ineficiente de ferro e hormônio da tireóide para a musculatura, prejudicando os processos adaptativos envolvidos na biogênese mitocondrial.

Os grupos treinado e FOR não apresentaram alterações nas concentrações das proteínas envolvidas no processo inflamatório, como observado no grupo NFOR. Vários estudos sugerem um efeito antiinflamatório como uma adaptação decorrente da prática regular de exercício. Níveis

basais de marcadores inflamatórios como PRC e interleucinas tendem a diminuir em resposta ao treinamento físico^{55,56,57,58}. No caso da alfa-1-macroglobulina e da haptoglobina dos nossos animais, embora não tenhamos observado uma diminuição nas concentrações séricas destas proteínas no grupo FOR, os valores não foram significativamente diferentes dos valores encontrados no grupo CT e T.

Dados obtidos no nosso laboratório⁵⁹ com a mensuração das concentrações das interleucinas 6 (IL6), 1 β (IL1 β), 10 (IL10) e TNF alfa (TNF- α) no fígado e músculo gastrocnêmico vermelho de animais submetidos a este mesmo protocolo de treinamento, mostraram que o grupo T e FOR apresentam valores de IL6 superiores aos valores das citocinas pró-inflamatórias, IL1 β e TNF α , reforçando a proposta de um quadro anti-inflamatório, que propiciou a adaptação dos animais e conseqüentemente a melhora da *performance*.

Embora a mensuração das citocinas no grupo NFOR não tenha sido possível no trabalho acima citado, os poucos trabalhos encontrados na literatura que mensuraram as concentrações de citocinas circulantes em atletas que apresentaram um quadro de *overtraining* encontraram valores elevados de IL6, IL1 β e TNF α , sugerindo um estado pró-inflamatório instalado^{60,61,62}.

A análise comparativa dos géis 2D também mostrou um aumento nas concentrações das proteínas apolipoproteína A1 (apo A1) e apolipoproteína E (apo E) nos grupos treinado e FOR.

A apo A1 é a principal proteína do HDL, responsável pela remoção do colesterol dos tecidos. Por este papel, sua concentração possui uma relação inversa com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares⁶³. Poucos trabalhos com exercício mensuram as concentrações de apo A1. Similarmente aos resultados encontrados neste trabalho, Laaksonen e col.⁶⁴ encontraram níveis aumentados de HDL e apo A1 em indivíduos diabéticos submetidos a 12 de semanas de treinamento de *endurance*.

A apo E está presente nos quilomícrons, HDL, VLDL e LDL. Três isoformas de apo E, E2, E3 e E4, podem ser expressas dependendo do genótipo do indivíduo, sendo que as isoformas E2 e E3 estão associadas a uma diminuição dos níveis de LDL no sangue e a E4 a um aumento de LDL⁶⁵. Os diferentes polimorfismos para apo E estão relacionados ao desenvolvimento de várias doenças, como diabetes, Alzheimer e coronarianas, e respondem de forma distintas a diversas formas de intervenções como exercício, dieta e fármacos^{65,66}. No caso do exercício alguns trabalhos já mostraram que os polimorfismos associados aos alelos E2 e E3 são mais responsivos do que o alelo E4^{67,68}.

É consenso na literatura os benefícios gerados pela prática regular de exercício sobre os níveis de colesterol no sangue e redução do risco de desenvolvimento de aterosclerose. Diversos trabalhos mostraram que o exercício, principalmente de *endurance*, leva a um aumento dos níveis

de HDL e diminuição de LDL⁶⁹. O fato de tanto a apo E quanto a apo A1 estarem envolvidas na síntese de HDL, como mostrado por Zannis e col.⁷⁰, pode representar um dos mecanismos moleculares pelo qual o exercício leva a um aumento nos níveis de HDL.

Diminuições nos níveis de VLDL e LDL podem estar relacionados a uma maior concentração de apo E nestas lipoproteínas. Sabendo que os receptores de LDL possuem uma afinidade maior pela apo E em relação a apo B⁷¹ isto faria com que, principalmente o LDL, permanecesse por um tempo menor na corrente sanguínea, diminuindo as chances de ser oxidado, e assim dar início ao desenvolvimento de aterosclerose. Nossos dados sugerem que o aumento nas concentrações das apolipoproteínas A1 e E pode representar um dos mecanismos pelo qual a prática regular de atividade física leva a uma melhora no perfil lipídico, aumentando os níveis de HDL e diminuindo o LDL.

Pudemos observar que as alterações nos perfis proteicos dos soros dos animais que se adaptaram ao treinamento proposto, grupos treinado e FOR, indicam uma resposta inflamatória eficiente para o reparo dos microtraumas gerados na musculatura no tempo de recuperação propiciado. Além disto, uma maior eficiência no transporte de ferro, vitamina A e hormônio da tireóide podem ter favorecido os processos adaptativos decorrentes deste tipo de treino, favorecendo assim a produção de energia e conseqüentemente ao aumento da *performance*.

Por outro lado, no grupo NFOR as alterações proteicas observadas indicam a presença de um quadro inflamatório crônico, dando indícios de que os microtraumas na musculatura não foram reparados no tempo de recuperação estabelecido. As alterações das proteínas de transporte podem ter prejudicado a disponibilidade de ferro, vitamina A e hormônio da tireóide, inviabilizando assim as respostas adaptativas do treino. O progresso dos microtraumas adaptativos para um grau subclínico e um menor aporte energético podem estar relacionados à queda de *performance* observada neste grupo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Hawley JA. Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense *endurance* training. Clin Exp Pharm Physiol. 29: 218 – 222, 2002.
2. Hansen AK, Fischer CP, Plomgaard P, Andersen JL, SaltinB, Pedersen BK. Skeletal muscle adaptation: Training twice every second day vs. training once daily. J Applied Physiol. 98: 93 – 99, 2005.
3. Durstine JL, Grandjean PW, Davis PG, Ferguson MA, Alderson NL, DuBose KD. Blood lipid and lipoprotein adaptations to exercise: a quantitative analysis. Sports Med. 31 (15): 1033-1062, 2001.
4. Irrcher I, Adhihetty PJ, Joseph AM, Ljubicic V, Hood, DA. Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by *endurance* exercise. Sports Med. 33 (11): 783-793, 2003.

5. Midgley AW, McNaughton LR, Wilkinson M. Is there an optimal training intensity for enhancing the maximal oxygen uptake of distance runners? empirical research findings, current opinions, physiological rationale and practical recommendations. *Sports Med.* 36(2): 117-132, 2006.
6. Chin ER. The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. *Proc Nutr S.* 63: 279-286, 2004.
7. Kramer HF, Goodyear LJ. Exercise, MAPK, and NF- κ B signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 103: 388-395, 2007.
8. Koulmann N, Bigard AX. Interaction between signaling pathways involved in skeletal muscle responses to *endurance* exercise. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 452: 125-139, 2006.
9. Winder WW, Taylor EB, Thomson DM. Role of AMP-activated protein kinase in the molecular adaptation to *endurance* exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38(11): 1945-1949, 2006.
10. Matsakas A, Patel K. Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. *Histol Histopathol.* 24: 209-222, 2009.
11. Meeusen R, Duclos M, Gleeson M, Rietjens G, Steinacker J, Urhausen A. Prevention, diagnosis and treatment of the *Overtraining Syndrome*. *Eur. J. Sports Sci.* 6(1): 1-14, 2006.
12. Armstrong LE, VanHeest JL. The unknown mechanism of the *overtraining syndrome*. *Sports Med.* 32(3):185-209, 2002.
13. Halson SL, Jenkendorf AE. Does *overtraining* exist? An analysis of overreaching and *overtraining* research. *Sports Med.* 34: 967-981, 2004.
14. Hohl R, Ferrareso RLP, Buscariolli R, Lucco R, Brenzikofer R, Macedo DV. Development and characterization of an *overtraining* animal model. *Med Sci Sports Exerc.* 41(5): 1155-63, 2009.
15. Kellner R. Proteomics: Concepts and Perspectives. *Fresenius J Anal Chem.* 366: 517-524, 2000.
16. Boluyt MO, Brevick JL, Rogers DS, Randall MJ, Scalia AF, Li ZB. Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20. *Proteomics.* 6: 3154-3169, 2006.
17. Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled *endurance* exercise. *Proteomics.* 9: 106-115, 2009.
18. Burniston JG. Changes in the rat skeletal muscle proteome induced by moderate-intensity *endurance* exercise. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1784: 1077-1086, 2008.
19. Molloy MP, Brzezinski EE, Hang J, McDowell MT, VanBogelen RA. Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics.* 3: 1912-1919, 2003.
20. Stead DA, Preece A, Brown AJP. Universal metrics for quality assessment of protein identifications by Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics.* 5:1205-1211, 2006.

