



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

MICHELLI CRISTINA DE ANDRADE GONÇALVES

**PROTEOMA DO EXERCÍCIO:
Princípios, aplicações e
perspectivas.**

Campinas
2006

507/4



MICHELLI CRISTINA DE ANDRADE GONÇALVES

**PROTEOMA DO EXERCÍCIO:
Princípios, aplicações e
perspectivas.**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação apresentado à Faculdade de
Educação Física da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Bacharel em Educação Física.

Orientador: Fernanda Lorenzi Lazarim
Co-Orientador: Denise Vaz de Macedo

Campinas
2006

CENTRO DE DOCUMENTAÇÃO
 24.11.06
 ANDRÉIA DA SILVA MANZATO
 Bibliotecária - CRB 7202
 FEF/UNICAMP - Matr. 28703-6

UNIDADE FEF/199
 N.º CHAMADA:
 TCC/Unicamp
 G587p
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 3222
 PROC
 C ☐ D ☒
 PREÇO 12,46
 DATA 14/02/2007
 N.º CPD 435948

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA FEF - UNICAMP

G587p Gonçalves, Michelli Cristina de Andrade.
 Proteoma do exercício: princípios, aplicações e perspectivas / Michelli
 Cristina de Andrade Gonçalves. - Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Fernanda Lorenzi Lazarim.
 Co-Orientadora: Denise Vaz de Macedo.
 Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Faculdade de
 Educação Física, Universidade Estadual de Campinas.

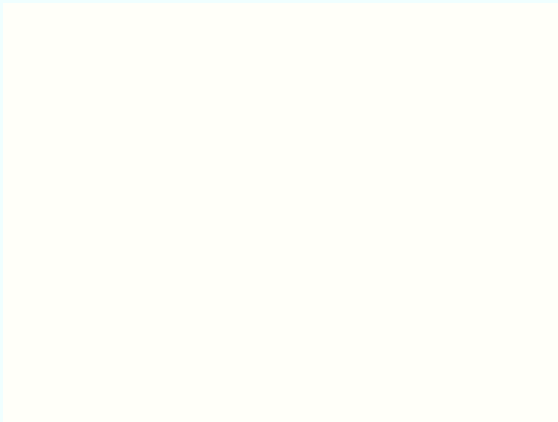
1. Exercícios. 2. Ciência. 3. Esportes. I. Lazarim, Fernanda Lorenzi. II.
 Macedo, Denise Vaz de. III. Universidade Estadual de Campinas,
 Faculdade de Educação Física. IV. Título.

(asm/fef)

MICHELLI CRISTINA DE ANDRADE GONÇALVES

**PROTEOMA DO EXERCÍCIO:
Princípios, aplicações e perspectivas.**

Este exemplar corresponde à redação final do Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) defendido por Michelli Cristina de Andrade Gonçalves e aprovado pela Comissão julgadora em: 31/10/06.



Campinas
2006

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais que me oferecem a melhor herança do mundo: a oportunidade de estudar.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, pela inteligência, pela saúde, pelos meus pais e amigos.

Agradeço aos meus pais pelas oportunidades, pelo amor e dedicação, pela paciência e formação que me deram, entre muitas outras coisas, que apenas se pede obrigado, não há nada no mundo que pague. Ao meu irmão, pela admiração e pela oportunidade de aprender a ser mais paciente.

Aos meus amigos do coração, de São João, de Campinas, da faculdade, da infância, primos: Ju, Íris, Curitiba, Japonês, Ricardo, Andreza, Carol Palomo, André, Tálita, Laura, Tati, Mariana, Cecília, Rafael, Bia, Camila, Patricia,...pelas festas, alegrias, tristezas, pelo amor incondicional que nem a distância destrói.

Às minhas irmãs de Campinas: Élide, Thabata e Thais, pelo companheirismo de todos esses anos. E às integrantes do Reino: Ju, Danúbia, Laura, Marina, Bruna e Tamiris.

Aos meus amigos-professores do Labex: Denise (obrigada pela oportunidade), Fernando, Paulo, Lucas, Carol, Madla, Rodrigo, Renato, Lázaro, Thiago, Duda, Danilo, Rubinho, Dalila, Rejane, Mirtes...pelas risadas e pelos ensinamentos. Em especial à minha orientadora Fernanda, por toda paciência do mundo, pelas aulas do dia-a-dia, pela amizade, pelo respeito às minhas limitações e ajuda em tentar superá-las.

Aos meus amigos FEFianos...e ao O3 diurno.

Por todos os professores que passaram pelo meu caminho e plantaram uma semente de conhecimento.

E por fim novamente a Deus por colocar todas essas pessoas no meu caminho, que me fazem mais feliz a cada dia.

Vocês todos moram no meu coração!!!

GONÇALVES, Michelli Cristina de Andrade. **Proteoma do Exercício: princípios, aplicações e perspectivas**. 2006. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

RESUMO

A prática regular de atividade física está associada a diversos benefícios para a saúde e na prevenção de doenças crônicas como diabetes, problemas cardiovasculares, osteoporose, hipertensão, câncer, depressão entre outras. A admirável capacidade das diversas células musculares do nosso organismo se adaptar em resposta ao exercício físico 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 anteriormente. A análise proteômica permite separar, quantificar e identificar o perfil protéico de tecidos e fluidos biológicos, possibilitando a identificação de biomarcadores que se alteram em resposta a um estímulo estressor. Permite também caracterizar o fluxo de informações catalisado por proteínas que controlam a transcrição de diversos genes em diferentes processos biológicos. A análise proteômica ainda não é aplicada em larga escala na ciência do esporte. São poucos os estudos nessa área que se preocupam em desvendar os mecanismos moleculares envolvidos nos processos adaptativos e não adaptativos decorrentes do exercício físico. O objetivo do presente trabalho é apresentar os princípios e técnicas envolvidas na análise proteômica, sua aplicabilidade dentro da ciência do esporte e apontar perspectivas futuras na pesquisa com exercício.

Palavras-Chaves: Proteoma; Exercício; Ciência do Esporte.

GONÇALVES, Michelli Cristina de Andrade. **Exercise Proteomics: principles, applications and perspectives**. 2006. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ABSTRACT

The physical activity regular practice is associated to diverse benefits for health and prevention of chronic disease such as diabetes, cardiovascular problems, osteoporosis, hypertension, cancer, depression and others. The admirable capacity of muscular cells of our organism to adapt in response to physical exercise is related to gene transcription and subsequent protein synthesis activation that will confer better phenotypes to cells than the previous one. Proteomic analysis allows to separate, quantify and identify the protein profile of tissues and biological fluids making possible the biomarkers identification that alters in response to stress stimulus. It also allows to characterize the information flow catalyzed by proteins that controls the transcription of variety genes in different biological processes. The proteomics analysis isn't yet applied on a large scale in sport science. There are few studies in this area which goals are to understand the molecular mechanisms involved in adaptative and non-adaptative response to physical exercise. The goal of the present work is to present the principles and techniques involved in the proteomic analysis, its applicability in sports science and to point out future perspectives in the research with exercise.

