UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

TREINAMENTO DE FORÇA COM OCLUSÃO VASCULAR: ADAPTAÇÕES
NEUROMUSCULARES E MOLECULARES

Gilberto Cândido Laurentino

SÃO PAULO
2010

TREINAMENTO DE FORÇA COM OCLUSÃO VASCULAR: ADAPTAÇÕES
NEUROMUSCULARES E MOLECULARES

Gilberto Cândido Laurentino

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Educação Física.

ORIENTADOR PROF. DR. VALMOR ALBERTO AUGUSTO TRICOLI

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos se estendem a todos que de alguma forma contribuíram na conquista de mais um desafio da minha vida acadêmica e pessoal.

Primeiramente, agradeço à minha esposa Kátia, minha companheira inseparável à quase vinte anos. Sempre me incentivou e acreditou que este sonho seria concretizado. Obrigado pela paciência e dedicação principalmente na reta final do processo de doutorado.

Ao Prof. Dr. Valmor, sempre muito cauteloso e seguro nas suas orientações. Obrigado pela oportunidade e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos, sempre disposto a colaborar com suas críticas altamente construtivas. Agradeço muito à sua colaboração.

Aos membros do Gepan: Barroso, Hamilton, Lilian, Edu, Lucas, Anderson, Léo. Vocês são muito especiais.

Ao Mauro, grande amigo e companheiro. Nunca se negou a ajudar quando precisei. Você merece um lugar de destaque nos agradecimentos.

À Universidade Paulista, que cedeu o espaço para realização da pesquisa. Muito obrigado a todos!

Aos alunos do Curso de Educação Física do Campus Tatuapé da UNIP, que colaboraram e se dedicaram para o desenvolvimento do estudo. Bendita AACCs.

Aos Prof.s Drs. Marcelo Saldanha e Anselmo Moriscot, pela colaboração na construção do projeto e nas análises moleculares.

Aos meus colegas da FIG, obrigado pelo incentivo e a amizade de todos.

Ao Fabiano, Sarah e a Carla, pelo auxílio nos treinamentos dos alunos. Sempre foram prestativos na condução do estudo.

Ao meu pai, que se estivesse aqui, com certeza ficaria muito feliz em compartilhar este momento.

À minha mãe, Dona Maria, que lutou como uma guerreira para que tivéssemos uma boa educação e uma vida digna.

Aos meus familiares e da minha esposa, obrigado pelo incentivo.

Aos meus colegas do Ladesp, Nilo, Edson, Rumenig, Salomão, pela ajuda nas coletas.

Ao Dr. Manoel Neves, meu colega de Recife que conduziu as biópsias dos nossos alunos com muita competência.

Ao Dr. André Aihara e o Dr. Artur Fernandes do laboratório Diagnóstico das Américas/DASA, pela colaboração na confecção das imagens de ressonância magnética para o estudo.

A todos, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

Página

	LISTA DE TABELAS	vii
	LISTA DE FIGURAS.....	viii
	LISTA DE ABREVIACÕES.....	ix
	LISTA DE ANEXOS.....	xi
	RESUMO.....	xii
	ABSTRACT	xiii
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	5
2.1	Objetivo geral	5
2.2	Objetivo específico	6
3	REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1	Efeito agudo e crônico do treinamento de força com oclusão vascular na ativação muscular.....	6
3.2	Adaptações neuromusculares ao treinamento de força com oclusão vascular.....	9
3.3	Mecanismos intracelulares de modulação da massa muscular.....	13
3.3.1	Mecanismos envolvidos na modulação da massa muscular pela via de sinalização do insulin-like growth factor 1 (IGF-1) e da miostatina.....	14
3.3.2	Mecanismo de ação dos agonistas e antagonistas da MSTN	17
3.3.3	Efeito do treinamento de força nos genes agonistas e antagonistas da MSTN	22
3.3.4	Sinalização intracelular mediada pela hipóxia e as respostas ao treinamento de força com oclusão vascular	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28