21. Myers RP, Ratziu V, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis: a comparison with historical features in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 97(9):2419-25, 2002.
22. Abe M. Complement activation and inflammation. *Rinsho Byori.* 54(7):744-56, 2006.
23. Smith JK, Chi DS, Krish G, Reynolds S, Cambron G. Effect of exercise on complement active. *Ann Allergy.* 65(4): 304-10, 1990.
24. Smith LL. Cytokine hypothesis of *overtraining*: a physiological adaptation to excessive stress? *Med Sci Sports Exerc.* 32(2):317-31, 2000.
25. Smith LL. Tissue trauma: the underlying cause of *overtraining* syndrome? *J. Strength Cond. Res.* 18(1):184-191, 2004.
26. Wassell J. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab.* 46(11-12):547-52, 2000.
27. Cigliano L, Spagnuolo MS, Abrescia P. Quantitative variations of the isoformas in haptoglobina 1-2 and 2-2 individual phenotypes. *Arch Biochem Biohys.* 15:416(2): 227-37, 2003.
28. Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Wiegerinck ET, Swinkels DW, Trinder D. Training surface and intensity: inflammation, hemolysis, and hepcidin expression. *Med Sci Sports Exerc.* *In press.* 2009.
29. Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Wiegerinck ET, Swinkels DW, Trinder D. Cumulative effects of consecutive running sessions on hemolysis, inflammation and hepcidin activity. *Eur J Appl Physiol.* *In press.* 2009.
30. Yusof A, Leithauser RM, Roth HJ, Finkernagel H, Wilson MT, Beneke R. Exercise-induced hemolysis is caused by protein modification and most evident during the early phase of an *ultraendurance* race. *J Appl Physiol.* 102(2):582-6, 2007.
31. Smith JA, Kolbuch-Braddon M, Gillam I, Telford RD, Weidemann MJ. Changes in the susceptibility of red blood cells to oxidative and osmotic stress following submaximal exercise. *Eur J Appl Physiol* 70: 427-436, 1995.
32. Sentürk UK, Gündüz F, Kuru O, Koçer G, Ozkaya YG, Yesilkaya A, Bor-Küçükataş M, Uyüklü M, Yalçın O, Baskurt OK. Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. *J Appl Physiol* 99: 1434-1441, 2005.
33. Senturk UK, Gunduz F, Kuru O, Aktekim MR, Kipmen D, Yalcin O, Bor-Kucukatay M, Yesilkaya A, Baskurt OK. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise trained rats. *J Appl Physiol* 91: 1999-2004, 2001.
34. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exercise.* 25: 218-224, 1993.
35. Reid MB. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.* 90: 724-731, 2001.
36. Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, Vihalemm T, Zilmer K, Kairane C, Landõr A, Karu T, Zilmer M. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology.* 7: 263-270, 2001.
37. Tiidus PM. Radical species in inflammation and *overtraining*. *Can J Physiol Pharmacol.* 76: 533-8, 1998.

38. Petibois C, Cazorla G, Poortmans JR, Délérís G. Biochemical aspects of *overtraining* in *endurance* sports: the metabolism alteration process syndrome. *Sports Med.* 33(2): 83-94, 2003.
39. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress relationship with exercise and training. *Sports Med.* 36 (4): 327-358, 2006.
40. Margonis K, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Douroudos I, Chatzinikolaou A, Mitrakou A, Mastorakos G, Papassotiriou I, Taxildaris K, Kouretas D. Oxidative stress biomarkers responses to physical *overtraining*: Implications for diagnosis. *Free Rad Biol Med.* 43: 901-910, 2007.
41. Zoppi CC, Macedo DV. Overreaching induced oxidative stress, enhanced HSP72 expression, antioxidant and oxidative enzymes downregulation. *Scand J Med Sci Sports.* 18(1):67-76, 2008.
42. Antunes Neto JMF. Estudo da relação entre estresse oxidativo e síntese de proteínas de estresse HSP70 no sangue de animais submetidos a diferentes níveis de exercício físico. Tese de doutorado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, 2003.
43. Bolteau AL, Ikeda-Saito M, Szweda LI. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochem.* 42: 14846-14855, 2003.
44. Sharma LK, Lu J, Bai Y. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Curr Med Chem.* 16(10): 1266-77, 2009.
45. Hood DA, Kelton R, Nishio ML. Mitochondrial adaptations to chronic muscle use: effect of iron deficiency. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 101(3):597-605, 1992.
46. Tuomainen TP, Loft S, Nyssönen K, Punnonen K, Salonen JT, Poulsen HE. Body iron is a contributor to oxidative damage of DNA. *Free Radic Res.* 41(3):324-8, 2007.
47. Raghu P, Sivakumar B. Interactions amongst plasma retinol-binding protein, transthyretin and their ligands: implications in vitamin A homeostasis and transthyretin amyloidosis. *Biochim Biophys Acta.* 1703(1):1-9, 2004.
48. Nagao A. Absorption and Function of Dietary Carotenoids. *Forum Nutr.* 61:55-63, 2009.
49. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 81(3):1097-142, 2001.
50. Everst ME. Effects of thyroid hormones on contractility and cation transport in skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 156:325-333, 1996.
51. Weitzel JM, Iwen KA, Seitz HJ. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp Physiol.* 88(1):121-8, 2003.
52. Hood DA, Simoneau JA, Kelly AM, Pette D. Effect of thyroid status on the expression of metabolic enzymes during chronic stimulation. *Am J Physiol.* 263(4 Pt 1):C788-93, 1992.
53. Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubcic V, Hood DA. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol.* 88:99-107, 2003.
54. Irrcher I, Adhihetty PJ, Joseph AM, Ljubcic V, Hood DA. Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by *endurance* exercise. *Sports Med.* 33 (11): 783-793, 2003.
55. Bruunsgaard H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 78: 819-835, 2005.