Keywords: Proteomics; Exercise; Sport Science.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do processo de transcrição gênica.	14
Figura 2	Esquema do mecanismo de tradução nos ribossomos.	15
Figura 3	Esquema da 2DE. 1ª Dimensão: <i>strip holder</i> no aparelho de focalização isoeletrica que separa as proteínas pelo seu ponto isoeletrico, determinado pelo pH. 2ª Dimensão: o gel da primeira dimensão é acoplado ao gel da segunda dimensão e as proteínas são separadas por peso molecular (Mr).	19
Figura 4	Gel de poliacrilamida de soro de rato corado com prata.	20

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HSP20	<i>Heat shock protein 20</i>
IEF	Focalização isoeletrica
pH	Potencial de hidrogenio ionico
pI	Ponto isoeletrico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA_t	Ácido ribonucleico transportador
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS PAGE	Gel de poliacrilamida de eletroforese
2DE	Eletroforese de duas dimensoes
2D DIGE	Two-dimensional differential gel electrophoresis

SUMÁRIO

1 Introdução	11
1.1 Adaptações moleculares ao exercício.....	12
2 Mecanismos envolvidos na síntese protéica.....	14
3 Análise Proteômica.....	17
3.1 Técnicas Utilizadas na Análise Proteômica.....	18
3.2 Aplicação da Análise Proteômica.....	21
4 Proteoma e Exercício.....	23
5 Perspectivas Futuras.....	25
Conclusões	26
Referências Bibliográficas	27

1 Introdução

Os benefícios gerados pela prática regular de exercício físico para a saúde são decorrentes de uma resposta adaptativa positiva a aplicação de um programa de treinamento. Um programa ou periodização de treinamento é caracterizado por modulações na intensidade e volume de esforço, com aplicação de estímulos sucessivos ao longo das semanas, de forma a sempre induzir um desequilíbrio na homeostasia do organismo, uma vez que a adaptação positiva, refletida pelo aumento do desempenho, é uma resposta ao estresse dos exercícios.

A resposta ao exercício é a somatória de dois momentos, que ocorrem durante e após a realização do estímulo. A aplicação do princípio da sobrecarga durante o exercício induz um desequilíbrio na homeostasia, relacionado à fadiga, que sinaliza ações integradas entre cérebro, glândulas, hormônios, sistema imune, coração, musculatura esquelética, sangue e pulmões, permitindo a adequação no recrutamento muscular e fornecimento de combustível, oxigênio e energia. Já a resposta adaptativa esperada em resposta a esse estímulo estressor ocorre após o exercício, durante a recuperação, no chamado período regenerativo.

A resposta adaptativa envolve resposta inflamatória branda, com a função de reparo e regeneração dos tecidos lesionados, aumentos nas concentrações das reservas intramusculares de ATP e nas atividades de enzimas-chave do metabolismo, além da síntese de novas proteínas (SMITH, 2000; 2004). A adaptação positiva ao treinamento é resultado de uma alternância corretamente programada entre indução de estresse e período de regeneração (BOMPA, 2001). Ou seja, a relação entre quantidade de estímulo e tempo de recuperação entre cada sessão de treinamento, é de fundamental importância para o pico dessa resposta adaptativa, e é chamado no treinamento de supercompensação.

O desequilíbrio crônico entre quantidade de estímulo e tempo de recuperação pode levar à instalação de um processo conhecido como *overtraining*, de mal-adaptação ao treinamento, que está associado sempre à queda no desempenho. O *overtraining* ainda não é bem conhecido e diagnosticado, sendo a única característica comum em todos os casos a queda na performance. Outras alterações podem ou não acompanhar a diminuição da performance como, por exemplo, alterações comportamentais, fisiológicas e psicológicas. Entretanto, essas alterações não se

repetem em todos os casos (HALSON, JEUKENDRUP, 2004).

Pelo exposto, fica claro que a adaptação positiva ao treinamento é resultado de uma alternância corretamente programada entre indução de estresse e período de regeneração (BOMPA, 2001). Ou seja, a relação entre quantidade de estímulo x tempo de recuperação entre cada sessão de treinamento e a *otimização* das cargas de treino são de fundamental importância para a supercompensação. Por este motivo, o tempo dedicado ao período regenerativo também deveria estar sempre quantificado numa periodização de treinamento, embora na prática ele seja freqüentemente negligenciado.

1.1 Adaptações moleculares ao exercício

A regulação da expressão gênica está associada às condições que o organismo é submetido. Assim, é esperado que um mesmo tecido ou célula, na presença de diferentes situações de exercício físico apresente padrões de expressão de proteínas tanto quantitativos como qualitativos diferentes. Esta plasticidade fenotípica já está bem caracterizada e conhecida em alguns tecidos, como o tecido muscular esquelético de mamíferos, porém, somente nos níveis estrutural e funcional. Por exemplo, sabe-se que o treinamento de resistência resulta em aumentos de massa muscular e da força, além de hipertrofia de fibras (MCDONAGH, DAVIES, 1987; TESCH, 1987) e que o treinamento de *endurance* resulta em aumentos na densidade mitocondrial, capilarização e captação máxima de oxigênio, além de alterar enzimas-chave do metabolismo (HOLLOSZY e BOOTH, 1976; SJODIN, 1990). Além disso, são bem estudadas as adaptações fisiológicas e bioquímicas decorrentes da prática regular de atividade física que beneficiam a prevenção e tratamento de doenças crônicas como doenças cardiovasculares (KOHL, 2001; SHEPHARD, 2001) osteoporose (WOLFF et al., 1999; CARTER et al., 2001), diabetes (LARKIN, 2001; CAUZA et al., 2005; LAAKSONEN et al., 2005) dislipidemias (Leon et al., 2001; WILLIAMS et al., 2000), obesidade (BLAIR, 1999; WING et al., 2001), câncer (LEE, 2003; THUNE, 2001) hipertensão (WARBURTON et al., 2004) e depressão (DUNN, 2001; WARBURTON, 2001).

