

Identificação de isoformas miosínicas estruturais de músculo gastrocnêmio de ratos treinados e sedentários em gel bidimensional

Identification of isoforms of myosin structural gastrocnemius muscle of trained rats and sedentary two-dimensional gel

MACHADO AAN, FERRAZ ASM, OLIVEIRA AC, BARBOSA R, CARDOSO JHL, CECCATTO VM. Identificação de isoformas miosínicas estruturais de músculo gastrocnêmio de ratos treinados e sedentários em gel bidimensional. *R. bras. Ci. e Mov* 2010;18(2):26-34.

RESUMO: A biologia molecular e a fisiologia humana fornecem ferramentas pelas quais a atividade física pode ser avaliada em termos de atuação e interação no organismo, induzindo adaptações estruturais e funcionais. Desta forma, as proteínas musculares podem ser usadas como eventuais marcadores moleculares. Neste trabalho caracterizou-se a expressão de isoformas miosínicas, através da obtenção de um mapa eletroforético bidimensional, em músculo esquelético de ratos, em decorrência da realização de exercícios em esteira adaptada. Ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: sedentário e exercício, mantidos em condições ideais. O grupo exercício foi submetido a sessões de treinamento, em dias alternados, 30 minutos por dia, durante 12 semanas, utilizando velocidades de 7 m/min a 20 m/min. O padrão eletroforético bidimensional com faixa de pI ácido, apresentou vários grupos protéicos como as miosinas, tropomiosinas, troponinas e a actina, identificados *in silico*. Dentro desses grupos, foi verificada a presença de algumas isoformas leves de miosina e uma isoforma lenta de troponina T. Os géis proteômicos mostram-se importantes na análise da composição muscular. As isoformas protéicas, especialmente as miosínicas, podem ser úteis na caracterização do exercício em termos de expressão de proteínas além de poder contribuir na avaliação do exercício físico.

Palavras-chave: Condicionamento físico animal; Proteínas Musculares; Músculo esquelético.

ABSTRACT: Molecular biology and human physiology providing tools by which physical activity can be assessed in terms of action and interaction in the body, inducing structural and functional changes. Thus, muscle proteins can be used as potential molecular markers. This study characterized the expression of myosin isoforms, by a two-dimensional electrophoretic map, in skeletal muscle of rats, as a result of induced exercise in treadmill. Wistar male rats were divided randomly into two groups: sedentary and exercise, held in ideal conditions. The exercise group was subjected to sessions of training on alternate days, 30 minutes per day for 12 weeks, using speed of 7 m / min to 20 m / min. The electrophoretic two-dimensional standard on acid pI range, presented various protein groups such as myosin, tropomyosin, troponin and actin, identified *in silico*. Within these groups, there was the presence of some light isoforms of myosin and a slow isoform of troponin T. The proteomic gels become important in analysis of the skeletal muscle composition. The protein isoforms, especially myosin, may be useful in characterizing the exercise training in terms of expression of proteins and could help in evaluation of the exercise.

Key Words: Physical Conditioning; Animal; Muscle Proteins; Muscle skeletal

André A. N. Machado¹
Alex S. M. Ferraz²
Ariclécio C. de Oliveira¹
Roseli Barbosa¹
José H. L. Cardoso¹
Vânia M. Ceccatto¹

¹Universidade Estadual do Ceará

²Universidade Federal do Piauí

Recebido em: 07/10/2009

Aceito em: 19/10/2010

Contato: André Accioly Nogueira Machado - acciolyandre@gmail.com

Introdução

Nos últimos anos, a prática de atividade física vem se destacando como um instrumento muito importante para manutenção da saúde e qualidade de vida. Segundo Nahas²⁵, o estilo de vida ativo, mais do que nunca, passou a ser um dos mais importantes determinantes da saúde de indivíduos, grupos e comunidades. A promoção e manutenção da saúde do indivíduo ocorrem, em parte, pelo efeito do exercício físico sobre o bom funcionamento metabólico do organismo.

A partir do conhecimento de que toda a atividade física depende de eventos fisiológicos e moleculares de expressão ou inibição gênica, conseqüentemente protéica, são esses eventos que promoverão as diversas modificações, sejam elas positivas ou negativas, em diversos tecidos, órgãos e células²⁶. Estudos relacionados aos mecanismos de expressão gênica e protéica proveniente da prática de exercícios regulares tornaram-se fundamentais nessa área, e vão desde abordagens de identificação de genealidade²² até a obtenção de mapas gênicos e protéicos relacionados ao exercício^{13,21,27} de forma a auxiliar no entendimento de como a atividade física atua e interage no organismo, induzindo alterações estruturais e funcionais. Nesse contexto, as análises proteômicas dizem respeito ao conjunto de tecnologias, que tem por objetivo separar, quantificar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas¹⁹. E estão situadas no contexto dos estudos “ômicos”, que são a genômica, o transcriptoma e a proteômica⁹.