56. Moldoveanu AI, Shephard RJ, Shek PN. The cytokine response to physical activity and training. *Sports Med.* 31 (2): 115-144, 2001.
57. Kasapis CMD, Thompson PD, FACC MD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers. A systematic review. *J Am Col Cardiol.* 45(10): 1563-9, 2005.
58. Plaisance EP, Grandjean PW. Physical activity and high-sensitivity C-reactive protein. *Sports Med.* 36 (5): 443-458, 2006.
59. Da Silva FOC. Treinamento físico, processo inflamatório e adaptação. Tese de doutorado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, 2009.
60. Rananto CE, Hogen K, Person et al. Elevated serum cytokines associated with plantar fasciitis. *Med Sci Sport Exerc.* 31:S60, 1999.
61. Rowbottom D, Keast C, Goodman C, Mortan AR. Glutamine and the *overtraining* syndrome. *Eur J Physiol.* 70: 502, 1995.
62. Wilson J, Smith LL, Holbert D, Anwar A, Houdmard JA. The effect of combined versus eccentric training on markers of overstress. *Med Sci Sports Exerc.* 29: S52, 1997.
63. Frank PG, Marcel JY. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J. Lipid Res.* 41: 853-872, 2000.
64. Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen LK, Mustonen J, Sen CK, Lakka TA, Uusitupa MI. Aerobic exercise and the lipid profile in type 1 diabetic men: a randomized controlled trial. *Med Sci Sports Exerc.* 32(9):1541-8, 2000.
65. Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE. APO E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiol Genomics.* 4(2):101-108, 2000.
66. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a huge review. *Am J Epidemiol.* 155:487-95, 2002.
67. Thompson PD, Tsongalis GJ, Seip RL, Bilbie C, Miles M, Zoeller R, Visich P, Gordon P, Angelopoulos TJ, Pescatello L, Bausserman L, Moyna N. Apolipoprotein E genotype and changes in serum lipids and maximal oxygen uptake with exercise training. *Metabolism.* 53(2):193-202, 2004.
68. Obisesan TO, Ferrell RE, Goldberg AP, Phares DA, Ellis TJ, Hagberg JM. APOE genotype affects black-white responses of high-density lipoprotein cholesterol subspecies to aerobic exercise training. *Metabolism.* 57(12):1669-76, 2008.
69. Durstine JL, Grandjean PW, Davis PG, Ferguson MA, Alderson NL, DuBose KD. Blood lipid and lipoprotein adaptations to exercise: A quantitative analysis. *Sports Med.* 31 (15): 1033-1062, 2001.
70. Zannis VI, Koukos G, Drosatos K, Vezeridis A, Zanni EE, Kypreos KE, Chroni A. Discrete roles of apoA1 and apoE in the biogenesis of HDL species: lessons learned from gene transfer studies in different mouse models. *Ann Med.* 40 suppl 1:14-28, 2008.
71. Bayners JW, Dominiczak MH. *Bioquímica Médica.* Editora Elsevier. 2ª edição. Rio de Janeiro, 2007, p.238.

PARTE II: ENSINO

CAPÍTULO 4

PROPOSTA DE UMA ATIVIDADE PRÁTICA PARA O ESTUDO DAS VIAS DE SÍNTESE E INTEGRAÇÃO METABÓLICA NO ESTADO ALIMENTADO A PARTIR DO ENTENDIMENTO DOS CONCEITOS DE ÍNDICE GLICÊMICO E CARGA GLICÊMICA

RESUMO

Temos introduzido o estudo das vias de síntese e a integração metabólica do estado alimentado através de dois experimentos: 1- determinação do índice glicêmico (IG) de alguns alimentos e a influência de fibras e gordura; 2- determinação da glicemia após algumas refeições contendo cargas glicêmicas altas ou baixas manipuladas por quantidades diferentes de alimentos com IG altos ou baixos. Após a montagem da prática e a determinação dos alimentos ou refeições a serem ingeridos os alunos foram divididos em grupos. Na aula seguinte, 3 integrantes de cada grupo, em jejum de 8 horas, ingeriram 50 g de CHO de um alimento ou uma refeição. Após a ingestão a glicemia foi mensurada com aparelho portátil a cada 30 minutos por um período de 2 horas. A discussão dos dados obtidos no experimento 1 permitiu que os alunos assimilassem os mecanismos de ação da insulina e entendessem como é feita a determinação do IG apresentada pela literatura. Os alunos concluíram também que a adição de fibras diminui a resposta da glicemia mesmo de alimentos com alto IG, sendo uma estratégia interessante para dieta de emagrecimento ou pessoas diabéticas. A discussão do experimento 2 permitiu que os alunos entendessem que a quantidade de alimento ingerida é o fator determinante na resposta da glicemia e subsequente liberação de insulina. O conhecimento teórico e as observações dos experimentos permitiram também que os alunos transpusessem este conteúdo com muita facilidade para o seu dia-a-dia. Os alunos aprovaram a prática e se sentiram estimulados para estudar as vias de síntese e a integração metabólica do estado alimentado.

Palavras-Chave: índice glicêmico, carga glicêmica, integração metabólica, insulina, vias de síntese.

INTRODUÇÃO

A disciplina de bioquímica faz parte da grade curricular dos cursos de Educação Física e Nutrição. Um dos objetivos da disciplina é o entendimento do funcionamento das vias produtoras de energia e de síntese de reservas, assim como as integrações metabólicas envolvidas no jejum e estado alimentado.

Conceitos como Índice Glicêmico (IG) despertam grande interesse nos alunos devido à aplicabilidade imediata deste conhecimento no dia-a-dia destes profissionais, tanto para a prescrição de dietas quanto na utilização de suplementos esportivos a base de carboidratos antes, durante e após a prática de uma atividade física.

Índice glicêmico (IG) se refere à classificação dos carboidratos de acordo com a velocidade com que alteram a glicemia e a resposta subsequente de liberação de insulina [1]. Assim, através do IG os carboidratos são classificados não apenas pela sua estrutura (simples ou complexos), mas também pela resposta fisiológica que desencadeiam, contribuindo para a fixação dos mecanismos moleculares de sinalização da insulina.

O IG de um alimento é determinado a partir do cálculo da área da curva obtida pela mensuração da glicose sanguínea por um período de 2 horas após a ingestão de 50 g de carboidrato de um determinado alimento. O valor desta área é comparado ao valor da área da curva de um alimento padrão, geralmente a glicose [2]. O IG dos alimentos é expresso como uma porcentagem da área da curva do alimento padrão, e permite classificar os alimentos contendo carboidratos como de IG alto (maior que 70), moderado (55-70), baixo (40-54) e muito baixo (menor que 39). É importante ressaltar que o IG de determinado alimento pode ser influenciado por diversos fatores tais como tipo de carboidrato presente (frutose, glicose, sacarose etc.), natureza do amido (amilose, amilopectina), cozimento e processamento (grau de gelatinização, tamanho, forma) e a presença de outros nutrientes como gorduras e fibras [3].

Quando analisamos a dieta de um indivíduo, no entanto, a mesma se traduz em diversas refeições ao longo do dia, que são compostas por diversos alimentos e em quantidades variadas. Neste caso, o IG representa apenas uma medida da qualidade dos carboidratos que compõem esta dieta, pois não leva em consideração a quantidade de carboidratos que estão sendo ingeridos. Neste contexto, a determinação da carga glicêmica (CG) da refeição se torna uma ferramenta bastante interessante, principalmente para a análise de dietas.

A carga glicêmica (CG) representa a alteração da glicemia em resposta à ingestão de uma determinada porção de alimento. O seu cálculo leva em consideração o IG do alimento e também a quantidade de alimento ingerida, pela seguinte fórmula: (conteúdo de carboidrato da porção do

alimento – conteúdo de fibras da porção do alimento) x IG do alimento/100. No caso de uma refeição, a somatória das cargas glicêmicas de todos os alimentos que a compõem representa a carga glicêmica total daquela refeição [4]. Através do cálculo da CG das refeições é possível planejar cardápios com refeições que não elevem demasiadamente a secreção de insulina durante o dia e, conseqüentemente, a sinalização para as vias de síntese, principalmente de triacilglicerol.

