

Patrícia Sousa Dantas

**A nandrolona inibe adaptações cardíacas benéficas induzidas pelo
treinamento físico resistido: uma abordagem proteômica**

**São Paulo
2018**

Patrícia Sousa Dantas

**A nandrolona inibe adaptações cardíacas benéficas induzidas pelo
treinamento físico resistido: uma abordagem proteômica**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências pelo Programa de Pós-
Graduação em Medicina
Translacional.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana de Sousa da Cunha Uchiyama

Co-orientadoras: Profa. Dra. Juliana Dinéia Perez Brandão
Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

**São Paulo
2018**

Dantas, Patrícia Sousa

A nandrolona inibe adaptações benéficas induzidas pelo treinamento físico resistido: uma abordagem proteômica. / Patrícia Sousa Dantas. -- São Paulo, 2018.

xxi, 90f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: Nandrolone disrupts beneficial adaptations induced by resistance training: a proteomic approach.

1. Proteômica. 2. Nandrolona. 3. Exercício. 4. Cardiomegalia. 5. Modelos animais.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL**

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Ana Luisa Godoy Fernandes

Chefe da Disciplina de Nefrologia: Profa. Dra. Ita Pfeferman Heilberg

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional: Profa. Dra.
Dulce Elena Casarini

Este trabalho está vinculado ao Programa de Pós-graduação em Medicina Translacional, Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina, sob orientação da Profa. Dra. Tatiana de Sousa da Cunha Uchiyama

Apoio financeiro:
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –
CAPES
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

Dedicatória

Eu dedico este trabalho aos meus pais, Raimunda e José, aos meus irmãos, Alexandre e Ulisses e ao meu marido, Jean Estevam.

Agradecimentos

A defesa do doutorado é um marco importante na vida de todos, e tenho percebido que todos aqueles que passaram por este processo enfrentaram grandes obstáculos até chegar ao final. Cada um tem sua provação durante esse percurso, e por isso a vitória no final é tão comemorada. Pois bem, comigo não foi diferente... No entanto, o que tornou o processo tão difícil para mim foi perceber que aquele que deveria ser meu maior aliado, se tornou meu pior inimigo. Nós, que trabalhamos com pesquisa em ciências, necessitamos da nossa mente criativa o tempo todo... É através dela que conseguimos estabelecer conexões, criar teorias, enfim, responder às perguntas que inicialmente criamos. Mas e quando a nossa mente se vira contra nós? Infelizmente eu passei por esta situação e posso dizer que foi uma das experiências mais assustadoras e traumáticas da minha vida. Meu cérebro, que outrora era meu aliado, se tornou meu pior inimigo, e já não mais me possibilitava criar ou desenvolver aquilo que antes eu fazia tão bem. Foi um verdadeiro pânico... E tentar encontrar maneiras de reverter esta situação foi extremamente difícil... Na maior parte do tempo estive sozinha, seja por opção ou por falta de compreensão daqueles que me cercavam, o que tornou o processo ainda mais desgastante. E por que estou compartilhando este relato com vocês? Não é para dizer que sou especial ou para dar uma lição de superação... Nada disso. Eu ainda estou travando esta batalha, e creio que ela nunca terminará. Haverá momentos onde ela será mais branda e talvez em outras tão difícil quanto o que já passei, mas o intuito deste relato é simplesmente agradecer. Agradecer cada um dos que estão aqui por terem contribuído de alguma maneira para que eu chegasse até aqui. Eu obtive uma grande vitória, mas esta vitória não é apenas minha. Então quero agradecer a todos os meus colegas do laboratório de Rins e Hormônios, pelo acolhimento, pela ajuda que me foi dada nestes anos, pelo companheirismo, pelas festinhas, pelas conversas jogadas fora e pelas inestimáveis contribuições.

Agradeço a oportunidade que me foi dada pela Dra. Dulce e pela Dra. Tatiana, que me abriram as portas para a pesquisa científica, que me ensinaram e que contribuíram imensamente com a minha formação profissional e pessoal. Agradeço à Dra. Juliana Perez e à Dra. Maísa Sakata por terem contribuído substancialmente com este trabalho, através das análises proteômicas e na seleção das proteínas, principalmente à Dra. Juliana, que com sua grande expertise enriqueceu e muito este trabalho, graças às suas contribuições. Agradeço ao Dr. Alexandre Tashima por ter auxiliado na utilização do Synapt e na interpretação dos dados gerados. Agradeço à Dra. Fernanda Klein que gentilmente cedeu os tecidos cardíacos utilizados neste trabalho, assim como o Dr. Vinicius Guzzoni que treinou os animais e nos auxiliou nas análises antropométricas.

Agradeço aos meus amigos, que sorriram e choraram comigo, que compartilharam conversas e diversão, pelo bem da minha sanidade mental. Agradeço aos meus pais e irmãos, por todo o apoio e força para continuar trilhando este caminho, e pelo amparo nos momentos difíceis. E principalmente agradeço ao meu marido, que sempre esteve ao meu lado, nos piores e melhores momentos, que viu o meu melhor e o meu pior, e ainda assim fez questão de continuar ao meu lado. Ele foi uma das poucas pessoas que suportou pacientemente o fardo que eu estava carregando, e que apesar de não poder carregá-lo por mim, por muitas vezes me ajudou a torná-lo mais leve. E acima de tudo agradeço aos meus mentores, meus guias, meus orixás, enfim, a todo o plano espiritual, que me acolheu e me deu sabedoria e paciência para lidar com meus altos e baixos, que me deu forças para continuar quando eu achava que já não existia mais nada. E um dos ensinamentos mais preciosos trazidos por eles e que compartilho com vocês, para aqueles momentos que acharem que não há mais saída, é: não procurem a luz no fim do

túnel. Sejam a luz que vocês precisam para suas vidas. E mais uma vez, agradeço por estarem aqui compartilhando comigo desta grande vitória.

Epígrafe

**“Somos tão grandes quanto o inimigo que escolhemos para lutar,
e tão pequenos quanto grande for o medo que tivermos.
Escolha um inimigo grande e isso te obrigará a crescer para poder enfrentá-lo.
Diminua seu medo, porque se ele crescer, você vai diminuir. ”**

Autor desconhecido

RESUMO

Apesar do consenso que existe sobre os malefícios decorrentes do uso de esteroides anabólicos androgênicos (EAA), tem se tornado cada vez mais comum a associação destas substâncias com protocolos de treinamento físico extenuantes, com o intuito de acelerar as adaptações relacionadas ao desempenho e aparência física, principalmente entre jovens frequentadores de academias e atletas recreacionais. No entanto, muitos estudos têm demonstrado que esta associação pode ser potencialmente prejudicial ao sistema cardiovascular, fato este confirmado pelos inúmeros casos de morte súbita entre jovens atletas que faziam uso de esteroides. Apesar disso, pouco ainda se sabe sobre as vias de sinalização ativadas pelo anabolizante e os mecanismos responsáveis por desencadear os efeitos deletérios decorrentes do uso de doses supra fisiológicas destas substâncias. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da nandrolona, associada ou não ao treinamento físico resistido, sobre o perfil proteico cardíaco de ratos. Ratos Wistar machos (n=6-10/grupo) foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: não-treinado + veículo (NTV), não-treinado + nandrolona (NTN), treinado + veículo (TV) e treinado + nandrolona (TN). Os animais dos grupos treinados foram submetidos a um protocolo de treinamento físico resistido em meio líquido, com sobrecarga de peso durante 6 semanas, associado ou não ao tratamento com doses suprafisiológicas de nandrolona. Após este período, todos os animais foram eutanasiados por decapitação e o ventrículo esquerdo dissecado para análise proteômica. Foram identificadas 1559 proteínas, sendo que 488 foram consideradas para posterior análise após a aplicação dos critérios de exclusão; destas, 4 estavam expressas exclusivamente no grupo NTV e 29 no grupo TV. Na análise quantitativa, comparando o grupo NTV ao NTN, 28 proteínas estavam subexpressas e 12 estavam superexpressas no primeiro em relação ao segundo. Na comparação do grupo TN com o NTN, 25 proteínas estavam subexpressas e 12 superexpressas no grupo submetido ao treinamento e tratado com nandrolona. Comparando o grupo TN com o NTV, 19 proteínas estavam subexpressas e 28 superexpressas. E na comparação do grupo TV com TN, 9 proteínas estavam subexpressas e 46 superexpressas no primeiro. Dentre os principais achados, observamos a expressão das proteínas antioxidantes glutathione S-transferase Mu 2 (GSTM2) e peroxirredoxina 6 nos grupos NTV e TV, bem como a regulação negativa da peroxirredoxina 5 e tioredoxina redutase dependente de peróxido no grupo TN quando comparadas às demais. Observamos também a ausência de expressão do canal de

potássio ATPase e da citrato sintase no grupo NTN, sugerindo mudanças no fluxo de potássio. Desta forma, podemos concluir que a nandrolona predispõe a instalação de disfunção cardíaca já que altera a expressão de importantes proteínas associadas à mecanismos protetores desencadeados pelo treinamento físico.

ABSTRACT

Despite the consensus about the harm caused by the use of androgenic anabolic steroids, it has become increasingly common the association between these substances with strenuous training protocols, in order to accelerate the transformations related to performance and mainly to physical appearance, especially among young in gyms and recreational athletes. However, many studies have shown that this association may be potentially harmful to heart health, a fact confirmed by the countless cases of sudden death among young athletes who used steroids. Despite this, little is known about the signaling pathways activated by the AAS and the mechanisms responsible for triggering the deleterious effects arising from the use of supra-physiological doses. Thus, the objective of this study is to evaluate the impact of the use of nandrolone, associated or not to resistance training, on the cardiac protein profile of rats. Male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: non trained + vehicle (SV), non trained + nandrolone (SN), trained + vehicle (TV) and trained + nandrolone (TN). The animals in the T group were submitted a resistance training protocol with pressure overload for 6 weeks, associated or not with supraphysiological doses of nandrolone. Then, all animals were euthanized by decapitation and the left ventricle dissected and removed for proteomic analysis. We identified 1559 proteins, of which 488 were considered; 4 were expressed exclusively in the NTV group and 29 in the TV group. In the quantitative analysis, comparing the NTV group to the NTN, 28 proteins were underexpressed and 12 were overexpressed. In the comparison of TN group with NTN, 25 proteins were underexpressed and 12 overexpressed. In the TN versus NTV group, 19 proteins were underexpressed and 28 overexpressed. And in the comparison of the TV group with TN, 9 proteins were underexpressed and 46 overexpressed. We observed the expression of the antioxidant proteins Glutathione S-transferase Mu 2 (GSTM2) and Peroxiredoxin 6 in NTV and TV groups, as well as downregulation of Peroxiredoxin 5 and Thioredoxin dependent peroxide reductase in the TN group when compared to the others. We also observed that Potassium transporting ATPase and Citrate synthase were not expressed on NTN group, suggesting changes in potassium flow. Thus, we can conclude that nandrolone predisposes to the installation of cardiac dysfunction since it alters the expression of important proteins associated with protective mechanisms triggered by physical training.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DE: eletroforese em 2 dimensões
Akt: proteína quinase B
ANP: peptídeo atrial natriurético
CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato
CISY: Citrato sintase
DVI: diâmetro ventricular interno
EAA: esteroide anabólico androgênico
ERK: quinase reguladora de sinal extracelular
ERP: espessura relativa da parede
ERO: espécies reativas de oxigênio
ESI: ionização por eletrospray
FC: frequência cardíaca
GSTM2: Glutathione S transferase mu 2
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
Hsp: proteínas *heat shock*
HSP20: proteína *heat shock* de 20 kDa
IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina
IHC: índice de hipertrofia cardíaca
IRS-1 e 2: substratos receptores de insulina 1 e 2
JNK: c-Jun N-terminal quinase
KATP: canal de potássio ATPase dependente
MALDI: dessorção a laser assistida por matriz
MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos
MS: espectrometria de massas
Nf-kB: fator nuclear kappa B
NO: óxido nítrico
NTN: não treinado nandrolona
NTV: não treinado veículo
PAD: pressão arterial diastólica
PAM: pressão arterial média
PAS: pressão arterial sistólica
PC: peso corporal

PCor: peso do coração
PGCK1: Fosfoglicerato quinase 1
PI3k: fosfatidilinositol 3 quinase
PPAR: proliferador de peroxissomo
PRDX5: Peroxirredoxina 5
SERCA: retículo sarcoplasmático de cálcio ATPase
SOD: Superóxido dismutase CuZn
TN: treinado nandrolona
TR: treinamento resistido
TV: treinado veículo
UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência
VE: ventrículo esquerdo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre hipertrofia concêntrica e excêntrica devido a estresse fisiológico e patológico: o coração normal adapta-se a um aumento na demanda hemodinâmica, seja por estímulos fisiológicos (por exemplo, exercícios) ou patológicos (por exemplo, hipertensão). Esse crescimento hipertrófico segue dois padrões típicos de crescimento determinados pela relação geométrica entre o diâmetro ventricular interno (DVI) e a espessura da parede ventricular, ou espessura relativa da parede (ERP): (1) aumento concomitante da ERP e DVI (excêntrico), geralmente devido à sobrecarga de volume; (2) um aumento desproporcional na espessura da parede comparado ao DVI (concêntrico), impulsionado pela sobrecarga de pressão. Normalmente, a hipertrofia excêntrica ou concêntrica devido ao exercício (fisiológico) é limitada a um aumento de 12% a 15% no peso total do coração e não progride para insuficiência cardíaca. Em contraste, a hipertrofia cardíaca devido a doenças como hipertensão, infarto do miocárdio ou cardiomiopatia hipertrófica (patológica) geralmente exibe uma resposta hipertrófica mais robusta (concêntrica ou excêntrica) e frequentemente progride para um estado de insuficiência cardíaca. O crescimento excêntrico patológico pode representar a transição inicial para um estado dilatado; o crescimento concêntrico patológico resulta em espessamento profundo da parede ventricular com uma redução no DVI. Adaptado de Vega *et al*, 2017.

Figura 2. Estímulos externos diferentes desencadeiam hipertrofias distintas no cardiomiócito. Em resposta a hipertensão ou sobrecarga de pressão (patológica), o cardiomiócito ativa um programa de crescimento caracterizado pela indução de um gene fetal, incluindo o aumento da expressão do peptídeo natriurético (ANP) e mudanças na expressão gênica da isoforma do sarcômero. Este programa eventualmente leva a uma remodelação patológica global, incluindo a dilatação do ventrículo esquerdo e função cardíaca diminuída, levando a uma insuficiência cardíaca. Em contraste, o exercício (fisiológico) provoca uma hipertrofia sem indução dos genes fetais e com aumento na capacidade metabólica energética através da oxidação de ácidos graxos. Este último programa mantém a função cardíaca normal. MHC: miosina de cadeia pesada; ANP: peptídeo natriurético atrial; PPAR α : receptor ativado por proliferador de peroxissoma α . Adaptado de Vega *et al*, 2017.

Figura 3. Os dois processos mais comuns para análise proteômica quantitativa são mostrados. No primeiro (topo), 2DE é usado para separar e quantificar proteínas, e proteínas selecionadas são então isoladas e identificadas por espectrometria de massa. Na segunda (inferior), utiliza-se a LC-MS / MS para analisar as digestões de enzimas de misturas proteicas não separadas, e consegue-se quantificação exata marcando os péptidos com isótopo estável. Ambos os processos são compatíveis com métodos de fracionamento ou separação de proteínas, como o fracionamento subcelular, isolamento de complexos protéicos e eletroforese e cromatografia, proporcionando, assim, um contexto biológico adicional às amostras de proteínas analisadas. Adaptado de Patterson *et al* 2003.

Figura 4. Ilustração esquemática do método de treinamento (adaptado de Tanno *et al*).

Figura 5. Representação temporal do protocolo experimental, demonstrando o protocolo as etapas do protocolo de treinamento a que os animais foram submetidos.

Figura 6. Exemplo de tabela de saída do ProteinLynx quanto à identificação das proteínas. Note que na coluna R há o parâmetro `protein.AutoCurate` e descritores como “green”, “yellow” e “red”. Estes descritores dizem respeito aos parâmetros de identificação dos espectros. Quando a proteína se encaixa nos parâmetros, ela recebe uma etiqueta de “green” e apenas estas são consideradas para as posteriores análises.

Figura 7. Proteínas identificadas e quantificadas em todos os grupos experimentais. Em relação à análise qualitativa dos grupos NTN e TN, não foram identificadas proteínas significativas.

Figura 8. Representação esquemática das proteínas expressas no VE do grupo NTV de acordo com processos biológicos (A) e compartimentos celulares (B). Proteínas expressas no VE do grupo TV, de acordo com processos biológicos (C) e compartimentos celulares (D). Todas as proteínas foram classificadas com base no *Gene Ontology*.

Figura 9. Mapa de interações das proteínas expressas exclusivamente (análise qualitativa) no ventrículo esquerdo dos animais submetidos ao treinamento físico de alta intensidade, de acordo com o banco de dados STRING. Atp5h: ATP sintase subunidade d. Vdac1: canal ânion seletivo voltagem dependente. Dld: diidrolipoil desidrogenase. Pdhb: piruvato desidrogenase. Acat1: acetil CoA acetiltransferase. Slc25a3: proteína carreadora de fosfato. Pgm1: fosfoglicomutase 1. Acs1: CoA ligase de ácidos graxos de cadeia longa. Hadhb: enzima tri funcional de cadeia beta. Ckb: creatina quinase tipo B. Pkm: piruvato quinase isoenzimas M1 e M2. Etfa: flavoproteína transferidora de elétron subunidade alfa. Atp5f1: ATP sintase subunidade B. Ndufa10: NADH desidrogenase. Hspa5: proteína reguladora de 78 kDa. Atp12a: transportador de potássio ATPase dependente. Hspb6: proteína *heat shock* beta 6. Bcat2: aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada. Pdha1: piruvato desidrogenase. Hadha: enzima tri funcional de cadeia alfa. Atp5c1: ATP sintase subunidade gama. Ogdh: 2-oxoglutarato desidrogenase. Cryab: alfa cristalina de cadeia beta. Acaa2: 3-cetoacil-CoA tiolase. Hspd1: proteína heat shock de 60 kDa. Mug2: murinoglobulina 2. Fonte: <http://string-db.org>.

Figura 10. Representação esquemática das proteínas subexpressas no VE dos ratos NTV em comparação com ratos NTN, de acordo com os processos biológicos (A) e compartimentos celulares (B), e proteínas superexpressas de acordo com processos biológicos (C) e compartimentos celulares (D). Todas as proteínas foram classificadas com base no *Gene Ontology*.

Figura 11. Mapa de interações das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo de ratos não treinados + veículo (NTV) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de tratamento, de acordo com o banco de dados STRING. Atp5o: ATP sintase subunidade O. Atp5b: ATP sintase subunidade beta. Mdh1: malato desidrogenase citoplasmática. Car1: anidrase carbônica. Fabp4: proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito. Slc25a4: ADP/ATP translocase. RGD1562690: lactato desidrogenase cadeia A. Acadl: acil CoA desidrogenase específica de cadeia longa. Ldhb: lactato desidrogenase cadeia B. Idh2: isocitrato desidrogenase mitocondrial. Atp5d: ATP sintase subunidade delta. Got1: aspartato aminotransferase. Atp5a1: ATP sintase subunidade alfa. Ckm: creatina quinase tipo M. Etfb: flavoproteína transferidora de elétron subunidade beta. Atp2a2: retículo sarcoplasmático de cálcio ATPase. Uqcrcf1: citocromo b c1 subunidade Rieske. Hpx: hemopexina. ENSRNOG00000018522: enoi- CoA hidratase. Prdx5: Peroxirredoxina 5. Aco2: aconitato hidratase. Aldoa: frutose bisfosfato aldolase A. Dlat: diidrolipoil lisina acetiltransferase. Gapdh: gliceraldeído 3 fosfato. Hbb: hemoglobina subunidade beta. Oxt1: succinil-CoA cetoácido coenzima A transferase. Fonte: <http://string-db.org>.

Figura 12. Mapa de interações das proteínas superexpressas no ventrículo esquerdo de ratos não treinados + veículo (NTV) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de tratamento, de acordo com o banco de dados STRING. Pebp1: proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1. Mdh2: malato desidrogenase mitocondrial. Alb: albumina sérica. Prdx2: peroxirredoxina 2. Mb: mioglobina. Tf: serotransferrina. Car2: anidrase carbônica 2. Got2: aspartato aminotransferase. Fabp3: proteína ligadora de ácidos graxos no coração. Pgam2: fosfoglicerato mutase 2. Uba52: proteína ubiquitina 60S ribossomal. Hba2: hemoglobina subunidade alfa. Fonte: <http://string-db.org>.

Figura 13. Representação esquemática das proteínas subexpressas no VE dos animais TV em comparação com animais TN, de acordo com processos biológicos (A) e compartimentos celulares (B), e proteínas superexpressas de acordo com processos biológicos (C) e compartimentos celulares (D). Todas as proteínas foram classificadas com base no *Gene Ontology*.

Figura 14. Mapa de interações das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + veículo (TV) em comparação com ratos treinados + nandrolona (TN), após 6 semanas de tratamento e treinamento, de acordo com o banco de dados STRING. Acta: alfa actina de músculo cardíaco. Fabp4: proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito. Got2: aspartato aminotransferase. Atp5d: ATP sintase subunidade delta. Cox4i1: citocromo c oxidase subunidade 4 isoforma 1. Etfb: flavoproteína transferidora de

elétron subunidade beta. Hba2: hemoglobina subunidade alfa. Hbb: hemoglobina subunidade beta 1. LOC689064: hemoglobina subunidade beta 2. Fonte: <http://string-db.org>.

Figura 15. Mapa de interações das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + veículo (TV) em comparação com ratos treinados + nandrolona (TN), após 6 semanas de tratamento e treinamento, de acordo com o banco de dados STRING. Pebp1: proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1. Mdh2: malato desidrogenase mitocondrial. Atp5j: ATP sintase fator acoplador 6. Sod1: superóxido dismutase Cu-Zn. Alb: albumina sérica. Atp5b: ATP sintase subunidade beta. Prdx2: peroxirredoxina 2. Eno3: beta enolase. Mb: mioglobina. Mdh1: malato desidrogenase citoplasmática. Serpina1: alfa 1 antiproteínase. Tf: serotransferrina. Akr1b1: aldose redutase. Acot2: acil coenzima A tioesterase 2. Lgals1: galectina 1. Car1: anidrase carbônica 1. Slc25a4: ADP/ATP translocase 1. Prdx3: tioredoxina redutase dependente de peróxido. Ndufs1: NADH ubiquinona oxidoreductase. Fabp3: proteína ligadora de ácidos graxos no coração. RGD15690: l-lactato desidrogenase. Acadl: acil CoA desidrogenase específica de cadeia longa. Ldhd: l-lactato desidrogenase de cadeia B. Pgam2: fosfoglicerato mutase 2. Idh2: isocitrato desidrogenase mitocondrial. Hspe1: proteína *heat shock* de 10 kDa. ENSRNOG00000015290: triosefosfato isomerase. Uqcrc2: citocromo b c1 subunidade 2. Got1: aspartato aminotransferase. Atp5a1: ATP sintase subunidade alfa. Ckm: creatina quinase tipo M. Atp2a2: retículo sarcoplasmático de cálcio ATPase. Uqcrcs1: citocromo b c1 subunidade Rieske. Hpx: hemopexina. Cox5a: citocromo c oxidase subunidade 5 A. Uba52: proteína ubiquitina 60S. Prdx5: peroxirredoxina 5. Aco2: aconitato hidratase. Aldoa: frutose bisfosfato aldolase A. Dlat: diidrolipoil lisina acetiltransferase. A1i3: alfa 1 inibidor 3. Gapdh: gliceraldeído 3 fosfato. Uqcrc1: citocromo b c1 subunidade 1. COX2: citocromo c oxidase subunidade 2. Hspa8: proteína *heat shock* membro 8 da família A (HSP70). Fonte: <http://string-db.org>.

Figura 16. Representação esquemática das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo de animais TN comparado aos animais NTN, de acordo com processos biológicos (A) e compartimentos celulares (B), e proteínas superexpressas de acordo com processos biológicos (C) e compartimentos celulares (D). Todas as proteínas foram classificadas com base no *Gene Ontology*.

Figura 17. Mapa de interações das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + nandrolona (TN) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de tratamento e/ou treinamento, de acordo com o banco de dados STRING. Pebp1: proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1. Mdh2: malato desidrogenase mitocondrial. Alb: albumina sérica. Prdx2: peroxirredoxina 2. Mb: mioglobina. Mdh1: malato desidrogenase citoplasmática. Tf: serotransferrina. Akr1b1: aldose redutase. Car1: anidrase carbônica 1. Slc25a4: ADP/ATP translocase 1. Prdx3: tioredoxina redutase dependente de peróxido. Got2: aspartato aminotransferase. Idh2: isocitrato desidrogenase mitocondrial. Hspe1: proteína *heat shock* de 10 kDa. Atp5a1: ATP sintase subunidade alfa. Ckm: creatina quinase tipo M. Atp2a2: retículo sarcoplasmático de cálcio ATPase. Hpx: hemopexina. Uba52: proteína ubiquitina 60S. Aco2: aconitato hidratase. Aldoa: frutose bisfosfato aldolase A. Gapdh: gliceraldeído 3 fosfato. Hba2: hemoglobina subunidade alfa. Hbb: hemoglobina subunidade beta 1. LOC689064: hemoglobina subunidade beta 2. Fonte: <http://string-db.org>.

Figura 18. Mapa de interações das proteínas superexpressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + nandrolona (TN) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de tratamento e/ou treinamento, de acordo com o banco de dados STRING. Atp5b: ATP sintase subunidade beta. Fabp4: proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito. Fabp3: proteína ligadora de ácidos graxos no coração. Acadl: acil-CoA desidrogenase específica de cadeia longa. Ldhd: l-lactato desidrogenase de cadeia B. ENSRNOG00000015290: triosefosfato isomerase. Atp5d: ATP sintase subunidade delta. Got1: aspartato aminotransferase. Etfb: flavoproteína transferidora de elétron subunidade beta. Dlat: diidrolipoil lisina acetiltransferase. Uqcrc1: citocromo b c1 subunidade 1. COX2: citocromo c oxidase subunidade 2. Fonte: <http://string-db.org>.

Figura 19. Concentração absoluta das proteínas em nanogramas (ng) expressas no VE dos grupos experimentais. SERCA2: retículo sarcoplasmático ATPase de cálcio 2 (A); KATP: canais de potássio sensíveis a ATP (B); CuZn SODC: superóxido dismutase Cu Zn (C); PRDX5: peroxirredoxina 5 (D); GSTM2: Glutathione S-transferase Mu2 (E) LDHA: lactato desidrogenase A (F); PGCK1: fosfoglicerato quinase 1 (G); C1SY: citrato sintase (H); HSP20: proteína de choque térmico 20kDa (I); HSP7C: proteína de choque térmico 7C (J). Grupos: veículo não treinado (NTV); veículo treinado (TV); nandrolona não treinado (NTN) e

nandrolona treinado (TN). ANOVA de duas caudas + Bonferroni. n = 6 / grupo. * p <0,05 vs. NTV; #p <0,05 vs. TV; & p <0,05 vs. NTN.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo de treinamento físico resistido.

Tabela 2 - Parâmetros do peso corporal inicial e final (PC), peso do coração (PCor), índice de hipertrofia cardíaca (IHC), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

Tabela 3. Termo de acesso na base UniProt e descrição das proteínas identificadas através de UPLC-MSE, expressas exclusivamente no ventrículo esquerdo de ratos não treinados + veículo (NTV) e treinados + veículo (TV), após 6 semanas de treinamento resistido de alta intensidade.

Tabela 4. Termo de acesso na base de dados UniProt e descrição das proteínas identificadas por UPLC-MSE, expressas no ventrículo esquerdo de ratos não treinados + veículo (NTV) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de tratamento. As proteínas foram classificadas de acordo com o processo biológico. Valores acima de 1 ng correspondem às proteínas superexpressas e abaixo disso, subexpressas.

Tabela 5. Termo de acesso à base de dados de UniProt e descrição das proteínas identificadas por UPLC-MSE, expressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + veículo (TV) em comparação com ratos treinados + nandrolona (TN), após 6 semanas de treinamento resistido de alta intensidade e/ou tratamento com nandrolona. As proteínas foram classificadas de acordo com o processo biológico. Valores acima de 1 ng correspondem a proteínas superexpressas e abaixo disso, subexpressas.

Tabela 6. Número de acesso à base de dados UniProt e descrição das proteínas identificadas por UPLC-MSE, expressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + nandrolona (TN) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de treinamento resistido de alta intensidade e/ou tratamento com nandrolona. As proteínas foram classificadas de acordo com o processo biológico. Valores acima de 1 ng correspondem a proteínas superexpressas e abaixo disso, subexpressas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Exercício físico e saúde cardiovascular	1
1.2 Hipertrofia cardíaca e seus mecanismos desencadeadores	4
1.3 O papel dos esteroides anabólicos no desencadeamento da hipertrofia patológica.....	10
1.4 O uso da proteômica como ferramenta investigativa	13
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais	18
3.2 Protocolo de treinamento	18
3.3 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca.....	20
3.4 Coleta de tecidos e preparação de amostras	20
3.5 Protocolo de digestão trípica.....	20
3.6 Análise de dados em equipamento do tipo nano UPLC- MSE	21
3.7 Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Índice de hipertrofia cardíaca e pressão arterial	23
4.2 Proteínas	24
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
8. APÊNDICE	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Exercício físico e saúde cardiovascular

Segundo dados do site da OMS, em 2016 as doenças cardiovasculares foram a principal causa de morte em todo o mundo, superando qualquer outra doença. Atualmente, muitas estratégias para a prevenção e tratamento destas enfermidades tem sido discutidas, dentre medicamentos e outras intervenções não-farmacológicas; no entanto o exercício físico ainda tem se mostrado a intervenção mais simples, barata e eficaz, e uma das mais indicadas pela OMS.