4.1	Amostra	28
4.2	Procedimentos experimentais	29
4.3	Medida da área de secção transversa muscular (AST).....	29
4.4	Biópsia muscular	30
4.5	Sessões de Familiarização.....	31
4.6	Teste de força dinâmica máxima (1RM) no exercício extensão dos joelhos	31
4.7	Determinação da pressão de oclusão vascular de treinamento	32
4.8	Programa de treinamento de força	33
4.9	Análise molecular (expressão gênica).....	33
4.9.1	Extração do RNA.....	33
4.9.2	RT-PCR.....	34
4.9.3	Método de detecção da expressão gênica em tempo real	34
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
6	RESULTADOS	36
6.1	Força dinâmica máxima no exercício extensão dos joelhos.....	36
6.2	Área de secção transversa (AST) do quadríceps femoral	37
6.3	Expressão gênica da miostatina (MSTN)	39
6.4	Expressão gênica dos receptores Activina IIB	40
6.5	Expressão gênica da proteína SMAD-7	41
6.6	Expressão gênica da FLST-3	42
6.7	Expressão gênica da GASP-1	43
7	DISCUSSÃO	44
8	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	ANEXO I - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	63

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Características físicas dos indivíduos dos grupos BI, BIO e AI.....	29
TABELA 2 - Sequência de iniciadores (primers) utilizados para amplificação dos genes da proteína MSTN, receptores activina IIB, proteínas SMAD-7, FLST-3 e GASP-1.....	35
TABELA 3 - Valores absolutos de força dinâmica máxima (1RM) no exercício de extensão de joelhos dos grupos BI, BIO e AI.....	37
TABELA 4 - Valores de área de secção transversa do quadríceps femoral para os grupos BI, BIO e AI.	38

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Representação esquemática dos eventos intracelulares de ativação e inibição do crescimento muscular mediados pelo IGF-1 e a miostatina.....	16
FIGURA 2 - Diferentes ações da FLST e da FLST-3 neutralizando a ação da activina.....	19
FIGURA 3 - Inibição da atividade da MSTN pela ligação extracelular com pró-peptídeo, FLST, FLST-3 e GASP-1	21
FIGURA 4 - Regulação da proteína mTOR sob condições de baixo nível energético e hipóxia.....	26
FIGURA 5 - Percentual de mudança na força dinâmica máxima (1RM) no exercício extensão de joelhos nos grupos BI, BIO e AI.	38
FIGURA 6 - Percentual de mudança na área de secção transversa (AST) do músculo quadríceps femoral nos grupos BI, BIO e AI.	39
FIGURA 7 - Expressão gênica da miostatina nos grupos BI, BIO e AI.....	40
FIGURA 8 - Expressão gênica dos receptores Activina IIB nos grupos BI, BIO e AI	41
FIGURA 9 - Expressão gênica da SMAD-7 nos grupos BI, BIO e AI.	42
FIGURA 10 - Expressão gênica da FLST-3 nos grupos BI, BIO e AI.	43
FIGURA 11 - Expressão gênica da GASP-1 nos grupos BI, BIO e AI.....	44

LISTA DE ABREVIACÕES

AST	Área de secção transversa
Akt	Proteína Akt
AMPK	AMP-activated protein kinase
Cdk1/2	Cyclin-dependent kinase 1 e 2
CVM	Contração voluntária máxima
DNA	Deoxyribonucleic acid
eIF-2B	Eukaryotic translation initiation factor 2B
eIF-4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
FLST	Folistatina
FLST-3	Follistatin-like-3
FLST288	Folistatina 288
FLST315	Folistatina 315
FLST303	Folistatina 303
FLRG	Follistatin related gene
GASP-1	Growth and differentiation factor-associated serum protein-1
GDF8	Growth differentiation factor 8
GH	Growth hormone
GSK3 β	Glycogen-synthase kinase 3 β
GC	Grupo controle
G20	Grupo 20% de uma repetição máxima sem oclusão
GO20	Grupo 20% de uma repetição máxima com oclusão
G40	Grupo 40% de uma repetição máxima sem oclusão
GO40	Grupo 40% de uma repetição máxima com oclusão
G50	Grupo 50% de uma repetição máxima sem oclusão
GO50	Grupo 50% de uma repetição máxima com oclusão
G80	Grupo 80% de uma repetição máxima sem oclusão
GO80	Grupo 80% de uma repetição máxima com oclusão