Estudos sobre as adaptações moleculares ao exercício são ainda em pequeno número, mas apontam que as respostas adaptativas moleculares sejam mediadas pela ativação/inibição de diversos genes, que produzem fenótipos variados que se sobressaem aos fenótipos presentes anteriormente (BRAY, 2000). Existem trabalhos mostrando um aumento significativo na concentração de RNA mensageiros correspondentes a genes envolvidos na resposta metabólica (KOVAL et al., 1998; KRANIOU et al., 2000; WADLEY et al., 2001), coordenação (PUNTSCHART et al., 1998; GUSTAFSSON et al., 1999) e proteínas de estresse (FEBBRAIO, 2000; NEUFER, 1998) após uma sessão de exercício. Outros trabalhos têm mostrado que pode ocorrer inibição ao invés de ativação de determinados genes (O'NEILL et al., 1999; RICHARDSON et al., 2000).

Contudo, a maioria desses estudos limitam-se a analisar a síntese de RNAm, ou seja, o processo de transcrição gênica. Níveis aumentados de RNAm indicam quais genes estão ativos, sem informar a função e possível ação desse gene no processo adaptativo (GOLDSPINK, 1998; BOOTH et al., 1998). Dessa forma, para se investigar os mecanismos moleculares envolvidos na resposta adaptativa ao exercício seria interessante conhecer o produto dos genes: as proteínas, expressas em função dos diferentes tipos de exercícios. Nesse sentido, a análise proteômica aparece como um enorme atrativo, pois permite a separação, quantificação e identificação em larga escala das mais diversas proteínas expressas pelo nosso organismo em diferentes situações (WILKINS et al., 1995).

O conhecimento do proteoma dos mais diversos tecidos e fluidos biológicos tem sido apontado por muitos autores como a ferramenta que promoverá uma revolução em diversas áreas, por representar o elo entre os genes e as proteínas e também os mecanismos de transmissão de informação em diferentes situações (LOHR, 2004; PETRICON et al., 2002).

Neste trabalho, vamos discutir os princípios e técnicas envolvidas na análise proteômica e sua aplicabilidade dentro da Ciência do Esporte, apontando perspectivas futuras da pesquisa com exercício.

2. Mecanismos envolvidos na síntese protéica

Um estímulo gerado pelo exercício ativa ou inibe determinados genes. O gene representa uma pequena parte do DNA que contém a informação da sequência de aminoácidos presentes em uma determinada proteína. Uma vez ativados, a informação contida nestes genes é copiada, através de um processo chamado de transcrição. Em seguida, a informação é traduzida, gerando uma nova proteína através de um processo conhecido como tradução.

As ativações dos genes ocorrem através de uma cascata de reações, desencadeadas por um estímulo que ao final irá ativar diversos fatores de transcrição (FT) específicos. Estes, por sua vez, irão identificar o gene a ser transcrito, dando o sinal para o início da transcrição.

A transcrição, ou seja, a cópia do gene é feita por ação de uma enzima chamada RNA polimerase. Esta enzima é capaz de se ligar à fita de DNA no gene indicado pelo fator de transcrição e copiar a sequência de bases (adenina, guanina, timina e citosina) presentes neste gene. A cópia é uma molécula de RNA que carrega a informação da sequência de aminoácidos da nova proteína a ser sintetizada, conhecido como RNA mensageiro (RNAm). A figura 1 mostra um esquema que ilustra esta etapa.

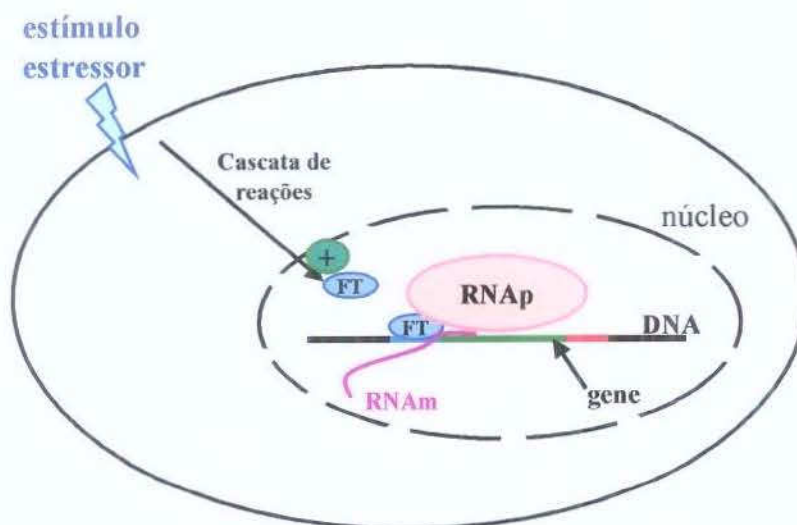


Figura 1: Esquema do processo de transcrição gênica.

A próxima etapa do processo consiste na tradução deste RNAm pelos ribossomos. Ou seja, o RNAm é lido e traduzido para a sequência de aminoácidos que compõem a proteína. Os

aminoácidos são encaminhados até os ribossomos através de uma molécula de RNA chamada RNA transportador (RNAt). Cada um dos 20 aminoácidos possui um RNAt específico, com uma sequência única de três bases. Os aminoácidos são ligados ao seu RNAt correspondente pela ação de enzimas chamadas aminoacilRNAt sintetase, específicas para cada um dos aminoácidos.

Os ribossomos possuem três sítios para ligação do RNAt, chamados de A, P e E. No sítio A sempre liga um RNAt que está trazendo um novo aminoácido para ser incorporado na cadeia peptídica. No sítio P situa-se o RNAt que está segurando a cadeia peptídica que está sendo formada. O sítio E representa um sítio de saída para o RNAt livre após a ligação do seu aminoácido.

Nos ribossomos, cada três bases do RNAm são lidas no sítio A, possibilitando a ligação do RNAt com a sequência de bases correspondentes ligado ao seu aminoácido. A ligação peptídica ocorre entre os aminoácidos situados nos sítios A e P. Após ocorrer a ligação peptídica, o ribossomo se desloca às custas de energia, deixando novamente o sítio A livre para entrada de novo RNAt com seu aminoácido, deslocando o RNAt livre para o sítio E, para ser liberado. Este ciclo se repete até a ligação de um fator de liberação, que indicará o fim da síntese protéica. A figura 2 ilustra essa sequência de reações.