Muitos estudos demonstram que as alterações provenientes do treinamento físico, quando prescrito de forma adequada, são benéficas ao sistema cardiovascular, principalmente para o coração [1-3]. Sendo o coração o principal responsável por suprir a demanda de aporte de oxigênio, o treinamento físico age neste órgão estimulando a melhora de seu desempenho. A esta alteração dá-se o nome de “coração de atleta”, um termo popular para a hipertrofia cardíaca, que se caracteriza pelo aumento nas dimensões do cardiomiócito [4, 5].

Uma vez que o sistema cardiovascular (principalmente o coração) se adapta às necessidades do organismo, a demanda energética vai depender do tipo de treinamento e da intensidade. Basicamente, existem dois tipos de exercício: os aeróbios (também conhecidos como dinâmicos ou isotônicos, que contemplam atividades como natação, ciclismo, entre outros) e os anaeróbios (também conhecidos como isométricos, resistidos ou estáticos, que contemplam atividades como levantamento de peso, arremesso de disco, entre outros). De maneira geral, esta categorização é baseada no tipo de carga imposta ao coração; exercícios aeróbios requerem uma elevação contínua da função cardíaca (sobrecarga de volume), enquanto os exercícios anaeróbios produzem breves instantes de elevação da pressão (sobrecarga de pressão) [3, 6].

Em virtude das características mecânicas diferentes, os efeitos agudos e crônicos produzidos por cada tipo de exercício físico (aeróbios e resistidos) são distintos. Os exercícios dinâmicos promovem uma hipertrofia chamada excêntrica, com aumento da massa do coração de maneira global, mantendo a relação de espessamento da parede e volume das câmaras [3, 6, 7]. Morfologicamente, a hipertrofia excêntrica caracteriza-se pelo estiramento dos miócitos, que se tornam alongados devido à sobrecarga de volume sofrida pelo coração. Já os exercícios resistidos promovem uma hipertrofia chamada

concêntrica, onde há aumento na massa do coração acompanhado por um espessamento da parede das câmaras e do septo, com pouca ou nenhuma alteração do volume da câmara. Esta hipertrofia instala-se principalmente no ventrículo esquerdo, responsável por promover o fluxo do sangue do coração para a aorta, que o distribuirá para os demais órgãos e tecidos. Neste caso, devido à sobrecarga de pressão sofrida pelo coração, morfológicamente, observa-se um aumento na largura do miócito [3, 6, 7].

Ainda com relação às diferenças entre os treinamentos aeróbio e anaeróbio, o aeróbio apresenta uma elevação do débito cardíaco com redução ou não da resistência vascular periférica, enquanto o anaeróbio apresenta intensos períodos de elevação da resistência vascular periférica (ainda que curtos), além de um débito cardíaco normal ou ligeiramente aumentado [3, 5].

É importante salientar que quando corretamente prescrito, o exercício estimula processos fisiológicos de hipertrofia do músculo cardíaco (hipertrofia fisiológica), geralmente benéficos, uma vez que representam uma adaptação do coração frente à demanda imposta. Por outro lado, sabe-se que estímulos inadequados podem induzir ou estimular processos hipertróficos patológicos, desencadeado mal funcionamento do miocárdio, e neste caso, consideramos a hipertrofia como patológica [3, 8]. A figura 1 ilustra a relação entre o tipo de hipertrofia e o estímulo desencadeador.

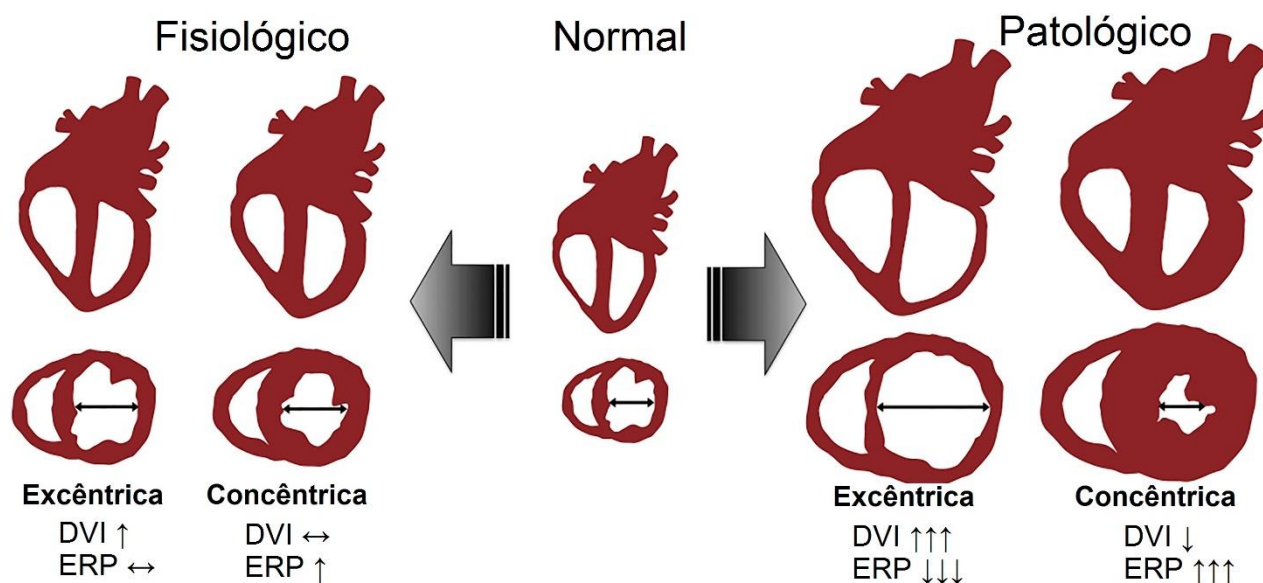


Figura 1: Comparação entre hipertrofia concêntrica e excêntrica devido a estresse fisiológico e patológico: o coração normal adapta-se a um aumento na demanda hemodinâmica, seja por estímulos fisiológicos (por exemplo, exercícios) ou patológicos (por exemplo, hipertensão). Esse desenvolvimento hipertrófico segue dois padrões típicos de crescimento determinados pela relação geométrica entre o diâmetro ventricular interno (DVI) e a espessura da parede ventricular, ou espessura relativa da parede (ERP): (1) aumento concomitante da ERP e DVI (excêntrico), geralmente devido à sobrecarga de volume; (2) um aumento desproporcional na espessura da parede comparado ao DVI (concêntrico), impulsionado pela sobrecarga de pressão. Normalmente, a hipertrofia excêntrica ou concêntrica devido ao exercício (fisiológico) é limitada a um aumento de 12% a 15% no peso total do coração e não progride para insuficiência cardíaca. Em contraste, a hipertrofia cardíaca devido a doenças como hipertensão, infarto do miocárdio ou cardiomiopatia hipertrófica (patológica) geralmente exibe uma resposta hipertrófica mais robusta (concêntrica ou excêntrica) e frequentemente progride para um estado de insuficiência cardíaca. O crescimento excêntrico patológico pode representar a transição inicial para um estado dilatado; o crescimento concêntrico patológico resulta em espessamento expressivo da parede ventricular com uma redução no DVI. Adaptado de Vega *et al*, 2017.

1.2 Hipertrofia cardíaca e seus mecanismos desencadeadores

1.2.1 Hipertrofia cardíaca fisiológica

A hipertrofia cardíaca, como descrito anteriormente, pode ser classificada como fisiológica ou patológica. A importância de contextualizar os tipos de hipertrofia deve-se, principalmente, à necessidade de se estabelecer alvos terapêuticos para as disfunções cardíacas, através da identificação das vias de sinalização e mecanismos responsáveis por desencadear uma destas duas formas de adaptação. Ao delinear quais vias são responsáveis por promover um efeito cardioprotetor (hipertrofia fisiológica) ou disfunção (hipertrofia patológica), é possível definir a busca por terapias mais eficientes.

No que diz respeito à hipertrofia fisiológica, anos de estudos conseguiram elucidar diversos mecanismos responsáveis por disparar os efeitos protetores decorrentes do exercício, principalmente a longo prazo. Parte destes efeitos é desencadeada por fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e seu receptor, IGF-1R. A ativação do receptor IGF-1 induz o crescimento dos miócitos através da fosforilação da ERK (quinase reguladora de sinal extracelular - uma família de proteínas que faz parte da cascata de sinalização envolvida em diversos processos biológicos, como a proliferação celular) e dos substratos receptores de insulina 1 e 2 (IRS-1 e 2) [8, 9]. A fosforilação dos receptores IRS-1 e IRS-2 ativa a PI3k e a Akt, que são mediadores responsáveis pela síntese proteica através da ativação dos ribossomos e de outros fatores de iniciação translacional. Além disso, o IGF-1 melhora a captação de insulina pelas células e a repolarização dos miócitos, e sua baixa concentração circulante, por si só, tem demonstrado ser um fator de risco independente para doenças cardíacas [8, 9].

Além do IGF-1, outro fator importante estimulado pelo exercício é o receptor ativado por proliferadores de peroxissomo (ou PPAR). Este fator de transcrição é ativado através da expressão de genes reguladores do metabolismo β -oxidativo lipídico, que se encontra elevado na adaptação ao exercício. A isoforma α é expressa predominantemente em tecidos associados a grande consumo lipídico, como o coração, fígado, rins e fibras musculares de contração lenta. Uma vez ativado, o PPAR- α estimula a produção de proteínas que melhoram o metabolismo oxidativo, promovendo um aporte energético mais eficaz ao coração. Além disso, o PPAR- α parece inibir mediadores inflamatórios, como o Nf-kB, além de reduzir os níveis séricos de triglicerídeos, de colesterol-LDL, e de espécies reativas de oxigênio (ERO) [10, 11].

Existem ainda outros mediadores importantes relacionados à proteção cardíaca, como o óxido nítrico (NO) e as *heat shocks proteins*. Com relação ao NO, este é produzido pela enzima óxido nítrico endotelial sintase (eNOS), e que é ativada pelo treinamento físico. O NO estimula a vasodilatação, melhorando o fluxo sanguíneo e reduzindo a pressão arterial [3]. Já as *heat shocks* são proteínas cuja expressão é desencadeada por situações de estresse (aumento de temperatura corpórea, alteração de pH, entre outros), e são responsáveis por manter a conformação de outras proteínas, contribuindo para a manutenção de atividades importantes do organismo. Algumas *heat shocks* moduladas pelo exercício físico (e que atuam na manutenção estrutural do miocárdio) são a Hsp20 e a α -cristalina de cadeia β [12, 13].

Outro importante painel típico da hipertrofia fisiológica diz respeito ao perfil metabólico energético. A adaptação ao exercício estimula a utilização de ácidos graxos preferencialmente à glicose para a produção do ATP, uma vez que a β -oxidação lipídica gera número maior de ATPs do que a glicólise. Com isso, aumenta a expressão de genes que codificam transportadores, proteínas ligadoras e outros fatores relacionados ao aumento da β -oxidação, como acontece com o PPAR- α [3, 14]. Uma vez que a β -oxidação ocorre na mitocôndria, outras atividades mitocondriais também se encontram elevadas, como a cadeia de transporte de elétrons; o funcionamento harmonioso destas vias fornece a energia necessária para o bom funcionamento do coração, uma vez que interdependentes [3, 8]. E adicionalmente já foi demonstrado que um dos principais fatores indicativos do bom funcionamento do coração é o metabolismo mitocondrial, caracterizado pela expressão da citrato sintase, que em situações fisiológicas, encontra-se levemente aumentada [15, 16].

1.2.2 Hipertrofia cardíaca patológica

De maneira geral, a hipertrofia patológica é considerada concêntrica. O treinamento físico resistido pode desencadear tanto uma hipertrofia excêntrica quanto concêntrica, apesar de esta última estar correlacionada com achados clínicos de mau prognóstico. Apenas o que difere a hipertrofia proveniente do treinamento e a hipertrofia desencadeada por processos patológicos é que a primeira não causa disfunção cardíaca em indivíduos saudáveis. Além disso, algumas patologias podem promover uma hipertrofia patológica concêntrica, como a hipertensão e a constrição aórtica, justamente devido à sobrecarga de pressão sofrida pelo coração [3, 8].

Um dos principais achados histológicos oriundos da hipertrofia patológica é a fibrose por deposição de colágeno; uma vez estabelecido o insulto inicial, posteriormente ocorre a morte celular e conseqüentemente, uma grave injúria tecidual. No local onde outrora haviam miócitos, há deposição de colágeno (principalmente do tipo I), um tecido meramente cicatricial e sem atividade, que acaba enrijecendo o coração e dificultando os processos de contração e relaxamento [3, 14].

Existem vias de sinalização que, uma vez ativadas, promovem o mau funcionamento do miócito e deflagram a morte tecidual. A reprogramação estrutural e funcional do miocárdio, basicamente, se inicia através da ativação de genes chamados fetais, assim chamados pois sua maior atividade ocorre na fase fetal; no útero, o feto dispõe de muito mais glicose do que ácidos graxos para a produção de energia. Desta forma, o padrão genético metabólico transcreve muito mais proteínas relacionadas à glicólise do que à β -oxidação, além de pouco expressar proteínas relacionadas à atividade mitocondrial, como a cadeia respiratória. No entanto, após o nascimento, estes genes passam a ser desligados, e outros genes passam a coordenar os processos de transcrição, substituindo o metabolismo essencialmente glicolítico para oxidativo [3, 17]. No estabelecimento da hipertrofia patológica, ocorre a reativação de alguns destes genes, fazendo com que a glicose se torne o substrato preferencial para a produção de ATP ao invés dos ácidos graxos. Uma vez que a quantidade de ATP produzida pela glicólise é menor, se torna insustentável para o coração manter a massa decorrente da hipertrofia, que passa a funcionar de maneira inadequada até deflagrar uma disfunção [8].

Além dos genes fetais relacionados ao metabolismo, outros genes também são ativados, como o responsável pela produção do peptídeo natriurético atrial (ANP) e da α -miosina de cadeia pesada [3, 18]. A α -miosina de cadeia pesada, diferente da β -miosina de cadeia pesada, possui um padrão de contração menos eficiente, e por isso é mais expressa na fase fetal [18]. Já o ANP, em situações fisiológicas, é liberado como fator regulador pressórico, principalmente para contrabalancear os efeitos vasoconstritores decorrentes do sistema renina-angiotensina. No entanto, em situações patológicas, como na insuficiência cardíaca, o estresse sofrido pelas paredes do ventrículo ativa a expressão do ANP [19].

A nível molecular, observa-se a expressão de mediadores como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que são uma família de proteínas que estão relacionadas, segundo estudos dos últimos anos, a diversos processos ligados à insuficiência cardíaca. As MAPKs são divididas em subfamílias, que correspondem às ERKs, às JNKs e às p38; todas podem ser ativadas em situações de estresse mecânico

(como o que ocorre na hipertrofia concêntrica) e falência cardíaca, e atuam como mediadores para a produção de citocinas pró-inflamatórias e outros fatores, como a Angiotensina II [14, 20]. Com relação a Angiotensina-II, sabe-se que alguns processos patológicos estimulam a sua produção, como a hipertensão, a aterosclerose, a insuficiência cardíaca, a doença renal crônica, entre outras, podendo agravar ainda mais o quadro em si. No coração, além de favorecer a hipertrofia ventricular e a liberação de catecolaminas, a Angiotensina-II parece estar relacionada à exacerbada produção de colágeno e à produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) [20, 21], que são compostos químicos instáveis, capazes de retirar elétrons de moléculas carregadas, como os aminoácidos, e modificá-las de forma a perderem sua ação. Em pequenas quantidades, os ERO's ativam as defesas antioxidantes do organismo (que são compostas basicamente por proteínas que possuem grande capacidade de reconstituição perante a perda de elétrons) e estimulam os processos biológicos. No entanto, o excesso de ERO's promove um desequilíbrio no organismo, uma vez que as substâncias antioxidantes são consumidas rapidamente e não são capazes de impedir a ação destes compostos contra proteínas transportadoras, estruturais, entre outras, que passam a ter um mau funcionamento, como é o caso da SERCA (Retículo sarcoplasmático de cálcio ATPase) e da KATP (canal de potássio ATPase dependente), que são canais iônicos extremamente importantes para o funcionamento normal do coração, mas que são afetadas drasticamente pelos ERO's [22-24].

Fisiologicamente, outro fator predominante na hipertrofia patológica é a hiperestimulação de receptores β 1-adrenérgicos. A sobrecarga de pressão promovida pela hipertrofia concêntrica aumenta os níveis das catecolaminas, que estimula de maneira exacerbada os receptores β 1. Como mecanismo compensatório, para evitar a falência cardíaca por excesso de estimulação, a quantidade destes receptores é diminuída, e a expressão dos receptores β 2 aumenta. No entanto, os receptores β 2 reduzem a estabilidade elétrica do coração, já que promovem aumento de cálcio para dentro da célula. Esta alteração no padrão de expressão dos receptores β -adrenérgicos torna o tecido cardíaco instável, e arritmias podem ser deflagradas [25, 26].

Como foi dito anteriormente, a hipertrofia concêntrica está relacionada a um mau prognóstico. O treinamento resistido, quando associado ao treinamento aeróbio, é capaz de fortalecer o coração e os demais músculos, trazendo aspectos positivos para o organismo de maneira geral, como aumento da capacidade funcional, prevenção da osteoporose, sarcopenia e outras condições decorrentes da reabsorção óssea, além de diminuir a resistência à insulina e a pressão arterial, diminuir a gordura corporal, entre

outros [27]. No entanto, a restrição de treinamento apenas no resistido, a longo prazo, pode deflagrar uma hipertrofia patológica. De fato, nosso grupo de pesquisa analisou o impacto de um protocolo de treinamento resistido, com sobrecarga de pressão, sobre o perfil proteico cardíaco de ratos, e observou alterações típicas da hipertrofia patológica, como a alteração do metabolismo cardíaco. No entanto, também foi verificada a presença de várias proteínas protetoras (como *heat shocks* e antioxidantes), cuja expressão provavelmente estava agindo de forma a impedir a propagação de possíveis efeitos deletérios resultantes dessa alteração [28].

Além de protocolos de treinamento extenuantes, substâncias químicas também podem deflagrar a hipertrofia patológica. Substâncias extremamente comuns, inclusive associadas ao treinamento físico, cujos estudos têm apontado que são extremamente prejudiciais ao coração, são os esteroides anabólicos androgênicos. Estas substâncias estão relacionadas a diversos mecanismos de hipertrofia patológica, e quando associadas a protocolos resistidos extenuantes, podem rapidamente promover uma hipertrofia patológica importante, causando grave disfunção cardíaca.

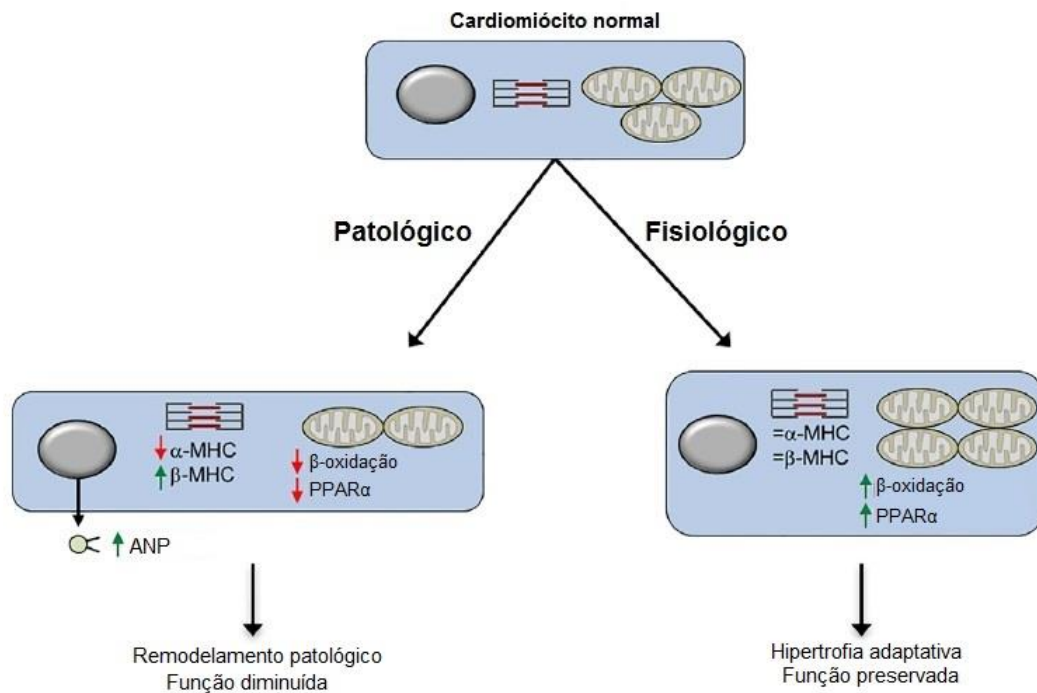


Figura 2. Estímulos externos diferentes desencadeiam hipertrofias distintas no cardiomiócito. Em resposta a hipertensão ou sobrecarga de pressão (patológica), o cardiomiócito ativa um programa de crescimento caracterizado pela indução de um gene fetal, incluindo o aumento da expressão do peptídeo natriurético (ANP) e mudanças na expressão gênica da isoforma do sarcômero. Este programa eventualmente leva a uma remodelação patológica global, incluindo a dilatação do ventrículo esquerdo e função cardíaca diminuída, levando a uma insuficiência cardíaca. Em contraste, o exercício (fisiológico) provoca uma hipertrofia sem indução dos genes fetais e com aumento na capacidade metabólica energética através da oxidação de ácidos graxos. Este último programa mantém a função cardíaca normal. MHC: miosina de cadeia pesada; ANP: peptídeo natriurético atrial; PPAR α : receptor ativado por proliferador de peroxissoma α . Adaptado de Vega *et al*, 2017.

1.3 O papel dos esteroides anabólicos no desencadeamento da hipertrofia patológica

Com o objetivo de acelerar a ocorrência das adaptações frente ao treinamento físico, melhorar o desempenho atlético e a aparência física, tanto atletas quanto não-atletas utilizam diversas substâncias ergogênicas, sendo as principais e mais difundidas, os esteroides anabólicos androgênicos (ou anabolizantes). Estas substâncias são hormônios derivados do colesterol e produzidos em alguns tecidos, que no organismo têm função de auxiliar no desenvolvimento do sistema reprodutor e conferir características sexuais secundárias, além de ter papel importante na síntese proteica [29]. O principal hormônio produzido é a testosterona, que acabou servindo como base para a síntese de outros esteroides através de métodos de modificação molecular.

Devido ao aumento da massa muscular e da densidade óssea como resultado direto da ação destas substâncias na síntese proteica, além do desenvolvimento de força, recuperação da musculatura e controle dos níveis de gordura corporal [29], a utilização de esteroides anabólicos androgênicos (EAA) é amplamente difundida. Estudos apontam que pode ocorrer um ganho de força de 5 a 20% comparado à força inicial, além de um ganho de massa muscular de até 5 kg. No entanto, apesar do consenso que parece existir entre os adeptos da utilização de EAA sobre o aumento da capacidade física, as alterações relativas ao ganho de massa muscular e incremento de força física parecem estar associadas a um efeito placebo do que realmente a uma alteração fisiológica adaptativa [30].

Como qualquer substância, os EAA, quando utilizados para fins diversos e de maneira indiscriminada, podem acarretar inúmeros prejuízos à saúde. Alguns já são conhecidos há algum tempo, como esterilidade transitória, aparecimento de acne e espinhas, aparecimento de caracteres sexuais secundários masculinos em mulheres que os utilizam (alteração da voz, diminuição das mamas), entre outros [31].

Dentre os EAA largamente difundidos a nandrolona tem grande destaque. Sintetizada pela primeira vez em 1950, seu potencial terapêutico em pesquisas seria direcionado para tratamento de pacientes em hemodiálise, anemia aplástica, astenia em pacientes com HIV, recuperação após traumas ou cirurgias, proteção do sistema imune durante tratamento de câncer, na osteoporose e caquexia, devido seu maior potencial anabólico quando comparado à testosterona, por exemplo [32]. No entanto, o uso não-terapêutico da nandrolona é extremamente difundido, devido sua ação prolongada de até

3 semanas após administração intramuscular e por apresentar maior ação anabólica e menor atividade androgênica quando comparada à testosterona [33].

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos vêm apontando as ações deletérias que os EAA têm sobre as modificações positivas ocorridas no organismo adaptado às práticas físicas. Algumas destas alterações, inclusive, acabam diminuindo a capacidade e a tolerância do indivíduo aos exercícios, e podem levar a quadros graves, inclusive morte. Tem sido dada grande importância às alterações a nível cardiovascular, devido ao grande número de mortes súbitas associadas ao uso de EAA em indivíduos treinados. Algumas alterações morfológicas e funcionais no coração incluem hipertrofia concêntrica, possível aumento do diâmetro das câmaras cardíacas, alterações na função diastólica e no relaxamento ventricular, comprometimento na contração do ventrículo esquerdo e diminuição da resposta adrenérgica em situações de stress, além de ativar a agregação plaquetária, contribuindo para a formação de trombos [34]. Dessa forma, a associação de treinamento físico com EAA poderia potencializar ainda mais os efeitos deletérios citados anteriormente.

Outros estudos apontam que usuários de EAA apresentam uma desfavorável reatividade vascular, possuem alteração no metabolismo de lipídeos (elevação do LDL e a diminuição do HDL) e apresentam maior risco de desenvolver arritmias que levam a morte súbita, apesar deste mecanismo ainda não ter sido elucidado [34]. Além disso, ainda há indícios de que o uso de EAA ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona no coração (envolvido no remodelamento patológico) [35], além de interferir nos sistemas relacionados à eliminação/redução de espécies reativas de oxigênio, o que pode acelerar eventos isquêmicos cardiovasculares [36].

Ainda com relação aos danos promovidos pelos esteroides, no tocante à nandrolona, estudos apontam que o uso de doses suprafisiológicas reduz o conteúdo hepático de glicogênio, além de promover uma fibrose considerável no tecido hepático, com consequente aumento das concentrações de enzimas como a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que são utilizadas como marcadoras de lesão no fígado. Além do fígado, a nandrolona afeta os testículos e órgãos sexuais acessórios, promovendo, inclusive, apoptose das células germinativas, deflagrando problemas na fertilidade [37, 38]. No entanto, um aspecto pouco citado, porém de grande importância, é o potencial dos esteroides enquanto drogas de abuso. Antigamente, era bem comum que os transtornos relacionados à aparência física se limitassem às mulheres, porém, há algumas décadas este problema parece ter afetado também aos homens. O ideal másculo e viril tem feito com que mais e mais homens,

principalmente jovens, recorram a substâncias que facilitam a aquisição deste padrão físico desejável, e o esteroide é uma destas principais substâncias. Os usuários de EAA acreditam que além do efeito direto, estimulando a hipertrofia muscular, há um efeito indireto, proporcionando sessões de treino mais intensas e duradouras, além de promover disposição e motivação. No entanto, o uso crônico dos EAA parece promover alterações psicológicas importantes, como transtorno de humor (como mania, transtorno bipolar ou depressão), episódios de agressividade descontrolada e até mudanças súbitas de comportamento e temperamento, com aumento da possibilidade destes indivíduos cometerem crimes, principalmente devido ao sentimento de “invencibilidade”. O narcisismo patológico e a personalidade antissocial também estão relacionados ao abuso de EAA. Além disso, ainda existe uma correlação entre o uso de EAA e um decréscimo na tolerância à frustração, principalmente quando existe provocação. Tais comportamentos, associados com uma visão deturpada do indivíduo sobre sua própria capacidade, podem promover acessos de fúria que resultam em homicídios, suicídio e abuso infantil. Em alguns casos, o uso de esteroide pode desencadear esquizofrenia aguda, além de confusão mental, paranoia e alucinações. Devido a estes sintomas (além do fato de que a interrupção do uso do anabolizante promove uma síndrome de abstinência marcada por sintomas adrenérgicos e “fissura”), a Associação Psiquiátrica Americana codificou, em 1994, o “transtorno de dependência do hormônio esteroide sexual” [39].

Apesar do consenso que existe sobre o uso indiscriminado de anabolizantes e seu potencial danoso à saúde, os estudos a respeito ainda são pouco contundentes quanto à administração de doses suprafisiológicas de EAA em humanos. Os poucos estudos delineados para investigar a utilização de EAA não refletem, necessariamente, a realidade; eles subestimam os efeitos colaterais e, além disso, não englobam os esquemas de uso destas substâncias. Apesar de muitos usuários negarem o uso de esteroides, é muito comum a utilização dos mesmos e ainda, com a adoção de um regime com múltiplos esteroides durante um ciclo de tratamento, para incrementar o ganho de massa muscular de acordo com o treinamento. Outro fator a ser considerado é a aquisição destas substâncias: uma vez que a venda é controlada, a única alternativa que resta aos usuários é o mercado informal, porém a qualidade das mesmas é questionável. Todos estes fatores interferem nos estudos que buscam relacionar o uso de esteroides na saúde humana, já que não é possível estabelecer uma relação causal dos efeitos colaterais destas substâncias a partir da dosagem e do tempo de tratamento [40]. Desta forma, se faz necessário o delineamento de estudos com o maior controle possível destas

variáveis, afim de estabelecer o real impacto da associação do anabolizante com o treinamento físico, principalmente o resistido, uma vez que esta associação tem se difundido amplamente nas academias, atualmente. A utilização de técnicas de mapeamento de proteínas, como a proteômica, tem se mostrado extremamente útil nestes casos, uma vez que é possível estabelecer o padrão proteico em todas as situações de estudo (treinamento isolado, anabolizante isolado e associação de ambos) e fazer comparações para verificar quais vias de sinalização estão ativadas e que alterações estão ocorrendo, afim de confirmar o real impacto desta associação ou de cada estímulo isoladamente.