HIF-1	Hypoxia inducible factor
IGF-1	Insulin like growth factor 1
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
MADs	Mothers against decapentaplegic
MGF	Mechano growth factor
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MSTN	Proteína miostatina
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MyoD	Myogenic differentiation factor D
PDK-1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PHAS-1	Phosphorylated heat- and acid-stable protein
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PKB	Protein kinase B
PKC α	Protein kinase C alpha
PPA	Potencial pós-ativação
p21	Proteína p21
p70S6K1	p70S6 kinase 1
REDD-1	Reducing emissions from deforestation and forest degradation
rpS6	Ribosomal protein 6
Ser9	Serina 9
Ser473	Serina 473
Smad2/3	Mothers against decapentaplegic 2 e 3
SMAD-7	Mothers against decapentaplegic 7
S6K1	S6 kinase 1
TF	Treinamento de força
TFOV	Treinamento de força com oclusão vascular
TGF- β	Transforming growth factor β
TFCr	Treinamento de força creatina
TFPL	Treinamento de força placebo
TSC1/2	Tuberous sclerosis complex 1 e 2
UMs	Unidades motoras
VEGF	Vascular endothelial growth factor

LISTA DE ANEXOS

Página

ANEXO I -	Termo de consentimento livre e esclarecido.....	63
-----------	---	----

RESUMO

TREINAMENTO DE FORÇA COM OCLUSÃO VASCULAR: ADAPTAÇÕES
NEUROMUSCULARES E MOLECULARES

Autor: GILBERTO CÂNDIDO LAURENTINO

Orientador: PROF. DR. VALMOR ALBERTO AUGUSTO TRICOLI

Estudos têm mostrado que o treinamento de força de baixa intensidade com oclusão vascular (TFOV) tem apresentado resultados similares nos ganhos de força e hipertrofia comparado ao treinamento de força (TF) de alta intensidade. O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos de três diferentes programas de TF nos ganhos de força e hipertrofia musculares e na expressão da miostatina (MSTN) e seus antagonistas. Para isso, vinte e nove jovens do sexo masculino, sem experiência em TF, foram recrutados e divididos randomicamente nos grupos: treinamento de força de baixa intensidade sem oclusão (BI), treinamento de força de baixa intensidade com oclusão (BIO) e treinamento de força de alta intensidade sem oclusão (AI). Os grupos BIO e BI treinaram com intensidade de 20% 1RM, enquanto o grupo AI treinou com intensidade de 80% 1RM. A ANOVA one way foi utilizada para testar as diferenças percentuais nos ganhos de força (1RM) e na área de secção transversa (AST) do músculo quadríceps femoral. O modelo misto para análise das medidas repetidas foi utilizado para testar as diferenças nas variáveis miostatina (MSTN), folistatina-3 (FLST-3), SMAD-7 e GASP-1 nos grupos BI, BIO e AI nas condições pré e pós-treinamento. Os resultados mostraram que os aumentos de força e hipertrofia musculares nos grupos BIO e AI foram similares, entretanto superiores ao grupo BI. Esses resultados podem ser atribuídos a maior diminuição na expressão da MSTN nos grupos BIO (45%) e AI (41%) comparados com o grupo BI (16%) e o aumento na expressão dos genes que antagonizam sua atividade (SMAD-7, FLST-3 e GASP-1). Podemos concluir que a inibição na atividade da MSTN dos grupos BIO e AI podem responder em parte a similaridade nos ganhos de força e hipertrofia entre os grupos e a diferença para o grupo BI.