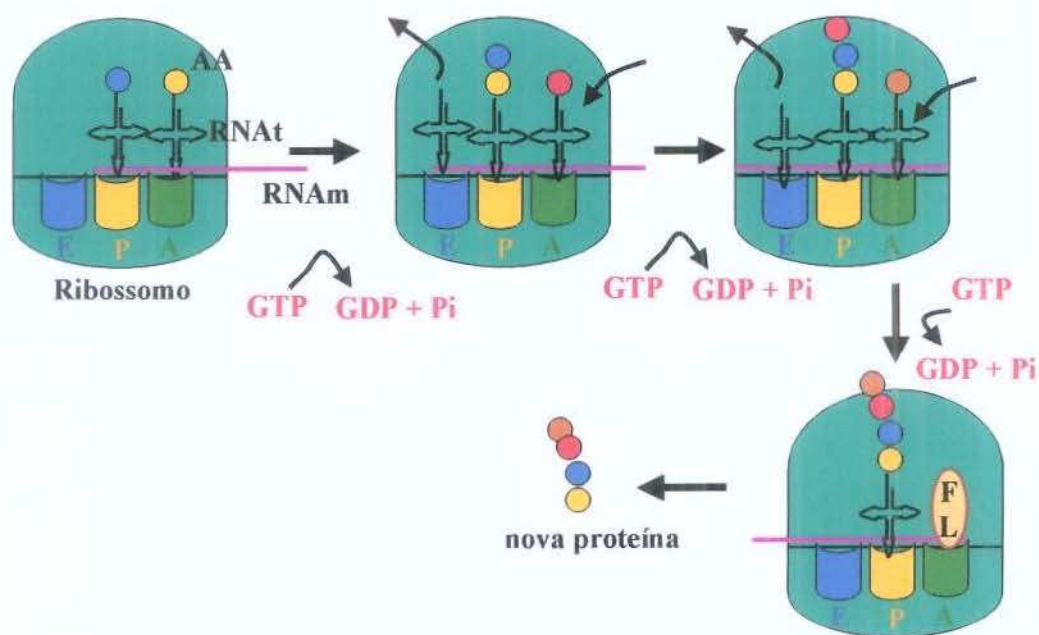


Figura2: Esquema do mecanismo de tradução nos ribossomos.

Após serem sintetizadas as proteínas são endereçadas para o Complexo de Golgi ou retículo endoplasmático onde podem sofrer mudanças pós-traducionais, como por exemplo: acetilações, fosforilações, metilações, pontes dissulfeto, glicosilação e lipidação.

Após essa etapa, as proteínas vão para os lisossomos, vesículas secretoras, citosol, núcleo e membrana plasmática para desempenhar suas diferentes funções.

3. Análise Proteômica

Um dos objetivos mais ambiciosos da ciência neste século foi atingido recentemente com o seqüenciamento de diversos genomas, incluindo o genoma humano (VENTER et al., 2001). No entanto, embora hoje sejamos capazes de ler nossa seqüência genética, ainda não conseguimos correlacionar essa informação com os diversos mecanismos fisiológicos ou patológicos que ocorrem no nosso organismo. Isto ocorre porque a informação da seqüência gênica indica apenas um estado estático das diversas maneiras que as células podem responder, através das proteínas expressas, nas mais variadas situações a que são submetidas.

Como já abordamos anteriormente, a análise dos níveis de RNAm (transcriptoma) representa uma parte importante da compreensão da tradução da informação genética em proteínas funcionais no nosso organismo, indicando 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 a natureza transiente do RNAm (que pode durar de poucos minutos até horas), a ativação da tradução desse RNAm para a síntese protéica e a própria meia-vida da proteína (SMITH et al., 2002). Devido a estes fatos, o aumento da transcrição (síntese de RNAm) e tradução (estabilidade e eficiência na síntese protéica), assim como as mudanças pós traducionais que ocorrem na proteína, ainda são muito pouco compreendidos.

A análise proteômica surge neste contexto como o elo entre a informação genética e seu produto - as proteínas - nas mais diversas vias de sinalizações envolvidas em processos fisiológicos e patológicos que ocorrem no organismo (PLEBANI, 2005).

O termo proteômica foi introduzido inicialmente em 1995, e foi definido como sendo a caracterização em larga escala do conjunto de proteínas expresso numa célula ou tecido em um determinado momento e sob determinada condição (WILKINS et al., 1995; PENNINGTON, 1997). 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 proteínas-proteínas.

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 mais diversas proteínas em uma célula e entre células podem caracterizar o fluxo de informações em uma via de sinalização

envolvida nos diversos mecanismos biológicos (PAWSON, 1995; SCHWIKOWSKI, 2000; LEGRAIN, 2001). Assim, a possibilidade de acesso e visualização do “circuito” protéico presente tanto em células e tecidos como em fluidos biológicos, que conectam o meio intra e extracelular, gerada pela análise proteômica, permitem a compreensão e comparação dos mecanismos moleculares envolvidos em diferentes condições: normal, doenças e exercício físico (PETRICON et al., 2003; LIEBOLD, 2006).

Devido à quantidade de informações obtidas com a análise proteômica, Andy et al. (2003) sugeriram a divisão em três tipos de análise:

- ✓ *Protein expression proteomics* – objetiva uma análise quantitativa da expressão protéica, com o objetivo de identificar novas proteínas e biomarcadores;
- ✓ *Structural Proteomics* – o objetivo principal é mapear estruturalmente complexos protéicos e separar as proteínas de acordo com sua localização celular (mitocôndria, núcleo, membrana etc.);
- ✓ *Functional Proteomics* – objetiva a análise do perfil protéico para compreender a organização celular ao nível molecular.

Para atender a esses objetivos, a caracterização de determinado proteoma requer métodos analíticos sensíveis para separar, detectar e quantificar as proteínas tanto na sua forma normal quanto modificada (PLEBANI, 2005).

3.1 – Técnicas Utilizadas na Análise Proteômica

A análise proteômica foi possível devido ao desenvolvimento de métodos de detecção e identificação de proteínas (DOVE, 1999). A tecnologia mais aplicada atualmente para isso é a combinação da eletroforese de duas dimensões (2DE) em gel de poliacrilamida, para separação, detecção e quantificação das proteínas, com a espectrometria de massa, para identificação das proteínas separadas.

Embora a 2DE seja uma técnica muito utilizada na análise proteômica, ela ainda apresenta limitações, devido ao grande manuseio que a técnica exige e também pelas dificuldades na separação de determinadas proteínas. Para superar essas limitações, outras técnicas de separação

podem ser associadas a 2DE, resultando em maior eficiência. A mais utilizada é cromatografia líquida de alta performance (HPLC), que auxilia no pré-fracionamento de amostras através da separação de proteínas por exclusão molecular, carga iônica ou afinidade (ISSAQ et al., 2002).

A 2DE baseia-se na combinação de duas técnicas de separação em gel de poliacrilamida: focalização isoeletrica seguida de eletroforese em SDS PAGE, conforme mostrado na figura 3.