1.4 O uso da proteômica como ferramenta investigativa

Nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas laboratoriais tem possibilitado cada vez mais o diagnóstico precoce das doenças, proporcionando aos pacientes uma melhor qualidade de vida. As “ômicas”, termo que compreende o uso de técnicas que possibilitam o entendimento global dos processos celulares, desde o gene até o transcrito final, têm facilitado o estudo e a comparação dos perfis fisiológicos e patológicos [41]. Dentre elas, a proteômica é uma das mais promissoras, uma vez que as proteínas costumam estar relacionadas a diversas vias de sinalização, atuando como efetoras em processos tanto fisiológicos quanto patológicos.

A proteômica surgiu, conceitualmente, como um ensaio biológico para quantificar e analisar amostras complexas de proteínas. É uma ferramenta poderosa que suporta catalogar e quantificar de forma confiável, sensível e com alto rendimento, o perfil proteico de uma matriz biológica, fornecendo informações valiosas da ligação entre o gene que codifica tais proteínas com a atividade e função exercida por elas [42]. A proteômica fornece uma rápida identificação de todas as proteínas expressas por uma célula ou tecido, proporcionando, assim, um rápido avanço na química das proteínas [42].

O termo proteoma foi sugerido pela primeira vez em 1994, por Marc Wilkins e colaboradores, no Primeiro Encontro de 2DE em Siena, Itália. O proteoma foi definido como complemento proteico do genoma, daí o termo criado (proteína + genoma = proteoma); já o processo de estudo do proteoma seria conhecido como proteômica, e abrange o estudo dos processos relacionados à quantificação, modificação e interação das proteínas [41, 42]. A proteômica proporciona a investigação em larga escala das proteínas, o que facilita a identificação de possíveis biomarcadores como alvos terapêuticos em processos patológicos [43]. Devido à natureza dinâmica da expressão

proteica nos tecidos, se faz necessário criar técnicas eficientes que proporcionam desde a separação até a identificação das proteínas [44]. No entanto, apesar do avanço das técnicas de separação, identificação e quantificação, observa-se que não há uma única análise que satisfaça todas as necessidades dos pesquisadores referente ao tipo de informação que se deseja obter de uma matriz biológica; cada plataforma fornece valiosas informações, apesar dos seus aspectos negativos inerentes a técnica [42].

Nos últimos anos, diversas técnicas foram criadas e aperfeiçoadas para a investigação eficaz das proteínas. Basicamente, elas podem ser divididas em técnicas baseadas em gel ou *gel-free* para a separação, podendo ainda ser quantificadas ou não, mas em ambas as técnicas é necessário que as proteínas sejam previamente digeridas. As técnicas baseadas em gel promovem uma separação em dois princípios das proteínas: primeiramente pelo ponto isoelétrico e em seguida pela massa molecular; por isso são denominadas 2-DE (eletroforese em 2 dimensões). Apesar da grande capacidade de identificar isoformas e modificações pós-traducionais, a técnica de gel 2-DE é pouco reprodutiva e não consegue identificar proteínas em baixas concentrações e em extremos de pH [44].

Nas técnicas *gel-free*, as proteínas são previamente digeridas em fragmentos menores para aumentar o poder de resolução e facilitar a separação. O principal método de separação *gel-free* é através do HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), e atualmente é o método de escolha para a separação das proteínas, uma vez que não possui as desvantagens do gel 2-DE, apesar de não ser tão acessível [43]. No entanto, a técnica de espectrometria de massas (MS) é a responsável por efetuar a análise proteômica propriamente dita, uma vez que ela é capaz de separar, identificar e ainda quantificar as proteínas. A figura 3 traz um esquema conceitual da técnica de proteômica.

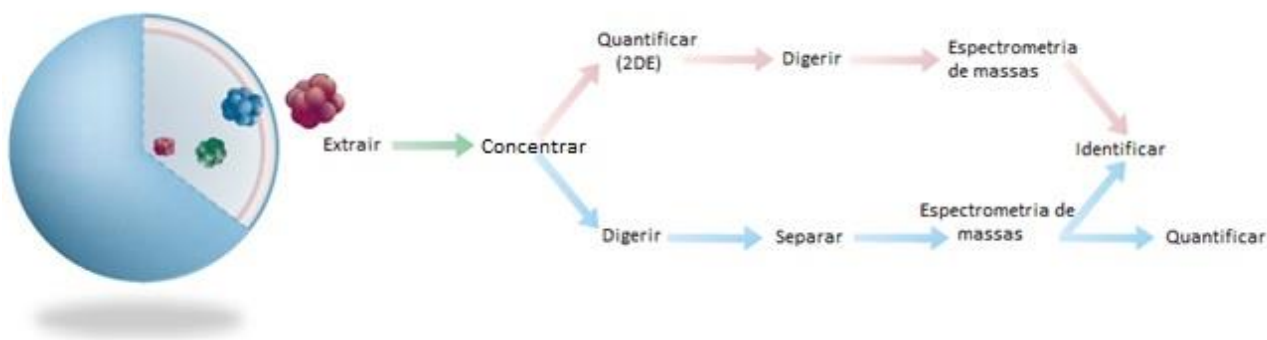


Figura 3. Os dois processos mais comuns para análise proteômica quantitativa são mostrados. No primeiro (topo), 2DE é usado para separar e quantificar proteínas, e proteínas selecionadas são então isoladas e identificadas por espectrometria de massa. Na segunda (inferior), utiliza-se a LC-MS / MS para analisar as digestões de enzimas de misturas proteicas não separadas, e consegue-se quantificação exacta marcando os péptidos com isótopo estável. Ambos os processos são compatíveis com métodos de fracionamento ou separação de proteínas, como o fracionamento subcelular, isolamento de complexos protéicos e eletroforese e cromatografia, proporcionando, assim, um contexto biológico adicional às amostras de proteínas analisadas. Adaptado de Patterson *et al* 2003.

A técnica de espectrometria de massas se baseia na capacidade dos analitos de sofrer ionização. A molécula, ao adentrar o equipamento, é bombardeada por íons até formar fragmentos iônicos. Através da mensuração da razão massa/carga destes fragmentos, é possível determinar a molécula através de sua estrutura [42]. Apesar de ser uma técnica valiosa, a espectrometria de massas se mostrava incompatível com muitas macromoléculas biológicas (como peptídeos e proteínas), devido à dificuldade de ionização das mesmas, o que impedia a determinação destas macromoléculas. No final dos anos 80, no entanto, foram desenvolvidos dois métodos que permitiam a ionização de peptídeos e proteínas sem que houvesse uma fragmentação excessiva dos mesmos. Eram as técnicas de Ionização por Eletrospray (ESI) e Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI). A partir daí, a química de proteína obteve grande avanço [42]. A técnica de MALDI constitui-se por uma técnica de identificação de proteínas conhecida como “impressão digital de massa do peptídeo”. Nesta análise, o espectro de massa obtido é usado para gerar uma lista de fragmentos de massas de peptídeos, que depois são combinados com as sequências disponíveis em uma base de dados. O sucesso deste tipo de análise depende da especificidade da enzima usada (geralmente

tripsina), do número de peptídeos identificados e da acurácia de massa do espectrômetro [42, 45].

Já na técnica de ESI, além de mensurar a massa dos peptídeos, também é possível isolar íons específicos da mistura com base na sua carga/massa e fragmentá-los ainda mais, gerando uma espécie de duplo espectro, conhecido como MS/MS. Devido a essa grande capacidade de fragmentação, a identificação dos peptídeos é muito melhor e mais rápida. Além disso, a técnica de ESI pode ser facilmente combinada com ferramentas de separação de peptídeos, como a cromatografia, facilitando o processo de separação e consequentemente, de identificação dos peptídeos em uma mistura [42, 45]. Essa abordagem oferece grandes vantagens, pois a separação eficiente das frações proteicas através da cromatografia (como o HPLC) facilita a identificação e quantificação de um número maior de proteínas pelo espectrômetro de massas [46].

Dentre todas as técnicas de análise proteômica, a técnica baseada em espectrometria de massas tem se tornado o padrão ouro para a análise do perfil proteico, uma vez que ela fornece maneiras de identificar muitas proteínas de diversos compartimentos, auxiliando a estabelecer as conexões e a compreender melhor as funções dentro de um determinado compartimento celular [42].

Devido às diversas vantagens oriundas da espectrometria de massas para análise do proteoma, neste trabalho utilizamos a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplado a um espectrômetro de massas de alta/baixa energia de colisão (MS^E) com o intuito de aumentar o poder de resolução de nossas análises, e dessa forma, estabelecer as principais alterações proteicas desencadeadas pelo anabolizante e sua associação com o treinamento resistido.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da administração crônica de doses supra-fisiológicas de decanoato de nandrolona, associada ao treinamento físico de alta intensidade, sobre o perfil proteico em tecido cardíaco de ratos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, em tecido cardíaco de ratos tratados com doses supra-fisiológicas de decanoato de nandrolona e submetidos ao treinamento físico resistido de alta intensidade:

- O perfil proteico, buscando identificar alterações qualitativas e quantitativas induzidas por estes estímulos;
- Identificar proteínas e possíveis vias de sinalização que possam estar envolvidas no desenvolvimento da hipertrofia patológica e disfunção cardíaca, induzidas por cada estímulo separadamente ou pela associação de ambos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos machos Wistar de 2 meses de idade foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais: não-treinado + veículo (NTV), treinado + veículo (TV), não-treinado + nandrolona (NTN) e treinado + nandrolona (TN) (n = 6-10 /grupo). A dose de nandrolona utilizada foi de 5mg/Kg (Organon – EUA), administrada via intramuscular, duas vezes por semana, durante 6 semanas consecutivas. Já os grupos controle (veículo) receberam injeção de propilenoglicol (0,2 mL/Kg). O peso corporal dos animais foi avaliado duas vezes por semana, durante todo o período experimental.

Os animais foram mantidos no Biotério da Disciplina de Nefrologia, Departamento de Medicina da Escola Paulista de Medicina (Universidade Federal de São Paulo), alojados em gaiolas coletivas com 4 animais no máximo, em temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), e com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 6:00 h). Além disso, tiveram água e ração própria para roedores (Moinho Primor®) disponíveis à vontade. Todos os procedimentos utilizados neste experimento foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNIFESP (# 4462310114).

3.2 Protocolo de treinamento

Após um período de adaptação de 1 semana, os animais dos grupos Treinados (TV e TN) realizaram saltos em um cilindro contendo água, com uma sobrecarga acoplada ao tórax através de um colete, com 30 segundos de intervalo de descanso entre cada série (Figura 4). Este modelo de treinamento resistido (TR) tem sido utilizado por nosso grupo de pesquisa e já foi descrito anteriormente por Cunha *et al* [47]. O TR consistiu em 30 sessões de saltos, 5 dias por semana, durante 5 semanas. Em cada sessão foram realizados 4 conjuntos de 10 saltos com sobrecarga de peso progressiva (na primeira e segunda semanas, 50%, na terceira e quarta, 60% e na quinta, 70% do peso corporal do animal) (Tabela 1, Figura 5). Após cada sessão de treinamento, os animais foram secos com toalha absorvente, mantidos por cerca de 30 minutos no laboratório, e em seguida foram transportados ao biotério de experimentação. A figura 4 traz um esquema ilustrativo do protocolo de treinamento e a figura 5 traz um esquema ilustrativo do treinamento.

Tabela 1: Protocolo de treinamento físico resistido.

Dia de treinamento	Treinamento	Sobrecarga (% Peso corporal)
1º	2 séries de 5 saltos	50
2º	3 séries de 5 saltos	50
3º	4 séries de 5 saltos	50
4º	4 séries de 7 saltos	50
5º	4 séries de 9 saltos	50
6º ao 15º	4 séries de 10 saltos	50
16º ao 25º	4 séries de 10 saltos	60
26º ao 30º	4 séries de 10 saltos	70

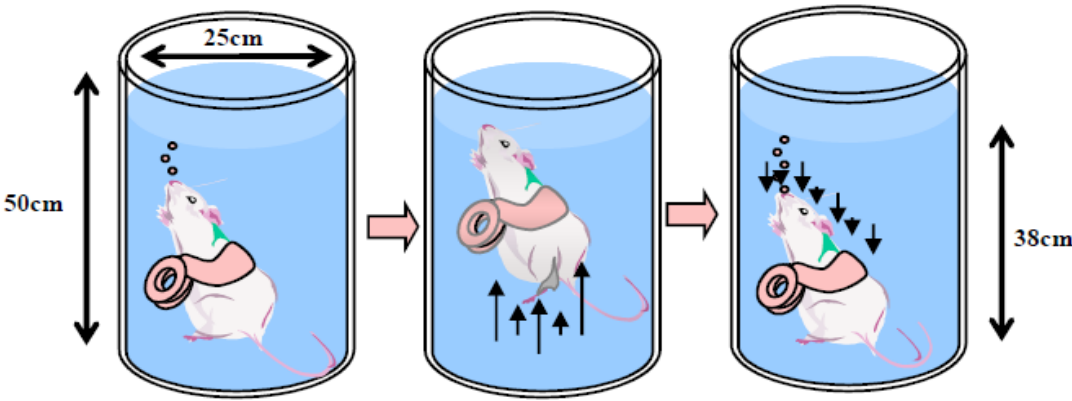


Figura 4. Ilustração esquemática do método de treinamento (adaptado de Tanno et al [48]).

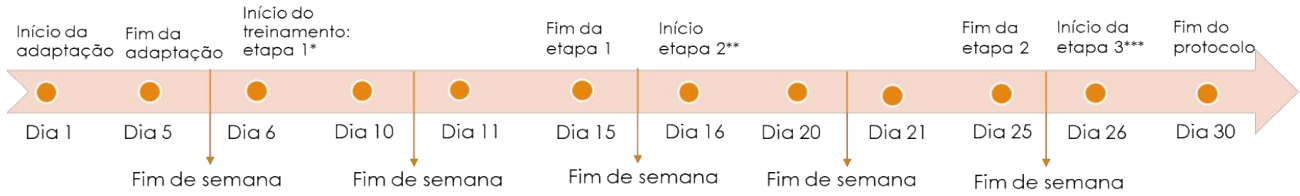


Figura 5. Representação temporal do protocolo experimental, demonstrando o protocolo as etapas do protocolo de treinamento a que os animais foram submetidos.

3.3 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca

Ao final do período experimental, a pressão arterial e a frequência cardíaca foram avaliadas nos animais, mantidos acordados, usando um sistema de manguito de cauda (BP-2000, Sistema de Análise de Pressão SangueTM/Sistema de Visitach). Os animais (n=10/grupo) foram levados para uma sala com isolamento acústico e mantidos por 30 minutos para adaptação. Os ratos permaneceram por 5 minutos em uma plataforma aquecida a 36 °C com a cauda conectada ao aparelho antes de iniciar as medidas. Após 5 minutos de adaptação do animal ao dispositivo, foram coletados os dados de pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca. A cada troca de animais, o aparelho foi devidamente sanitizado para evitar interferências na análise subsequente. As medidas foram realizadas uma vez por semana entre as 8h às 12h.

3.4 Coleta de tecidos e preparação de amostras

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, os animais foram mortos por decapitação e o coração foi isolado e pesado para determinar a hipertrofia cardíaca (peso total do coração/peso corporal final). O ventrículo esquerdo foi dissecado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido e depois armazenado a -80°C.

Para a preparação da amostra, o ventrículo esquerdo foi pesado (200 mg), homogeneizado (Polytron, Kinematic Inc - EUA) em 5 mL de tampão de lise (Tris 40 mM, CHAPS 2%, 500 µL de solução de inibidor de protease, pH = 7,6) e o material foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Em seguida, 100 µL do homogenato foram dialisados utilizando um filtro Amicon (3kDa) com água ultrapura a 2000 rpm e 4°C. A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o método de Bradford [49].

3.5 Protocolo de digestão trípica

A análise proteômica foi realizada conforme previamente descrito por Dantas et al [28]. Resumidamente, as amostras (n=6/grupo) foram agrupadas em uma única amostra representativa do grupo e normalizadas de acordo com a concentração proteica, obtendo-se o equivalente a 50 µg de proteína final. Em seguida, foram completamente secas utilizando-se um evaporador até a obtenção de um precipitado, que foi ressuspenso em 60 µL de uma solução de bicarbonato de amônio a 50 mM. Adicionou-se uma solução de RapiGest SF de 0,2% (Waters - EUA) para desnaturar as proteínas e realizada a incubação a 80°C durante 15 minutos, seguida por uma redução com ditiotretol 100 mM durante 30 minutos a 60°C e por uma alquilação com iodoacetamida 300 mM à

temperatura ambiente por 30 minutos. Depois disso, as amostras foram incubadas durante a noite com tripsina a 37°C. Após a hidrólise, as amostras receberam 10 µL de uma solução de ácido trifluoroacético a 5% e foram novamente incubadas a 37°C durante 90 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14 000 rpm a 6°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para *vials* Waters Total Recovery (Waters - EUA) e adicionou-se o padrão interno (50 µL de enolase 100 fmol/µL) para permitir a quantificação absoluta de proteínas. Por fim, foram adicionados 40 µL de acetonitrila a 3% e 0,1% de FA, obtendo uma solução com volume final de 200 µL, sendo a concentração final de proteínas de 250 ng/µL e do padrão interno de 25 fmol/µL.

3.6 Análise de dados em equipamento do tipo nano UPLC- MSE

Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi injetada no sistema cromatográfico nanoAcquity acoplado ao espectrômetro de massas Synapt MS equipado com uma fonte de ionização de pulverizador nanolocks que operava em modo positivo (nanoESI-MS, Waters-USA). Os peptídeos foram concentrados e dessalinizados em coluna Acquity UPLC PST C18 (5 µm, 180 µm x 20mm) e depois fracionados por uma coluna HSS T3 (1.8 µm, 75 µm x 100mm) (Waters - EUA) utilizando-se um gradiente de 2 a 35% de acetonitrila e uma solução de ácido fórmico a 0,1%, seguindo um fluxo de 500 nL/min. As definições por espectrometria de massas foram realizadas no modo "V" com potência de resolução de pelo menos 10000 FWHM (largura à meia altura). A calibração foi realizada com uma solução de GFP (Human [Glu1] -fibrinopeptide B a 200 fmol/mL). Todas as aquisições foram realizadas no modo MSE consistindo em espectros alternados de energia de colisão baixa (3eV) e alta (15-50eV), aplicada ao módulo de *trap* do *T-wave*. O tempo de varredura da pesquisa de MS foi de 0,6 segundos em cada modo. A frequência aplicada ao analisador de massa quadrupolar foi ajustada de modo que os íons de m/z 50 a 2000 fossem transmitidos de forma eficiente, garantindo que qualquer íon inferior a m/z 300 fossem oriundos exclusivamente de dissociações na célula de colisão. Todas as medidas de varredura alternadas foram realizadas em repetições.

Os espectros de proteínas foram processados e identificados utilizando-se o software ProteinLynx Global Server v.2.4 (PLGs). A identificação e a quantificação das proteínas foram geradas através de algoritmos dedicados e a pesquisa foi realizada em uma base de dados específica da espécie pela biblioteca *UniProtKB/Swiss-Prot Release* com os seguintes parâmetros: taxonomia *Rattus norvegicus* (ID 10116), número máximo de clivagens perdidas igual a 1, modificação fixa da cisteína por carbamidometilação, modificações variáveis por acetilação no N-terminal e oxidação da metionina. Os bancos

proteômicos foram randomizados *on the fly* e a taxa de 4% foi estabelecida para a identificação de falsos positivos. Repetições técnicas de cada grupo foram realizadas, considerando-se para as posteriores análises apenas as proteínas identificadas e quantificadas em pelo menos três das cinco corridas, além de terem sido marcadas como aceitas pelo ProteinLynx, de terem pelo menos 2 peptídeos identificados e mínimo de 5 fragmentos por proteína. A figura 6 demonstra um exemplo de identificação e aceitação das proteínas pelo ProteinLynx.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1	protein.k	protein.Er	protein.Access	protein.Descrip	protein.d	protein.sc	protein	protein.avgM	protein.M	protein.m	protein.di	protein.se	protein.M	protein.tc	protein.M	protein.fmo	protein.ngra	protein.AutoCurate
41	5562	Q68FY0	QCR1_RAT	Cytochrome b c Regular	3.827.839	0.00		535.331.797	10	3	37	10.42	19283	26253	6789	280.517	15.017	Green
42	1485	P00406	COX2_RAT	Cytochrome c c Regular	3.810.050	0.00		261.134.837	9	1	11	4.41	14134	42402	3347	453.071	11.831	Green
43	3052	P20059	HEMO_RAT	Hemopexin OS Regular	3.478.656	0.00		520.923.509	21	7	36	26.96	61544	43299	16371	462.655	24.101	Green
44	2271	Q68FU3	ETFB_RAT	Electron transfr Regular	3.392.417	0.00		279.155.720	7	2	17	12.94	17123	34056	3186	363.893	10.158	Green
45	1	P00924	ENO1_YEAST	Enolase 1 OS Ss Regular	2.381.082	0.00		468.732.187	17	5	28	17.16	34391	23397	8990	250.000	11.718	Yellow
46	1289	Q8VHF5	CISY_RAT	Citrate synthas Regular	2.218.675	0.00		522.090.392	14	3	33	7.94	17075	15267	7042	163.130	0.8517	Yellow
47	4800	Q01205	ODO2_RAT	Dihydrolipoylly Regular	1.706.247	0.00		492.676.304	13	4	33	8.81	18705	15708	6962	167.842	0.8269	Yellow
48	637	P35435	ATPG_RAT	ATP synthase si Regular	1.554.060	0.00		302.477.976	10	3	20	6.59	14984	15310.5	6745	163.595	0.4948	Yellow
49	5114	P16617	PGK1_RAT	Phosphoglyceri Regular	1.514.804	0.00		449.377.525	19	3	32	11.99	63744	51022.5	18052	545.182	24.499	Yellow
50	3163	P63018	HSP7C_RAT	Heat shock cogi Regular	1.045.035	0.00		710.992.839	12	5	50	6.81	22568	20789	6134	222.133	15.794	Yellow
51	54	P14046	A113_RAT	Alpha 1 inhibiti Regular	913.078	0.00		1.651.422.097	17	6	93	3.79	22692	14239	7179	152.146	25.126	Yellow
52	587	P11507	AT2A2_RAT	Sarcoplasmic ei Regular	499.710	0.00		1.164.220.034	18	6	72	6.42	46375	30675	10635	327.766	38.159	Yellow
53	12050	RANDOM	RANDOM4282	Random Seque Random	54.107	1.92		1.165.538.679	5	2	82	2.04	73620	2316	25360	24.747	0.2884	Red

Figura 6. Exemplo de tabela de saída do ProteinLynx quanto à identificação das proteínas. Note que na coluna R há o parâmetro protein.AutoCurate e descritores como “green”, “yellow” e “red”. Estes descritores dizem respeito aos parâmetros de identificação dos espectros. Quando a proteína se encaixa nos parâmetros, ela recebe uma etiqueta de “green” e apenas estas são consideradas para as posteriores análises.

3.7 Análise estatística

A quantificação de proteínas foi baseada na medição de intensidade de picos de íons peptídicos e os resultados foram gerados com a massa exata no tempo de retenção, contendo todas as informações da proteína e seus valores de quantificação pelo software Expression Plus. Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para determinar a existência do efeito da droga e do exercício, foram realizadas análises de variância de duas vias (ANOVA), seguidas do teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas em $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Índice de hipertrofia cardíaca e pressão arterial

Os resultados de peso corporal, hipertrofia cardíaca e pressão arterial estão apresentados na tabela 2. O peso corporal foi semelhante entre os grupos experimentais, no início do período experimental. Os ratos treinados apresentaram menor peso corporal após 6 semanas de treinamento quando comparados com grupos não-treinados (TV vs. NTV, TN vs. NTN). Além disso, o peso corporal final dos animais treinados e tratados com nandrolona foi reduzido em comparação com o grupo TV (TN vs. TV).

O peso do coração dos animais dos grupos TV, NTN e TN foi menor do que dos animais NTV ($p < 0,05$). Com relação ao índice de hipertrofia cardíaca, observa-se que os animais do grupo TN apresentaram valores significativamente superiores em comparação aos demais ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística com relação aos valores de pressão arterial sistólica (PAS) entre os grupos experimentais. Por outro lado, a pressão arterial diastólica (PAD), a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram significativamente menores no grupo TV em relação ao grupo NTV. Os ratos TN apresentaram FC mais baixa do que os registrados nos grupos NTV e NTN.

Tabela 2 - Parâmetros do peso corporal inicial e final (PC), peso do coração (PCor), índice de hipertrofia cardíaca (IHC), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

	NTV	TV	NTN	TN
PC Inicial (g)	248 ± 5	242 ± 4	246 ± 5	253 ± 4
PC Final (g)	381 ± 2	327 ± 5*	345 ± 5*	318 ± 5* ^{&}
PCor (mg)	1147 ± 14	1052 ± 11*	1054 ± 9*	1057 ± 17*
IHC (mg/g)	2,92 ± 0,03	3,17 ± 0,04*	3,06 ± 0,02*	3,32 ± 0,03* ^{#&}
PAS (mmHg)	153 ± 2	146 ± 3	155 ± 2	149 ± 1
PAD (mmHg)	114 ± 2	101 ± 5*	117 ± 3	112 ± 3
PAM (mmHg)	127 ± 2	117 ± 2*	132 ± 1	125 ± 2
FC (batimentos/min)	391 ± 6	363 ± 4*	386 ± 4	356 ± 2* ^{&}

Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. NTV: não treinado + veículo, TV: treinado + veículo, NTN: não treinado + nandrolona e TN: treinado + nandrolona. ANOVA de duas vias + teste Tukey pós-hoc. n = 6 / grupo; * $p < 0,05$ vs. NTV; # $p < 0,05$ vs. TV e & $p < 0,05$ vs. NTN.

4.2 Proteínas

A figura 7 mostra as análises qualitativas e quantitativas das proteínas identificadas nos ventrículos esquerdos (VE) dos animais em cada grupo experimental.

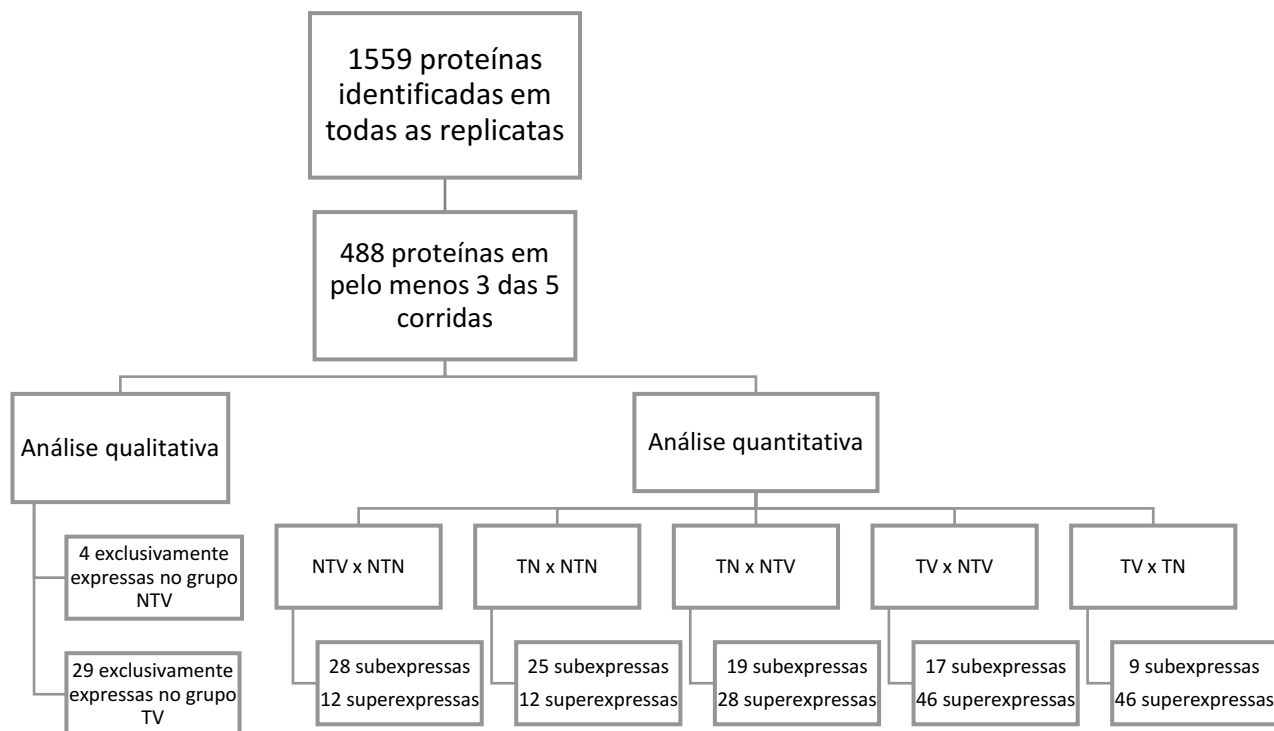


Figura 7. Proteínas identificadas e quantificadas em todos os grupos experimentais. Em relação à análise qualitativa dos grupos NTN e TN, não foram identificadas proteínas significativas.