Uma questão bem estabelecida é que o treinamento físico acarreta respostas adaptativas no músculo. Respostas estas que envolvem o aumento das miofibrilas (hipertrofia) sem necessariamente aumentar o número de fibras musculares (hiperplasia), essa hipertrofia se dá por aumento da sessão transversal da fibra muscular decorrente do acúmulo de proteínas contráteis dentro da fibra²⁴. Isto se deve, em parte, ao fato de que cada evento de contração resulta numa série de mudanças intra e intercelulares dentro do músculo esquelético. Os maiores desafios no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas adaptações musculares induzidas pelo exercício físico envolvem a complexidade dos estímulos

acoplados com a diversidade das adaptações fenotípicas evidenciadas no músculo esquelético¹¹.

Esta plasticidade do tecido muscular esquelético se baseia possivelmente, na presença de múltiplos genes determinantes e também ao processo de *splicing* alternativo dos transcritos, criando assim múltiplas isoformas protéicas²⁸. Muitos experimentos comprovam a capacidade do músculo esquelético para adaptar-se à treinamentos, por mudanças qualitativas e quantitativas no suprimento energético e catabólico, entre elas o aumento na capacidade das vias metabólicas oxidativas⁽¹⁾. O efeito do treinamento extenuante em ratos, sobre a expressão das moléculas de miosina, foram eletroforeticamente analisados por Wada e colaboradores³¹. Este trabalho, entre outros, mostrou que ocorrem mudanças nos perfis de distribuição das isoformas miosínicas mais leves, em comparação com as mais pesadas.

Apenas nas últimas décadas é que se tem despertado para o estudo e aplicações da biologia molecular e da fisiologia para as ciências da atividade física terapêutica e do desporto. A definição e implementação de novas técnicas e protocolos para a produção do estresse físico em ratos e a análise proteômica podem ser entendidas como um importante ponto de partida para a busca de subsídios para melhorar nosso entendimento sobre estes processos básicos. Desta forma, busca-se neste trabalho, caracterizar e analisar o processo de expressão de proteínas no músculo esquelético de ratos em decorrência da realização de exercícios físicos induzidos.

Materiais e métodos

Os experimentos e análises foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Cultura de Células, integrado ao Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas (www.uece.br/cmacf), situado no Instituto Superior e Ciências Biomédicas (ISCB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE – CE – Brasil). O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais, CEUA – UECE, processo nº. 05409173-0.

Foram utilizados 16 ratos machos, albinos, *Rattus norvegicus* (Wistar), com idade média de 90 dias, clinicamente saudáveis, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no centro de aclimação de animais, divididos aleatoriamente em dois grupos: Sedentário (n=8) e Exercício (n=8). Durante o período de tratamento os animais ficaram em gaiolas coletivas contendo quatro animais cada, sob condições similares, com ciclo 12 horas claro e 12 horas escuro, temperatura de 22 a 25 °C, recebendo ração e água *ad libitum*.

No grupo submetido a tratamento com exercício físico, os ratos foram submetidos a sessões de treinamento – de acordo com protocolos previamente definidos na literatura^{10,20} – em esteira humana adaptada (*Athletic Speed* 2), em dias alternados, 30 minutos por dia, durante 12 semanas. Na 1ª e 2ª semanas, realizou-se um período de adaptação dos animais à esteira, os ratos foram submetidos à velocidades de 7 m/min e 10 m/min respectivamente, a qual foi aumentada para 15 m/min na 3ª semana, 18 m/min na 4ª semana, na 5ª semana foi atingida a velocidade final do protocolo 20 m/min, mantida até a 12ª semana.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, em seguida procedeu-se a dissecação do músculo gastrocnêmio. Amostras desse tecido foram retiradas, lavadas com água deionizada fria, secas, congeladas em nitrogênio líquido e guardadas em – 80 °C. A ruptura do tecido muscular se deu por maceração, após o qual as amostras foram então solubilizadas em solução desnaturante não iônica (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 10% de glicerol, 25mM de DTT, 0,1% de Triton X-100) homogeneizadas centrifugadas por 30 minutos e coletado o sobrenadante. A concentração de proteínas foi então determinada usando-se o método reativo de Bradford⁸.