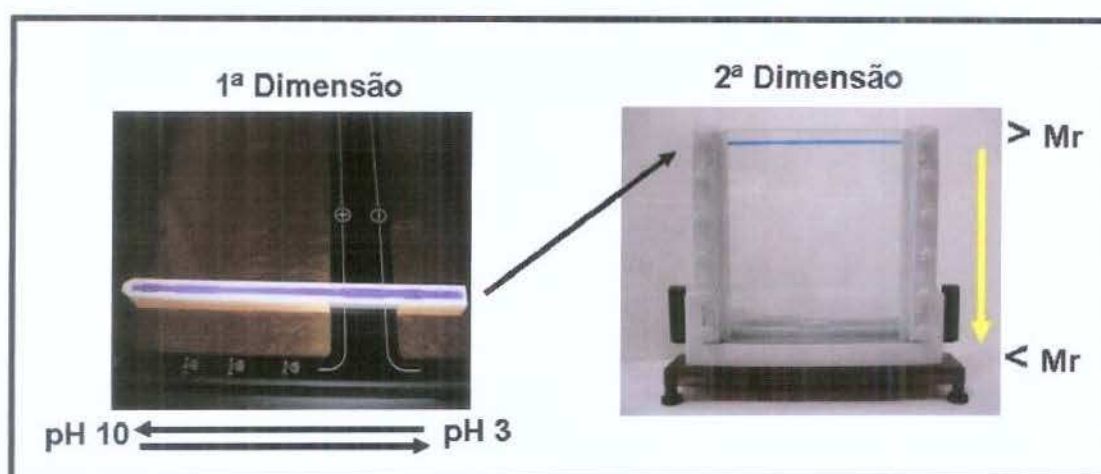


Figura 3: Esquema da 2DE. **1ª Dimensão:** *strip holder* no aparelho de focalização isoeletrica que separa as proteínas pelo seu ponto isoeletrico, determinado pelo pH. **2ª Dimensão:** o gel da primeira dimensão é acoplado ao gel da segunda dimensão e as proteínas são separadas por peso molecular (M_r).

O primeiro passo é a separação das proteínas pelo seu ponto isoeletrico (pI), através da focalização isoeletrica (IEF), ou primeira dimensão da 2DE. Para isso, inicialmente estabelece-se um gradiente de pH, através da aplicação de um campo elétrico ao longo de um gel. Ao aplicar uma mistura protéica nesse gel cada proteína irá migrar até alcançar a região de pH igual ao seu pI, definido como o valor de pH específico no qual a proteína permanece em uma posição estacionária, onde sua carga é zero.

A disponibilidade atual de *strips* com diferentes intervalos de pH vem possibilitando uma melhora na resolução dos géis. Faixas mais amplas (3-10) permitem a visualização de cerca de 1000 – 3000 *spots* por gel (HOVING et al., 2002). *Strips* com faixas mais estreitas, os chamados “*zoom géis*” permitem a visualização de proteínas menos abundantes (WILDGRUBER et al., 2000; HOVING et al., 2002).

O segundo passo é a solubilização das proteínas contidas no gel da primeira dimensão em tampão com SDS e a sua separação, por meio de corrida da amostra em segunda dimensão. Dessa forma, as proteínas separadas por pI através da IEF podem ser separadas pelo peso molecular na eletroforese do tipo SDS PAGE. Com isso, é possível separar proteínas de peso molecular idêntico que diferem no valor de seus pIs, ou proteínas com valores de pI semelhantes mas que apresentam pesos moleculares distintos.

O uso de gel de gradiente na 2DE também possibilitou uma melhora na resolução em uma determinada faixa de peso molecular, favorecendo a visualização de regiões específicas do gel, principalmente das proteínas de baixo peso molecular (GORG et al., 2000).

O resultado final dessas separações é um gel de duas dimensões que, por coloração por prata ou *Coomassie Blue* apresenta um perfil composto de diversos *spots* (pontos), onde cada *spot* representa uma proteína, cujo tamanho é proporcional à sua quantidade.

O perfil do mapa 2DE segue um sistema cartesiano, onde da esquerda para a direita observa-se um aumento do pI contido sobre o eixo X, enquanto que sobre o eixo Y, de baixo para cima observa-se o aumento da massa molecular, conforme mostrado na figura 4.

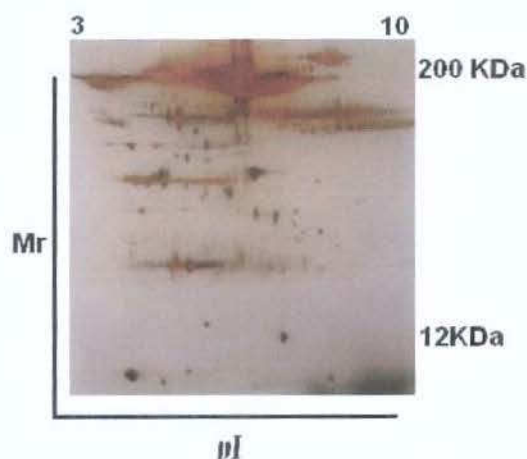


Figura 4: Gel de poliacrilamida de soro de rato corado com prata.

Um outro método de coloração, que se apresenta mais eficiente atualmente, é por fluorescência, como *SYPRO Ruby*, que permite uma maior faixa de detecção de proteínas, sendo mais compatível com a espectrometria de massas (PATTON, 2000). Existe também a técnica 2D

DIGE (*Two-dimensional differential gel electrophoresis*) que permite o processamento e comparação de três amostras em um único gel através de 3 fluorescências (Cy2, Cy3 e Cy5) (CHROMY et al., 2004).

Uma vez feito o mapa, é possível analisar as imagens dos géis 2D através de sistemas e programas de computador especializados, capazes de digitalizar essas imagens. Tais programas permitem a detecção dos *spots* e sua quantificação, bem como estimativas sobre pI e peso molecular de cada *spot*. Esses programas são indispensáveis também para o armazenamento dos dados coletados, para a construção de bancos de dados, para análises mais rápidas e para comparações de diferentes géis.

A próxima etapa da análise proteômica é identificar os *spots* de interesse detectados no gel. Esses *spots* são extraídos do gel, cortados, digeridos e submetidos à espectrometria de massas.

Nesta técnica, após a digestão, os peptídeos resultantes são ionizados e transferidos para dentro de um tubo a vácuo onde há um campo elétrico. Deste modo os peptídeos atravessam o tubo de modo que os menores o fazem em menor tempo do que os peptídeos maiores. Através deste tempo de voo, as massas dos peptídeos podem ser quantificadas e posteriormente comparadas com bancos de dados de proteínas ou seqüências genômicas, permitindo a identificação das proteínas.

Devido aos crescentes avanços na técnica de espectrometria de massas, a alta resolução e sensibilidade dos aparelhos estão sendo possíveis atualmente, além de identificar os peptídeos, caracterizar as principais mudanças pós-traducionais. (LIEBOLD, 2006).