As proteínas foram identificadas pela base de dados UniProtKB e confirmadas pelo Swiss-Prot, em <http://www.uniprot.org/uniprot/>. O número inicial de 1559 proteínas diz respeito a todas as proteínas identificadas, independente das replicatas. Uma vez confirmadas, todas as proteínas passam por uma análise detalhada e aquelas presentes em mais de 1 replicata são agrupadas de acordo com o grupo, chegando ao valor de 488. Destas, foram excluídas aquelas que não foram aceitas pelo software ProteinLynx (conforme demonstrado na figura 6), assim como aquelas que não tinham pelo menos 2 peptídeos identificados e confirmados e no mínimo 5 fragmentos por proteína, chegando às proteínas de interesse de cada grupo.

Algumas proteínas expressas exclusivamente no VE do grupo TV, foram: HSP20 (*heat shock protein* 20 kDa), α cristalina de cadeia β e transportador de potássio ATPase dependente. Não foi detectada expressão dessas proteínas nos dois grupos tratados com nandrolona (TN e NTN).

As proteínas identificadas no VE foram classificadas com base no *Gene Ontology* de acordo com o processo biológico e o compartimento celular:

- Figura 8 - proteínas expressas exclusivamente nos grupos NTV e TV;
- Figura 10 - proteínas expressas em NTV vs. NTN;
- Figura 13 - proteínas expressas em TV vs. TN;
- Figura 16 - proteínas expressas em TN vs. NTN.

Observamos a expressão equivalente (25%) de uma gama de proteínas no tecido relacionadas à glicólise, inflamação, proteínas estruturais e conformação protéica no grupo NTV (figura 8A). Considerando os compartimentos celulares, encontramos 17%, 50% e 33% de proteínas na fração nuclear, citoplasma e circulação sanguínea, respectivamente (figura 8B). Em resposta ao TR, observamos que 27% das proteínas estão relacionadas à cadeia respiratória, 14% relacionadas à glicólise e ao metabolismo dos ácidos graxos e 10% relacionadas ao ciclo de Krebs (figura 8C). De acordo com os compartimentos celulares, observamos 43% das proteínas na fração mitocondrial, enquanto 16% delas foram encontradas no citoplasma e nas frações da membrana (figura 8D).

Na tabela 3 apresentamos as proteínas expressas exclusivamente no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos NTV e TV, uma vez que os grupos NTN e TN não apresentaram proteínas exclusivas. Além disso, com o objetivo de identificar possíveis interações entre as proteínas identificadas exclusivamente no grupo Treinado, utilizamos o banco de dados STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, v.10.5 - disponível em <http://string-db.org>), que demonstra as interações e os tipos de ação entre as proteínas, conforme ilustrado na figura 9.

Tabela 3. Termo de acesso na base UniProt e descrição das proteínas identificadas através de UPLC-MSE, expressas exclusivamente no ventrículo esquerdo de ratos não treinados + veículo (NTV) e treinados + veículo (TV), após 6 semanas de treinamento resistido de alta intensidade.

Não-treinado + veículo

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
1. GLICÓLISE			
G6PI_RAT	Glicose 6 fosfato isomerase	62998.21	9
2. CONFORMAÇÃO PROTEICA			
PPIA_RAT	Peptidil prolil cis trans isomerase A	18102.47	3
3. ESTRUTURAL			
ACTA_RAT	Actina aórtica de músculo liso	42408.26	12
4. RESPOSTA INFLAMATÓRIA			
FETUA_RAT	Alfa 2 HS glicoproteína	38780.75	4

Treinado + veículo

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
1. GLICÓLISE			
KPYM_RAT	Piruvato quinase isoenzimas M1 M2	58331.18	7
ODPA_RAT	Piruvato desidrogenase subunidade E1	43911.01	4
PGM1_RAT	Fosfoglicomutase 1	61688.38	8
ODPB_RAT	Piruvato desidrogenase subunidade E1	39324.39	5

2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS

ACSL1_RAT	CoA ligase 1 de ácidos graxos de cadeia longa	79205.32	10
ECHB_RAT	Enzima tri funcional subunidade beta mitocondrial	51699.74	7
ECHA_RAT	Enzima tri funcional subunidade alpha mitocondrial	83349.36	11
THIM_RAT	3 cetoacil CoA tiolase mitocondrial	42270.19	6

3. CADEIA RESPIRATÓRIA

DLDH_RAT	Diidrolipoil desidrogenase mitocondrial	54608.44	4
NDUV2_RAT	NADH desidrogenase flavoproteína ubiquinona	27720.55	5
ATPG_RAT	ATP sintase subunidade gama mitocondrial	30247.80	5
NDUAA_RAT	NADH desidrogenase ubiquinona subunidade 1 alfa	40778.28	3
AT5F1_RAT	ATP sintase subunidade b mitocondrial	28982.91	6
ATP5H_RAT	ATP sintase subunidade d mitocondrial	18820.50	4
ETFA_RAT	Flavoproteína transferidora de elétron subunidade alfa	35293.56	5
KCRB_RAT	Creatina quinase tipo B	43010.49	8

4. CICLO DE KREBS

DHSA_RAT	Succinato desidrogenase flavoproteína ubiquinona	72641.82	6
THIL_RAT	Acetil CoA acetiltransferase mitocondrial	45037.27	6
ODO1_RAT	2 oxoglutarato desidrogenase mitocondrial	117493.53	8

5. HEAT SHOCKS

CH60_RAT	Proteína <i>heat shock</i> de 60 kDa mitocondrial	61126.70	8
GRP78_RAT	Proteína <i>heat shock</i> de 78 kDa reguladora de glicose	72518.16	7
HSPB6_RAT	Proteína <i>heat shock</i> beta 6 (HSP20)	17561.97	3
CRYAB_RAT	Alfa cristalina de cadeia beta	20088.86	4

6. ANTIOXIDANTE

THIO_RAT	Tiorredoxina	12015.66	3
----------	--------------	----------	---

7. TRANSPORTE

AT12A_RAT	Transportador de potássio ATPase cadeia alfa (KATP)	115716.41	2
MPCP_RAT	Proteína mitocondrial carreadora de fosfato	39901.42	7
VDAC1_RAT	Canal ânion seletivo voltagem dependente	30869.59	8

8. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

BCAT2_RAT	Aminotransferase de cadeia ramificada	44845.88	5
-----------	---------------------------------------	----------	---

9. RESPOSTA INFLAMATÓRIA

MUG2_RAT	Murinoglobulina 2	162957.96	13
----------	-------------------	-----------	----

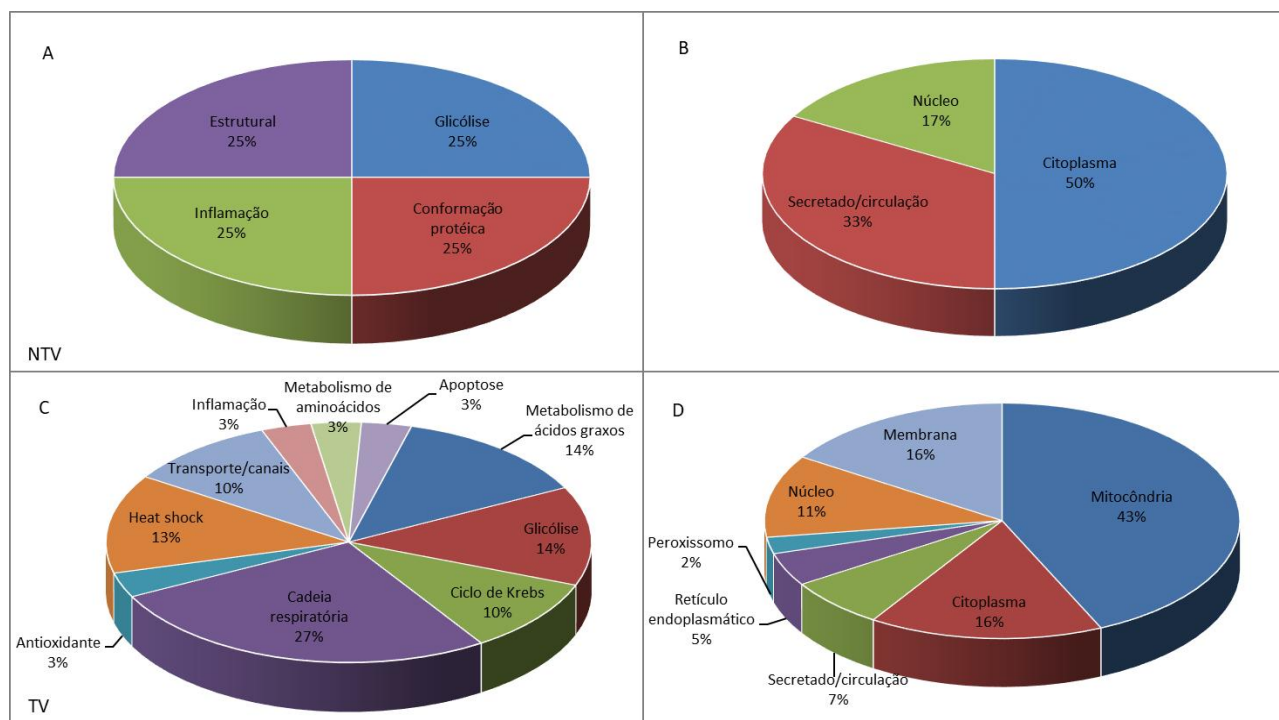


Figura 8. Representação esquemática das proteínas expressas no ventrículo esquerdo do grupo NTV de acordo com processos biológicos (A) e compartimentos celulares (B). Proteínas expressas no VE do grupo TV, de acordo com processos biológicos (C) e compartimentos celulares (D). Todas as proteínas foram classificadas com base no *Gene Ontology*.

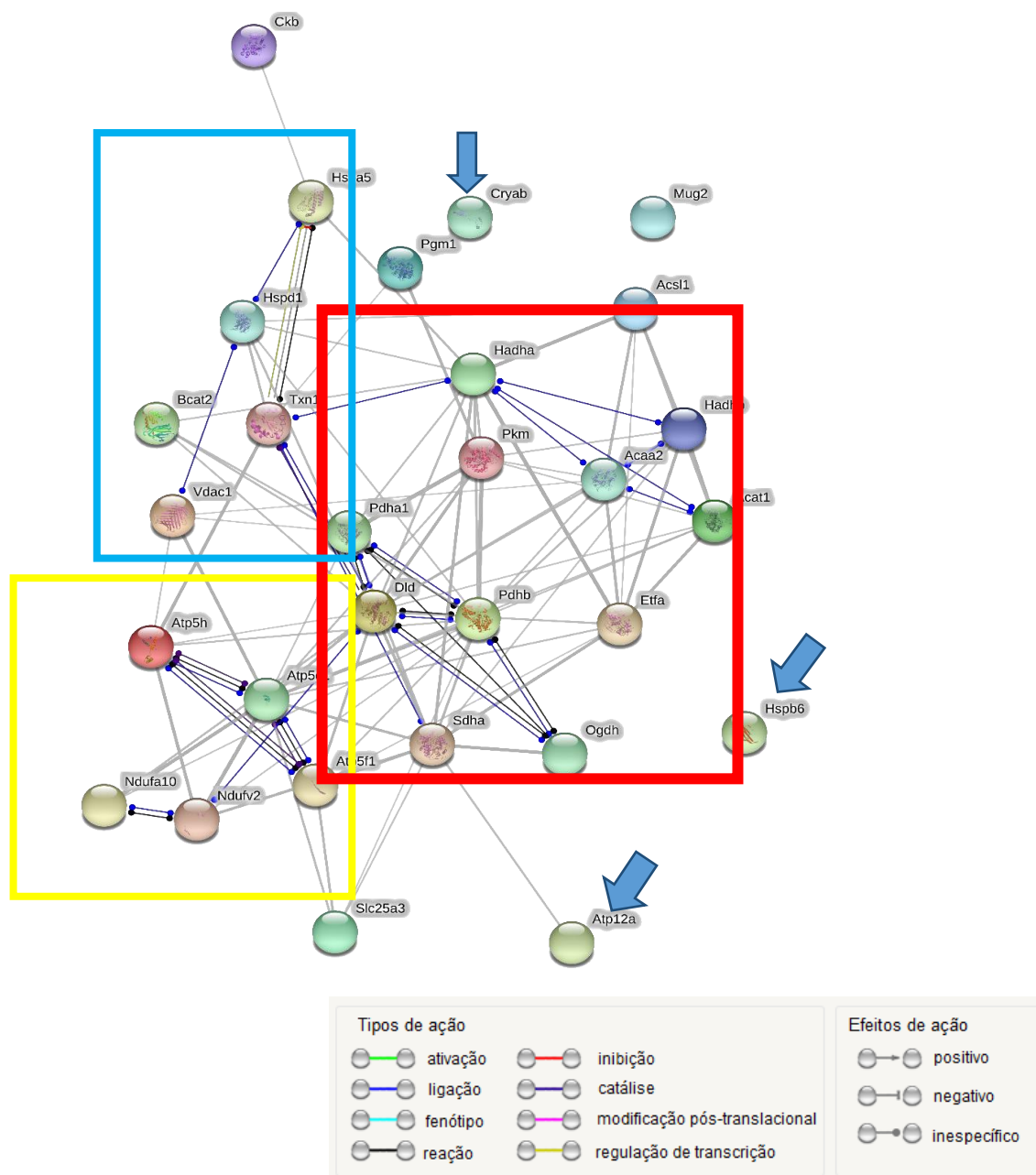


Figura 9. Mapa de interações das proteínas expressas exclusivamente (análise qualitativa) no ventrículo esquerdo dos animais submetidos ao treinamento físico de alta intensidade, de acordo com o banco de dados STRING. Atp5h: ATP sintase subunidade d. Vdac1: canal ânion seletivo voltagem dependente. Dld: diidrolipoil desidrogenase. Pdhb: piruvato desidrogenase. Acat1: acetil CoA acetiltransferase. Slc25a3: proteína carreadora de fosfato. Pgm1: fosfoglicomutase 1. Acs1: CoA ligase de ácidos graxos de cadeia longa. Hadhb: enzima tri funcional de cadeia beta. Ckb: creatina quinase tipo B. Pkm: piruvato quinase isoenzimas M1 e M2. Etfa: flavoproteína transferidora de elétron subunidade alfa. Atp5f1: ATP sintase subunidade B. Ndufa10: NADH desidrogenase. Hspa5: proteína reguladora de 78 kDa. Atp12a: transportador de potássio ATPase dependente. Hspb6: proteína *heat shock* beta 6. Bcat2: aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada. Pdha1: piruvato desidrogenase. Hadha: enzima tri funcional de cadeia alfa. Atp5c1: ATP sintase subunidade gama. Ogdh: 2-oxoglutarato desidrogenase. Cryab: alfa cristalina de cadeia beta. Acaa2: 3-cetoacil-CoA tiolase. Hspd1: proteína *heat shock* de 60 kDa. Mug2: murinoglobulina 2. O bloco destacado em vermelho ressalta as proteínas de metabolismo energético (glicólise e β -oxidação lipídica), o bloco em azul traz algumas das proteínas *heat shocks* e o bloco em amarelo traz as proteínas da cadeia respiratória. As proteínas destacadas pelas setas são proteínas consideradas chave neste grupo. Fonte: <http://string-db.org>.

As comparações entre os grupos não treinados (NTV vs. NTN) estão demonstradas na figura 10. Observamos uma subexpressão de proteínas relacionadas à cadeia respiratória (35%), glicólise (17%), ciclo de Krebs (14%) e metabolismo de ácidos graxos (10%) nos animais NTV (vs. NTN) (figura 10A). As proteínas subexpressas no grupo NTV (vs. NTN) estão localizadas nos seguintes compartimentos: fração mitocondrial (44%), citoplasma (28%) e membrana (14%) (figura 10B). Por outro lado, observamos a subexpressão de proteínas relacionadas ao transporte/canais (31%), antioxidante (15%) e ciclo de Krebs, metabolismo de aminoácidos, ácidos graxos e glicólise (7%) no ventrículo esquerdo dos ratos NTN (vs NTV) (figura 10C). Considerando o compartimento celular, as proteínas da fração do citoplasma (39%), as secretadas/circulantes (22%), as das frações nuclear, de membrana e mitocondrial (8%) tiveram uma superexpressão no VE dos ratos NTV (vs. NTN) (figura 10D). Na tabela 4 apresentamos as proteínas encontradas na comparação entre os grupos NTV vs NTN. Na figura 11 apresentamos o mapa de interações das proteínas subexpressas no grupo NTV comparado ao grupo NTN, e na figura 12 apresentamos o mapa de interações das proteínas superexpressas.

Tabela 4. Termo de acesso na base de dados UniProt e descrição das proteínas identificadas por UPLC-MSE, expressas no ventrículo esquerdo de ratos não treinados + veículo (NTV) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de tratamento. As proteínas foram classificadas de acordo com o processo biológico. Valores acima de 1 ng correspondem às proteínas superexpressas e abaixo disso, subexpressas.

Subexpressas NTV:NTN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. GLICÓLISE				
ODP2_RAT	Diidrolipoil lisina acetiltransferase	67679.19	5	0.710
G3P_RAT	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	36113.20	9	0.555
LDHB_RAT	L lactato desidrogenase de cadeia B	36897.58	11	0.688
ALDOA_RAT	Frutose bisfosfato aldolase A	39808.20	12	0.696
LDHA_RAT	L lactato desidrogenase de cadeia A	36735.70	6	0.715
2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS				
FABP4_RAT	Proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito	14822.06	4	0.725
ACADL_RAT	Acil CoA desidrogenase específica de cadeia longa	48272.14	10	0.632
ECHM_RAT	Enoil CoA hidratase mitocondrial	31915.66	3	0.461
3. CADEIA RESPIRATÓRIA				
ATPB_RAT	ATP sintase subunidade beta mitocondrial	56353.65	21	0.606
KCRS_RAT	Creatina quinase tipo S mitocondrial	47841.56	12	0.788
QCR2_RAT	Citocromo b c1 subunidade 2 mitocondrial	48453.27	4	0.664
ADT1_RAT	ADP ATP translocase 1	33217.59	9	0.488
ATPO_RAT	ATP sintase subunidade O mitocondrial	23454.63	5	0.551
ATPD_RAT	ATP sintase subunidade delta mitocondrial	17595.10	3	0.751
ATPA_RAT	ATP sintase subunidade alfa mitocondrial	59867.78	16	0.497
ETFB_RAT	Flavoproteína transferidora de elétron subunidade beta	27915.57	3	0.511
KCRM_RAT	Creatina quinase tipo M	43273.16	18	0.815
UCRI_RAT	Citocromo b c1 subunidade Rieske mitocondrial	29730.88	5	0.589

4. CICLO DE KREBS

SCOT1_RAT	Succinil CoA 3 cetoácido coenzima A transferase	56660.18	9	0.995
MDHC_RAT	Malato desidrogenase citoplasmática	36654.26	14	0.712
ACON_RAT	Aconitato hidratase mitocondrial	86174.90	21	0.714
IDHP_RAT	Isocitrato desidrogenase NADP mitocondrial	51423.61	12	0.640

5. ANTIOXIDANTE

PRDX5_RAT	Peroxirredoxina 5 mitocondrial	22520.88	7	0.782
-----------	--------------------------------	----------	---	-------

6. TRANSPORTE

AT2A2_RAT	Retículo sarcoplasmático de cálcio (SERCA2)	116422.00	7	0.491
HBB1_RAT	Hemoglobina subunidade beta 1	16093.47	11	0.834
HEMO_RAT	Hemopexina	52092.35	12	0.853

7. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

AATC_RAT	Aspartato aminotransferase citoplasmática	46656.91	20	0.801
----------	---	----------	----	-------

8. METABOLISMO DO GÁS CARBÔNICO

CAH1_RAT	Anidrase carbônica 1	28356.68	8	0.906
----------	----------------------	----------	---	-------

Superexpressas NTV:NTN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. GLICÓLISE				
PGAM2_RAT	Fosfoglicerato mutase 2	28926.18	9	1.039

2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS

FABPH_RAT	Proteína ligadora de ácidos graxos no coração	14774.73	10	1.057
-----------	---	----------	----	-------

3. CICLO DE KREBS

MDHM_RAT	Malato desidrogenase mitocondrial	36139.83	17	1.077
----------	-----------------------------------	----------	----	-------

4. ANTIOXIDANTE

PRDX2_RAT	Peroxirredoxina 2	21954.78	6	1.065
-----------	-------------------	----------	---	-------

5. TRANSPORTE

ALBU_RAT	Albumina sérica	70726.82	47	1.080
----------	-----------------	----------	----	-------

TRFE_RAT	Serotransferrina	78562.28	31	1.194
----------	------------------	----------	----	-------

HBA_RAT	Hemoglobina subunidade alfa 1 2	15499.63	8	1.022
---------	---------------------------------	----------	---	-------

MYG_RAT	Mioglobina	17213.87	12	1.067
---------	------------	----------	----	-------

6. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

AATM_RAT	Aspartato aminotransferase mitocondrial	47713.56	16	1.039
----------	---	----------	----	-------

7. METABOLISMO DO GÁS CARBÔNICO

CAH2_RAT	Anidrase carbônica 2	29284.93	6	1.296
----------	----------------------	----------	---	-------

8. INFLAMAÇÃO

PEBP1_RAT	Proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1	20915.47	7	1.034
-----------	--	----------	---	-------

9. TRADUÇÃO

RL40_RAT	Proteína ubiquitina 60S ribossomal L40	15013.47	5	1.117
----------	--	----------	---	-------

Exclusivas nesta comparação NTN:NTV

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
1. GLICÓLISE			
PYGM_RAT	Glicogênio fosforilase isoforma muscular	97786.86	6
2. CADEIA RESPIRATÓRIA			
COX2_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 2	26113.48	3
QCR1_RAT	Citocromo b c1 subunidade 1 mitocondrial	53533.18	6

Exclusivas nesta comparação NTV:NTN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
1. GLICÓLISE			
PGK1_RAT	Fosfoglicerato quinase 1	44937.75	6
2. CADEIA RESPIRATÓRIA			
CYC_RAT	Citocromo c somático	11719.52	4
ATP5J_RAT	ATP sintase fator acoplador 6 mitocondrial	12494.45	3
COX41_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 4 isoforma 1	19571.63	2
COX5A_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 5A mitocondrial	16357.66	5
3. CICLO DE KREBS			
ODO2_RAT	Dihidrolipoil lisina succiniltransferase	49267.63	3
4. HEAT SHOCKS			
GRP75_RAT	Proteína <i>heat shock</i> 70 mitocondrial	74142.98	9
HSP7C_RAT	Proteína <i>heat shock</i> cognato 71 kDa	71099.28	10

5. ANTIOXIDANTE

GSTM2_RAT	Glutathione S transferase Mu 2	25873.77	4
PARK7_RAT	Proteína DJ 1	20202.33	3
PRDX6_RAT	Peroxirredoxina 6	24875.6585	7

6. ESTRUTURAL

MYL3_RAT	Miosina de cadeia leve 3	22270.31	3
VINC_RAT	Vinculina	117185.81	9
PROF1_RAT	Profilina 1	15128.34	3

7. INFLAMAÇÃO

LEG1_RAT	Galectina 1	15199.03	2
----------	-------------	----------	---

8. METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEO

NDKB_RAT	Nucleosídeo difosfato quinase B	17397.07	7
----------	---------------------------------	----------	---

9. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

SPRE_RAT	Sepiapterina redutase	28527.57	2
----------	-----------------------	----------	---

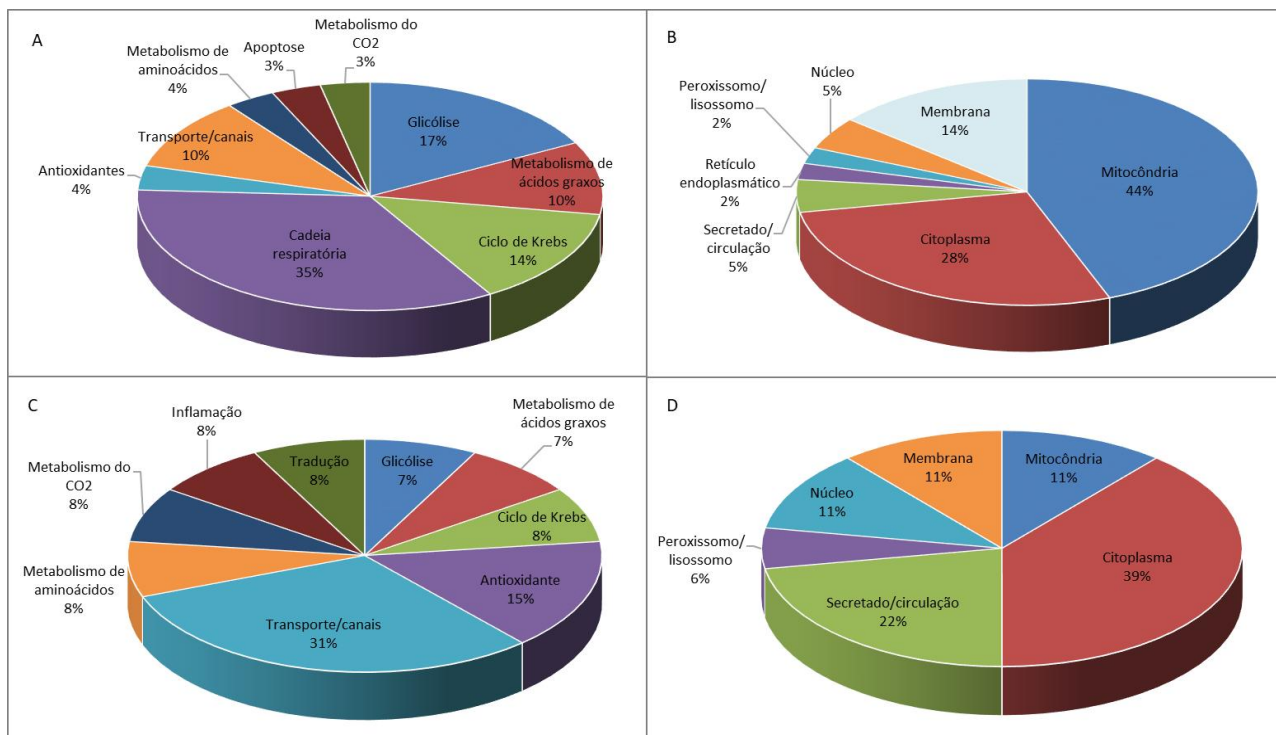


Figura 10. Representação esquemática das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo dos ratos NTV em comparação ao NTN, de acordo com os processos biológicos (A) e compartimentos celulares (B), e proteínas superexpressas de acordo com processos biológicos (C) e compartimentos celulares (D). Todas as proteínas foram classificadas com base no *Gene Ontology*.