Para introduzir o estudo das vias de síntese e a integração metabólica no estado alimentado a partir de dados reais, discutimos os conceitos de índice glicêmico e carga glicêmica e sua aplicabilidade com educadores físicos e nutricionistas em um curso de especialização em treinamento e nutrição esportiva com enfoque em bioquímica através da montagem e realização de dois experimentos:

Experimento 1: determinar o IG de alguns alimentos e verificar a influência de fibras e gordura na resposta da glicemia.

Experimento 2: determinar a CG de algumas refeições e analisar o comportamento da glicemia.

ESTRUTURAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA PRÁTICA

É importante ressaltar que antes dessa aula prática os alunos já trabalharam os dados de uma curva de tolerância a glicose e os mecanismos moleculares de ação da insulina. A montagem dos experimentos com a classe é direcionada a partir da definição dos conceitos de IG e CG e algumas questões apresentadas aos alunos. A Tabela 1 abaixo mostra as questões apresentadas, as respostas dos alunos e a seqüência utilizada na montagem do experimento.

Tabela 1: Questões do professor e repostas dos alunos na montagem da prática.

Experimento 1
<p>Conceito Apresentado: IG é a classificação dos alimentos contendo carboidratos de acordo com a velocidade com que alteram a glicemia.</p> <p>Pergunta 1: Como poderíamos determinar o IG dos alimentos?</p> <p>Resposta dos alunos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ingerir diferentes alimentos que contenham carboidratos; 2. Medir a glicemia; 3. Fazer o gráfico e comparar os resultados dos alimentos. <p>Pergunta para a resposta 1: Qual a quantidade de CHO a ser ingerida?</p> <p>Resposta: diversos valores são apresentados pelos alunos. Porém, todos concordam que a quantidade a ser ingerida deve ser igual para todos os alimentos.</p>

Determinamos a partir daí 50 g de CHO disponível (CHO – fibras dos alimentos) como a quantidade a ser ingerida.

Pergunta para a resposta 2: Por quanto tempo a glicemia deve ser medida? E com que frequência?

Resposta: Devido ao estudo prévio sobre curva glicêmica, a proposta dos alunos é medir a glicemia numa frequência de 30 em 30 minutos por um período de 2 horas.

Pergunta para a resposta 3: Como saberemos se a alteração foi grande ou pequena? Qual seria nossa referência?

Resposta: os alunos facilmente propõem adotar como padrão a glicose pura e comparar a curva de cada alimento com a curva da glicose. A partir daí, a proposta do cálculo da área da curva é apresentada aos alunos e definimos a determinação do IG do alimento como sendo a área da curva do alimento/área da curva da glicose.

Pergunta 2: Outros nutrientes como fibras e gorduras podem influenciar a absorção de glicose. Como poderíamos verificar a influência desses compostos no IG dos alimentos?

Resposta: a proposta dos alunos é adicionar um alimento rico em fibras/gordura e determinar o seu IG. Em seguida, compará-lo ao IG do alimento ingerido sem a fibra/gordura.

Pergunta 3: Quais cuidados devem ser tomados durante o experimento para evitar possíveis interferências nos dados obtidos?

Respostas: Após certa discussão os alunos definem os seguintes procedimentos: estar em jejum de 8 horas; permanecer sentado durante o experimento; ficar atento aos momentos das medidas; utilizar sempre o mesmo aparelho; cuidados de higiene e assepsia durante a coleta; mastigar bem o alimento. Nesse momento também é definido o tempo de ingestão do alimento em no máximo 15 minutos.

EXPERIMENTO 2

Conceito Apresentado: $CG = (\text{IG do alimento} \times \text{quantidade de CHO disponível do alimento da porção ingerida}) / 100$.

Pergunta: De que maneira a quantidade de alimentos com diferentes IG pode influenciar a glicemia pós-refeição?

Resposta: Depois de alguma discussão os alunos propõem a ingestão de refeições que induzam a uma CG alta e baixa, a partir dos mesmos alimentos com IG alto e baixo em diferentes quantidades, a mensuração da glicemia e a comparação do comportamento da curva glicêmica de cada refeição. Nesse momento, fica também definido que os procedimentos adotados nesse experimento serão iguais aos determinados para o experimento 1.

Após a montagem do experimento com a participação ativa dos alunos, são apresentados os alimentos e as refeições para que os alunos se dividam em grupos para a realização da atividade prática como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Divisão dos grupos de acordo com os alimentos e refeições.

EXPERIMENTO 1 ALIMENTO (50g de carboidratos) *		EXPERIMENTO 2: REFEIÇÕES	
Grupo 1	<i>Padrão:</i> glicose (50g de dextrose diluída em 300 mL de água)	Grupo 9	Refeição 1: Alimentos com alto IG em pequena quantidade: 1 unidade de biscoito tipo <i>cream craker</i> ; 2g de geléia de fruta; 30 mL de achocolatado pronto. Carga Glicêmica Baixa = 7.9.
Grupo 2	Frutose (50g em 300 mL de água)		
Grupo 3	Maltodextrina (50g em 300 mL de água)	Grupo 10	Refeição 2: Alimentos com alto IG em grande quantidade. 3 unidade de biscoito tipo <i>cream craker</i> ; 6g de geléia de fruta; 90 mL de achocolatado pronto. Carga Glicêmica Alta = 23.8
Grupo 4	Caldo de Cana (276mL, equivalente a 50g)		
Grupo 5	Suco de Melancia (625 mL, equivalente a 50g)	Grupo 11	Refeição 3: Alimentos com baixo IG em pequena quantidade. 100 mL de iogurte desnatado sem adição de açúcar; 10g de aveia; 1 maçã pequena. Carga Glicêmica Baixa = 7.7
Grupo 6	Suco de Melancia (625 mL) com fibra solúvel (30g)		
Grupo 7	Pão Francês (89g)	Grupo 12	Refeição 4: Alimentos com baixo IG em grande quantidade. 300 mL de iogurte desnatado sem adição de açúcar; 30g de aveia; 3 maçãs pequenas. Carga Glicêmica Alta = 23.3
Grupo 8	Pão Francês (89g) com manteiga (10g)		

*O cálculo da quantidade de alimento a ser ingerido foi determinado utilizando-se como referência a tabela de composição centesimal de alimentos da UNICAMP (TACO) [5] e a tabela Internacional de Índice Glicêmico [6].

Na aula seguinte, 3 integrantes de cada grupo, que estavam em jejum de 8 horas, ingerem um alimento ou uma refeição. Após a ingestão a glicemia é mensurada pelos outros componentes do grupo com aparelho portátil a cada 30 minutos por um período de 2 horas.

Uma vez obtidos os dados de glicemia, os alunos plotavam os mesmos em uma planilha de dados do programa MatLab versão 7.0 o qual, através de uma função matemática previamente determinada, calculava imediatamente a área dos gráficos e o valor do índice glicêmico de cada alimento, apresentando estes valores junto ao gráfico da curva glicêmica (para o cálculo do IG pode ser utilizado qualquer programa matemático).

RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÕES

Experimento 1: A Figura 1 mostra a média dos dados de glicemia medidos a cada 30 minutos após a ingestão do alimento por um período de 2 horas e o valor de IG obtido nos grupos: glicose, frutose, caldo de cana e maltodextrina.