É importante ressaltar que a maioria dos métodos que possibilitaram a identificação de proteínas separadas em 2DE de forma rápida, conclusiva e com sensibilidade foram desenvolvidos apenas nos últimos 10 anos (AEBERSOLD, GOODLETT, 2001). Os principais fatores que possibilitaram o surgimento destes métodos foram avanços na técnica de espectrometria de massa, disponibilidade de seqüências genômicas completas e desenvolvimento de programas computacionais para correlação dos dados obtidos por espectrometria de massa com os bancos de dados de seqüências de proteínas.

3.2 – Aplicação da Análise Proteômica

A análise proteômica tem sido aplicada em diferentes áreas, desde a investigação de mecanismo de doenças cardiovasculares (ZERKOWSKI et al., 2004) e neurodegenerativas (PIERSON et al., 2004), transplantes de órgãos (BOROZDENKOVA et al., 2004), infertilidade (BOHRING, 2003), desenvolvimento de vacinas e medicamentos (PETRICON & LIOTTA, 2003) e nutrição (FUCHS et al., 2005). No entanto, a área mais promissora e que mais tem crescido é a que envolve pesquisas com câncer (CLARKE, 2003). O grande objetivo nesta área é descobrir os mecanismos de desenvolvimento de tumores e principalmente identificar biomarcadores para diagnóstico da doença ainda em estágios iniciais, na tentativa de garantir um tratamento com maiores chances de sucesso.

Existem ainda grandes desafios a serem vencidos, como, por exemplo, estabelecer uma correlação entre as proteínas diferencialmente expressas nos tecidos e a presença destas proteínas no sangue. O sangue reflete o estado fisiológico de todos os tecidos, possibilitando a identificação de biomarcadores que no futuro podem ser monitorados por técnicas não invasivas, mais simples e baratas (KENNEDY, 2001; HANASH et al., 2002; LIOTTA, 2003). Embora seja uma amostra de fácil acesso, a análise proteômica de soro ou plasma é considerada um dos proteomas mais difíceis de se mapear (VEENSTRA et al., 2005).

A literatura já apresenta alguns estudos que mostram com êxito a identificação de biomarcadores para algumas doenças tanto em tecidos como no soro.

Weekes et al. (1999) estudaram, através de biópsias do coração de bovinos, a dilatação do miocárdio, uma doença cujos mecanismos ainda são pouco conhecidos. Ela é caracterizada por um desequilíbrio sistólico, que leva à redução do volume de sangue ejetado e concomitantemente a um aumento na pressão sistólica. Foram identificadas 12 proteínas diferencialmente expressas em células com a patologia quando comparadas com células sadias e três proteínas foram detectadas como possíveis marcadores dessa doença.

Hojlund et al. (2003) estudaram, através de biópsias musculares, os mecanismos de resistência a insulina presentes na diabetes do tipo II, com o objetivo de identificar marcadores protéicos para o diagnóstico desta doença. Através de comparações de perfis 2DE entre indivíduos sadios e com diabetes foram identificadas oito proteínas com grande potencial para

atuarem como marcadores desta doença.

Zhang et al. (2004) identificaram 3 biomarcadores para detecção de câncer de ovário em estágio inicial através de análise proteômica de soro comparando grupos de mulheres sadias e mulheres com câncer em estágio inicial e avançado.

Ren et al. (2004) descobriram níveis aumentados da proteína TF- α_1 -AT em pacientes com síndrome respiratória aguda comparada com indivíduos sadios indicando que esta poderia ser um biomarcador para a doença, quem vem causando um impacto severo no mundo.

4. Proteoma e Exercício

A aplicação da análise proteômica na pesquisa com exercício ainda é pouco explorada. Um dos primeiros estudos nessa área foi conduzido por Isfort et al. (2002). Os autores buscaram identificar as proteínas diferencialmente expressas no músculo sóleo de ratos que foram impossibilitados de andar, para induzir uma atrofia muscular, e um outro grupo que teve a locomoção permitida, com o intuito de induzir uma hipertrofia muscular. Os autores mostraram alterações significativas em 29 proteínas do músculo atrofiado e em 15 proteínas no músculo hipertrofiado quando comparado com o normal. Eles identificaram aumento da expressão no músculo hipertrofiado das proteínas troponina T, lactato desidrogenase, beta enolase, cadeia leve da miosina e da anidrase carbônica.

Yuan et al. (2004) analisaram o soro de ratos normais e mutantes para o gene $CPE^{fat/fat}$, envolvido no processo de obesidade, que realizaram exercício físico voluntário em comparação com ratos sedentários. Foram identificadas 20 proteínas que se alteraram em decorrência do exercício nos dois tipos de animais. Seis delas diminuíram significativamente, dentre elas a cadeia β da hepatoglobulina e a apolipoproteína-A IV. Os autores sugeriram que níveis diminuídos de hepatoglobulina 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 (Chiellini et al., 2002; Engstrom et al., 2003). Já a apolipoproteína-A IV estaria envolvida na regulação da ingestão de comida (Tso, 2001). Outras 14 proteínas estavam mais expressas nos ratos normais exercitados, sendo que as proteínas tipo calicreína (*kallikrein like proteins*) foram umas das mais expressas. Outros trabalhos apontam que tais proteínas estariam envolvidas na manutenção da pressão arterial (Maeda et al., 2000; Arakawa, 1999). Os autores sugeriram que essas proteínas poderiam estar envolvidas no efeito crônico do treinamento, que leva a uma diminuição da pressão arterial no repouso.

Boluyt et al. (2006) 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 foram 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. Apoiado em resultados de outros estudos, os autores sugeriram que a HSP20 poderia ser um dos mecanismos pelo qual 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 (PIPKIN et al., 2003; FAN et al., 2004).

Existem poucos trabalhos com proteoma do exercício, mas podemos perceber que os resultados são promissores.

5. Perspectivas Futuras

Apenas saber quais genes estão ativos em decorrência do exercício físico não desvenda os mecanismos envolvidos nos processos adaptativos desencadeados pelo exercício. 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 pelo quais elas alteram o fenótipo dos diversos órgãos e tecidos gerando benefícios.

Esta técnica também pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de interação entre o estímulo gerado pelo exercício para promover uma adaptação positiva e os mecanismos de diversas doenças crônicas como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. Isto ajudará a entender como os fenótipos produzidos pelo efeito do exercício superam os fenótipos da doença ou até inibem a sua ativação.

A análise proteômica pode contribuir também para esclarecer um outro desafio: compreender a relação entre quantidade ótima de treinamento e recuperação, identificando os mecanismos moleculares envolvidos na resposta adaptativa ao treinamento e no overtraining. A correlação entre as proteínas expressas no músculo de indivíduos treinados e seu aparecimento na corrente sanguínea permitirá selecionar alguns alvos que possam ser monitorados 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 a supercompensação e evitar a instalação do *overtraining*.