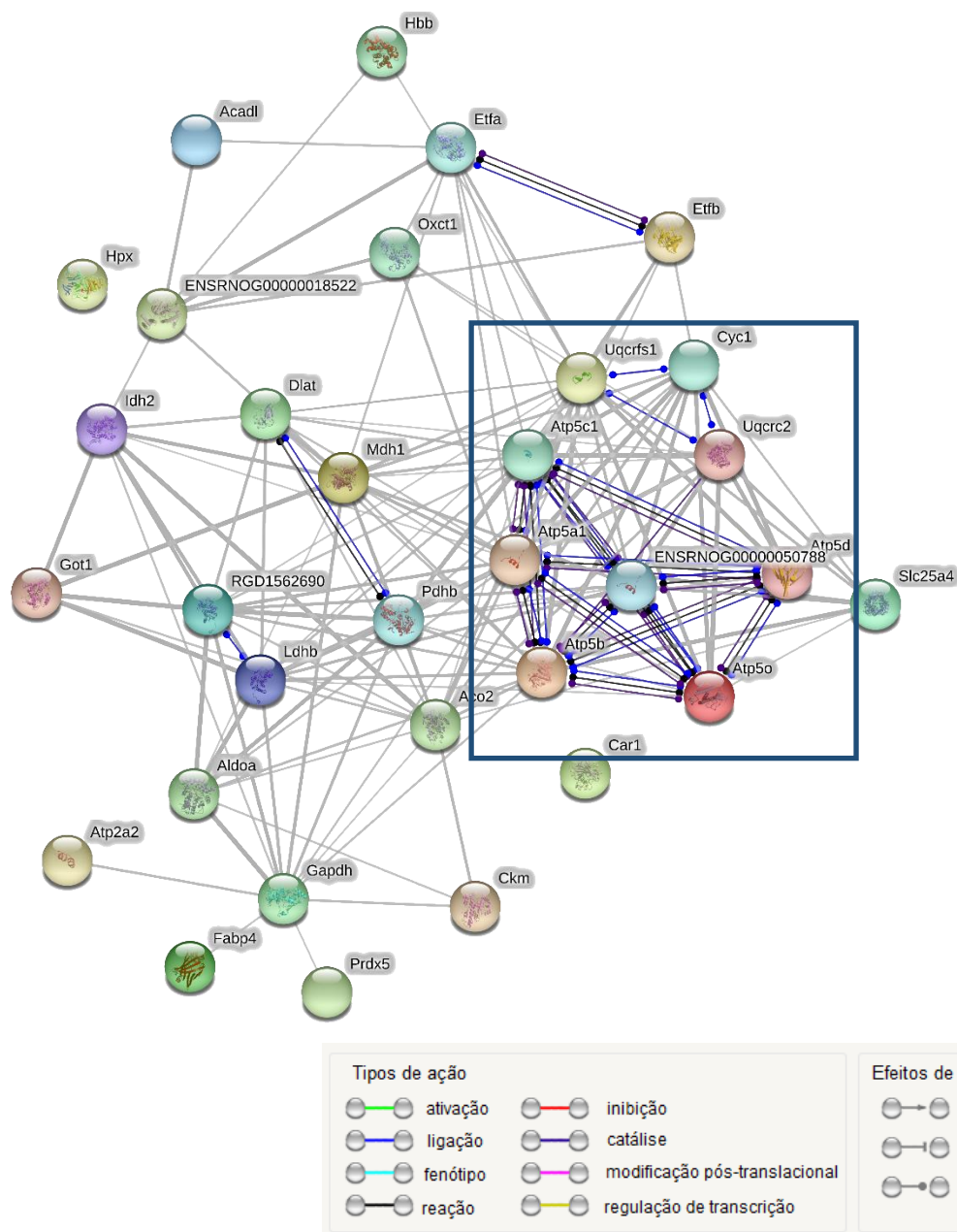


Figura 11. Mapa de interações das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo de ratos não treinados + veículo (NTV) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de tratamento, de acordo com o banco de dados STRING. Atp5o: ATP sintase subunidade O. Atp5b: ATP sintase subunidade beta. Mdh1: malato desidrogenase citoplasmática. Car1: anidrase carbônica. Fabp4: proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito. Slc25a4: ADP/ATP translocase. RGD1562690: lactato desidrogenase cadeia A. Acadl: acil CoA desidrogenase específica de cadeia longa. Ldhd: lactato desidrogenase cadeia B. Idh2: isocitrato desidrogenase mitocondrial. Atp5d: ATP sintase subunidade delta. Got1: aspartato aminotransferase. Atp5a1: ATP sintase subunidade alfa. Ckm: creatina quinase tipo M. Etfb: flavoproteína transferidora de elétron subunidade beta. Atp2a2: retículo sarcoplasmático de cálcio ATPase. Uqcrcs1: citocromo b c1 subunidade Rieske. Hpx: hemopexina. ENSRNOG00000018522: enoil- CoA hidratase. Prdx5: Peroxirredoxina 5. Aco2: aconitato hidratase. Aldoa: frutose bisfosfato aldolase A. Dlat: diidrolipoil lisina acetiltransferase. Gapdh: gliceraldeído 3 fosfato. Hbb: hemoglobina subunidade beta. Oxct1: succinil-CoA cetoácido coenzima A transferase. O bloco em azul destaca as proteínas da cadeia respiratória, onde se encontra a maior interação. Fonte: <http://string-db.org>.

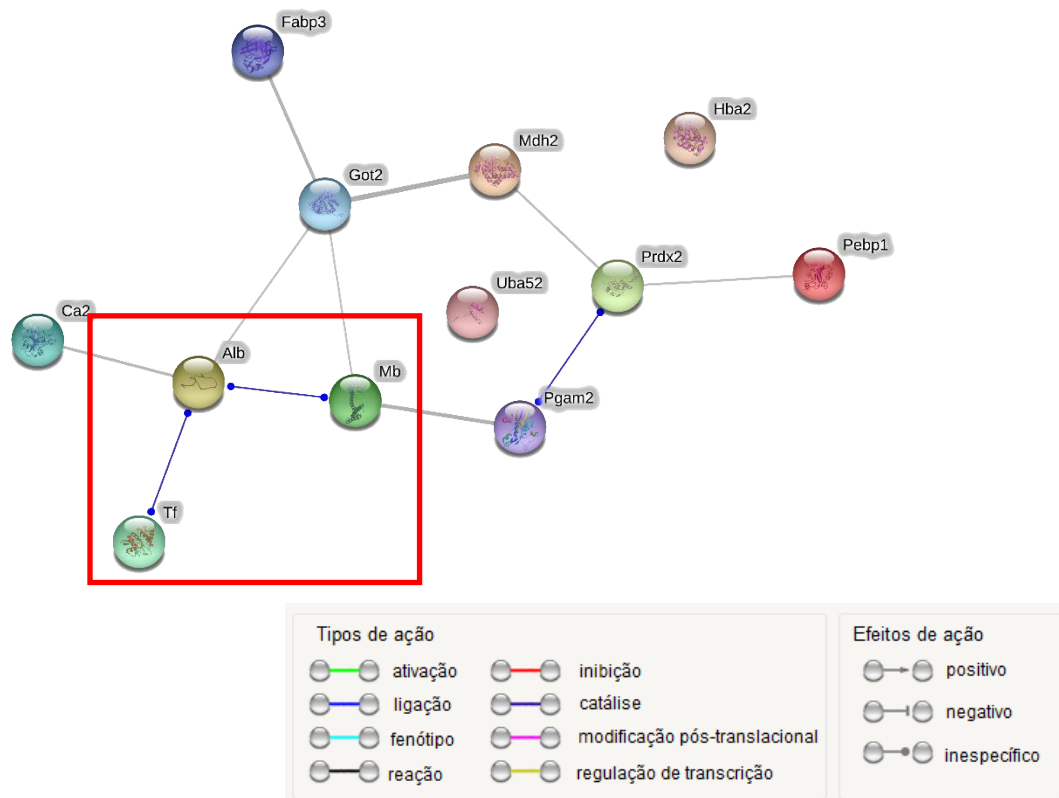


Figura 12. Mapa de interações das proteínas superexpressas no ventrículo esquerdo de ratos não treinados + veículo (NTV) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de tratamento, de acordo com o banco de dados STRING. Pebp1: proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1. Mdh2: malato desidrogenase mitocondrial. Alb: albumina sérica. Prdx2: peroxirredoxina 2. Mb: mioglobina. Tf: serotransferrina. Car2: anidrase carbônica 2. Got2: aspartato aminotransferase. Fabp3: proteína ligadora de ácidos graxos no coração. Pgam2: fosfoglicerato mutase 2. Uba52: proteína ubiquitina 60S ribossomal. Hba2: hemoglobina subunidade alfa. O bloco em vermelho destaca as proteínas transportadoras, onde se encontra a relação mais proeminente da imagem. Fonte: <http://string-db.org>.

Na figura 13, comparamos as proteínas expressas no VE entre os grupos treinados (TV vs. TN). Verificamos a subexpressão das proteínas associadas ao transporte/canais (50%), metabolismo de aminoácidos e proteínas estruturais (17%) além da cadeia respiratória (16%) (figura 13A). De acordo com os compartimentos celulares, observamos 43% das proteínas sendo secretadas/circulantes, enquanto 29%, 14% e 14% foram encontradas nas frações mitocondrial, de membrana e citoplasma, respectivamente (figura 13B). Por outro lado, encontramos uma superexpressão das proteínas relacionadas à cadeia respiratória (25%), glicólise (17%), ciclo de Krebs (10%), antioxidante e transporte/canais (9%) nos ratos do grupo TV (vs TN) (figura 13C). Considerando os compartimentos celulares, observamos 35% das proteínas na fração mitocondrial, enquanto 28% e 13% foram observadas no citoplasma e nas frações de membrana dos animais TV em comparação com os animais TN.

As proteínas no VE do grupo TV (vs. TN) corresponderam a 11% do proteoma relativo ao núcleo e às frações secretadas/circulantes (figura 13D). Na tabela 5 apresentamos as proteínas identificadas na comparação TV vs TN. Na figura 14 apresentamos o mapa de interações das proteínas subexpressas no grupo TV comparado ao grupo TN, e na figura 15 apresentamos o mapa de interações das proteínas superexpressas.

Tabela 5. Termo de acesso à base de dados de UniProt e descrição das proteínas identificadas por UPLC-MSE, expressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + nandrolona (TN) em comparação com ratos treinados + veículo (TV), após 6 semanas de treinamento resistido de alta intensidade e/ou tratamento com nandrolona. As proteínas foram classificadas de acordo com o processo biológico. Valores acima de 1 ng correspondem a proteínas superexpressas e abaixo disso, subexpressas.

Subexpressas TV:TN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS				
FABP4_RAT	Proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito	14822.06	4	0.973
2. CADEIA RESPIRATÓRIA				
ETFB_RAT	Flavoproteína transferidora de elétron subunidade beta	27915.57	3	0.750
ATPD_RAT	ATP sintase subunidade delta mitocondrial	17595.10	3	0.927
COX41_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 4 isoforma 1	19571.63	2	0.972
3. ESTRUTURAL				
ACTC_RAT	Actina alfa de músculo cardíaco 1	42361.25	14	0.922
4. TRANSPORTE				
HBA_RAT	Hemoglobina subunidade alfa 1 2	15499.64	8	0.941
HBB2_RAT	Hemoglobina subunidade beta 2	16096.51	9	0.740
HBB1_RAT	Hemoglobina subunidade beta 1	16093.47	11	0.931
5. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO				
AATM_RAT	Aspartato aminotransferase mitocondrial	47713.56	16	0.915

Superexpressas TV:TN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. GLICÓLISE				
PGAM2_RAT	Fosfoglicerato mutase 2	28926.19	9	1.098
ENOB_RAT	Beta enolase	47356.14	6	1.077
ODP2_RAT	Diidrolipoil lisina acetiltransferase	67679.19	5	1.327
TPIS_RAT	Triosefosfato isomerase	27362.18	10	1.181
G3P_RAT	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	36113.20	9	1.204
ALDR_RAT	Aldose redutase	36253.55	6	1.332
LDHB_RAT	L lactato desidrogenase de cadeia B	36897.58	11	1.123
ALDOA_RAT	Frutose bisfosfato aldolase A	39808.20	12	1.189
LDHA_RAT	L lactato desidrogenase de cadeia A	36735.70	6	1.486
2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS				
ACADL_RAT	Acil CoA desidrogenase específica de cadeia longa	48272.14	10	1.098
ACOT2_RAT	Acil coenzima A tioesterase 2 mitocondrial	49986.38	4	1.442
FABPH_RAT	Proteína ligadora de ácidos graxos no coração	14774.73	10	1.040
3. CADEIA RESPIRATÓRIA				
QCR1_RAT	Citocromo b c1 subunidade 1 mitocondrial	53533.18	6	1.085
ATPB_RAT	ATP sintase subunidade beta mitocondrial	56353.65	21	1.017
KCRS_RAT	Creatina quinase tipo S mitocondrial	47841.56	12	1.056
QCR2_RAT	Citocromo b c1 subunidade 2 mitocondrial	48453.27	4	1.292
ADT1_RAT	ADP ATP translocase 1	33217.59	9	1.444
COX2_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 2	26113.48	3	1.370
ATPA_RAT	ATP sintase subunidade alfa mitocondrial	59867.78	16	1.492
COX5A_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 5A mitocondrial	16357.66	5	1.100
ATP5J_RAT	ATP sintase fator acoplador 6 mitocondrial	12494.45	3	1.049
KCRM_RAT	Creatina quinase tipo M	43273.16	18	1.390

NDUS1_RAT	NADH ubiquinona oxidoreductase subunidade de 75 kDa	80381.96	5	1.316
UCRI_RAT	Citocromo b c1 subunidade Rieske mitocondrial	29730.88	5	1.028
4. CICLO DE KREBS				
MDHC_RAT	Malato desidrogenase citoplasmática	36654.26	14	1.152
ACON_RAT	Aconitato hidratase mitocondrial	86174.90	21	1.075
IDHP_RAT	Isocitrato desidrogenase NADP mitocondrial	51423.61	12	1.552
MDHM_RAT	Malato desidrogenase mitocondrial	36139.83	15	1.181
5. HEAT SHOCKS				
HSP7C_RAT	Proteína <i>heat shock</i> cognato de 71 kDa	71099.28	10	1.115
CH10_RAT	Proteína <i>heat shock</i> de 10 kDa mitocondrial	10901.68	4	1.189
6. ANTIOXIDANTE				
SODC_RAT	Superóxido dismutase Cu Zn	16082.77	7	1.094
PRDX5_RAT	Peroxirredoxina 5 mitocondrial	22520.88	7	1.357
PRDX2_RAT	Peroxirredoxina 2	21954.79	6	1.189
PRDX3_RAT	Tiorredoxina redutase dependente de peróxido	28580.55	7	1.179
7. TRANSPORTE				
ALBU_RAT	Albumina sérica	70726.83	47	1.111
AT2A2_RAT	Retículo sarcoplasmático de cálcio (SERCA2)	116422.00	7	1.296
TRFE_RAT	Serotransferrina	78562.28	31	1.111
MYG_RAT	Mioglobina	17213.88	12	1.529
HEMO_RAT	Hemopexina	52092.35	12	1.064
8. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO				
AATC_RAT	Aspartato aminotransferase citoplasmática	46656.91	20	1.132
9. METABOLISMO DO GÁS CARBÔNICO				
CAH1_RAT	Anidrase carbônica 1	28356.68	8	1.208

10. INFLAMAÇÃO

A1I3_RAT	Alfa 1 inibitor 3	16514.22	6	1.554
LEG1_RAT	Galectina 1	15199.03	2	1.035
PEBP1_RAT	Proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1	20915.47	7	1.240
A1AT_RAT	Alpha 1 antiproteinase	46306.99	5	1.027

11. TRADUÇÃO

RL40_RAT	Proteína ubiquitina 60S ribossomal L40	15013.47	5	1.137
----------	--	----------	---	-------

Exclusivas nesta comparação TV:TN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
1. GLICÓLISE			
PGK1_RAT	Fosfoglicerato quinase 1	44937.75	6
ODPB_RAT	Piruvato desidrogenase subunidade E1	39324.39	7
PGAM1_RAT	Fosfoglicerato mutase 1	28946.09	8
2. CADEIA RESPIRATÓRIA			
CYC_RAT	Citocromo c somático	11719.52	4
ATPO_RAT	ATP sintase subunidade O mitocondrial	23454.63	5
3. CICLO DE KREBS			
CISY_RAT	Citrato sintase mitocondrial	52209.04	5
ODO2_RAT	Diidrolipoil lisina succiniltransferase	49267.63	3
SCOT1_RAT	Succinil CoA 3 cetácido coenzima A transferase	56660.18	9

5. HEAT SHOCKS

GRP75_RAT	Proteína <i>heat shock</i> de 70 kDa mitocondrial	74142.98	9
-----------	---	----------	---

4. ANTIOXIDANTE

PRDX6_RAT	Peroxirredoxina 6	24875.66	7
GSTM2_RAT	Glutathione S transferase Mu 2	25873.77	4
PARK7_RAT	Proteína DJ 1	20202.33	3

5. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

SPRE_RAT	Sepiapterina redutase	28527.57	2
----------	-----------------------	----------	---

6. METABOLISMO DO GÁS CARBÔNICO

CAH2_RAT	Anidrase carbônica 2	29284.93	6
----------	----------------------	----------	---

7. ESTRUTURAL

PROF1_RAT	Profilina 1	15128.34	3
VINC_RAT	Vinculina	11718.58	9

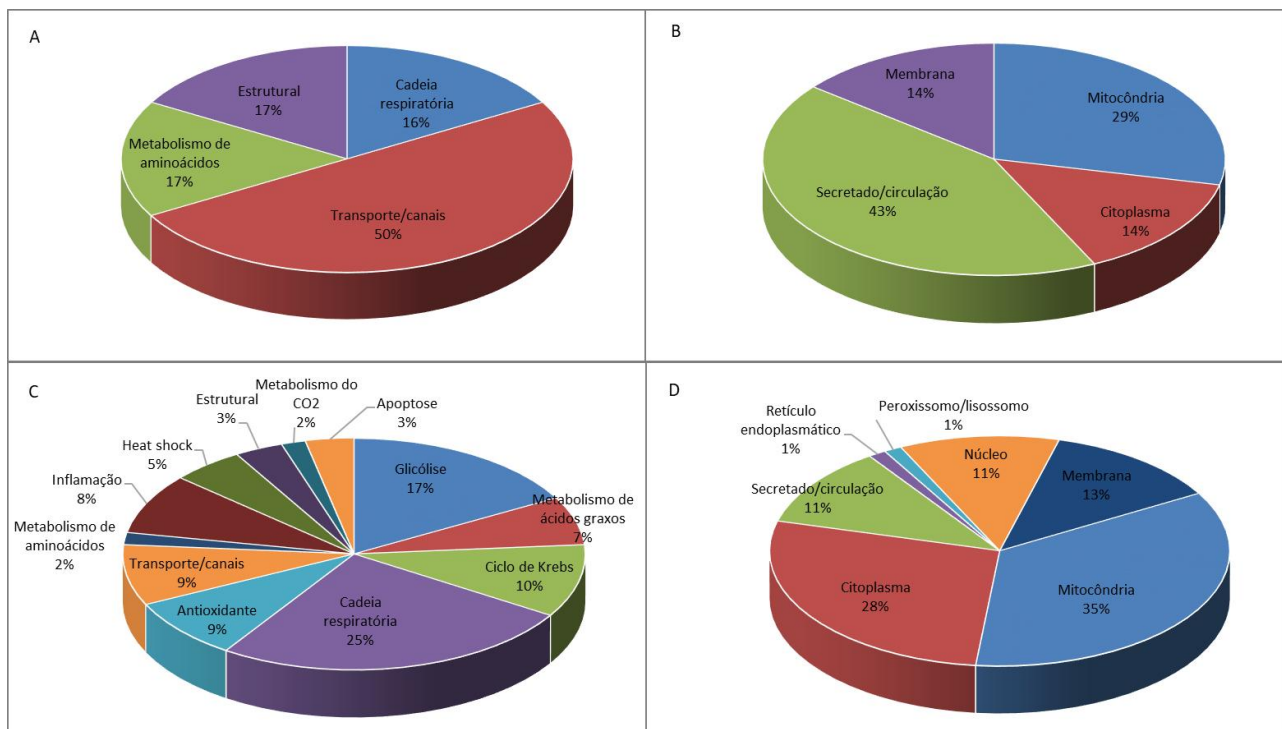


Figura 13. Representação esquemática das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo dos animais TV em comparação com animais TN, de acordo com processos biológicos (A) e compartimentos celulares (B), e proteínas superexpressas de acordo com processos biológicos (C) e compartimentos celulares (D). Todas as proteínas foram classificadas com base no *Gene Ontology*.

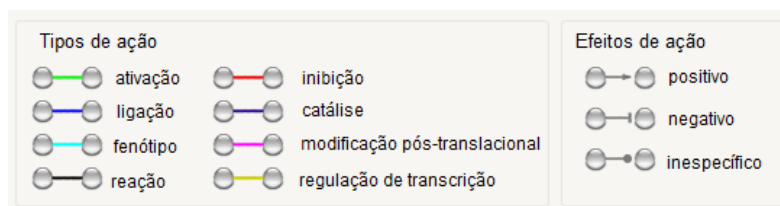
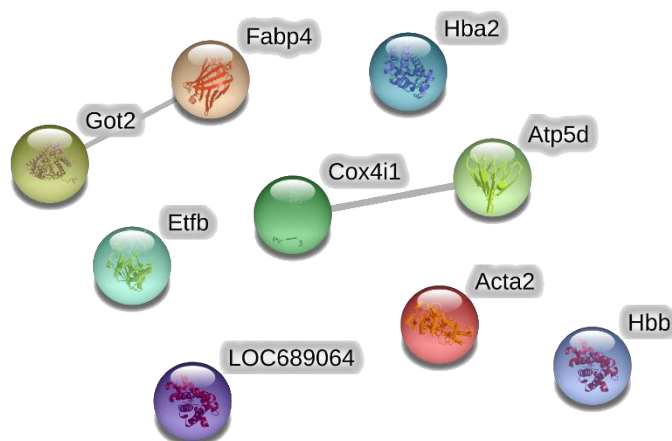


Figura 14. Mapa de interações das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + veículo (TV) em comparação com ratos treinados + nandrolona (TN), após 6 semanas de tratamento e treinamento, de acordo com o banco de dados STRING. Acta: alfa actina de músculo cardíaco. Fabp4: proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito. Got2: aspartato aminotransferase. Atp5d: ATP sintase subunidade delta. Cox4i1: citocromo c oxidase subunidade 4 isoforma 1. Etfb: flavoproteína transferidora de elétron subunidade beta. Hba2: hemoglobina subunidade alfa. Hbb: hemoglobina subunidade beta 1. LOC689064: hemoglobina subunidade beta 2. Fonte: <http://string-db.org>.

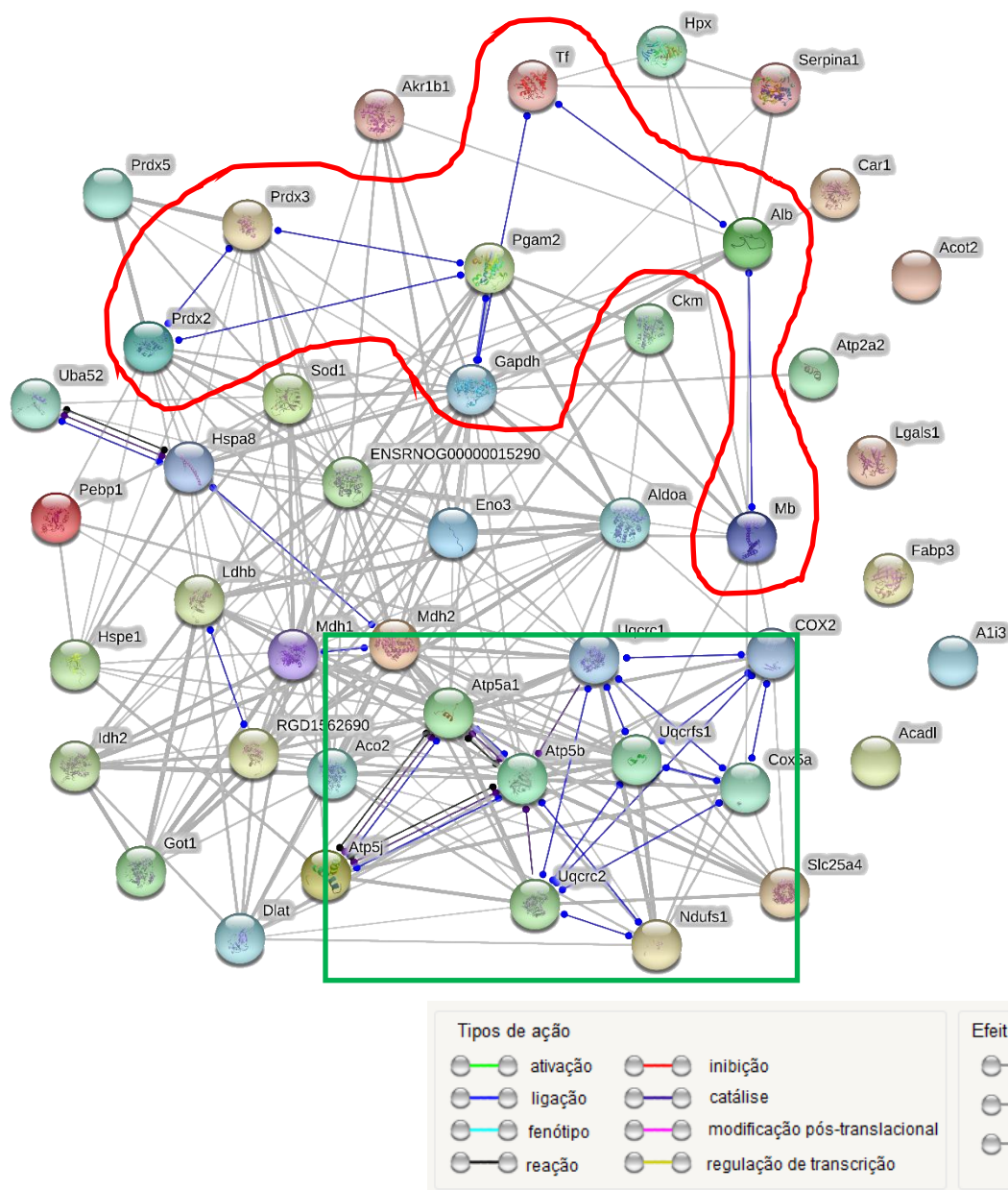


Figura 15. Mapa de interações das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + veículo (TV) em comparação com ratos treinados + nandrolona (TN), após 6 semanas de tratamento e treinamento, de acordo com o banco de dados STRING. Pebp1: proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1. Mdh2: malato desidrogenase mitocondrial. Atp5j: ATP sintase fator acoplador 6. Sod1: superóxido dismutase Cu-Zn. Alb: albumina sérica. Atp5b: ATP sintase subunidade beta. Prdx2: peroxirredoxina 2. Eno3: beta enolase. Mb: mioglobina. Mdh1: malato desidrogenase citoplasmática. Serpina1: alfa 1 antiproteínase. Tf: serotransferrina. Akrlb1: aldose redutase. Acot2: acil coenzima A tioesterase 2. Lgals1: galectina 1. Car1: anidrase carbônica 1. Slc25a4: ADP/ATP translocase 1. Prdx3: tiorredoxina redutase dependente de peróxido. Ndufs1: NADH ubiquinona oxidoreductase. Fabp3: proteína ligadora de ácidos graxos no coração. RGD15690: l-lactato desidrogenase. Acadl: acil CoA desidrogenase específica de cadeia longa. Ldhd: l-lactato desidrogenase de cadeia B. Pgam2: fosfoglicerato mutase 2. Idh2: isocitrato desidrogenase mitocondrial. Hspe1: proteína *heat shock* de 10 kDa. ENSRNOG00000015290: triosefosfato isomerase. Uqcrc2: citocromo b c1 subunidade 2. Got1: aspartato aminotransferase. Atp5a1: ATP sintase subunidade alfa. Ckm: creatina quinase tipo M. Atp2a2: retículo sarcoplasmático de cálcio ATPase. Uqcrcs1: citocromo b c1 subunidade Rieske. Hpx: hemopexina. Cox5a: citocromo c oxidase subunidade 5 A. Uba52: proteína ubiquitina 60S. Prdx5: peroxirredoxina 5. Aco2: aconitato hidratase. Aldoa: frutose bisfosfato aldolase A. Dlat: diidrolipoil lisina acetiltransferase. A1i3: alfa 1 inibidor 3. Gapdh: gliceraldeído 3 fosfato. Uqcrc1: citocromo b c1 subunidade 1. COX2: citocromo c oxidase subunidade 2. Hspa8: proteína *heat shock* membro 8 da família A (HSP70). Das relações destacadas, o bloco verde ressalta a interação entre as proteínas da cadeia respiratória e no bloco vermelho, podemos destacar uma interação de proteínas glicolíticas, transportadoras e antioxidantes. Fonte: <http://string-db.org>.

Comparando os grupos tratados com nandrolona treinados e não treinados (TN vs. NTN), observamos a subexpressão de proteínas relacionadas ao transporte/canais (27%), ao ciclo de Krebs (17%), à cadeia respiratória e à glicólise (14% cada) (figura 16A). De acordo com os compartimentos celulares, a subexpressão de proteínas relacionadas à fração mitocondrial (30%), citoplasma (25%) e secretadas/circulantes (20%) foram observadas no grupo TN quando comparadas com o grupo NTN (figura 16B). Por outro lado, foi observado a superexpressão de proteínas relacionadas à cadeia respiratória (42%), metabolismo de ácidos graxos (21%) e glicólise (16%) no VE dos ratos TN (vs. NTN) (figura 16C). Considerando os compartimentos celulares, as proteínas da fração mitocondrial (44%), do citoplasma (32%), as secretadas/circulantes, as nucleares e de membrana (8%) tiveram uma superexpressão no tecido cardíaco dos ratos TN (vs. NTN) (figura 16D). Na tabela 6 apresentamos todas as proteínas identificadas na comparação TN vs NTN. Na figura 17 apresentamos o mapa de interações das proteínas subexpressas no grupo TN comparado ao grupo NTN, e na figura 18 apresentamos o mapa de interações das proteínas superexpressas.

No apêndice apresentamos as demais tabelas comparativas entre os grupos experimentais, descrevendo todas as proteínas encontradas.

Tabela 6. Termo de acesso à base de dados UniProt e descrição das proteínas identificadas por UPLC-MSE, expressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + nandrolona (TN) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de treinamento resistido de alta intensidade e/ou tratamento com nandrolona. As proteínas foram classificadas de acordo com o processo biológico. Valores acima de 1 ng correspondem a proteínas superexpressas e abaixo disso, subexpressas.