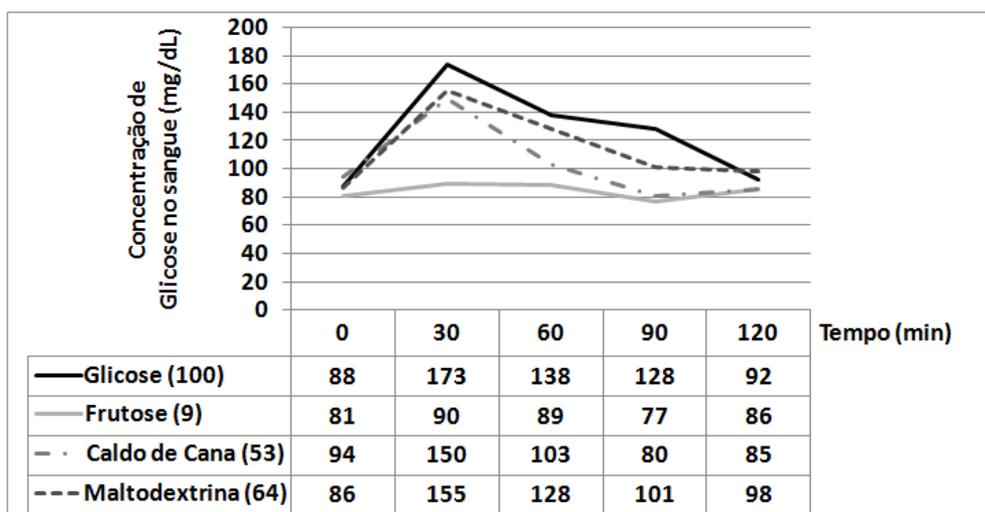


Figura 1. Média dos valores de glicemia dos grupos glicose, frutose, caldo de cana e maltodextrina obtidos a cada 30 minutos por um período de 2 horas. O valor entre parênteses representa o IG determinado a partir da área da curva em comparação com a área da curva da glicose.

Tomando a ingestão de 50 g de glicose como o padrão (100%), os dados mostraram que a frutose pode ser considerada um suplemento de baixo IG, e a maltodextrina (amido) e caldo de cana (sacarose) possuem IG de moderado a alto.

A Figura 2 mostra a média dos dados de glicemia medidos a cada 30 minutos após a ingestão do alimento por um período de 2 horas e o valor de IG obtido nos grupos suco de melancia e suco de melancia com fibra solúvel (A) e nos grupos pão e pão com manteiga (B).

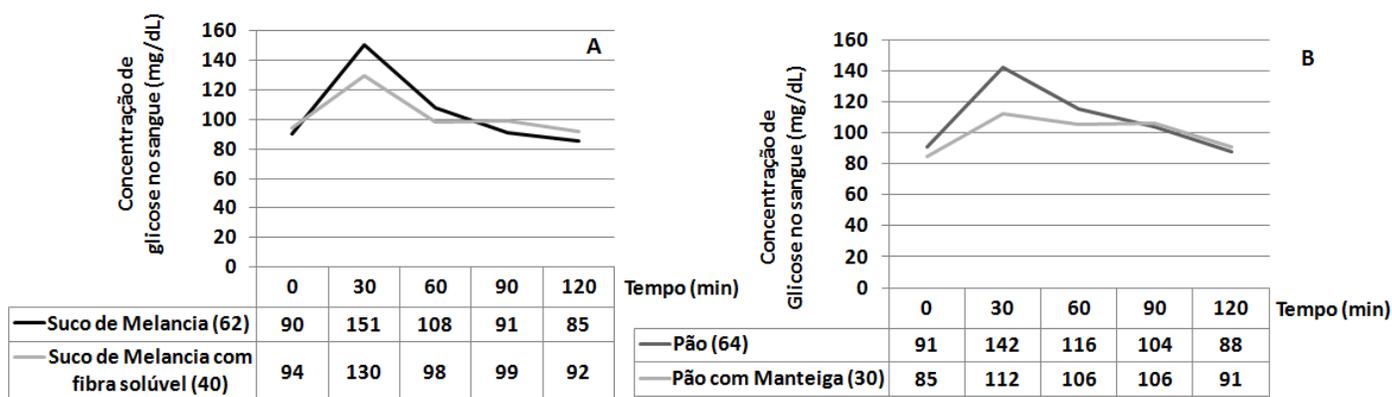


Figura 2. Média dos valores de glicêmica dos grupos melancia x melancia com fibra solúvel (A) e pão x pão com manteiga (B) obtidos a cada 30 minutos por um período de 2 horas. O valor entre parênteses representa o IG determinado a partir da área da curva em comparação com a área da curva da glicose.

Os dados mostraram que a presença de fibra ou gordura diminui o IG do suco de melancia e do pão.

Após a obtenção dos gráficos e dos IG dos diferentes alimentos, os alunos tinham que preencher, também em grupo, um relatório com os tópicos como mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Relatório do Experimento 1.

RELATÓRIO EXPERIMENTO 1	
<u>OBJETIVOS:</u>	
<u>METODOLOGIA:</u>	
<i>Sujeitos:</i>	
<i>Alimentos:</i>	
<i>Mensuração da Glicemia:</i>	
<i>Cuidados para obtenção dos dados:</i>	
<i>Momentos de coleta:</i>	
<u>RESULTADOS:</u>	
Plotados da Tabela e em um papel quadriculado fornecido para preenchimento do gráfico.	
<u>QUESTÕES PARA DIRECIONAR A DISCUSSÃO:</u>	
1) Qual a importância da determinação do IG de alimentos contendo carboidratos?	
2) Quais fatores biológicos e/ou experimentais podem influenciar na determinação do IG?	
3) Qual a possível explicação para as diferenças no comportamento da curva	

glicêmica entre os alimentos mostrados na Figura 1?

- 4) Qual a influência de outros nutrientes como fibras e gorduras no índice glicêmico de um alimento? Qual a aplicação prática deste conhecimento?
- 5) Uma estratégia muito comum dos praticantes de atividade física é a ingestão de carboidratos antes, durante e após os treinos ou competições. Qual seria o objetivo desta estratégia em cada um destes momentos? Baseado nos dados obtidos, que tipo de carboidrato seria indicado em cada um destes momentos?
- 6) Quais os cuidados que devemos tomar ao utilizar apenas o dado do IG de um alimento ao pensar nas refeições que realizamos durante um dia?

CONCLUSÕES:

A partir da análise dos dados obtidos no experimento 1 os alunos puderam discutir as alterações da glicemia e a subsequente liberação de insulina em resposta a ingestão de alimentos com índices glicêmicos variados. Outro ponto importante a ser considerado é que os alunos puderam entender de maneira simples como é feita a determinação do IG presente em Tabelas em livros ou mesmo na Internet, e adotar uma postura crítica em relação a elas. Nesse sentido, algumas dessas tabelas utilizam 50g de pão francês como o padrão, o que imediatamente é percebido pelos alunos como uma escolha não tão adequada como a glicose. Isto se deve ao fato de muitos alimentos elevarem muito mais a glicemia do que o pão dificultando desta forma a classificação do IG além deste alimento sofre influencia do modo de preparo.

A influência de outros nutrientes como gordura e fibras na resposta da glicemia também é facilmente visualizada. Trazendo a discussão para o dia a dia, os alunos concluem que a adição de fibras (farinha de linhaça, aveia em flocos, farinha de casca de maracujá etc.) a alimentos com baixo IG pode ser uma prática interessante para manipular a dieta de pessoas diabéticas e /ou com objetivo de emagrecimento.