Conclusões

A aplicação da análise proteômica nas pesquisas em Ciência do Esporte permitirá um avanço enorme no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos tanto no processo adaptativo como não adaptativo decorrente do exercício físico. Tal conhecimento auxiliará também na compreensão da interação entre as respostas moleculares desencadeadas pela atividade física e seu mecanismo de ação em diversas doenças.

Com isso, novas tecnologias e ferramentas poderão ser desenvolvidas de modo a auxiliar a prescrição e avaliação do programa de treino, otimizando os benefícios obtidos através da prática regular de atividade física por atletas, sedentários e indivíduos com doenças crônico-degenerativas.

Referências Bibliográficas

AEBERSOLG, R.; GOODLETT, D. Mass spectrometry in proteomics. **Chem. Rev.** v. 101, p.269-295, 2001.

ANDY, L. T. Y.; QING-YU, H. E.; JEN-FU, C. Proteomic technology and its biomedical application. **Acta Biochem Biophys Sin.** v. 35, p.965-75, 2003.

ARAKAWA, K. Exercise, a measure to lower blood pressure and reduce other risks. **Clin Exp Hypertens.** v. 21, p. 797-803, 1999.

BLAIR, S. N.; BRODNEY S. Effects of physical inactivity and obesity on morbidity and mortality: current evidence and research issues. **Med Sci Sports Exerc.** v. 31, p.646-62, 1999.

BOHRING, C.; KRAUSE, W. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto) immunity. The value of proteomic analysis. **Human Reprod.** v.18, p.915-24, 2003.

BOLUYT, M. O. et al. Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20. **Proteomics.** v. 6, p. 3154-3169, 2006.

BOMPA, T.O. **Periodização.** 4. ed. São Paulo: Phorte, 2001.

BOOTH, F. W. et al. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. **J. Appl. Physiol.** v. 88, p. 774-787, 2000.

BOOTH, F. W. et al. Molecular and cellular adaptation of muscle response to physical training. **Acta Physiol Scand.** v. 162, p. 343-350. 1998.

BOROZDENKOVA, S. et al. Use of proteomics to discover novel markers of cardiac allograft rejection. **J. Proteome Res.** v. 3, p.282-288, 2004.

BRAY, M. Genomics, genes and environmental interaction: the role of exercise. **J App. Physiol.** v. 88, p.788-729, 2000.

CARTER, N. D. et al. 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.** v. 35, p.348-51, 2001.

CAUZA, E. et al. 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.** v. 86, p.1527-33, 2005.

CHIELLINI, C. et al. Obesity modulates the expression of haptoglobin in the white adipose tissue via TNF α . **J Cell Physiol.** v. 190, p.251–8, 2002.

CHROMY, B. A. et al. Proteomic Analysis of Human Serum by Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis after Depletion of High-Abundant Proteins. **Journal of Proteome Research.** v. 3, p.1120-7, 2004.

CLARKE, W.; ZHANG, Z.; CHAN, D. W. The application of clinical proteomics to cancer and other diseases. **Clin Chem Lab Med.** v. 41, p.1562-70, 2003.

DOVE, A. Proteomics: translating genomics into products? **Nat. Biotechn.** v.17, n.3, p. 233-236, 1999.

DUNN, A. L.; TRIVEDI, M. H.; O'NEAL, H. A. Physical activity dose-response effects on outcomes of depression and anxiety. **Med Sci Sports Exerc.** v. 33, p.587-97, 2001.

ENGSTROM, G. et al. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. **Diabetes.** v. 52, p.2097–101, 2003.

FAN, G. C. et al. Small Heat-Shock Protein Hsp20 Phosphorylation Inhibits beta-Agonist-Induced Cardiac Apoptosis **Circ. Res.** v. 94, p.1474 – 1482, 2004.

FEBBRAIO, M.; KOUKOULAS, I. *HSP72* gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. **J. Appl. Physiol.** v. 89, p.1055–60, 2000.

FRY, R.; MORTON, A. R.; KEAST, D. Periodisation of training stress - a review. **Can. J. Sports and Sci.** v.17, n. 03, p. 234-240, 1992.

FUCHS, D. et al. Proteome analysis for identification of target proteins of genistein in primary human endothelial cells stressed with oxidized LDL or homocysteine. **Eur J Nutr.** v. 44, p.95-104, 2005.

GOLDSPINK, G. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** v. 120, p.5-15, 1998.

GORG, A. et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis.** v. 21, p.1037-1053, 2000.

GUSTAFSSON, T. et al. Exercise induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** v. 276, p.679-85, 1999.

HALSON, S. H.; JEUKENDRUP, A. E. Does overtraining exist? An analysis oh overreaching and overtraining research. **Sports Med.** v. 34, p.967-981, 2004.

HANASH, S. M. et al. Integrating cancer genomics and proteomics in the post-genome era. **Proteomics.** v. 2, p.69-75, 2002.

HOJLUND, K. et al. Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP syntase beta-subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. **Journal of Biological Chemistry.** v. 278, p. 10436-10442, 2003.

HOLLOSZY, J. A.; BOOTH, F. W. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. **Annu. Rev. Physiol.** v. 38, p.273-291, 1976.

HOVING, S. et al. Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. **Proteomics.** v. 2, p.127-134, 2002.

ISSAQ, H. J. et al. Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. **Electrophoresis.** v.23, p. 3048-61, 2002.

ISFORT, R. J. et al. Proteomic analysis of rat soleus and tibialis anterior muscle following immobilization. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** 769(2), p.323-32, 2002.

KENNEDY, S. Proteomic profile from human samples: the body fluid alternative. **Toxicology Letters**. v. 120, p.379-384, 2001.

KRANIOU, Y. et al. Effects of exercise on GLUT-4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** v. 88, p.794-6, 2000.

KOHL, H. W. III. Physical activity and cardiovascular disease: evidence for a dose response. **Med Sci Sports Exerc.** v. 33, p.472-83, 2001.

KOVAL, J. A. et al. Regulation of hexokinase II activity and expression in human muscle by moderate exercise. **Am. J. Physiol.** v. 274, p.304-8, 1998.

LAAKSONEN, D. E. et al. Physical activity in the prevention of type 2 diabetes: the finnish diabetes prevention study. **Diabetes.** v. 54, p.158-65, 2005.

LARKIN, M. Diet and exercise delay onset of type 2 diabetes, say US experts. **Lancet.** v. 358, p. 565-565, 2001.

LEE, I. M. Physical activity and cancer prevention — data from epidemiologic studies. **Med Sci Sports Exerc.** v. 35, p.1823-7, 2003.

LEGRAIN, P.; WOJCIK, J.; GAUTHIER, J. M. Protein-protein interaction maps: a lead towards cellular functions. **Trends Genet.** v. 17, p.346-352, 2001.