A Eletroforese bidimensional baseou-se especialmente nos manuais técnicos dos equipamentos de focalização isoeletrica e nas recomendações dos fabricantes de equipamentos (Amersham/GE, Bioscience). Os protocolos de eletroforese bidimensional foram baseados em Berkelman e Stenstedt⁴ e Wilkins³³.

A análise através dessa técnica se deu com a separação das proteínas através do seu gradiente de pH por focalização isoeletrica, essa foi a primeira dimensão da corrida eletroforética onde foi utilizado o sistema *Multifphor II* com gel de focalização do tipo *Immobiline Dry Strip*. Amostras de proteínas totais (200 µg) foram homogeneizadas com 200 µl de tampão de rehidração de gel (uréia 8 M, tiouréia 1 M, 10% glicerol, 2 % CHAPS, 0,5 a 2 % de *IPG Buffer* pH 3-10, 25 mM de DTT e 0,001 % de bromofenol blue). Géis de 11 cm, pH 4-7, foram retirados do freezer e equilibrados a temperatura ambiente (20 a 25 oC). As amostras transferidas para a bandeja de rehidração (*reswelling tray*) e os géis colocados sobre as amostras. Óleo de silicone (*IPG cover fluid*) foi usado para cobertura de amostra e gel. A hidratação das tiras de géis, simultaneamente ao carregamento da amostra, ocorreu por 12 horas. Em seguida procedeu-se à focalização isoeletrica a uma temperatura de 20 °C. A corrida isofocalizadora constou de 3 fases: a primeira, com 300V, 2mA e 5W por 5 minutos; seguida por 1 hora e 30 minutos à 350V, 2mA e 5W e finalizando, com 3500V, 2mA e 5W por 4 horas e 10 minutos.

Já na segunda dimensão as proteínas focalizadas foram separadas através de suas massas moleculares em gel de poliácridamida, com posterior coloração feita com o protocolo padrão de Coomassie Brilliant Blue, detalhado abaixo. As tiras de gel de isofocalização foram incubadas com 5 – 10 mL de solução de equilíbrio, contendo 10 mg/mL de DTT, por 15 minutos, entre 10 e 25 °C. Seguiu-se novo banho, em 5 – 10 mL da solução de equilíbrio, contendo 25 mg/mL de iodoacetamida, por 15 minutos, entre 20 e 25 °C. As tiras de géis foram posicionadas no topo dos géis SDS-PAGE (sistema Mini-Gel Amersham - Bioscience). Após a corrida os géis foram desmontados e corados com Coomassie Brilliant Blue R250 0,2% (p/v) em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v). A descoloração foi feita com metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). então escaneadas com ImageScanner em 400 pontos por polegada e a detecção dos *spots* e quantificação foram feitas com ImageMaster[®]TM 2D Platinum 6.01 (GE Healthcare). A

normalização dos géis foi feita com o uso de três géis para obtenção de um gel *master*, definido pelo software. A subtração do ruído de fundo (*spots* falso positivos) foi feita utilizando delimitadores de área, que possibilitam a correção adequada.

Os cálculos de massa molecular aparente foram efetuados através da plotagem de dados de cada banda ou spot, ligados à corrida eletroforética (parâmetros de migração da banda ou *spot* em milímetro x curva padrão dos marcadores moleculares utilizados) em planilha e posteriormente em gráfico que possibilitou obter a Massa Molecular relativa e o ponto isoelétrico (pI) dos peptídeos e proteínas contidos nas bandas e *spots*.

O algoritmo utilizado para a identificação *in silico* dos *spots* dos géis 2D foi o Tagident^{33,32} uma ferramenta de busca *online* disponível no portal ExpASY¹⁴ (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>).

Esta ferramenta gera uma lista de peptídeos e proteínas a partir dos valores informados nos campos de massa molecular aparente e pI fazendo uma seleção dentro de uma busca específica. As palavras chave utilizadas para restringir esta busca foram: músculo e vertebrado.

Os resultados das análises efetuadas foram analisados tomando como base a média das replicatas

utilizadas e seu correspondente erro padrão. A significância estatística foi considerada quando os resultados apresentarem probabilidade de ocorrência da hipótese nula seja menor que 5% ($p < 0,05\%$).

Resultados

Como pode ser visto na Figura 1, ao fim do tratamento os animais submetidos ao treinamento aeróbico em esteira rolante mostraram-se mais pesados ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle.

Após feita a eletroforese bidimensional do tecido muscular esquelético foram obtidos dois géis, um do grupo controle e um do grupo de exercício, os quais apresentaram configuração similar como ilustrado na Figura 2.