Subexpressas TN:NTN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. GLICÓLISE				
G3P_RAT	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	36113.20	9	0.824
ALDR_RAT	Aldose redutase	36253.55	6	0.793
ALDOA_RAT	Frutose bisfosfato aldolase A	39808.20	12	0.722
2. CADEIA RESPIRATÓRIA				
ADT1_RAT	ADP ATP translocase 1	33217.59	9	0.866
ATPA_RAT	ATP sintase subunidade alfa mitocondrial	59867.78	16	0.794
KCRM_RAT	Creatina quinase tipo M	43273.16	18	0.734
3. CICLO DE KREBS				
MDHC_RAT	Malato desidrogenase citoplasmática	36654.26	14	0.813
ACON_RAT	Aconitato hidratase mitocondrial	86174.90	21	0.782
IDHP_RAT	Isocitrato desidrogenase NADP mitocondrial	51423.61	12	0.783
MDHM_RAT	Malato desidrogenase mitocondrial	36139.83	15	0.690
4. HEAT SHOCKS				
CH10_RAT	Proteína <i>heat shock</i> de 10 kDa mitocondrial	10901.68	4	0.829
5. ANTIOXIDANTE				
PRDX2_RAT	Peroxirredoxina 2	21954.79	6	0.894
PRDX3_RAT	Tiorredoxina redutase dependente de peróxido	28580.55	7	0.649

6. TRANSPORTE

TRFE_RAT	Serotransferrina	78562.28	31	0.752
MYG_RAT	Mioglobina	17213.88	12	0.788
ALBU_RAT	Albumina sérica	70726.83	47	0.804
HBB1_RAT	Hemoglobina subunidade beta 1	16093.47	11	0.628
HBA_RAT	Hemoglobina subunidade alfa 1 2	15499.64	8	0.585
HBB2_RAT	Hemoglobina subunidade beta 2	16096.51	9	0.608
HEMO_RAT	Hemopexina	52092.35	12	0.870
AT2A2_RAT	Retículo sarcoplasmático de cálcio (SERCA2)	116422.00	7	0.836

7. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

AATM_RAT	Aspartato aminotransferase mitocondrial	47713.56	16	0.749
----------	---	----------	----	-------

8. METABOLISMO DO GÁS CARBÔNICO

CAH1_RAT	Anidrase carbônica 1	28356.68	8	0.606
----------	----------------------	----------	---	-------

9. INFLAMAÇÃO

PEBP1_RAT	Proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1	20915.47	7	0.844
-----------	--	----------	---	-------

10. TRADUÇÃO

RL40_RAT	Proteína ubiquitina 60S ribossomal L40	15013.47	5	0.851
----------	--	----------	---	-------

Superexpressas TN:NTN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. GLICÓLISE				
ODP2_RAT	Dilidrolipoil lisina acetiltransferase	67679.19	5	1.200
TPIS_RAT	Triosefosfato isomerase	27362.18	10	1.069
LDHB_RAT	L lactato desidrogenase de cadeia B	36897.58	11	1.087
2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS				
FABP4_RAT	Proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito	14822.06	4	1.050
ACADL_RAT	Acil CoA desidrogenase específica de cadeia longa	48272.14	10	1.240
FABPH_RAT	Proteína ligadora de ácidos graxos no coração	14774.73	10	1.002
3. CADEIA RESPIRATÓRIA				
ATPB_RAT	ATP sintase subunidade beta mitocondrial	56353.65	21	1.065
QCR1_RAT	Citocromo b c1 subunidade 1 mitocondrial	53533.18	6	1.326
COX2_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 2	26113.48	3	1.135
ETFB_RAT	Flavoproteína transferidora de elétron subunidade beta	27915.57	3	1.099
ATPD_RAT	ATP sintase subunidade delta mitocondrial	17595.10	3	1.296
4. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO				
AATC_RAT	Aspartato aminotransferase citoplasmática	46656.91	20	1.019

Exclusivas nesta comparação TN:NTN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
1. GLICÓLISE			
ENOB_RAT	Beta enolase	47356.14	6
2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS			
ACOT2_RAT	Acil coenzima A tioesterase 2 mitocondrial	49986.38	4
2. ESTRUTURAL			
MYL3_RAT	Miosina de cadeia leve 3	22270.31	3
ACTC_RAT	Actina alfa de músculo cardíaco 1	42361.25	14
3. INFLAMAÇÃO			
LEG1_RAT	Galectina 1	15199.03	2
A1I3_RAT	Alfa 1 inibidor 3	62998.21	6
4. CADEIA RESPIRATÓRIA			
QCR2_RAT	Citocromo b c1 subunidade 2 mitocondrial	48453.27	4
ATP5J_RAT	ATP sintase fator acoplador 6 mitocondrial	12494.45	3
CX7A2_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 7A2 mitocondrial	9353.01	1
5. HEAT SHOCKS			
HSP7C_RAT	Proteína <i>heat shock</i> cognate de 71 kDa	71099.28	10

Exclusivas nesta comparação NTN:TN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
1. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS			
ECHM_RAT	Enoil CoA hidratase mitocondrial	31915.66	3
2. CICLO DE KREBS			
CISY_RAT	Citrato sintase mitocondrial	52209.04	5
SCOT1_RAT	Succinil CoA 3 cetoácido coenzima A transferase	56660.18	9
3. METABOLISMO DO GÁS CARBÔNICO			
CAH2_RAT	Anidrase carbônica 2	29284.93	6
4. CADEIA RESPIRATÓRIA			
ATPO_RAT	ATP sintase subunidade O mitocondrial	23454.63	5

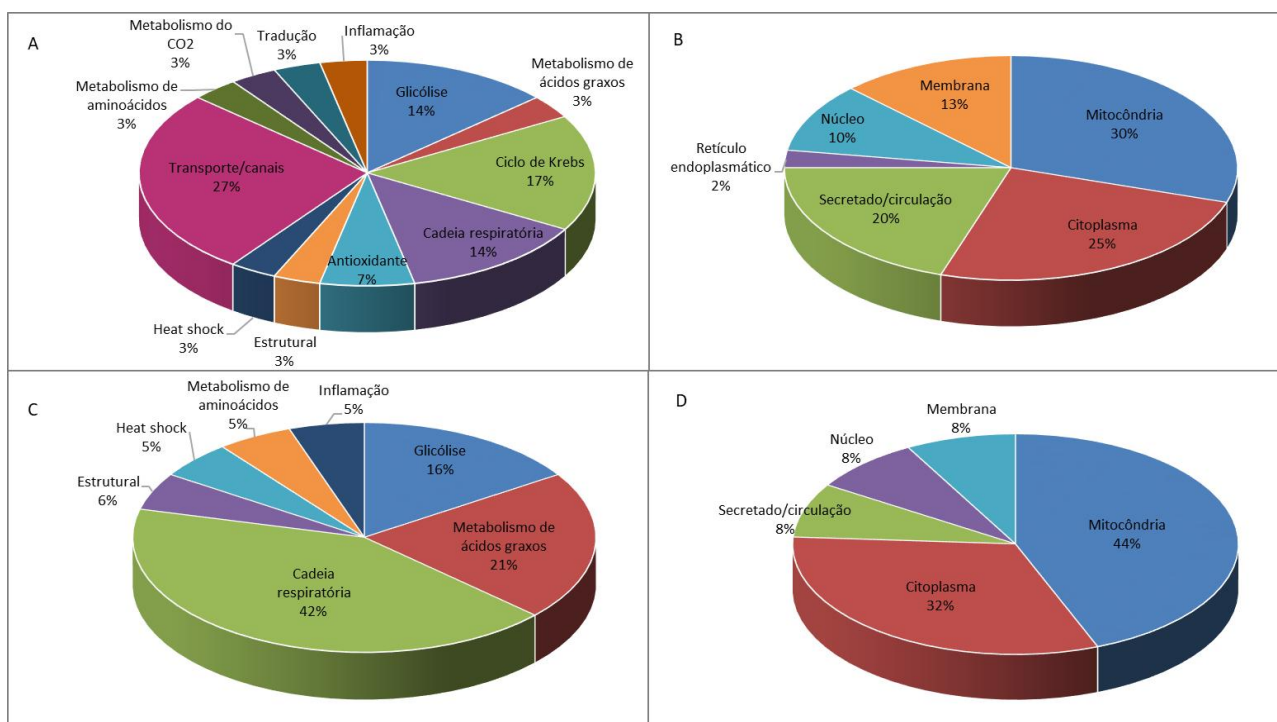


Figura 16. Representação esquemática das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo de animais TN comparado aos animais NTN, de acordo com processos biológicos (A) e compartimentos celulares (B), e proteínas superexpressas de acordo com processos biológicos (C) e compartimentos celulares (D). Todas as proteínas foram classificadas com base no *Gene Ontology*.

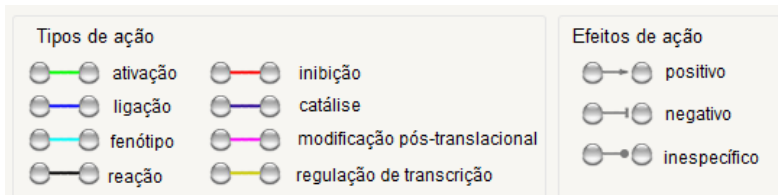
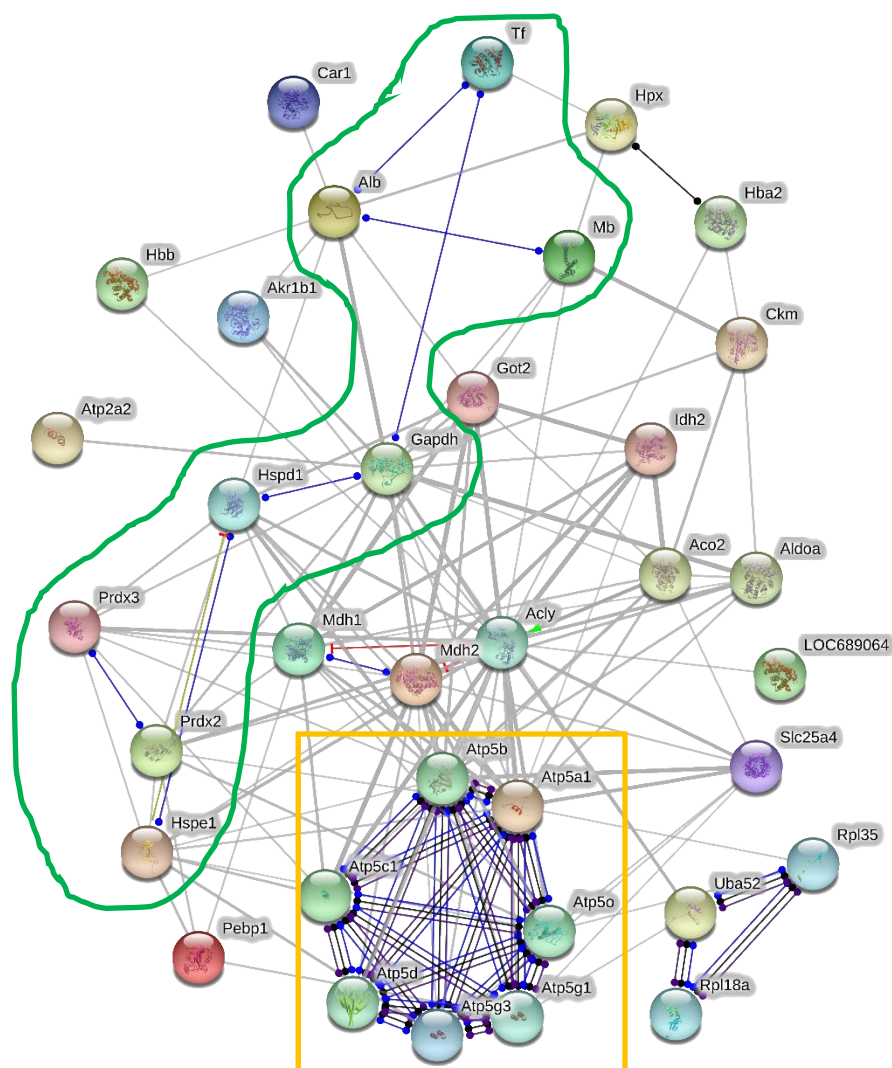


Figura 17. Mapa de interações das proteínas subexpressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + nandrolona (TN) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de tratamento e/ou treinamento, de acordo com o banco de dados STRING. Pebp1: proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1. Mdh2: malato desidrogenase mitocondrial. Alb: albumina sérica. Prdx2: peroxirredoxina 2. Mb: mioglobina. Mdh1: malato desidrogenase citoplasmática. Tf: serotransferrina. Akr1b1: aldose redutase. Car1: anidrase carbônica 1. Slc25a4: ADP/ATP translocase 1. Prdx3: tioredoxina redutase dependente de peróxido. Got2: aspartato aminotransferase. Idh2: isocitrato desidrogenase mitocondrial. Hspe1: proteína heat shock de 10 kDa. Atp5a1: ATP sintase subunidade alfa. Ckm: creatina quinase tipo M. Atp2a2: retículo sarcoplasmático de cálcio ATPase. Hpx: hemopexina. Uba52: proteína ubiquitina 60S. Aco2: aconitato hidratase. Aldoa: frutose bisfosfato aldolase A. Gapdh: gliceraldeído 3 fosfato. Hba2: hemoglobina subunidade alfa. Hbb: hemoglobina subunidade beta 1. LOC689064: hemoglobina subunidade beta 2. O bloco em laranja traz a interação das proteínas da cadeia respiratória, enquanto o bloco em verde traz a interação de proteínas transportadoras, antioxidantes e *heat shocks*. Fonte: <http://string-db.org>.

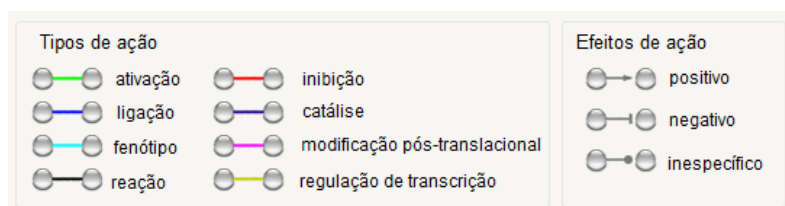
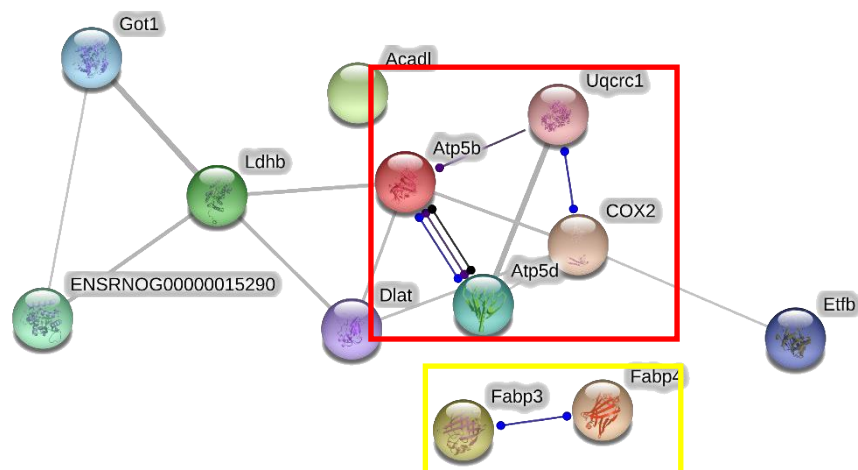


Figura 18. Mapa de interações das proteínas superexpressas no ventrículo esquerdo de ratos treinados + nandrolona (TN) em comparação com ratos não treinados + nandrolona (NTN), após 6 semanas de tratamento e/ou treinamento, de acordo com o banco de dados STRING. Atp5b: ATP sintase subunidade beta. Fabp4: proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito. Fabp3: proteína ligadora de ácidos graxos no coração. Acadl: acil-CoA desidrogenase específica de cadeia longa. Ldhd: l-lactato desidrogenase de cadeia B. ENSRNOG00000015290: triosefosfato isomerase. Atp5d: ATP sintase subunidade delta. Got1: aspartato aminotransferase. Etfb: flavoproteína transferidora de elétron subunidade beta. Dlat: diidrolipoil lisina acetiltransferase. Uqcrc1: citocromo b c1 subunidade 1. COX2: citocromo c oxidase subunidade 2. Das interações que se destacam, apresentamos a interação entre as proteínas de cadeia respiratória (bloco vermelho) e as proteínas de metabolismo β -oxidativo (bloco amarelo). Fonte: <http://string-db.org>.

A superexpressão da SERCA2a foi observada no tecido cardíaco de animais dos grupos TV, NTN e TN (vs. NTV). Por outro lado, no grupo TN observou-se subexpressão da SERCA em comparação com animais TV (figura 19A). Também houve uma superexpressão dos canais KATP no VE do grupo TV, enquanto a nandrolona suprimiu sua expressão (figura 19B).

Observou-se superexpressão da superóxido dismutase CuZn (SOD), peroxirredoxina 5 (PRDX5) e da glutathione transferase mu 2 (GSTM2) no tecido cardíaco de animais do grupo TV (vs. NTV). A expressão de PRDX5 aumentou no tecido cardíaco dos ratos NTN, enquanto que a expressão de GSTM2 foi abolida pelo tratamento com nandrolona (NTN vs. NTV). Além disso, a nandrolona atenuou as elevações induzidas pelo treinamento resistido na expressão da SOD e da PRDX5, embora a GSTM2 não tenha sido expressa em ratos TN (TN vs. TV - figura 19C-E). A superexpressão da lactato desidrogenase A (LDHA) foi observada no grupo TV e NTN quando comparada ao grupo NTV. A nandrolona, por sua vez, atenuou a regulação positiva induzida pelo treinamento da LDHA (figura 19F).

A expressão da fosfoglicerato quinase 1 (PGCK1) foi significativamente aumentada no VE dos animais TV, embora não tenha sido observada expressão de PGCK1 nos grupos NTN e TN (figura 19G).

Enquanto o treinamento resistido induziu maior expressão da Citrato sintase (CISY) (TV vs. NTV), foi observada uma subexpressão da CISY nos animais NTN (NTN vs. NTV). Além disso, a nandrolona associada com o treinamento resistido suprimiu a expressão da CISY no grupo TN (figura 19H).

A expressão da proteína *heat shock* de 20 kDa (HSP20) apresentou-se aumentada grupo TV (vs. NTV). Em contraste, a nandrolona aboliu sua expressão (figura 19I). Da mesma forma que a HSP20, a proteína *heat shock* de 71 kDa (HSP7C) foi superexpressa após o treinamento (TV vs. NTV). A nandrolona não induziu a expressão da HSP7C no grupo NTN, enquanto que o treinamento restaurou sua expressão no tecido cardíaco de ratos tratados com nandrolona (figura 19J).

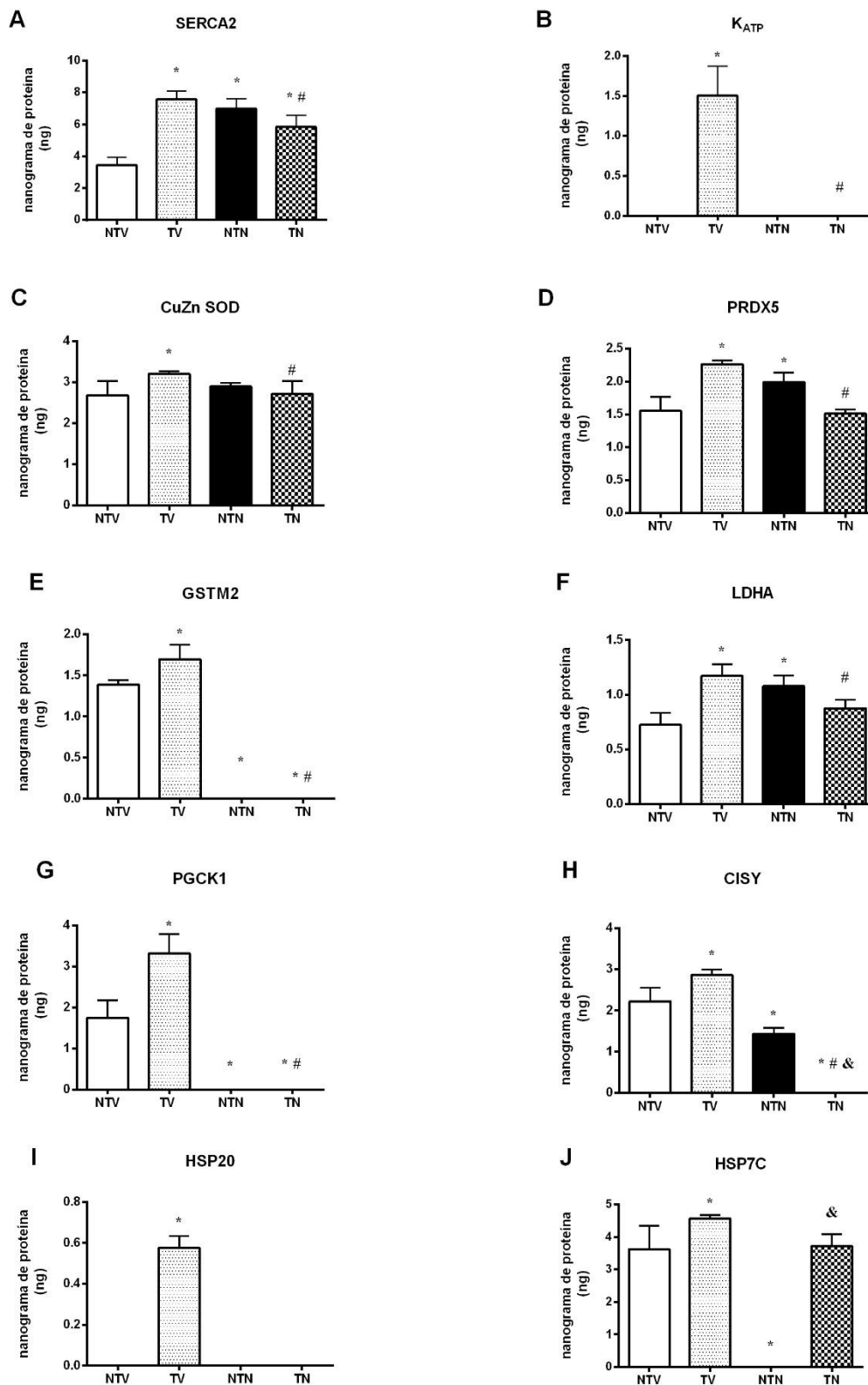


Figura 19. Concentração absoluta das proteínas em nanogramas (ng) expressas no ventrículo esquerdo dos grupos experimentais. SERCA2: retículo sarcoplasmático ATPase de cálcio 2 (A); KATP: canais de potássio sensíveis a ATP (B); CuZn SODC: superóxido dismutase Cu Zn (C); PRDX5: peroxirredoxina 5 (D); GSTM2: Glutathione S-transferase Mu2 (E) LDHA: lactato desidrogenase A (F); PGCK1: fosfoglicerato quinase 1 (G); CISO: citrato sintase (H); HSP20: proteína de choque térmico 20kDa (I); HSP7C: proteína de choque térmico 7C (J). Grupos: veículo não treinado (NTV); veículo treinado (TV); nandrolona não treinado (NTN) e nandrolona treinado (TN). ANOVA de duas caudas + Bonferroni. n = 6 / grupo. * p < 0,05 vs. NTV; #p < 0,05 vs. TV; & p < 0,05 vs. NTN.

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi identificar o perfil proteômico do ventrículo esquerdo de ratos que receberam doses suprafisiológicas de nandrolona e foram submetidos a um protocolo de treinamento resistido de alta intensidade. No que diz respeito à busca de proteínas candidatas a biomarcadores em proteômica, é preciso analisar os processos biológicos em que cada uma das proteínas identificadas estão envolvidas para então buscar dados na literatura que embasem o achado. A análise do perfil proteico do ventrículo esquerdo mostrou que altas doses de nandrolona induziram subexpressão de proteínas relacionadas a canais iônicos, metabolismo energético e enzimas antioxidantes. Além disso, os canais de íons cruciais para função de contração cardíaca (SERCA2, KATP) e enzimas chave metabólicas (LDHA, PGCK1 e CISO) foram modulados de maneiras distintas pelo EAA e pelo treinamento físico. Por fim, as enzimas antioxidantes (PRDX, SODC e GSTM2) e as proteínas expressas em resposta a condições estressantes (HSPs) tiveram sua expressão prejudicada pelo EAA, o que sugere que a nandrolona impede o desenvolvimento de adaptações cardíacas protetoras induzidas pelo treinamento físico resistido.

Está bem estabelecido que o uso indevido de EAA pode causar efeitos prejudiciais à diversos sistemas fisiológicos [50, 51], incluindo hipertrofia cardíaca com aumento da deposição de colágeno [18], aumento da resposta inflamatória cardíaca [52], arritmias [23], cardiomiopatia [53, 54] e pressão arterial elevada [55]. De fato no presente estudo, observamos que os animais do grupo TN apresentaram aumento do índice de hipertrofia cardíaca em comparação com os outros grupos experimentais [56, 57]. Além disto, observamos que o TR reduziu a reduziu a PAD, PAM e FC apenas em ratos tratados com veículo, enquanto que não foram observadas alterações nos ratos treinados tratados com nandrolona, dados que corroboram com aqueles já descritos na literatura [58].

Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, demonstramos que o EAA prolonga os intervalos QT, relacionados à atividade elétrica do coração [26]. No entanto, os mecanismos intracelulares não foram investigados. Essa resposta pode estar associada a alterações nas proteínas intracelulares relacionadas à despolarização cardíaca e à repolarização. Para abordar esta questão, buscamos investigar se a nandrolona afetaria as concentrações de SERCA2 e KATP no VE. Segundo nosso entendimento, este é o primeiro relato que demonstra o perfil proteico do VE em resposta a altas doses de nandrolona combinadas com exercício extenuante. Neste estudo, observamos que a SERCA2a foi superexpressa no tecido cardíaco de ratos NTN (vs.

NTV), enquanto que animais TN apresentaram subexpressão da SERCA em comparação com os animais TV. A SERCA2a é a maior isoforma desta proteína expressa no tecido cardíaco; sua atividade regula tanto a taxa de remoção de Ca^{2+} citosólico quanto a carga de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, exercendo um papel fundamental no controle do acoplamento da excitação/contração [59, 60]. Além disso, enquanto a subexpressão da SERCA2a tem sido associada à insuficiência cardíaca [60, 61], a superexpressão da SERCA parece facilitar a transmissão simpática e a alteração do tratamento intracelular de Ca^{2+} nos neurônios isolados [62] e, portanto, pode induzir arritmias [63]. Por outro lado, há estudos que não mostram alteração na expressão gênica da SERCA no coração de ratos tratados com propionato de testosterona [64]. No presente estudo, poderíamos inferir que a superexpressão da SERCA2a ocasionaria variações de FC; entretanto não foram observadas alterações significativas de FC dos ratos NTN (vs. NTV). Estes resultados sugerem que a modulação da SERCA2 não está envolvida mecanicamente nas diferenças relacionadas à FC. A explicação mais conservadora sobre a expressão diminuída da SERCA2a em resposta a altas doses de nandrolona, quando comparada ao grupo TV, pode estar associada à tentativa de melhoria da função contrátil. Neste caso, o funcionamento deste canal se torna mais eficiente, resultando em uma menor ativação simpática porém com uma resposta adrenérgica intensificada [65]. De fato, foi demonstrado anteriormente que a nandrolona induz aumento significativo da expressão de adrenorreceptores $\beta 1$ e $\beta 2$ no átrio direito dos grupos NTN e TN [26], que pode suportar, pelo menos em partes, nossos achados relacionados com uma expressão um pouco menor da SERCA2a no VE dos animais tratados com nandrolona.

Em resposta ao TR, a expressão dos canais KATP apresentou-se elevada no tecido cardíaco dos animais TV, enquanto a nandrolona suprimiu sua expressão. Nossos achados estão de acordo com os de outros estudos [66, 67], apesar dos autores terem utilizado diferentes modelos de treinamento. Os canais KATP são complexos de proteína de membrana que desempenham um papel importante na homeostase da energia cardíaca, pois se acredita que os mesmos atuam como sensores iônicos e bioenergéticos, de acordo com a concentração de ATP disponível no citosol. Quando os canais KATP são acionados (por exemplo, durante uma sessão de treinamento ou quando há ativação simpática), há um efluxo de potássio que provoca hiperpolarização do cardiomiócito, diminuindo o número de potenciais de ação. Consequentemente, há diminuição na entrada de cálcio, além da redução do metabolismo energético cardíaco através da cadeia de transporte de elétrons. Estes dois efeitos contribuem para que não haja acúmulo de cálcio intracelular (que pode desestabilizar a função cardíaca provocando

arritmias) e para que não haja aumento da produção de ERO's [66], reduzindo assim a susceptibilidade à lesão isquêmica [64, 67]. Assim, sugerimos que o treinamento físico pode induzir um mecanismo protetor no tecido cardíaco, em condições normais ou patológicas [67-70]. No entanto, os efeitos de altas doses de nandrolona na expressão dos canais KATP são controversos. De fato, os níveis de proteína das subunidades de canais KATP (sarcolemais e mitocondriais) não se alteram em resposta à nandrolona [64], mesmo que o treinamento (no caso, esteira) produzisse maior expressão de KATP [71]. Enquanto o TR não afetou a expressão do KATP cardíaco em ratos tratados com nandrolona, o estudo de Bayat demonstrou que a nandrolona diminuiu a superexpressão do KATP induzida pelo treinamento físico, sugerindo mecanismos diferentes entre os modelos de treinamento (TR e esteira). Além disso, estudos demonstram uma subexpressão do canal KATP no coração de ratos tratados com nandrolona sujeitos a isquemia-reperfusão [35]. Em acordo com estes estudos, também sugerimos que o EAA prejudique a ativação de mecanismos cardioprotetores induzidos pelo TR, particularmente no tocante a arritmias [70]. Além disto, sabe-se que o aumento da produção de ERO tem sido consistentemente observado no tecido cardíaco de ratos tratados com EAA [72], e mudanças no ambiente redox intracelular afetam propriedades dos canais iônicos, incluindo a SERCA, contribuindo para a disfunção do VE e distúrbios do sistema cardiovascular [24, 73]. De fato, em estudo anterior demonstramos que doses suprafisiológicas de nandrolona aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na aorta dos ratos TN quando comparados com o grupo TV, o que pode prejudicar o metabolismo redox.