Palavras-chave: hipertrofia, biópsia, miostatina

ABSTRACT

STRENGTH TRAINING AND VASCULAR OCCLUSION: NEUROMUSCULAR AND MOLECULAR ADAPTATIONS

Author: GILBERTO CÂNDIDO LAURENTINO

Adviser: PROFESSOR VALMOR ALBERTO AUGUSTO TRICOLI, PhD.

It has been demonstrated that low intensity training associated to vascular occlusion (LIO) promotes similar gains in strength and muscle mass when compared to high intensity strength training (HI). The aim of the present study was to evaluate the effect of three different training programs on skeletal muscle hypertrophy and atrophy related gene expression. Twenty nine young male, with no previous experience in strength training were randomly allocated in three groups: low intensity strength training (i.e. 20% - 1-RM) (LI); low intensity strength training associated to vascular occlusion (i.e. 20% - 1-RM) (LIO); high intensity strength training (HI) (i.e. 80% - 1-RM). One-way ANOVA was used to assess differences in % delta change values of 1-RM and cross sectional area (CSA) of the quadriceps *femoris*. Mixed model analysis was used to compare myostatin (MSTN), follistatin-3 (FLST-3), SMAD-7 e GASP-1 changes between groups pre and post training. Results demonstrated similar increases in strength and muscle hypertrophy for LIO and HI groups. Moreover, such increases were significantly greater when compared to LI. These results may be, at least in part, explained by a significant decrease in MSTN mRNA expression in LIO (45%) and HI (41%) when compared to LI (16%); additionally, SMAD-7; FLST-3 and GASP-1 mRNA expression were significantly increased. In conclusion, LIO training promotes similar gains than HI training. The results may be explained by changes in MSTN and related genes mRNA expression.

Keywords: skeletal muscle hypertrophy, muscle biopsy, myostatin

1 INTRODUÇÃO

O treinamento de força (TF) tem sido proposto como um potente estímulo para promover o aumento da força e massa musculares (KRAEMER, ADAMS, CAFARELLI, DUDLEY, DOOLY, FEIGENBAUM, FLECK, FRANKLIN, FRY, HOFFMAN, NEWTON, POTTEIGER, STONE, RATAMESS & TRIPLETT-MCBRIDE, 2002; KRAEMER & RATAMESS, 2004). As adaptações fisiológicas decorrentes do TF sugerem que diferentes variáveis como a sobrecarga mecânica, as alterações metabólicas e hormonais e os eventos intracelulares, podem de forma isolada ou integrada responder pelos aumentos de força, da área de secção transversa (AST) e da síntese de proteínas musculares (ACSM, 2009; GLASS, 2005).

A intensidade do exercício é a base para a prescrição de muitos programas de TF. O Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM, 2009) recomenda que a sobrecarga mecânica imposta ao músculo para promover o aumento da força e massa musculares deve situar-se entre 70-85% da força dinâmica máxima (1RM).

No entanto, há quase uma década pesquisadores japoneses desenvolveram uma técnica que combina o TF de baixa intensidade (20-50% 1RM) com a oclusão do fluxo sanguíneo também conhecido como “KAATSU training”. Estudos têm mostrado que as alterações causadas no ganho de força e massa musculares após um período de treinamento com esta técnica são similares as causadas pelo TF de alta intensidade ($\geq 80\%$ 1RM) (KARABULUT, ABE, SATO & BEMBEN, 2009; KUBO, KOMURO, ISHIGURO, TSUNODA, SATO, ISHII, KANEHISA & FUKUNAGA, 2006; TAKARADA, TAKAZAWA, SATO, TAKEBAYASHI, TANAKA & ISHII, 2000b)