A partir da análise desses géis os *spots* foram detectados através dos algoritmos do *software*, sendo possível selecionar entre os verdadeiros *spots* e os artefatos de coloração, com a utilização da ferramenta 3D do próprio *software*. Essa ferramenta nos permitiu visualizar os *spots* em 3 dimensões, possibilitando dessa forma uma triagem ideal dos *spots*, que, por estarem representados em forma de picos, se diferenciam dos artefatos. Fato demonstrado na Figura 3 (área ampla do gel), e na Figura 4 (delimitação de spot único).

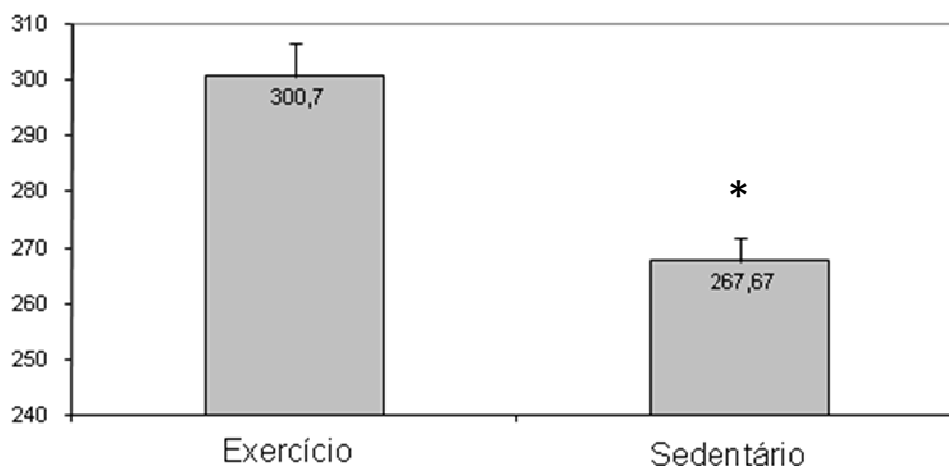


Figura 1. Representação gráfica do peso corporal dos grupos Exercício e Sedentário ao final do período de tratamento, expressos na forma de média e erro padrão

* indica diferença estatística (nível de 5% de significância)

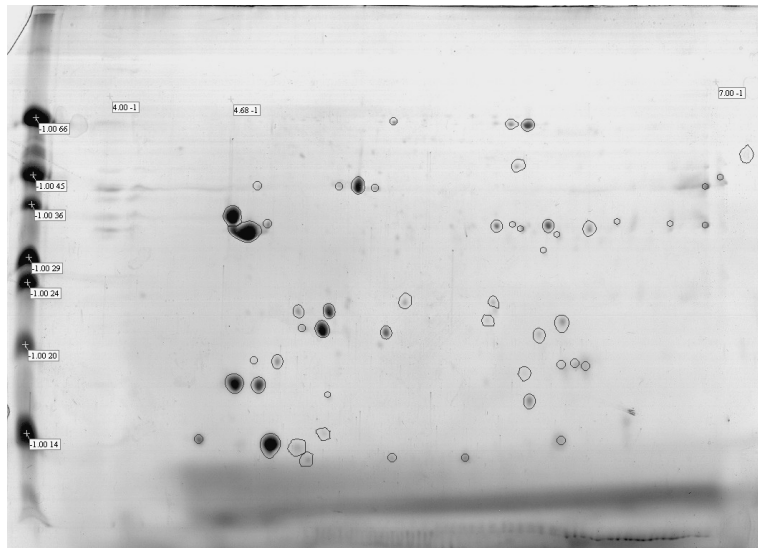


Figura 2. Pool 1 - Grupo exercício: Aspecto da análise do gel pelo software ImageMaster 2D Platinum 6.01.

Na esquerda temos os marcadores de peso molecular. Acima, os marcadores de pI Tratamento. Marcadores de peso: 66 kDa (albumina bovina); 45 kDa (ovoalbumina); 36 kDa (gliceraldeído -3-fosfato-dehidrogenase, músculo de coelho); 29 kDa (Anidrase carbonica de eritrócito bovino); 24 kDa (tripsinogênio, pâncreas bovino); 24 kDa (inibidor de tripsina de soja); 14,2 (alfa-lactoalbumina) (Dalton Mark VII-L- Sigma Tech) de spot único.