Embora não tenha sido investigada a produção de ERO no tecido cardíaco de animais submetidos ao TR aqui utilizado, sabe-se que ratos tratados com nandrolona apresentam aumento da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [72]. Além disso, a cardioproteção parece ser prejudicada pela administração de altas doses de nandrolona [57, 74]. Neste estudo, a nandrolona atenuou as elevações induzidas pelo TR das enzimas antioxidantes SOD, PRDX5 e GSTM2 (TN vs. TV), que estão parcialmente de acordo com outros achados [57], apesar das diferenças no tipo de treinamento (no estudo de Chaves, foi utilizado treinamento em esteira). Embora não tenham sido observadas alterações na expressão da SOD nos animais NTN (vs. NTV), altas doses de nandrolona não afetaram a atividade das enzimas antioxidantes cardíacas, incluindo SOD [72]. De fato, evidências sugestivas têm demonstrado que a nandrolona neutraliza as respostas adaptativas referentes ao aumento das enzimas antioxidantes induzido pelo exercício [23, 56, 57, 75]. Aqui, observamos uma superexpressão significativa da PRDX5 no VE dos

ratos NTN, sugerindo que a nandrolona pode estar agindo como um mecanismo de proteção para reduzir o estresse oxidativo cardíaco, como apoiado por outros [76]. Enquanto PRDXs constituem uma classe de enzimas antioxidantes que controlam os níveis de peróxido produzidos pelas citocinas [77] e exercem efeito cardioprotetor em condições de estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio [78], especula-se que as enzimas GST são expressas sob condições de estresse oxidativo como mecanismo de proteção contra insultos oxidativos em geral [79]. Diferentemente da PRDX5, a expressão da GSTM2 foi suprimida pela nandrolona em ambos os grupos tratados com altas doses de nandrolona (NTN vs NTV; TN vs. TV), apoiando nossa hipótese de que a nandrolona tem efeito negativo no sistema defensivo oxidativo cardíaco, mesmo que efeitos similares não foram observados na SOD e PRDX5. Assim, considerando que não há evidências anteriores sobre os efeitos do EAA nas enzimas GST e PRX5, poderíamos sugerir respostas distintas da nandrolona no sistema de defesa antioxidante cardíaco. No entanto, estudos adicionais são necessários para apoiar nossa hipótese.

Com relação ao metabolismo energético, sabe-se que altas doses de nandrolona prejudicam a produção de glicose e o conteúdo de glicogênio no fígado, além de diminuírem a absorção de glicose sérica e glicose muscular esquelética [80]. Sabe-se que durante o desenvolvimento fetal, glicose e lactato são substratos preferencialmente utilizados como fonte de energia, ao passo que no coração adulto, há utilização preferencial de lipídeos [81]. Além disso, o coração possui capacidade metabólica para utilizar diferentes substratos energéticos, sendo a preferência dependente da disponibilidade do substrato, alteração da via metabólica e crescimento cardíaco (hipertrofia) [82]. Neste trabalho, verificamos que a LDHA foi superexpressa no VE dos animais NTN, enquanto a nandrolona atenuou a superexpressão da LDHA em resposta ao TR (TV vs. NTV - figura 19F). A LDH é uma enzima citoplasmática responsável por converter o piruvato em lactato quando o fornecimento de oxigênio é escasso [83], e está associada ao metabolismo glicolítico. Já foi demonstrado que a nandrolona regula as subunidades de LDH (LDHA e LDHB) no músculo esquelético de ratos submetidos à sobrecarga funcional [84]. Além disso, sabe-se que a LDH sérica pode ser utilizada como marcador de infarto do miocárdio [85] e isquemia [86]. Considerando os resultados do presente estudo, observamos que a nandrolona altera o perfil proteico relacionado às enzimas metabólicas cardíacas, predispondo ao desenvolvimento de condições patológicas, incluindo isquemia e insuficiência cardíaca.

Ainda com relação ao metabolismo do tecido cardíaco, sabe-se que no segundo estágio da via glicolítica, a PGCK catalisa a transferência do grupo acilfosfato do 1,3-difosfoglicerato para ADP com formação de 3-fosfoglicerato e ATP [87]. No entanto, não há estudos relacionando os efeitos da nandrolona e treinamento físico sobre a regulação PGCK do tecido cardíaco. Curiosamente, a PGCK1 foi suprimida pela nandrolona, mesmo quando o tratamento foi associado ao TR (NTN vs. NTV, TN vs. NTV e TV), o que pode indicar comprometimento da produção de energia glicolítica.

De acordo com o metabolismo glicolítico no tecido cardíaco, o EAA combinado com treinamento em esteira afeta as enzimas da cadeia de transporte de elétrons no fígado de ratos [88], apesar de não afetar a atividade ou expressão da CISO [89]. Além disso, o treinamento de resistência em humanos resulta em aumento da atividade da CISO no músculo esquelético [90], bem como no aumento da expressão gênica da mesma no VE de ratos, sem alteração da atividade enzimática [91]. A CISO é uma enzima chave na via metabólica do ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico), que tem sido utilizada como marcador metabólico de capacidade oxidativa e respiratória [90]. Em paralelo com as respostas da PGCK1, doses elevadas de nandrolona provocaram a diminuição da regulação dos níveis da CISO no VE (NTN vs. NTV). Além disso, a nandrolona combinada com o TR suprimiu a expressão da CISO (TN vs. NTV, TV e NTN), sugerindo os efeitos nocivos do EAA na capacidade metabólica cardíaca.

O exercício físico tem demonstrado uma capacidade de induzir diversas adaptações cardíacas [92-95]. De fato, observou-se um aumento do PCor além de um IHC elevado nos animais treinados (vs. NTV), que pode indicar hipertrofia cardíaca em resposta ao TR, como apoiado por nossos estudos anteriores [18, 26]. Demonstramos anteriormente que o treinamento físico modula algumas proteínas no VE [28], como a HSP20, referida também como HSP β 6, que desempenha um papel importante na cardioproteção [96] e é considerada um biomarcador do treinamento físico [97]. De fato, as proteínas HSPs mostraram ter uma expressão aumentada em resposta ao treinamento progressivo em esteira [97, 98]. A HSP20 liga-se a outras pequenas HSPs (como a α -cristalina de cadeia β) e proteínas do citoesqueleto, exercendo seus efeitos sobre os mecanismos subjacentes à disfunção cardíaca [13], incluindo hipertrofia e apoptose [99]. A superexpressão da HSP20 e HSP7C foi observada no VE do grupo TV, sugerindo um mecanismo de proteção induzido pelo treinamento físico no tecido cardíaco [99, 100]. Além disso, não houve expressão da HSP20 no VE dos animais NTV, conforme documentado pelo nosso estudo anterior [28] e relatado por outros [97, 101]. As HSPs são conhecidas como proteínas de estresse, e são expressas para conferir tolerância

celular ao estresse oxidativo e proteção contra a desnaturação das proteínas [102, 103]. Neste trabalho, a nandrolona aboliu a superexpressão induzida pelo TR de ambas as proteínas (HSP20 e HSP7C), o que pode indicar possíveis efeitos deletérios do EAA na tolerância ao coração em condições estressantes. Em nossos achados, a nandrolona não induziu a expressão de HSP7C em tecido cardíaco de ratos. Em contraste, a HSP7C apresentou-se superexpressa no músculo esquelético de ratos tratados com doses suprafisiológicas de nandrolona [104]. No entanto, para nosso conhecimento, não há relatos da resposta a altas doses de nandrolona combinadas ou não com o TR com relação tanto a HSP20 quanto a HSP7C. Por outro lado, o TR reverteu a ausência de expressão da HSP7C induzida pela nandrolona nos ratos TN (vs. NTN), apoiando as evidências quanto ao efeito protetor do treinamento físico. Em suma, os dados aqui apresentados indicam que a nandrolona afeta adversamente as modificações positivas do TR, predispondo a alterações de função dos miócitos e tornando o coração vulnerável à disfunção severa.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, verificamos que a nandrolona, associada ou não ao treinamento físico resistido, está envolvida no desenvolvimento da hipertrofia patológica. Além disto, proteínas importantes, que atuam como fatores protetores, tiveram sua expressão reduzida ou não foram expressas em resposta ao tratamento com nandrolona. Dentre estas proteínas, destacamos:

- Inibição da KATP (proteína transportadora de potássio ATPase dependente);
- Inibição da *heat shock* de 20 kDa (HSP20);
- Inibição da Citrato sintase (marcadora de injúria mitocondrial);
- Inibição da Glutathione S transferase Mu 2 (antioxidante);
- Diminuição na expressão de algumas Peroxirredoxinas (proteínas antioxidantes), da Superóxido dismutase Cu-Zn (também antioxidante) e outras *heat shocks*.

Este é o primeiro estudo que demonstra que o uso de doses suprafisiológicas de EAA, associado a um protocolo de treinamento resistido, altera o perfil proteico protetor desencadeado pelo exercício, tornando o coração vulnerável a disfunções. Além disto, sugere possíveis mecanismos pelos quais o uso de EAA prejudica a função e estrutura do sistema cardiovascular, como é o caso da ausência da expressão da KATP e sua relação com quadros de arritmia decorrentes do uso destas substâncias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Lauschke, B. Maisch, Athlete's heart or hypertrophic cardiomyopathy?, *Clin Res Cardiol* 98(2) (2009) 80-8.
- [2] J.D. Sniderman, D.M. Sado, A.D. Sniderman, W.J. McKenna, Evaluation of suspected right ventricular pathology in the athlete, *Prog Cardiovasc Dis* 54(5) (2012) 397-406.
- [3] R.B. Vega, J.P. Konhilas, D.P. Kelly, L.A. Leinwand, Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Adaptation to Exercise, *Cell metabolism* 25(5) (2017) 1012-1026.
- [4] A. Pelliccia, M.S. Maron, B.J. Maron, Assessment of left ventricular hypertrophy in a trained athlete: differential diagnosis of physiologic athlete's heart from pathologic hypertrophy, *Prog Cardiovasc Dis* 54(5) (2012) 387-96.
- [5] B.M. Pluim, A.H. Zwinderman, A. van der Laarse, E.E. van der Wall, The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function, *Circulation* 101(3) (2000) 336-44.
- [6] T. Fernandes, U.P. Soci, E.M. Oliveira, Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants, *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 44(9) (2011) 836-47.
- [7] M.J. Haykowsky, R. Dressendorfer, D. Taylor, S. Mandic, D. Humen, Resistance training and cardiac hypertrophy: unravelling the training effect, *Sports medicine* 32(13) (2002) 837-49.
- [8] E.J. Johnson, B.P. Dieter, S.A. Marsh, Evidence for distinct effects of exercise in different cardiac hypertrophic disorders, *Life Sci* 123 (2015) 100-6.
- [9] B.B. Yaspelkis, 3rd, I.A. Kvasha, T.Y. Figueroa, High-fat feeding increases insulin receptor and IRS-1 coimmunoprecipitation with SOCS-3, IKK α /beta phosphorylation and decreases PI-3 kinase activity in muscle, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(6) (2009) R1709-15.
- [10] E.L. Schiffrin, Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(3) (2005) H1037-43.
- [11] B.N. Finck, The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease, *Cardiovasc Res* 73(2) (2007) 269-77.
- [12] J.G. Burniston, Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise, *Proteomics* 9(1) (2009) 106-15.
- [13] G.C. Fan, E.G. Kranias, Small heat shock protein 20 (HspB6) in cardiac hypertrophy and failure, *J Mol Cell Cardiol* 51(4) (2011) 574-7.
- [14] B.C. Bernardo, K.L. Weeks, L. Pretorius, J.R. McMullen, Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies, *Pharmacology & therapeutics* 128(1) (2010) 191-227.
- [15] D. Lachance, W. Dhahri, M.C. Drolet, E. Roussel, S. Gascon, O. Sarrhini, J.A. Rousseau, R. Lecomte, M. Arsenault, J. Couet, Endurance training or beta-blockade can partially block the energy metabolism remodeling taking place in experimental chronic left ventricle volume overload, *BMC Cardiovasc Disord* 14 (2014) 190.
- [16] G. Karamanlidis, L. Garcia-Menendez, S.C. Kolwicz, Jr., C.F. Lee, R. Tian, Promoting PGC-1 α -driven mitochondrial biogenesis is detrimental in pressure-overloaded mouse hearts, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307(9) (2014) H1307-16.
- [17] G.J. van der Vusse, M. van Bilsen, J.F. Glatz, Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease, *Cardiovasc Res* 45(2) (2000) 279-93.
- [18] A.P. Tanno, V.J. das Neves, K.T. Rosa, T.S. Cunha, F.C. Giordano, C.M. Calil, V. Guzzoni, T. Fernandes, E.M. de Oliveira, P.D. Novaes, M.C. Irigoyen, M.J. Moura, F.K. Marcondes, Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology, *Life Sci* 89(17-18) (2011) 631-7.
- [19] J. Wang, G.J. Tan, L.N. Han, Y.Y. Bai, M. He, H.B. Liu, Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction, *Journal of geriatric cardiology : JGC* 14(2) (2017) 135-150.
- [20] H. Aoki, M. Richmond, S. Izumo, J. Sadoshima, Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro, *The Biochemical journal* 347 Pt 1 (2000) 275-84.
- [21] P. Shanmugam, A.J. Valente, S.D. Prabhu, B. Venkatesan, T. Yoshida, P. Delafontaine, B. Chandrasekar, Angiotensin-II type 1 receptor and NOX2 mediate TCF/LEF and CREB dependent WISP1 induction and cardiomyocyte hypertrophy, *J Mol Cell Cardiol* 50(6) (2011) 928-38.
- [22] D. Liu, R. Hewawasam, S.M. Pace, E.M. Gallant, M.G. Casarotto, A.F. Dulhunty, P.G. Board, Dissection of the inhibition of cardiac ryanodine receptors by human glutathione transferase GSTM2-2, *Biochemical pharmacology* 77(7) (2009) 1181-93.
- [23] H. Ghorbani Baravati, S. Joukar, H. Fathpour, Z. Kordestani, Nandrolone Plus Moderate Exercise Increases the Susceptibility to Lethal Arrhythmias, *Research in cardiovascular medicine* 4(2) (2015) e26233.
- [24] A.V. Zima, L.A. Blatter, Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters, *Cardiovasc Res* 71(2) (2006) 310-21.
- [25] G.E. Billman, Cardiac autonomic neural remodeling and susceptibility to sudden cardiac death: effect of endurance exercise training, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(4) (2009) H1171-93.

- [26] V.J. das Neves, A.P. Tanno, T.S. Cunha, T. Fernandes, V. Guzzoni, C.A. da Silva, E.M. de Oliveira, M.J. Moura, F.K. Marcondes, Effects of nandrolone and resistance training on the blood pressure, cardiac electrophysiology, and expression of atrial beta-adrenergic receptors, *Life Sci* 92(20-21) (2013) 1029-35.
- [27] R.A. Winett, R.N. Carpinelli, Potential health-related benefits of resistance training, *Preventive medicine* 33(5) (2001) 503-13.
- [28] P.S. Dantas, M.M. Sakata, J.D. Perez, R.L. Watanabe, F.C. Bizerra, V.J. Neves, V. Guzzoni, F.K. Marcondes, D.E. Casarini, T.S. Cunha, Unraveling the role of high-intensity resistance training on left ventricle proteome: Is there a shift towards maladaptation?, *Life Sci* 152 (2016) 156-64.
- [29] F.L. Rocha, F.R. Roque, E.M.d. Oliveira, Esteróides Anabolizantes: mecanismos de ação e efeitos sobre o sistema cardiovascular, *O MUNDO DA SAÚDE* 31(4) (2007) 470-477.
- [30] T.S. Cunha, A.P. Tanno, F.K. Marcondes, S.E. Perez, H.S. Selistre-Araujo, [Nandrolone administration does not promote hypertrophy of soleus muscle in rats], *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50(3) (2006) 532-40.
- [31] S.R. Boff, Efeitos colaterais dos esteróides anabolizantes sintéticos, *R. Bras. Ci e Mov* 16(1) (2008) 123-127.
- [32] C. Ayotte, Significance of 19-norandrosterone in athletes' urine samples, *British journal of sports medicine* 40 Suppl 1 (2006) i25-9.
- [33] A.P. Tanno, Alterações cardíacas induzidas por esteróide anabólico androgênico em ratos sedentários e treinados, UNICAMP, São Paulo, 2007.
- [34] C. Penna, G. Abbadessa, D. Mancardi, A. Spaccamiglio, S. Racca, P. Pagliaro, Nandrolone-pretreatment enhances cardiac beta(2)-adrenoceptor expression and reverses heart contractile down-regulation in the post-stress period of acute-stressed rats, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 107(1-2) (2007) 106-13.
- [35] S.R. Marques-Neto, E.B. Ferraz, D.C. Rodrigues, B. Njaine, E. Rondinelli, A.C. Campos de Carvalho, J.H. Nascimento, AT1 and aldosterone receptors blockade prevents the chronic effect of nandrolone on the exercise-induced cardioprotection in perfused rat heart subjected to ischemia and reperfusion, *Cardiovascular drugs and therapy* 28(2) (2014) 125-35.
- [36] E.A. Chaves, P.P. Pereira, R.S. Fortunato, D.P. Carvalho, J.H.M. Nascimento, M.F. Oliveira, Cardioproteção Induzida pelo Exercício é Prejudicada pelo Tratamento com o Anabolizante Decanoato de Nandrolona, *Brazilian Journal of Biomotricity* 1 (2007) 46-55.
- [37] D.P. Venâncio, A.C.L.d. Nóbrega, S. Tufik, M.T.d. Mello, Avaliação descritiva sobre o uso de esteroides anabolizantes e seu efeito sobre as variáveis bioquímicas e neuroendócrinas em indivíduos que praticam exercício resistido, *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 16 (2010) 191-195.
- [38] S. Shokri, R.J. Aitken, M. Abdolvahabi, F. Abolhasani, F.M. Ghasemi, I. Kashani, S. Ejtemaeimehr, S. Ahmadian, B. Minaei, M.A. Naraghi, M. Barbarestani, Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells, *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 106(4) (2010) 324-30.
- [39] C. Mega Martins, F. H. Carijó, M.C. de Almeida, M. da Silveira, M. X. N. Mirailh, M. Monteiro Peixoto, R. Martins, T. Mendes Ramalho, A. Sholl-Franco, Efeitos psicológicos do abuso de anabolizantes, *Ciências & Cognição* 5 (2005) 84-91.
- [40] F. Hartgens, H. Kuipers, Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes, *Sports medicine* 34(8) (2004) 513-54.
- [41] Y. Hasin, M. Seldin, A. Lusi, Multi-omics approaches to disease, *Genome biology* 18(1) (2017) 83.
- [42] S.D. Patterson, R.H. Aebersold, Proteomics: the first decade and beyond, *Nature genetics* 33 Suppl (2003) 311-23.
- [43] Q. Xu, Z. Cui, G. Venkatraman, A.V. Gomes, The use of biophysical proteomic techniques in advancing our understanding of diseases, *Biophysical reviews* 4(2) (2012) 125-135.
- [44] R. Ferreira, D. Moreira-Goncalves, A.L. Azevedo, J.A. Duarte, F. Amado, R. Vitorino, Unraveling the exercise-related proteome signature in heart, *Basic research in cardiology* 110(1) (2015) 454.
- [45] C.E. Parker, M.R. Warren, V. Mocanu, Mass Spectrometry for Proteomics, in: O. Alzate (Ed.), *Neuroproteomics*, Boca Raton (FL), 2010.
- [46] W.J. Qian, J.M. Jacobs, T. Liu, D.G. Camp, 2nd, R.D. Smith, Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications, *Mol Cell Proteomics* 5(10) (2006) 1727-44.
- [47] T.S. Cunha, M.J. Moura, C.F. Bernardes, A.P. Tanno, F.K. Marcondes, Vascular sensitivity to phenylephrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment, *Hypertension* 46(4) (2005) 1010-5.
- [48] A.P. Tanno, Alterações cardíacas induzidas por esteroide anabolico androgenico em ratos sedentarios e treinados, (2007).
- [49] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248-54.
- [50] E. Turillazzi, G. Perilli, M. Di Paolo, M. Neri, I. Riezzo, V. Fineschi, Side effects of AAS abuse: an overview, *Mini reviews in medicinal chemistry* 11(5) (2011) 374-89.
- [51] E. Nieschlag, E. Vorona, Doping with anabolic androgenic steroids (AAS): Adverse effects on non-reproductive organs and functions, *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 16(3) (2015) 199-211.

- [52] E.C. Do Carmo, T. Fernandes, D. Koike, N.D. Da Silva, Jr., K.C. Mattos, K.T. Rosa, D. Barretti, S.F. Melo, R.B. Wich, M.C. Irigoyen, E.M. de Oliveira, Anabolic steroid associated to physical training induces deleterious cardiac effects, *Medicine and science in sports and exercise* 43(10) (2011) 1836-48.
- [53] M.Y. Youssef, A. Alqallaf, N. Abdella, Anabolic androgenic steroid-induced cardiomyopathy, stroke and peripheral vascular disease, *BMJ case reports* 2011 (2011).
- [54] S. Achar, A. Rostamian, S.M. Narayan, Cardiac and metabolic effects of anabolic-androgenic steroid abuse on lipids, blood pressure, left ventricular dimensions, and rhythm, *The American journal of cardiology* 106(6) (2010) 893-901.
- [55] F. Grace, N. Sculthorpe, J. Baker, B. Davies, Blood pressure and rate pressure product response in males using high-dose anabolic androgenic steroids (AAS), *Journal of science and medicine in sport* 6(3) (2003) 307-12.
- [56] V. Fineschi, M. Di Paolo, M. Neri, S. Bello, S. D'Errico, D. Dinucci, R. Parente, C. Pomara, R. Rabozzi, I. Riezzo, E. Turillazzi, Anabolic steroid- and exercise-induced cardio-depressant cytokines and myocardial beta1 receptor expression in CD1 mice, *Current pharmaceutical biotechnology* 12(2) (2011) 275-84.
- [57] E.A. Chaves, P.P. Pereira-Junior, R.S. Fortunato, M.O. Masuda, A.C. de Carvalho, D.P. de Carvalho, M.F. Oliveira, J.H. Nascimento, Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: role of antioxidant enzymes, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 99(4-5) (2006) 223-30.
- [58] M.C.R. Soares, I.C.d. Abreu, F. Assenço, M.O.d.R. Borges, Decanoato de nandrolona aumenta a parede ventricular esquerda, mas atenua o aumento da cavidade provocado pelo treinamento de natação em ratos, *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 17 (2011) 420-424.
- [59] E.G. Kranias, R.J. Hajjar, Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome, *Circulation research* 110(12) (2012) 1646-60.
- [60] L. Lipskaia, E.R. Chemaly, L. Hadri, A.M. Lompre, R.J. Hajjar, Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure, *Expert opinion on biological therapy* 10(1) (2010) 29-41.
- [61] A.R. Lyon, M.L. Bannister, T. Collins, E. Pearce, A.H. Sepehripour, S.S. Dubb, E. Garcia, P. O'Gara, L. Liang, E. Kohlbrenner, R.J. Hajjar, N.S. Peters, P.A. Poole-Wilson, K.T. Macleod, S.E. Harding, SERCA2a gene transfer decreases sarcoplasmic reticulum calcium leak and reduces ventricular arrhythmias in a model of chronic heart failure, *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* 4(3) (2011) 362-72.
- [62] J. Shanks, N. Herring, E. Johnson, K. Liu, D. Li, D.J. Paterson, Overexpression of Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2a Promotes Cardiac Sympathetic Neurotransmission via Abnormal Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Ca(2+) Regulation, *Hypertension* 69(4) (2017) 625-632.
- [63] N. Erkasap, SERCA in genesis of arrhythmias: what we already know and what is new?, *Anadolu kardiyoloji dergisi : AKD = the Anatolian journal of cardiology* 7 Suppl 1 (2007) 43-6.
- [64] F.A.C. Seara, R.A.Q. Barbosa, D.F. de Oliveira, D.L.S. Gran da Silva, A.B. Carvalho, A.C. Freitas Ferreira, J.H. Matheus Nascimento, E.L. Olivares, Administration of anabolic steroid during adolescence induces long-term cardiac hypertrophy and increases susceptibility to ischemia/reperfusion injury in adult Wistar rats, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 171 (2017) 34-42.
- [65] J.W. Bassani, R.A. Bassani, SERCA upregulation: breaking the positive feedback in heart failure?, *Cardiovasc Res* 67(4) (2005) 581-2.
- [66] L.V. Zingman, Z. Zhu, A. Sierra, E. Stepniak, C.M. Burnett, G. Maksymov, M.E. Anderson, W.A. Coetzee, D.M. Hodgson-Zingman, Exercise-induced expression of cardiac ATP-sensitive potassium channels promotes action potential shortening and energy conservation, *J Mol Cell Cardiol* 51(1) (2011) 72-81.
- [67] D.A. Brown, A.J. Chicco, K.N. Jew, M.S. Johnson, J.M. Lynch, P.A. Watson, R.L. Moore, Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat, *J Physiol* 569(Pt 3) (2005) 913-24.
- [68] G.C. Kane, X.K. Liu, S. Yamada, T.M. Olson, A. Terzic, Cardiac KATP channels in health and disease, *J Mol Cell Cardiol* 38(6) (2005) 937-43.
- [69] A.J. Chicco, M.S. Johnson, C.J. Armstrong, J.M. Lynch, R.T. Gardner, G.S. Fasen, C.P. Gillenwater, R.L. Moore, Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in the rat heart, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(5) (2007) H2432-7.
- [70] J.C. Quindry, L. Schreiber, P. Hosick, J. Wrieden, J.M. Irwin, E. Hoyt, Mitochondrial KATP channel inhibition blunts arrhythmia protection in ischemic exercised hearts, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(1) (2010) H175-83.
- [71] G. Bayat, M. Javan, F. Safari, A. Khalili, S. Shokri, M. Goudarzvand, M. Salimi, S. Hajizadeh, Nandrolone decanoate negatively reverses the beneficial effects of exercise on cardiac muscle via sarcolemmal, but not mitochondrial K(ATP) channel, *Canadian journal of physiology and pharmacology* 94(3) (2016) 324-31.
- [72] S.P. Frankenfeld, L.P. Oliveira, V.H. Ortenzi, I.C. Rego-Monteiro, E.A. Chaves, A.C. Ferreira, A.C. Leitao, D.P. Carvalho, R.S. Fortunato, The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate disrupts redox homeostasis in liver, heart and kidney of male Wistar rats, *PloS one* 9(9) (2014) e102699.

- [73] G.T. Rowe, N.H. Manson, M. Caplan, M.L. Hess, Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. Participation of the cyclooxygenase pathway, *Circulation research* 53(5) (1983) 584-91.
- [74] E. Sadowska-Krepa, B. Klapcinska, S. Jagsz, A. Sobczak, S.J. Chrapusta, M. Chalimoniuk, P. Grieb, S. Poprzecki, J. Langfort, High-dose testosterone propionate treatment reverses the effects of endurance training on myocardial antioxidant defenses in adolescent male rats, *Cardiovascular toxicology* 11(2) (2011) 118-27.
- [75] A.M. Nascimento, E.M. Lima, G.A. Brasil, I.F. Caliman, J.F. Silva, V.S. Lemos, T.U. Andrade, N.S. Bissoli, Serca2a and Na(+)/Ca(2+) exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid, *Toxicology and applied pharmacology* 301 (2016) 22-30.
- [76] B. Pergolizzi, V. Carriero, G. Abbadessa, C. Penna, P. Berchiolla, S. De Francia, E. Bracco, S. Racca, Subchronic nandrolone administration reduces cardiac oxidative markers during restraint stress by modulating protein expression patterns, *Mol Cell Biochem* 434(1-2) (2017) 51-60.
- [77] Z.A. Wood, E. Schroder, J. Robin Harris, L.B. Poole, Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends in biochemical sciences* 28(1) (2003) 32-40.
- [78] E.V. Karaduleva, E.K. Mubarakshina, M.G. Sharapov, A.E. Volkova, O.Y. Pimenov, V.K. Ravin, Y.M. Kokoz, V.I. Novoselov, Cardioprotective Effect of Modified Peroxiredoxins in Retrograde Perfusion of Isolated Rat Heart under Conditions of Oxidative Stress, *Bulletin of experimental biology and medicine* 160(5) (2016) 639-42.
- [79] S. Pahwa, R. Sharma, B. Singh, Role of Glutathione S-Transferase in Coronary Artery Disease Patients with and Without Type 2 Diabetes Mellitus, *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 11(1) (2017) BC05-BC08.
- [80] S.P. Frankenfeld, L.P. de Oliveira, D.L. Ignacio, R.G. Coelho, M.N. Mattos, A.C. Ferreira, D.P. Carvalho, R.S. Fortunato, Nandrolone decanoate inhibits gluconeogenesis and decreases fasting glucose in Wistar male rats, *The Journal of endocrinology* 220(2) (2014) 143-53.
- [81] G.D. Lopaschuk, M.A. Spafford, D.R. Marsh, Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth, *The American journal of physiology* 261(6 Pt 2) (1991) H1698-705.
- [82] S.C. Kolwicz, Jr., R. Tian, Glucose metabolism and cardiac hypertrophy, *Cardiovasc Res* 90(2) (2011) 194-201.
- [83] O. Feron, Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells, *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 92(3) (2009) 329-33.
- [84] T.A. Washington, J.M. Healey, R.W. Thompson, L.L. Lowe, J.A. Carson, Lactate dehydrogenase regulation in aged skeletal muscle: Regulation by anabolic steroids and functional overload, *Experimental gerontology* 57 (2014) 66-74.
- [85] J.T. Martins, D.J. Li, L.B. Baskin, I. Jialal, J.H. Keffer, Comparison of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for the late diagnosis of myocardial injury, *American journal of clinical pathology* 106(6) (1996) 705-8.
- [86] J.E. Adams, 3rd, V.A. Miracle, Cardiac biomarkers: past, present, and future, *American journal of critical care : an official publication, American Association of Critical-Care Nurses* 7(6) (1998) 418-23; quiz 424-5.
- [87] Y. Zhao, X. Yan, X. Li, Y. Zheng, S. Li, X. Chang, PGK1, a glucose metabolism enzyme, may play an important role in rheumatoid arthritis, *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 65(10) (2016) 815-25.
- [88] F. Molano, A. Saborido, J. Delgado, M. Moran, A. Megias, Rat liver lysosomal and mitochondrial activities are modified by anabolic-androgenic steroids, *Medicine and science in sports and exercise* 31(2) (1999) 243-50.
- [89] S. Egginton, Effects of an anabolic hormone on aerobic capacity of rat striated muscle, *Pflugers Arch* 410(4-5) (1987) 356-61.
- [90] R.J. Spina, M.M. Chi, M.G. Hopkins, P.M. Nemeth, O.H. Lowry, J.O. Holloszy, Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise, *J Appl Physiol* (1985) 80(6) (1996) 2250-4.
- [91] P.M. Siu, D.A. Donley, R.W. Bryner, S.E. Alway, Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles, *J Appl Physiol* (1985) 94(2) (2003) 555-60.
- [92] G. Hart, Exercise-induced cardiac hypertrophy: a substrate for sudden death in athletes?, *Exp Physiol* 88(5) (2003) 639-44.
- [93] R. de Cassia Cypriano Ervati Pinter, A.S. Padilha, E.M. de Oliveira, D.V. Vassallo, J.H. de Fucio Lizardo, Cardiovascular adaptive responses in rats submitted to moderate resistance training, *Eur J Appl Physiol* 103(5) (2008) 605-13.
- [94] Y. Wang, U. Wisloff, O.J. Kemi, Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy, *Physiological research* 59(5) (2010) 633-44.
- [95] U. Wisloff, O. Ellingsen, O.J. Kemi, High-intensity interval training to maximize cardiac benefits of exercise training?, *Exercise and sport sciences reviews* 37(3) (2009) 139-46.
- [96] G.C. Fan, G. Chu, E.G. Kranias, Hsp20 and its cardioprotection, *Trends in cardiovascular medicine* 15(4) (2005) 138-41.
- [97] M.O. Boluyt, J.L. Brevick, D.S. Rogers, M.J. Randall, A.F. Scalia, Z.B. Li, Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20, *Proteomics* 6(10) (2006) 3154-69.