A discussão dos alunos em relação a aplicação deste conhecimento na ingestão de carboidratos antes, durante e após a atividade física como forma de recuperar as reservas de glicogênio e fornecer energia para a atividade conduz as mesmas recomendações propostas pela literatura. Ou seja, antes da atividade é necessária a ingestão de carboidratos de baixo IG para evitar picos de insulina no início da atividade, o que poderia levar a um quadro de hipoglicemia. Durante a atividade é necessário a ingestão de CHO com moderado a alto IG para disponibilizar energia rapidamente para a musculatura ativa. Após o exercício é necessário ingerir CHO de alto IG para liberar insulina e iniciar a recuperação das reservas de glicogênio [7,8,9].

Experimento 2: A Figura 3 mostra a média dos dados de glicemia medidos a cada 30 minutos após a ingestão das refeições 1 e 2 (alimentos com alto IG em pequena e grande quantidade) [A] e das refeições 3 e 4 (alimentos com baixo IG em pequena e grande quantidade) [B] por um período de 2 horas.

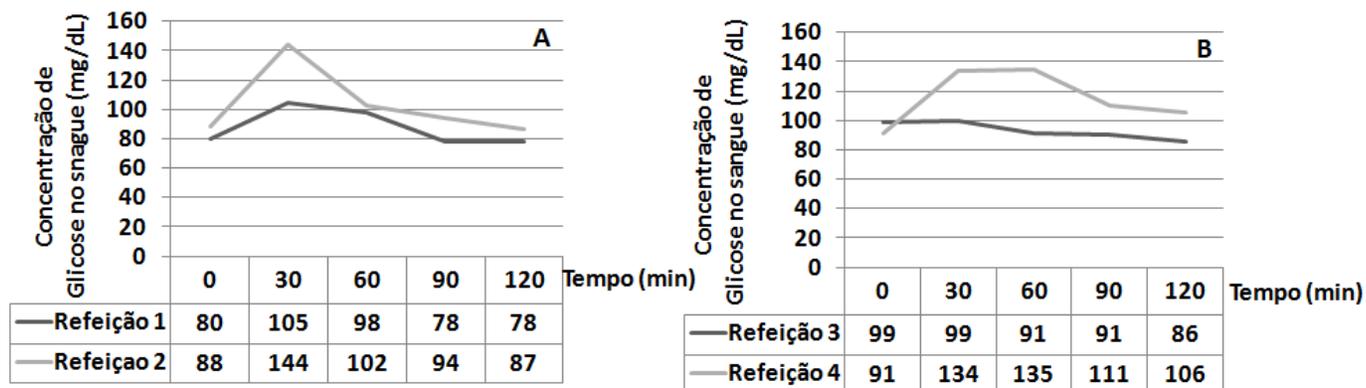


Figura 3. Média dos valores de glicêmica dos grupos refeição 1 (alimentos com alto IG em pequena quantidade) x refeição 2 (alimentos com alto IG em grande quantidade) (A) e refeição 3 (alimentos com baixo IG em pequena quantidade) x refeição 4 (alimentos com baixo IG em grande quantidade) obtidos a cada 30 minutos por um período de 2 horas.

Os dados obtidos mostraram que a quantidade de CHO nas refeições influencia a glicemia tanto quanto o IG dos alimentos individuais.

Para a análise e discussão desses resultados os alunos também tinham que preencher um relatório os seguintes tópicos apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Relatório do experimento 2.

RELATÓRIO EXPERIMENTO 2:	
<u>OBJETIVOS:</u>	
<u>METODOLOGIA:</u>	
<i>Sujeitos:</i>	
<i>Refeições:</i>	
<i>Mensuração da Glicemia:</i>	
<i>Cuidados para obtenção dos dados:</i>	
<i>Momentos de coleta:</i>	
<u>RESULTADOS:</u>	
Plotados da Tabela em um papel quadriculado fornecido para preenchimento do gráfico.	

QUESTÕES PARA DIRECIONAR A DISCUSSÃO:

- 1) Qual a relação entre carga glicêmica e índice glicêmico nas refeições acima?
- 2) Observando o comportamento da glicemia em cada caso, qual a provável resposta da insulina nas refeições realizadas?
- 3) Qual a implicação prática do estudo realizado?

CONCLUSÕES:

A análise do experimento 2 permitiu aos alunos entender o conceito de carga glicêmica e estabelecer uma correlação entre IG dos alimentos, quantidade de alimento ingerida, alteração da glicemia e resposta da insulina. As conclusões as quais chegaram foram que a quantidade de alimento ingerida é um fator tão importante quanto o IG do alimento na resposta da glicemia e liberação de insulina. Uma refeição contendo alimentos com IG baixo se ingeridas em grandes quantidades pode levar a uma alteração da glicemia igual à ingestão de um alimento de IG alto. Da mesma maneira, a ingestão de alimentos com IG alto em pequenas quantidades pode levar a uma alteração pequena da glicemia, igual a observada em alimentos com baixo IG.

Trazendo estas observações para o dia a dia os alunos concluíram que manipular a quantidade do alimento ingerido, principalmente em dietas de emagrecimentos, é a estratégia mais interessante, pois permite ao nutricionista incluir no cardápio alimentos com IG alto em pequenas quantidades e não aboli-los como muitas dietas da moda defendem. Além disto, fica o alerta de que não é pelo fato de um alimento apresentar um IG baixo que ele pode ser ingerido a vontade. Mesmo para este tipo de alimento a quantidade é um fator determinante na resposta da glicemia, e por este motivo também devem ser consumidos com moderação.

Em um estudo recente, Sacks et al. [10] acompanharam a perda de peso de um grupo de 800 pessoas com sobrepeso ou obesidade que seguiram dietas com diferentes quantidades de carboidrato, lipídio e proteína por um período de 2 anos. Os autores concluíram que o fator determinante para perda de peso era a redução de calorias devido a diminuição da quantidade de comida ingerida ao invés da composição de macronutrientes da dieta.

Tem se sugerido que uma alimentação com um volume adequado composta por alimentos com índices glicêmicos baixos melhoram a sensibilidade a insulina, reduzem níveis de triacilglicerol plasmático reduzindo o risco de desenvolvimento de diabetes, doenças cardiovasculares e como tratamento para obesidade [11,12,13].

CONCLUSÕES

De maneira geral os alunos aprovaram a prática e se sentiram estimulados para analisar e discutir os resultados obtidos a partir dos conhecimentos bioquímicos adquiridos até o momento. Essa atividade prática também estimulou os alunos para o estudo das vias de síntese e integração metabólica do estado alimentado. O conhecimento teórico e as observações dos experimentos permitiram que os alunos transpusessem este conteúdo com muita facilidade para o seu dia-a-dia. É importante ainda ressaltar que o custo da prática é relativamente baixo, sendo determinado pelos alimentos escolhidos e pela quantidade de alunos que realizarão os experimentos.

APOIO FINANCEIRO:

Funcamp (BIO-100)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D.J. Jenkins, T.M. Wolever, R.H. Taylor, H. Barker, H. Fielden, J.M. Baldwin, A.C. Bowling, H.C. Newman, A.L. Jenkins, D.V. Goff (1981) Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr.* 34, 362-6.
- [2] T.M. Wolever, D.J. Jenkins, A.L. Jenkins, R.G. Josse (1991) The glycemic index: methodology and clinical implications. *Am J Clin Nutr.* 54, 846-54.
- [3] E.M. Ostman, H.G.M. Liljeberg Elmståhl, I.M.E. Bjorck (2001) Inconsistency between glycemic index and insulinemic responses to regular and fermented milk products. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 96-100.
- [4] J. Salmeron, J.E. Manson, M.J. Stampfer, G.A. Colditz, A.L. Wing, W.C. Willett (1997) Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulindependent diabetes mellitus in women. *JAMA.* 277, 472-7.
- [5] Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA-UNICAMP.- T113 Versão II. 2. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006.113p.
- [6] K. Foster-Powell, S. H. A. Holt, J. C. Brand-Miller. (2002) International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *Am J Clin Nutr.* 76, 5-56.
- [7] E. Stevenson, C. Williams, H. Biscoe (2005) The Metabolic Responses to High Carbohydrate Meals with Different Glycemic Indices Consumed During Recovery from Prolonged Strenuous. *Exerc Int J Sp Nutr Exerc Met.* 15: 291-307.
- [8] G. A. Wallis, R. Dawson, J. Achten, J. Webber, A.J. Jeukendrup (2006) Metabolic response to carbohydrate ingestion during exercise in males and females. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290, E708-E715.