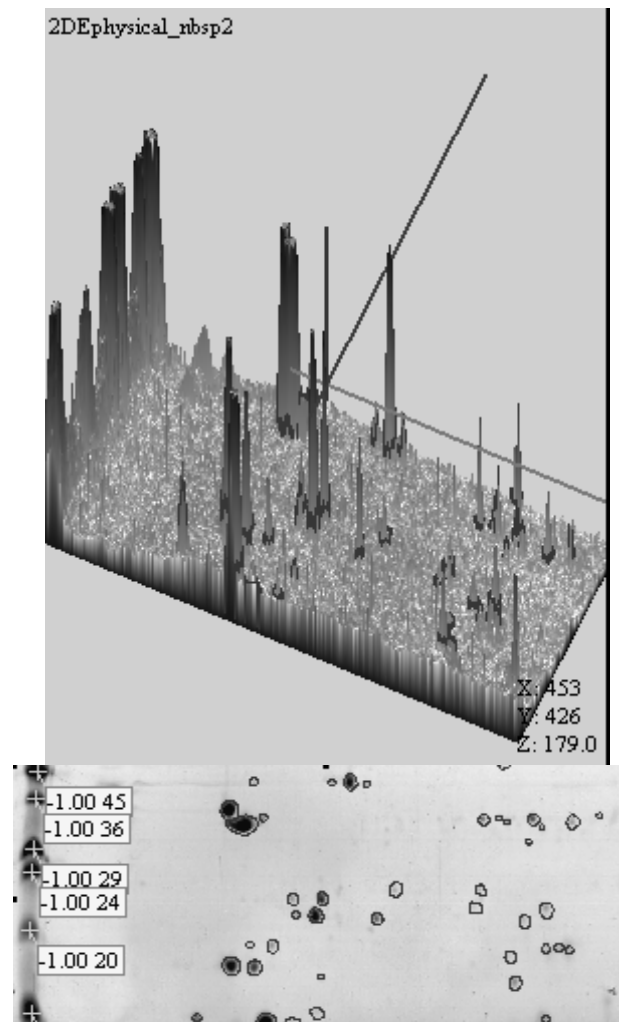


Figura 3. Picos apresentados em 3D pelo software ImageMaster 2D Platinum 6.01, a partir do aspecto do gel selecionado ao lado direito

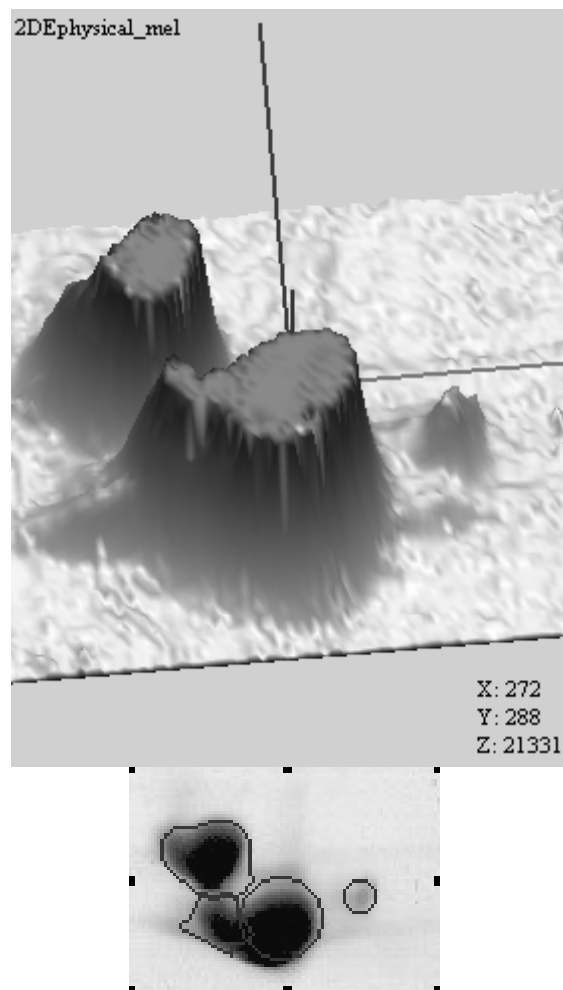


Figura 3. Picos 3D de spots selecionados, pelo software Imagemaster 2D Platinum 6.01, a partir da reunião de spots selecionados na figura à direita. As linhas mostram os 3 eixos X, Y e Z