LEHMANN, M.; FOSTER, C.; KEUL, J. Overtraining in endurance athletes: a brief review. **Med.Sci. Sports Exerc.** v. 25, n. 07, p. 854-862, 1998.

LEON, A. S. et al. 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.** v. 21, p.1226-32, 2001.

LIEBOLD, B. W.; GRAACK, H. R.; POHL, T. Two dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics.** v. 6, p.4688-4703, 2006.

LIOTTA, L. A.; FERRARI, M.; PETRICOIN, E. Written in blood. **Nature**. v.245, p. 905, 2003.

LOHR, M.; FAISSNER, R. Proteomics in pancreatic cancer. **Pancreatology**. v. 4, p.67-75, 2004.

MAEDA, H. et al. Roles of renal dopamine and kallikrein-kinin systems in antihypertensive mechanisms of exercise in rats. **Hypertens Res**. v. 23, p.511-9, 2000.

McDONAGH, M. J.; DAVIES, C. T. M. Adaptative responses of mammalian skeletal muscle to exercise with loads. **Eur. J. Appl. Physiol**. v. 56, p.178-198, 1987.

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

O'NEILL, D. et al. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle. **Am. J. Physiol**. v. 276, p.414-19, 1999.

PATTON, W. F. A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. **Electrophoresis**. v. 21, 1123-1144, 2000.

PAWSON, T. Protein modules and signalling networks. **Nature**. v. 373, p.573-580, 1995.

PENNINGTON, S. R.; WILKINS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. Proteome research: new frontiers in functional genomics. **Trends Cell Biol**. v. 7, p.168, 1997.

PETRICOIN, E. F. et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. **Lancet**. v. 359, p.572-7, 2002.

PETRICOIN, E. F.; LIOTTA, L. A. Nutritional Proteomics in Cancer Prevention. **The Journal of Nutrition**. v. 133, p. 2476-2484, 2003.

PIERSON, J. et al. Molecular profiling of experimental Parkinson's disease: Direct analysis of peptides and proteins on brain tissue sections by MALDI mass spectrometry. **J Proteome Res**. v. 3, p.289-95, 2004.

PIPKIN, W. et al. Localization, macromolecular associations and function of the small heat shock-related protein HSP20 in rat heart. **Circulation**. v. 107, p.469–476, 2003.

PLEBANI, M. Proteomics: the next revolution in laboratory medicine? **Clin Chim Acta**. v. 357, p.113-22, 2005.

PUNTSCHART, A. et al. Expression of *fos* and *jun* genes in human skeletal muscle after exercise. **Am. J. Physiol.** v. 274, p.129–37, 1998.

REN, Y. et al. The use of proteomics in the discovery of serum biomarkers from patients with severe acute respiratory syndrome. **Proteomics**. v. 4, p.3477-3484, 2004.

RICHARDSON, R. et al. Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** v. 279, p. 772–8, 2000.

SCHWIKOWSKI, B.; UETZ, P.; FIELDS, S. A network of protein-protein interactions in yeast. **Nature Biotechn.** v. 18, p.1257-61, 2000.

SHEPHARD, R. J. Absolute versus relative intensity of physical activity in a dose-response context. **Med Sci Sports Exerc.** v. 33, p.400-18, 2001.

SJODIN, B.; HELLSTEN, W. Y.; APPLE, F. S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Med.** v. 10, p.236-54. 1990.

SMITH, L. L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Med. Sci. Sports Exerc.** v.32, n.2, p.317-331, 2000.

SMITH, L. L. Tissue Trauma: the underlyine cause of overtraining syndrome? **The Journal of Strenght and Conditioning Research**. v. 18, n.1, p. 185-193, 2004.

SMITH, R. D. et al. An accurate mass tag strategy for quantitative and high-throughput proteome measurements. **Proteomics**. v. 2, p.513–523, 2002.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

THESCH, P. A. Acute and long-term metabolic changes consequent to heavy - resistance exercise. **Free Rad. Biol. Med.** v. 26, p.67-89,1987.

TIIDUS, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v. 76, p. 533-538, 1998.

THUNE, I.; FURBERG, A. S. Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site-specific. **Med Sci Sports Exerc.** v. 33, p.530-50, 2001.

TSO, P.; LIU, M.; KALOGERIS, T. J.; THOMSON, A. B. The role of apolipoprotein A-IV in the regulation of food intake. **Annu Rev Nutr.** v. 21, p.231-54, 2001.

VEENSTRA, T. D. et al. Biomarkers: Mining the biofluid proteome. **Molecular & Cellular Proteomics.** v. 4, p.409-418, 2005.

VENTER, J. C. et al. The sequence of the human genome. **Science.** v. 291, p.1304-51, 2001.

WADLEY, G. D. et al. Differential effects of exercise on insulin-signaling gene expression in human skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** v. 90, p.436-40, 2001.

WARBURTON, D. E.; GLEDHILL, N.; QUINNEY, A. The effects of changes in musculoskeletal fitness on health. **Can J Appl Physiol.** v. 26, p.161-216, 2001.

WARBURTON, D. E. et al. Blood volume expansion and cardiorespiratory function: effects of training modality. **Med Sci Sports Exerc.** v. 36, p.991-1000, 2004.

WEEKES, J. et al. Bovine dilated cardiomyopathy: Proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. **Electrophoresis.** v. 20, p. 898-906, 1999.

WILDGRUBER, R. et al. Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. **Electrophoresis.** v. 21, p.2610-2616, 2000

WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: a large scale protein identification by two-dimensional gel electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology.** v. 14, p.61-65, 1995.

WILLIAMS, A. et al. The ACE gene and performance. **Nature.** v. 403, p.614, 2000.

WING, R. R. et al. Behavioral science research in diabetes: lifestyle changes related to obesity, eating behavior, and physical activity. **Diabetes Care**. v. 24, n.1, p.117-23. 2001.

WOLFF, I. et al. The effect of exercise training programs on bone mass: a meta-analysis of published controlled trials in pre- and postmenopausal women. **Osteoporos Int**. v. 9, p.1-12, 1999.

YUAN, Q.; FONTENELE-NETO, J. D.; FRICKER, L. D. Effect of Voluntary Exercise on Genetically Obese Cpefat/fat Mice: Quantitative Proteomics of Serum. **Obesity Research**. v. 12, n.7, p.1179-1188, 2004.

ZERKOWSKI, H. R. et al. Proteomics strategies in cardiovascular research. **J Proteome Res**. v. 3, p.200-8, 2004.

ZHANG, Z. et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. **Cancer Research**. v. 64, p.5882-5890, 2004.

ZOPPI, C. C. et al. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Rev. Paul. Educ. Fís**. v.17, n.2, p.119-130, 2003.