- [9] K. Tsintzas, C. Williams (1998) Human Muscle Glycogen Metabolism During Exercise Effect of Carbohydrate Supplementation Sports Med. 25, 7-23.
- [10] F. A. Sacks, G. A. Bray, V. J. Carey, S. R. Smith, D. H. Steven, S. Anton, K. McManus, L. M. Bishop, N. B. Laranjo, C. Champagne, M. S. Leboff, J. C. Rood, L. Jonge, F. L. Greenway, C. M. Loira, E. Obarzanek, D. A. Williamson (2009) Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein and carbohydrates. The New England Journal of Medicine. 360(9), 859-873.
- [11] World Health Organization – Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation (2004) Diet, Nutrition and Prevention of chronic disease. Geneva. 916, 1-333.
- [12] G. Riccardi, A. A. Rivellese, R. Giacco (2008) Role of glycemic index and glycemic load in the healthy state, in prediabetes, and in diabetes. Am J Clin Nutr. 87, 269S–74S.
- [13] A.C.P. Volp, R.C.G. Alfenas (2006) Glycemic index, glycemic load and cardiovascular diseases. Rev Bras Nutr Clin. 21, 302-8.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação da análise proteômica na pesquisa com exercício está no seu início. Este é o primeiro trabalho que buscou investigar as alterações agudas e crônicas em resposta ao exercício através da análise proteômica de soro.

Os resultados desta primeira investigação mostraram que uma única sessão de exercício altera a concentração de diversas proteínas relacionadas à instalação de um processo inflamatório. Através da análise proteômica foi possível visualizar proteínas cujas concentrações se alteraram e que até então foram muito pouco estudadas na resposta ao exercício. Os dados obtidos nesse estudo reforçam a teoria de que a geração de microtraumas e a instalação de um processo inflamatório para sua regeneração é parte integrante do processo adaptativo. Por este motivo, um tempo de recuperação adequado é necessário para a alteração do fenótipo desejada.

Através do modelo de indução ao *continuum* treinamento-*overtraining* desenvolvido pelo nosso laboratório observamos que quando este tempo de recuperação não é adequado, as alterações destas proteínas, que deveria ser algo transiente, torna-se crônica, indicando que a resposta adaptativa está sendo prejudicada. Esta segunda investigação nos deu indícios de que alterações nas proteínas envolvidas na resposta inflamatória e proteínas envolvidas no transporte de hormônios, vitaminas e minerais podem estar relacionadas ao desenvolvimento do *overtraining*.

Este modelo de treinamento abre a possibilidade de aplicação desta técnica para investigação dos mecanismos moleculares envolvidos tanto na resposta adaptativa quanto no *overtraining* em diversos tecidos e fluidos biológicos.

O conjunto de dados obtidos nesta tese permitem que um próximo alvo de estudo seja a mensuração destas proteínas em um número de maior de animais através de outras técnicas como ELISA, para validação e determinação de valores de referência que possam auxiliar a detecção dos estados FOR e NFOR. Outras análises devem passar a fazer parte de nossas mensurações, tais como perfil lipídico, íons ferro, zinco, cobre e grau de hemólise, para melhor caracterizar o contexto fisiológico destes estados.

A análise de proteínas menos abundantes do soro (que podem ser obtidas com outras técnicas de separação) associada com as alterações das proteínas mais abundantes (visualizadas neste trabalho) e correlacionada à investigação do proteoma de músculo e fígado, poderá auxiliar na discriminação dos melhores alvos proteicos para monitoramento no sangue durante o processo de treinamento.

A possibilidade de desenvolvimento de chips específicos para estas proteínas permitirá a mensuração das mesmas de uma forma fácil, rápida e barata, tornando-se mais uma ferramenta de avaliação do processo de treinamento.

Outro alvo interessante de continuidade de estudo é o proteoma mitocondrial. O processo de biogênese mitocondrial é a principal adaptação ao treino de endurance, e pelos resultados encontrados neste trabalho e em outros trabalhos do nosso grupo sugere-se um prejuízo neste mecanismo nos animais do grupo NFOR. Desta forma, a análise do perfil proteico da matriz mitocondrial, das proteínas de membrana e dos próprios complexos mitocondriais pode nos dar informações dos mecanismos envolvidos na resposta adaptativa e no *overtraining* que podem estar relacionados ao fornecimento de energia, influenciando a queda ou aumento da performance.

Uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas adaptativas e no *overtraining* e a discriminação dos melhores biomarcadores sanguíneos poderão auxiliar no correto planejamento das cargas de treino e do tempo de recuperação adequado para cada indivíduo, buscando sua ótima performance e evitando-se a instalação do *overtraining*.

Para finalizar, vale ressaltar que é de extrema importância para a formação profissional dos pós-graduandos a vivência em atividades de ensino. O estudo apresentado no capítulo 4 está aceito para publicação no BAMBED (*Biochemistry and Molecular Biology Education*). Representa uma pequena parcela da experiência vivida em sala de aula ao longo dos anos da minha formação acadêmica. Um dos objetivos do nosso grupo é ajustar o conteúdo teórico a atividades práticas que se aproximem do dia-a-dia do aluno para facilitar a compreensão de diversos assuntos. A participação dos alunos neste tipo de atividade os coloca como agentes principais na produção dos dados a serem analisados e discutidos. Este processo facilita tanto a compreensão de uma teoria como a visualização dos acontecimentos biológicos, nem sempre triviais de serem imaginados. Acreditamos que esse tipo de metodologia permite que o aluno faça a transposição do conhecimento teórico para o seu dia-a-dia profissional com muito mais facilidade.

Os dados apresentados na parte II da presente tese mostraram que a discussão propiciada pela análise de dados reais possibilita que os alunos pensem estratégias que podem por ele ser adotadas no seu dia-a-dia, abrindo espaço para a imediata aplicação do conteúdo teórico abordado em sala de aula. Com este tipo de estratégia, a teoria, muitas vezes abstrata para o aluno, torna-se algo com sentido, permeando as tomadas de decisão na sua vida profissional. Isso certamente o diferencia no mercado de trabalho.

ATIVIDADES COMPLEMENTARES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO (2004-2009)

ARTIGOS PUBLICADOS:

- Fernanda L. Lazarim, Joaquim M.F. Antunes-Neto, Fernando O.C. da Silva, Lázaro A.S. Nunes, Adriana Bassini-Cameron, Luiz-Cláudio Cameron, Armindo A. Alves, René Brenzikofer, Denise Vaz de Macedo. **The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship.** *Journal of Science and Medicine in Sport.* 12: 85–90, 2009.
- Claudio C. Zoppi, Rodrigo Hohl, Fernando C. Silva, Fernanda L. Lazarim, Joaquim M. F. Antunes Neto, Mirtes Stancanelli, Denise V. Macedo. **Vitamin C and E supplementation effects in professional soccer players under regular training.** *Journal of the International Society of Sports Nutrition.* 3(2): 37-44, 2006.