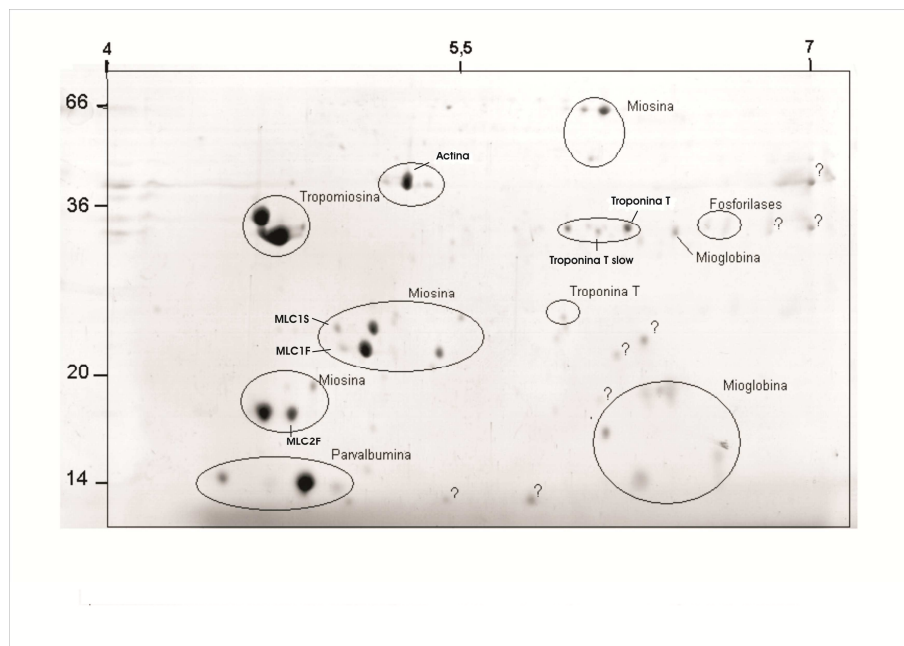


Figura 5. Análise eletroforética em gel bidimensional de músculo Gastrocnêmio de animais do grupo controle
Gel corado por Coomassie Brilhante Blue. Os valores de pI (ponto isoelétrico) e de massa molecular (kDa) estão indicado acima e à esquerda da figura, respectivamente

Depois de feitas todas as etapas descritas anteriormente, foi possível identificar 44 *spots*, obtidos através do cruzamento de informações dos valores de pM/pI (peso molecular/ponto isoelétrico) fornecidos pelos géis, juntamente com informações contidas no banco de dados proteômico (www.ExPASy.org). Como mostrados na Figura 5, ambos os géis apresentaram o seguinte perfil proteômico: 10 miosinas, 3 proteínas ligantes de miosinas, 3 tropomiosinas, 3 parvalbuminas, 3 actinas, 8 troponinas, 5 mioglobinas e 2 fosforilases. Cerca de 7 *spots* não puderam ser identificados porque não foram encontrados na busca, resultando 0 (zero) ocorrências.

Discussão

Os géis proteômicos analisados possibilitaram a revelação de uma possível expressão polimórfica das cadeias leves de miosina, a qual se caracterizou pela presença de duas cadeias de miosinas MLC1 (*Myosin Light Chain*, 1s e 1f – *slow* e *fast*, respectivamente) identificadas pelo peso maior (~20 kDa) e pI mais alcalino (5,0) e uma cadeia MLC2 (2f) mais leve (~17 kDa) e mais ácida (pI 4,8). Dados estes que corroboram com os dados contidos em géis obtidos por Sun *et al.*²⁹; Bozzo *et al.*⁶; Donoghue *et al.*¹² e Isfort¹⁸.

Além das miosinas polimórficas encontradas de forma coerente com os dados apresentados na literatura, ocorreram outras proteínas. Entre elas, destacamos a actina, de peso molecular ~ 42 kDa e pI ~ 5^{16,29,6}, a tropomiosina, de peso molecular ~ 32 kDa e pI ~ 4,7^{29,18}, e por fim, a troponina T isoforma *slow*, de peso molecular ~ 32 kDa e pI ~ 6,1^{15,12} e troponina T^{30,18}.

A molécula de miosina é composta por seis cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas, que espiraladas formam uma dupla hélice com extremidades globulares, e quatro cadeias leves, duas em cada extremidade, atuando assim na regulação do funcionamento da cabeça durante o processo de contração muscular. As cadeias leves de miosina que se encontram sempre associadas às duas cadeias pesadas de miosina, consistem de um par de cadeias regulatórias MLC2 e um par de cadeias leves alcalinas ou essenciais MLC1 e/ou MLC3³¹. Fato que justifica a presença dessas isoformas.