- [98] W. Lunz, E.C. Oliveira, M.T. Neves, E.P. Fontes, C.M. Dias, A.J. Natali, Anabolic steroid- and exercise-induced cardiac stress protein (HSP72) in the rat, *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 39(7) (2006) 889-93.
- [99] H.V. Edwards, J.D. Scott, G.S. Baillie, PKA phosphorylation of the small heat-shock protein Hsp20 enhances its cardioprotective effects, *Biochem Soc Trans* 40(1) (2012) 210-4.
- [100] D.S. Latchman, Heat shock proteins and cardiac protection, *Cardiovasc Res* 51(4) (2001) 637-46.
- [101] J.G. Burniston, E.P. Hoffman, Proteomic responses of skeletal and cardiac muscle to exercise, *Expert review of proteomics* 8(3) (2011) 361-77.
- [102] B. Kalmar, L. Greensmith, Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress, *Advanced drug delivery reviews* 61(4) (2009) 310-8.
- [103] J.P. Morton, A.C. Kayani, A. McArdle, B. Drust, The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans, *Sports medicine* 39(8) (2009) 643-62.
- [104] B. Gonzalez, R. Hernando, R. Manso, Anabolic steroid and gender-dependent modulation of cytosolic HSP70s in fast- and slow-twitch skeletal muscle, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 74(1-2) (2000) 63-71.

8. APÊNDICE



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



São Paulo, 21 de abril de 2014
CEUA N 4462310114

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Patrícia Sousa Dantas
Depto/Disc: Nefrologia/medicina Translacional
Tatiana De Sousa Da Cunha Uchiyama (orientador)

Título do projeto: "Análise Proteômica dos Efeitos do Esteróide Anabólico Nandrolona Associado ao Treinamento Físico Resistido de Alta Intensidade sobre o Tecido Cardíaco de Ratos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

O exercício físico, como já bem estabelecido, promove adaptações que contribuem para a melhora das funções fisiológicas, principalmente no sistema cardiovascular. No entanto, sabe-se também que quando o treinamento físico é mal prescrito muitos problemas podem ser desencadeados, desde lesões agudas a efeitos mais sérios irreversíveis, como a morte súbita. Além disso, é muito comum a utilização de esteroides anabólicos androgênicos (EAA) associado ao treinamento por parte de atletas e não-atletas para incrementar o ganho de massa muscular, mas nos últimos anos, devido a inúmeros episódios de disfunções cardíacas e morte ocasionada pelo uso indiscriminado destas substâncias, diversas pesquisas têm se dedicado a estudar os efeitos colaterais destas substâncias.

Com o objetivo de avaliar a modulação de um protocolo de treinamento físico resistido de alta intensidade sobre a expressão das proteínas do tecido cardíaco, associado ao uso de EAA, ratos Wistar machos serão aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais: treinado + veículo (TV), treinado + anabolizante (TN), sedentário + veículo (SV) e sedentário + anabolizante (SN). Os animais do grupo T serão submetidos a um protocolo de treinamento de salto em meio líquido, durante 6 semanas, associado ou não à injeções de decanoato de nandrolona. Após esse período, os animais serão sacrificados e terão seus corações isolados para posterior análise proteômica através de UPLC-MSE e dosagem de angiotensinas, e o plasma será submetido à análises de catecolaminas.

A análise do perfil proteico dos grupos deste protocolo experimental visa estudar o potencial deletério do uso de esteroides anabólicos androgênicos, associado ou não ao treinamento físico de alta intensidade, através da identificação de proteínas e vias específicas envolvidas na má-adaptação do tecido cardíaco para, desta forma, identificar possíveis marcadores para diagnóstico da hipertrofia patológica.

ANIMAIS:

Serão utilizados:

20 Ratos heterogênicos, Machos, idade: 2 meses

Procedência: CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica) da Universidade Estadual de Campinas

Manutenção: Biotério da Disciplina de Nefrologia, Departamento de Medicina, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo

VIGÊNCIA DO ESTUDO:

início previsto para: Fevereiro/2014 com término previsto para: Dezembro/2017

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 17/04/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Tabela 1. Termo de acesso da base UniProt e descrição das proteínas identificadas através de UPLC-MSE, tanto sub quanto superexpressas, no ventrículo esquerdo de ratos treinados + nandrolona comparados com ratos não treinados + veículo, após 6 semanas de tratamento e/ou tratamento com nandrolona. As proteínas foram classificadas e classificadas de acordo com o processo biológico.

Subexpressas TN:NTV

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. GLICÓLISE				
PGAM2_RAT	Fosfoglicerato mutase 2	28926.19	9	0.925
ALDR_RAT	Aldose redutase	36253.55	6	0.929
2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS				
FABPH_RAT	Proteína ligadora de ácidos graxos no coração	14774.73	10	0.901
3. CADEIA RESPIRATÓRIA				
KCRM_RAT	Creatina quinase tipo M	43273.16	18	0.900
ATP5J_RAT	ATP sintase fator acoplador 6 mitocondrial	12494.45	3	0.936
4. CICLO DE KREBS				
MDHM_RAT	Malato desidrogenase mitocondrial	36139.83	15	0.690
5. HEAT SHOCKS				
CH10_RAT	Proteína <i>heat shock</i> de 10 kDa mitocondrial	10901.68	4	0.965
6. ANTIOXIDANTE				
PRDX2_RAT	Peroxirredoxina 2	21954.79	6	0.840
PRDX3_RAT	Tiorredoxina redutase dependente de peróxido	28580.55	7	0.857

7. TRANSPORTE

ALBU_RAT	Albumina sérica	70726.83	47	0.841
TRFE_RAT	Serotransferrina	78562.28	31	0.718
HBA_RAT	Hemoglobina subunidade alfa 1 2	15499.64	8	0.572
HBB2_RAT	Hemoglobina subunidade beta 2	16096.51	9	0.906
MYG_RAT	Mioglobina	17213.88	12	0.738
HBB1_RAT	Hemoglobina subunidade beta 1	16093.47	11	0.753

8. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

AATM_RAT	Aspartato aminotransferase mitocondrial	47713.56	16	0.721
----------	---	----------	----	-------

9. METABOLISMO DO GÁS CARBÔNICO

CAH1_RAT	Anidrase carbônica 1	28356.68	8	0.669
----------	----------------------	----------	---	-------

10. INFLAMAÇÃO

PEBP1_RAT	Proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1	20915.47	7	0.909
-----------	--	----------	---	-------

11. TRADUÇÃO

RL40_RAT	Proteína ubiquitina 60S ribossomal L40	15013.47	5	0.762
----------	--	----------	---	-------

Superexpressas TN:NTV

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. GLICÓLISE				
TPIS_RAT	Triosefosfato isomerase	27362.18	10	1.131

ALDOA_RAT	Frutose bisfosfato aldolase A	39808.20	12	1.038
LDHA_RAT	L lactato desidrogenase de cadeia A	36735.70	6	1.013
ODP2_RAT	Diidrolipoil lisina acetiltransferase	67679.19	5	1.690
G3P_RAT	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	36113.20	9	1.485
LDHB_RAT	L lactato desidrogenase de cadeia B	36897.58	11	1.580

2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS

ACOT2_RAT	Acil coenzima A tioesterase 2 mitocondrial	49986.38	4	1.106
FABP4_RAT	Proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito	14822.06	4	1.449
ACADL_RAT	Acil CoA desidrogenase específica de cadeia longa	48272.14	10	1.961

3. CADEIA RESPIRATÓRIA

ATPB_RAT	ATP sintase subunidade beta mitocondrial	56353.65	21	1.738
KCRS_RAT	Creatina quinase tipo S mitocondrial	47841.56	12	1.336
QCR2_RAT	Citoromo b c1 subunidade 2 mitocondrial	48453.27	4	1.435
ADT1_RAT	ADP ATP translocase 1	33217.59	9	1.775
ATPA_RAT	ATP sintase subunidade alfa mitocondrial	59867.78	16	1.598
COX5A_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 5A mitocondrial	16357.66	5	1.840
ATPD_RAT	ATP sintase subunidade delta mitocondrial	17595.10	3	1.726
COX41_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 4 isoforma 1	19571.63	2	2.090
ETFB_RAT	Flavoproteína tranferidora de elétron subunidade beta	27915.57	3	1.778
UCRI_RAT	Citocromo b c1 subunidade Rieske mitocondrial	29730.88	5	1.637

4. CICLO DE KREBS

MDHC_RAT	Malato desidrogenase citoplasmática	36654.26	14	1.142
ACON_RAT	Aconitato hidratase mitocondrial	86174.90	21	1.096
IDHP_RAT	Isocitrato desidrogenase NADP mitocondrial	51423.61	12	1.224

5. HEAT SHOCKS

HSP7C_RAT	Proteína <i>heat shock</i> cognate de 71 kDa	71099.28	10	1.207
-----------	--	----------	----	-------

6. ANTIOXIDANTE

PRDX5_RAT	Peroxirredoxina 5 mitocondrial	22520.88	7	1.072
-----------	--------------------------------	----------	---	-------

7. ESTRUTURAL

MYL3_RAT	Miosina de cadeia leve 3	22270.31	3	2.270
----------	--------------------------	----------	---	-------

8. TRANSPORTE

AT2A2_RAT	Retículo sarcoplasmático de cálcio	116422.00	7	1.703
-----------	------------------------------------	-----------	---	-------

9. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

AATC_RAT	Aspartato aminotransferase citoplasmática	46656.91	20	1.272
----------	---	----------	----	-------

10. INFLAMAÇÃO

LEG1_RAT	Galectina 1	15199.03	2	1.353
----------	-------------	----------	---	-------

Exclusivas nesta comparação NTV:TN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
-----------------	-----------	------------	-------------------------

1. GLICÓLISE

PGK1_RAT	Fosfoglicerato quinase 1	44937.75	6
G6PI_RAT	Glicose 6 fosfato isomerase	62998.21	10
PGAM1_RAT	Fosfoglicerato mutase 1	28946.09	8

2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS

ECHM_RAT	Enoil CoA hidratase mitocondrial	31915.66	3
----------	----------------------------------	----------	---

3. CADEIA RESPIRATÓRIA

CYC_RAT	Citocromo c somático	11719.52	4
ATPO_RAT	ATP sintase subunidade O mitocondrial	23454.63	5
4. CICLO DE KREBS			
CISY_RAT	Citrato sintase mitocondrial	52209.04	5
SCOT1_RAT	Succinil CoA 3 cetoácido coenzima A transferase	56660.18	9
ODO2_RAT	Diidrolipoil lisina succiniltransferase	49267.63	3
5. HEAT SHOCKS			
GRP75_RAT	Proteína <i>heat shock</i> de 70 kDa mitocondrial	74142.98	9
5. ANTIOXIDANTE			
PRDX6_RAT	Peroxirredoxina 6	24875.66	7
GSTM2_RAT	Glutathione S transferase Mu 2	25873.77	4
6. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO			
SPRE_RAT	Sepiapterina redutase	28527.57	2
7. METABOLISMO DO GÁS CARBÔNICO			
CAH2_RAT	Anidrase carbônica 2	29284.93	6
8. ESTRUTURAL			
PROF1_RAT	Profilina 1	15128.34	3
9. METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEO			
NDKB_RAT	Nucleosídeo difosfato quinase B	17397.07	7

Exclusivas nesta comparação TN:NTV

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
1. GLICÓLISE			
ENOB_RAT	Beta enolase	47356.14	6
2.CADEIA RESPIRATÓRIA			
COX2_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 2	26113.48	3
NDUS1_RAT	NADH ubiquinona oxidoreductase subunidade de 75 kDa	80381.96	5
CX7A2_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 7A2 mitocondrial	9353.01	1
QCR1_RAT	Citocromo b c1 subunidade 1 mitocondrial	53533.18	6
3. ESTRUTURAL			
ACTC_RAT	Alfa actina de músculo cardíaco 1	42361.25	14

Tabela 2. Termo de acesso da base UniProt e descrição das proteínas identificadas através de UPLC-MSE, tanto sub quanto superexpressas, no ventrículo esquerdo de ratos treinados + veículo comparado com ratos não-treinado + nandrolona, após 6 semanas de tratamento e/ou tratamento com nandrolona. As proteínas foram classificadas e classificadas de acordo com o processo biológico.

Subexpressas TV:NTN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. GLICÓLISE				
PYGM_RAT	Glicogênio fosforilase forma muscular	97786.86	6	0.780
PGAM2_RAT	Fosfoglicerato mutase 2	28926.19	9	0.928
2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS				
ECHM_RAT	Enoil CoA hidratase mitocondrial	31915.66	3	0.551
3. CADEIA RESPIRATÓRIA				
ETFB_RAT	Flavoproteína transferidora de elétron subunidade beta	27915.57	3	0.824
UCRI_RAT	Citocromo b c1 subunidade Rieske mitocondrial	29730.88	5	0.992
4. CICLO DE KREBS				
SCOT1_RAT	Succinil CoA 3 cetoácido coenzima A transferase	56660.18	9	0.895
MDHM_RAT	Malato desidrogenase mitocondrial	36139.83	15	0.814
ACON_RAT	Aconitato hidratase mitocondrial	86174.90	21	0.841
MDHC_RAT	Malato desidrogenase citoplasmática	36654.26	14	0.936
5. HEAT SHOCKS				
CH10_RAT	Proteína <i>heat shock</i> de 10 kDa mitocondrial	10901.68	4	0.985

6. ANTIOXIDANTE

PRDX3_RAT	Tiorredoxina redutase dependente de peróxido	28580.55	7	0.764
-----------	--	----------	---	-------

7. TRANSPORTE

HBA_RAT	Hemoglobina subunidade alfa 1 2	15499.64	8	0.550
HBB2_RAT	Hemoglobina subunidade beta 2	16096.51	9	0.450
HBB1_RAT	Hemoglobina subunidade beta 1	16093.47	11	0.584
ALBU_RAT	Albumina sérica	70726.83	47	0.893

8. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

AATM_RAT	Aspartato aminotransferase mitocondrial	47713.56	16	0.686
----------	---	----------	----	-------

9. METABOLISMO DO GÁS CARBÔNICO

CAH2_RAT	Anidrase carbônica 2	29284.93	6	0.680
CAH1_RAT	Anidrase carbônica 1	28356.68	8	0.733

Superexpressas TV:NTN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. GLICÓLISE				
LDHA_RAT	L lactato desidrogenase cadeia A	36735.70	6	1.010
ODP2_RAT	Diidrolipoil lisina acetiltransferase	67679.19	5	1.592
TPIS_RAT	Triosefosfato isomerase	27362.18	10	1.262
G3P_RAT	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	36113.20	9	1.001
ALDR_RAT	Aldose redutase	36253.55	6	1.057
LDHB_RAT	L lactato desidrogenase cadeia B	36897.58	11	1.221

2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS

FABP4_RAT	Proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito	14822.06	4	1.221
ACADL_RAT	Acil CoA desidrogenase específica de cadeia longa	48272.14	10	1.362
FABPH_RAT	Proteína ligadora de ácidos graxos no coração	14774.73	10	1.042

3. CADEIA RESPIRATÓRIA

ATPB_RAT	ATP sintase subunidade beta mitocondrial	56353.65	21	1.084
KCRS_RAT	Creatina quinase tipo S mitocondrial	47841.56	12	1.111
ADT1_RAT	ADP ATP translocase 1	33217.59	9	1.250
COX2_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 2	26113.48	3	1.555
ATPA_RAT	ATP sintase subunidade alfa mitocondrial	59867.78	16	1.185
ATPO_RAT	ATP sintase subunidade O mitocondrial	23454.63	5	1.232
ATPD_RAT	ATP sintase subunidade delta mitocondrial	17595.10	3	1.202
QCR1_RAT	Citocromo b c1 subunidade 1 mitocondrial	53533.18	6	1.439
KCRM_RAT	Creatina quinase tipo M	43273.16	18	1.020

4. CICLO DE KREBS

CISY_RAT	Citrato sintase mitocondrial	52209.04	5	1.697
IDHP_RAT	Isocitrato desidrogenase NADP mitocondrial	51423.61	12	1.215

5. ANTIOXIDANTE

SODC_RAT	Superóxido dismutase Cu Zn	16082.77	7	1.006
PRDX5_RAT	Peroxirredoxina 5 mitocondrial	22520.88	7	1.138
PRDX2_RAT	Peroxirredoxina 2	21954.79	6	1.064

6. TRANSPORTE

AT2A2_RAT	Retículo sarcoplasmático de cálcio	116422.00	7	1.084
MYG_RAT	Mioglobina	17213.88	12	1.204

7. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

AATC_RAT	Aspartato aminotransferase citoplasmática	46656.91	20	1.154
----------	---	----------	----	-------

8. INFLAMAÇÃO

A1AT_RAT	Alpha 1 antiproteinase	46306.99	5	1.038
----------	------------------------	----------	---	-------

PEBP1_RAT	Proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1	20915.47	7	1.046
-----------	--	----------	---	-------

Exclusivas nesta comparação TV:NTN

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
-----------------	-----------	------------	-------------------------

1. GLICÓLISE

ENOB_RAT	Beta enolase	47356.14	6
----------	--------------	----------	---

PGAM1_RAT	Fosfoglicerato mutase 1	28946.09	8
-----------	-------------------------	----------	---

PGK1_RAT	Fosfoglicerato quinase 1	44937.75	6
----------	--------------------------	----------	---

2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS

ACOT2_RAT	Acil coenzima A tioesterase 2 mitocondrial	49986.38	4
-----------	--	----------	---

3. CADEIA RESPIRATÓRIA

CYC_RAT	Citocromo c somático	11719.52	4
---------	----------------------	----------	---

CX7A2_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 7A2 mitocondrial	9353.01	1
-----------	---	---------	---

QCR2_RAT	Citocromo b c1 complex subunidade 2 mitocondrial	48453.27	4
----------	--	----------	---

COX5A_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 5A mitocondrial	16357.66	5
-----------	--	----------	---

COX41_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 4 isoforma 1	19571.63	2
-----------	---	----------	---

ATP5J_RAT	ATP sintase fator acoplador 6 mitocondrial	12494.45	3
-----------	--	----------	---

NDUS1_RAT	NADH ubiquinona oxidoreductase subunidade de 75 kDa	80381.96	5
-----------	---	----------	---

4. CICLO DE KREBS

ODO2_RAT	Diidrolipoil lisina succiniltransferase	49267.63	3
----------	---	----------	---

5. HEAT SHOCKS

GRP75_RAT	Proteína <i>heat shock</i> de 70 kDa mitocondrial	74142.98	9
HSP7C_RAT	Proteína <i>heat shock</i> cognato de 71 kDa	71099.28	10

6. ANTIOXIDANTE

GSTM2_RAT	Glutathione S transferase Mu 2	25873.77	4
PARK7_RAT	Proteína DJ 1	20202.33	3
PRDX6_RAT	Peroxirredoxina 6	24875.66	7

7. ESTRUTURAL

MYL3_RAT	Miosina de cadeia leve 3	22270.31	3
VINC_RAT	Vinculina	117185.81	9
ACTC_RAT	Alfa actina de músculo cardíaco 1	42361.25	14

8. INFLAMAÇÃO

LEG1_RAT	Galectina 1	15199.03	2
A1I3_RAT	Alfa 1 inibidor 3	62998.21	6

9. METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEO

NDKB_RAT	Nucleosídeo difosfato quinase B	17397.07	7
----------	---------------------------------	----------	---

10. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

SPRE_RAT	Sepiapterina reductase	28527.57	2
----------	------------------------	----------	---

Tabela 3. Termo de acesso da base UniProt e descrição das proteínas identificadas através de UPLC-MSE, tanto sub quanto superexpressas, no ventrículo esquerdo de ratos treinados + veículo comparado com ratos não treinados + veículo, após 6 semanas de tratamento e/ou tratamento com nandrolona. As proteínas foram classificadas e classificadas de acordo com o processo biológico.

Subexpressas TV:NTV

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. CICLO DE KREBS				
MDHM_RAT	Malato desidrogenase mitocondrial	36139.83	15	0.815
SCOT1_RAT	Succinil CoA 3 cetoácido coenzima A transferase	56660.18	9	0.900
2. CADEIA RESPIRATÓRIA				
CYC_RAT	Citocromo c somático	11719.52	4	0.710
ATP5J_RAT	ATP sintase fator acoplador 6 mitocondrial	12494.45	3	0.982
3. TRANSPORTE				
ALBU_RAT	Albumina sérica	70726.83	47	0.934
TRFE_RAT	Serotransferrina	78562.28	31	0.797
HBA_RAT	Hemoglobina subunidade alfa 1 2	15499.64	8	0.538
HBB2_RAT	Hemoglobina subunidade beta 2	16096.51	9	0.671
HBB1_RAT	Hemoglobina subunidade beta 1	16093.47	11	0.700
4. HEAT SHOCKS				
GRP75_RAT	Proteína <i>heat shock</i> de 70 kDa mitocondrial	74142.98	9	0.189
5. ESTRUTURAL				
VINC_RAT	Vinculina	117185.81	9	0.824

6. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO

AATM_RAT	Aspartato aminotransferase mitocondrial	47713.56	16	0.660
----------	---	----------	----	-------

7. METABOLISMO DO GÁS CARBÔNICO

CAH2_RAT	Anidrase carbônica 2	29284.93	6	0.631
CAH1_RAT	Anidrase carbônica 1	28356.68	8	0.808

8. TRADUÇÃO

RL40_RAT	Proteína ubiquitina 60S ribossomal L40	15013.47	5	0.867
----------	--	----------	---	-------

9. INFLAMAÇÃO

A1AT_RAT	Alfa 1 antiproteinase	46306.99	5	0.988
----------	-----------------------	----------	---	-------

10. METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEO

NDKB_RAT	Nucleosídeo difosfato quinase B	17397.07	7	0.670
----------	---------------------------------	----------	---	-------

Superexpressas TV:NTV

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados	Razão (ng)
1. GLICÓLISE				
PGAM2_RAT	Fosfoglicerato mutase 2	28926.19	9	1.016
ODP2_RAT	Diidrolipoil lisina acetiltransferase	67679.19	5	2.242
TPIS_RAT	Triosefosfato isomerase	27362.18	10	1.336
G3P_RAT	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	36113.20	9	1.787
PGAM1_RAT	Fosfoglicerato mutase 1	28946.09	8	1.518

PGK1_RAT	Fosfoglicerato quinase 1	44937.75	6	1.900
ALDR_RAT	Aldose redutase	36253.55	6	1.238
LDHB_RAT	L lactato desidrogenase de cadeia B	36897.58	11	1.774
ALDOA_RAT	Frutose bisfosfato aldolase A	39808.20	12	1.234
LDHA_RAT	L lactato desidrogenase de cadeia A	36735.70	6	1.505

2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS

ECHM_RAT	Enoil CoA hidratase mitocondrial	31915.66	3	1.195
FABP4_RAT	Proteína ligadora de ácidos graxos no adipócito	14822.06	4	1.410
ACADL_RAT	Acil CoA desidrogenase específica de cadeia longa	48272.14	10	2.154
ACOT2_RAT	Acil coenzima A tioesterase 2 mitocondrial	49986.38	4	1.595

3. CADEIA RESPIRATÓRIA

ATPB_RAT	ATP sintase subunidade beta mitocondrial	56353.65	21	1.768
KCRS_RAT	Creatina quinase tipo S mitocondrial	47841.56	12	1.411
QCR2_RAT	Citocromo b c1 subunidade 2 mitocondrial	48453.27	4	1.854
ADT1_RAT	ADP ATP translocase 1	33217.59	9	2.563
ATPA_RAT	ATP sintase subunidade alfa mitocondrial	59867.78	16	2.385
COX5A_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 5A mitocondrial	16357.66	5	2.024
ATPO_RAT	ATP sintase subunidade O mitocondrial	23454.63	5	2.234
ATPD_RAT	ATP sintase subunidade delta mitocondrial	17595.10	3	1.600
COX41_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 4 isoform 1	19571.63	2	2.031
ETFB_RAT	Flavoproteína transferidora de elétrons subunidade beta	27915.57	3	1.334
KCRM_RAT	Creatina quinase tipo M	43273.16	18	1.251
UCRI_RAT	Citocromo b c1 subunidade Rieske	29730.88	5	1.683

4. CICLO DE KREBS

CISY_RAT	Citrato sintase mitocondrial	52209.04	5	1.288
MDHC_RAT	Malate desidrogenase citoplasmática	36654.26	14	1.315
ACON_RAT	Aconitato hidratase mitocondrial	86174.90	21	1.179
IDHP_RAT	Isocitrato desidrogenase NADP mitocondrial	51423.61	12	1.899

ODO2_RAT	Diidrolipoil lisina succiniltransferase	49267.63	3	1.395
5. HEAT SHOCKS				
HSP7C_RAT	Proteína <i>heat shock</i> cognate de 71 kDa	71099.28	10	1.346
CH10_RAT	Proteína <i>heat shock</i> de 10 kDa mitocondrial	10901.68	4	1.147
6. ANTIOXIDANTE				
PRDX5_RAT	Peroxirredoxina 5 mitocondrial	22520.88	7	1.455
GSTM2_RAT	Glutathione S transferase Mu 2	25873.77	4	1.403
SODC_RAT	Superóxido dismutase Cu Zn	16082.77	7	0.508
PARK7_RAT	Proteína DJ 1	20202.33	3	1.076
7. ESTRUTURAL				
MYL3_RAT	Miosina de cadeia leve 3	22270.31	3	1.433
PROF1_RAT	Profilina 1	15128.34	3	1.167
8. TRANSPORTE				
AT2A2_RAT	Retículo sarcoplasmático de cálcio	116422.00	7	2.207
MYG_RAT	Mioglobina	17213.88	12	1.129
HEMO_RAT	Hemopexina	52092.35	12	1.085
9. METABOLISMO DE AMINOÁCIDO				
AATC_RAT	Aspartato aminotransferase citoplasmática	46656.91	20	1.440
10. INFLAMAÇÃO				
PEBP1_RAT	Proteína ligadora de fosfatidiletanolamina 1	20915.47	7	1.127
A1I3_RAT	Alfa 1 inibidor 3	165142.21	6	1.417
LEG1_RAT	Galectina 1	15199.03	2	1.400

Exclusivas nesta comparação TV:NTV

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
1. GLICÓLISE			
ENOB_RAT	Beta enolase	47356.14	6
PYGM_RAT	Glicogênio fosforilase isoforma muscular	97786.86	6
ODPB_RAT	Piruvato desidrogenase subunidadeE1	39324.39	7
2. CADEIA RESPIRATÓRIA			
COX2_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 2	26113.48	3
NDUS1_RAT	NADH ubiquinona oxidoreductase subunidade 75 kDa	80381.96	5
CX7A2_RAT	Citocromo c oxidase subunidade 7A2 mitocondrial	9353.01	1
QCR1_RAT	Citocromo b c1 subunidade 1 mitocondrial	53533.18	6
3. ESTRUTURAL			
ACTC_RAT	Alfa actina de músculo cardíaco 1	42361.25	14

Exclusivas nesta comparação NTV:TV

Termo de acesso	Descrição	Massa (Da)	Peptídeos identificados
1. GLICÓLISE			
G6PI_RAT	Glicose 6 fosfato isomerase	62998.21	10