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO:

- Fernanda Lorenzi Lazarim; Mirtes Stancanelli, René Brenzikofer, Denise Vaz de Macedo. **Understanding the glycemic index and glycemic load and their practical applications.** *Biochemistry and Molecular Biology Education.* Aceito em Maio de 2009.
- Denise Vaz Macedo, Fernanda Lorenzi Lazarim, Fernando Oliveira Catanho da Silva, Lucas Samuel Tessuti, Rodrigo Hohl. **Is the lactate production related to muscular fatigue? A pedagogical proposition using empirical facts.** *Advances in Physiology Education.* Aceito em Junho de 2009.

CAPÍTULO DE LIVRO:

- Stancanelli, M. ; Lopes, C. R. ; F.O.C., Silva ; L.S., Tessutti ; LAZARIM, F. L. ; R. Hohl ; P.G., Granda . **Basquetebol.** In: Marcia Daskal Hirschbruch e Juliana Ribeiro de Carvalho. (Org.). *Nutrição esportiva Uma visão Prática.* 2 ed. São Paulo: Manole, 2008, v. , p. 77-84.

PRÊMIO RECEBIDO:

- 4º lugar no Prêmio Biofenac Aerosol de Incentivo a Ciência do Desporto na categoria Ciência da Atividade Física e do Desporto com o trabalho **"The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship."** Laboratório Aché e Fitness Brasil. São Paulo, 5 de setembro de 2008.

ATIVIDADES DOCENTE:

- Professora do Curso de Especialização em Bioquímica, Fisiologia, Treinamento e Nutrição Esportiva oferecido pelo Instituto de Biologia da UNICAMP desde 2004.
- Monitora da disciplina BB110-Bioquímica Básica oferecida aos alunos do curso de Educação Física da UNICAMP (2000-2007).
- Professora do curso "Bioquímica do Exercício" (12hs) ministrado na Semana da Química da UNICAMP em 2007.
- Participação na disciplina de Bioquímica do curso de Pós graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da UNICAMP, ministrando aula sobre metabolismo energético e atividade física e suplementação esportiva, 2004 e 2007.

ORIENTAÇÕES:

- Michelli Cristina de Andrade Gonçalves. **Padronização de géis 2D para amostras de soro de ratos submetidos a um protocolo de exercício exaustivo de natação.** 2007. *Iniciação Científica*. Universidade Estadual de Campinas, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Co-Orientação.
- Eduardo Iwamoto. **Suplementação com Carnitina: Aplicações na Atividade Física.** 2006. *Trabalho de Conclusão de Curso*. (Graduação em Educação Física) - Universidade Estadual de Campinas.
- Michelli Cristina de Andrade Gonçalves. **Proteoma do Exercício: Princípios, Aplicações e Perspectivas.** 2006. *Trabalho de Conclusão de Curso*. (Graduação em Educação Física) - Universidade Estadual de Campinas.

BANCA EXAMINADORA:

- Participação em banca de Ana Carolina Normand. **Comparação do efeito ergogênico do caldo de cana e da maltodextrina na reposição das reservas de glicogênio muscular e hepático na recuperação de exercícios exaustivos.** 2006. *Trabalho de Conclusão de Curso* (Graduação em Educação Física) - Universidade Estadual de Campinas.

REVISOR DE PERIÓDICO:

- Periódico: Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano, 2008.
- Periódico: RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2008.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS:

- Lazarim, F. L. **Análise Proteômica de Soro de Animais Treinados**. Apresentação oral de Trabalho no II Workshop em Ciências do Exercício e Saúde. Uberlândia, 16 a 18 de Novembro de 2007.
- Lazarim, F. L. ; R. Hohl ; L.S., Tessutti ; F.O.C., Silva ; Stancanelli, M. ; Sarraipa, M. ; Lopes, C. R. ; D.V., Macedo. **Atividades Práticas no Ensino de Bioquímica para Alunos da Educação Física**. Apresentação Oral no I Simpósio de Educação na UNICAMP, 13 e 14 de novembro de 2007.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS:

- Lazarim, F. L. ; D.V., Macedo . **Serum Proteomic Analysis of trained rats**. In: *XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica*, 2008, Águas de Lindóia. XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008.
- Lazarim, F. L. ; F.O.C., Silva ; L.S., Tessutti ; R. Hohl ; Machado, E ; Ferruci, D. ; Lourenco, T. F. ; Passos, M. A. ; Buscariolli, R. ; Normand, A. C. ; Ferraresso, R. L. P. ; Sarraipa, M. ; Goncalves, M. C. A. ; D.V., Macedo . **Building the glycolysis and Krebs cycle as a puzzle: a strategy to learning metabolic pathways**. In: *XXXIV Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, 2005, Águas de Lindóia. Reunião Anual da SBBq - Programas e Resumos, 2005.
- F.O.C., Silva ; Lazarim, F. L. ; L.S., Tessutti ; R. Hohl ; Sarraipa, M. ; D.V., Macedo **Lactate production retards, not causes, acidosis: a practical approach for physical education students**. In: *XXXIV Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, 2005, Águas de Lindóia. Reunião Anual da SBBq - Programas e Resumos, 2005.
- R. Hohl ; F.O.C., Silva ; Lazarim, F. L. ; L.S., Tessutti ; SARRAIPA, M. ; D.V., Macedo . **Lactate production retards, not causes, acidosis: a theoretical approach for physical education students**. In: *XXXIV Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, 2005, Águas de Lindóia. Reunião Anual da SBBq - Programas e Resumos, 2005.
- LAZARIM, F. L. ; F.O.C., Silva ; Lago, O C ; A. A. Alves ; Kubota, L. ; D.V., Macedo **Estabelecimento de um valor limite superior para a enzima creatina quinase como biomarcador de sobrecarga muscular em jogadores de futebol**. In: *VIII Simpósio Internacional de Atividade Física do Rio de Janeiro*, 2004, Rio de Janeiro. Revista de Educação Física. Rio de Janeiro : Viaman Gráfica e Editora LTDA., 2004. p. 48-48.

- F.O.C., Silva ; Lazarim, F. L. ; A. A. Alves ; Kubota, L. ; D.V., Macedo . **Proposta de modulação das cargas de treinamento através da análise de biomarcadores de estresse oxidativo em jogadores de futebol.** In: *VIII Simpósio Internacional de Atividade Física do Rio de Janeiro*, 2004, Rio de Janeiro. Revista de Educação Física. Rio de Janeiro : Viaman Gráfica e Editora LTDA., 2004. p. 49-49.

DESENVOLVIMENTO DE SOFTWARE:

- Participação no desenvolvimento do software *LABEX-Nutrição* para Avaliação do estado nutricional de indivíduos atletas, praticantes de atividade física e sedentários.

ANEXO 1:
Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada **ANÁLISE PROTEOMICA DE SORO DE RATOS EM DIFERENTES SITUAÇÕES DE EXERCÍCIO E UMA EXPERIÊNCIA DE PESQUISA EM ENSINO:**

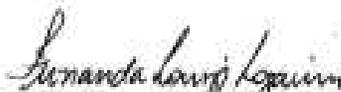
() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto **CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº _____), intitulado _____.

(x) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 638-1);

() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____).

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.
Especificar: _____



Aluno: Fernanda Lorenzi Lazarim



Orientador: Dra. Denise Vaz de Macedo

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: _____
Função: _____

Profª. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/IB - UNICAMP

21/8