A actina aparece como a segunda proteína em nível de abundância na formação dos miofilamentos contráteis, apresenta-se sob duas formas, globular (G-actina) e filamentar (F-actina). O músculo estriado apresenta as isoformas α -esquelética e α -cardíaca², diversidade estrutural que justifica a presença de isoformas no gel obtido.

Outra proteína importante, que também pode ser identificada foi a tropomiosina, está proteína filamentososa se encontra disposta de forma espiralada na dupla hélice de actina. Na ausência de íons cálcio, os filamentos de tropomiosina cobrem os sítios ativos do filamento de actina, de forma a inibir a interação entre as pontes cruzadas e o filamento de actina, fato este, necessário ao processo de contração²³.

Ligado lateralmente as moléculas de tropomiosina, existe o complexo troponina, o qual é formado por três subunidades protéicas ligadas, cada um com função específica na regulação da contração muscular. Dentre essas subunidades, a troponina T e a troponina T *slow*, ambas com afinidade a molécula de tropomiosina. Essas isoformas da proteína troponina são produzidas através do *splicing* alternativo do transcrito do gene da troponina T em músculo esquelético¹⁷.

Como pode ser visto, todas essas isoformas proteicas identificadas são determinantes nas propriedades contráteis das fibras musculares esqueléticas. E a presença de isoformas resulta em diferentes tipos de fibras com características específicas, representando a grande capacidade adaptativa do tecido muscular frente a diferentes estímulos⁷. A metodologia proposta foi eficiente em identificar o complexo protéico estrutural envolvido no mecanismo da contração muscular, representado por suas unidades protéicas majoritárias: actina, miosina, troponina e tropomiosina.

Apesar de o grupo exercitado ter apresentado um peso corporal mais elevado e de que se poderia esperar que esse aumento decorresse de uma maior hipertrofia muscular, esse fato não pôde ser demonstrado através da metodologia aqui utilizada. Dois fatos podem justificar tal resultado, em primeiro lugar temos que a hipertrofia muscular pode existir sem que essa seja fruto de um

aumento no conteúdo protéico, podendo ser causada por um aumento no conteúdo sarcoplasmático^{3,5}, que por sua vez é mais condizente com o tipo de exercício aqui utilizado, exercício aeróbico. O segundo fato é que formas de avaliação quantitativas em relação aos *spots* devem ser estabelecidas para contemplar esse tipo de abordagem.

Conclusões

A extração das proteínas das amostras mostrou-se adequada em termos de identificação dos *spots* protéicos relacionados a proteínas do mecanismo contrátil, mais em termos quantitativos mostrou reduzida sensibilidade, pois os géis proteômicos obtidos mostraram principalmente os grupos protéicos majoritários de proteínas com função estrutural acídicas, sendo de difícil identificação as proteínas de regulação com função enzimática.

Dentro desses grupos, foi possível, pela comparação com a literatura definir algumas isoformas leves de miosinas e isoforma lenta de troponina T. Apesar da identificação dessas isoformas através de consulta aos bancos de dados e géis disponíveis na literatura, se faz necessário uma posterior confirmação através da análise direta dos *spots*. Mostrando, portanto, a utilização de géis proteômicos na análise de isoformas protéicas.

Os géis obtidos mostram que a análise proteômica necessita de muita atenção em termos de análise dos *spots* individuais, pois uma grande parte deles são artefatos de coloração, como mostrado.

A análise dos géis em termos de tratamento efetuado e expressão protéica diferencial não apresentaram diferença entre os tratamentos. Em função do tipo de exercício utilizado sugere-se que esforços sejam despendidos em novas abordagens proteômicas relacionadas ao exercício, com vistas a diminuir a participação das proteínas estruturais no gel e priorizar a revelação de proteínas básicas e de função enzimática.

Agradecimentos

À CAPES, FUNCAP, CNPq

Referências

1. Bar A, Pette D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. **FEBS Lett** 1988;235:153-155.

2. Bárány K, Bárány M, Giometti CS. Polyacrilamide gel electrophoretic methods in separation of structural muscle proteins. **J Chromatogr A** 1995;698:301-332.

3. Barroso R, Tricoli V, Ugrinowitsch C. Adaptações neurais e morfológicas ao treinamento de força com ações excêntricas. **R Bras Ci Mov** 2005;13(2):111-122.

4. Berkelman T, Stenstedt T. **2-D Electrophoresis. Principles and Methods. Handbook from Amersham Biosciences**. Vastra Aros, 2002.

5. Bompa, T. O. **Periodização: teoria e metodologia do treinamento**. São Paulo: Phorte, 2002.

6. Bozzo C, Spolaore B, Toniolo L, Stevens L, Bastide B, Cieniewski-Bernard C, Fontana A, Mounier Y, Reggiani C. Nerve influence on myosin light chain phosphorylation in slow and fast skeletal muscles. **FEBS J** 2005;272(22):5771-5785.

7. Bruton A. Muscle plasticity: Response to training and detraining. **Physiotherapy** 2002;7(88):398-408.

8. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976; 7(72):248-254.

9. Brooks GA. Genome, Proteome, and Transcriptomes: The New Systems Approach to Research. **Exerc Sport Sci Rev** 2001;35(2):41-42.

10. Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FAMS. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol** 2005;140(4):409-413.

11. Chen YW, Nader GA, Baar KR, Fedele EP, Hoffman EP, Esser KA. Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. **J Physiol** 2002;545(1):27-41.

12. Donoghue P, Doran P, Dowling P, Ohlendieck K. Differential expression of the fast skeletal muscle proteome following chronic low-frequency stimulation. **Biochim Biophys Acta** 2005;1752(2):166-176.

13. Doran P, Donoghue P, O'Connell K, Gannon J, Ohlendieck K. Proteomic profiling of pathological and aged skeletal muscle fibres by peptide mass fingerprinting (Review). **Int J Mol Med** 2007;19(4):547-564.

14. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): **The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press**. Copyright Humana Press, 2005.

15. Gelfi 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** 2006;5(6):1344-1353.

16. Hamelin M, Sayd T, Chambon C, Bouix J, Bibé B, Milenkovic D, Leveziel H, Georges M, Clop A, Marinova P, Laville E. Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy. **J Anim Sci** 2006;84(12):3266-3276.

17. Huang QQ, Chen A, Jim JP. Genomic sequence and structural organization of slow skeletal muscle troponin T gene. **Gene** 1999;229:1-10.
18. Isfort R. J. Proteomic analysis of striated muscle. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 2002;771:155-165.
19. Isfort RJ, Wang F, Greis KD, Sun Y, Keough TW, Bodine SC, Anderson NL. Proteomic analysis of soleus and tibialis anterior muscle following immobilization. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 2002;769(2):323-332.
20. Lawler JM, Powers SK, Hammeren J, Martin D. Oxygen cost of treadmill running in 24-month-old Frscher-344 rats. **Med Sci Sports Exerc** 1993;25(11):1259-1264.
21. Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A, Tarnopolsky MA. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. **The FASEB Journal** 2005;Published online.
22. Maia JAR, Fernandes SCTC, Amorim A, Alves C, Gusmão L, Pereira L. Determinação da gemelaridade: do questionário de Peeters aos micro-satélites aleatórios espalhados pelo DNA. **Rev Port Cien Desp** 2007;7(2):147-154.
23. McArdle WD, Katch FI, Katch VL. **Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
24. Nader GA. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together Review. **Int J Biochem Cell Biol** 2005;37(10):1985-1996.
25. Nahas MV. **Atividade física, saúde e qualidade de vida: conceitos e sugestões para um estilo de vida ativo**. 3ª ed. Londrina: Midiograf, 2003.
26. Pereira B, Souza TP. **Metabolismo celular e exercício físico**. 1ª ed. São Paulo: Phorte, 2004.
27. Pérusse L, Rankinen T, Rauramaa R, Rivera MA, Wolfarth B, Bouchard C. The Human Gene Map for Performance and Health-Related Fitness Phenotypes The 2002 Update. **Med Sci Sports Exerc** 2003;35(8):1248-1264.
28. Pette D. Training effects on the contractile apparatus. **Acta Physiol Scand** 1998;162(3):367-376.
29. Sun H, Liu J, Ding F, Wang X, Liu M, Gu X. Investigation of differentially expressed proteins in rat gastrocnemius muscle during denervation-reinnervation. **J Muscle Res Cell Moti** 2006;27(3-4):241-250.
30. Vitorino R, Ferreira R, Neuparth M, Guedes S, Williams J, Tomer K, Domingues PM, Appell HJ, Duarte JA, Amado FML. Subcellular proteomics of mice gastrocnemius and soleus muscles. **Anal Biochem** 2007;366(2):156-169.
31. Wada M, Inashima S, Yamada T, Matsunaga S. Endurance training-induced changes in alkali light chain patterns in type IIB fibers of the rat. **J Appl Physiol** 2003; 94(3): 923-929.
32. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev** 1996;13:19-50.
1. Wilkins MR (ed). **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics**. Berlin: Springer Verlag, 1997.