Os possíveis mecanismos pelos quais o TF de força com oclusão vascular (TFOV) estimula os aumentos da força e da AST em magnitude semelhante ao TF de alta intensidade, incluem a maior ativação de fibras musculares tipo II, as quais são mais responsivas ao TF e o aumento na secreção do hormônio do crescimento (GH), o qual tem efeito anabólico (MORITANI, SHERMAN, SHIBATA, MATSUMOTO & SHINOHARA, 1992; PIERCE, CLARK, PLOUTZ-SNYDER & KANALEY, 2006; REEVES, KRAEMER, HOLLANDER, CLAVIER, THOMAS, FRANCOIS &

CASTRACANE, 2006; TAKARADA et al., 2000b; YAMADA, KUSAKA, TANAKA, MORI, NORIMATSU & ITOH, 2004; YASUDA, FUGITA, MIYAGI, KUBOTA, SATO, NAKAJIMA, BEMBEN & ABE, 2006)

TAKARADA et al. (2000b) avaliaram a ativação muscular após uma sessão aguda de TF nas intensidades de 40% 1RM com oclusão (GO40) e 80% 1RM sem oclusão (G80) e mostraram uma similaridade de resposta na ativação muscular entre as duas condições. Em seguida, no mesmo estudo, os sujeitos foram randomicamente distribuídos em dois grupos. Os grupos G50 e GO50 treinaram a 50% 1RM sem oclusão e com oclusão, respectivamente, no exercício de flexão do cotovelo. No grupo GO50 o braço contralateral foi treinado a 80% 1RM sem oclusão (G80). Após o período de treinamento foi observado que os ganhos de força e da AST dos músculos flexores do cotovelo foram similares nos grupos GO50 e G80 ($p>0,05$) e superiores ao grupo G50 ($p<0,05$). Esse estudo mostrou que as duas estratégias de TF (GO50 e G80) foram efetivas para o aumento de força e massa musculares.

Em outro estudo foi demonstrado que as melhoras ocasionadas pela exposição crônica ao TFOV foram atribuídas à ocorrência de hipertrofia muscular e não especificamente pelo aumento da ativação muscular. KUBO et al. (2006) mostraram que não houve diferença significativa nos aumentos da força e da AST nos grupos TFOV a 20% 1RM (GO20) e TF a 80% 1RM sem oclusão (G80), entretanto, foi observada mudança significativa na ativação muscular somente no grupo G80.

O aumento na concentração plasmática do hormônio do crescimento (GH) após a sessão de TFOV é atribuído ao acúmulo de metabólitos musculares produzidos durante as contrações com oclusão (REEVES et al., 2006; TAKARADA, NAKAMURA, ARUGA, ONDA, MIYAZAKI & ISHII, 2000a; YASUDA et al., 2006). Um estudo mostrou que a aplicação do TFOV a 20% 1RM em membros inferiores, promoveu um aumento na secreção do GH em 290 vezes comparado com a condição de repouso (TAKARADA et al., 2000a). Além disso, a magnitude no aumento da concentração de GH nos estudos de TFOV é igual ou superior aos protocolos de TF em alta intensidade (KRAEMER, MARCHITELLI, GORDON, HARMAN, DZIADOS, MELLO, FRYKMAN, MCCURRY & FLECK, 1990; TANIMOTO,

2005). Porém, é importante destacar que não está bem definido o papel do hormônio GH nas respostas hipertróficas deste modo de treinamento (FUJITA, ABE, DRUMMOND, CADENAS, DREYER, SATO, VOLPI & RASMUSSEN, 2007; PIERCE et al., 2006; SATO, YOSHITOMI & ABE, 2005; TAKANO, MORITA, IIDA, ASADA, KATO, UNO, HIROSE, MATSUMOTO, TAKENAKA, HIRATA, ETO, NAGAI, SATO & NAKAJIMA, 2005; TAKARADA et al., 2000a).

Alguns estudos têm sugerido que mudanças nos mecanismos de sinalização intracelulares estariam envolvidas nas adaptações neuromusculares decorrentes do TFOV (DRUMMOND, FUJITA, TAKASHI, DREYER, VOLPI & RASMUSSEN, 2008; FUJITA et al., 2007; LOENNEKE, WILSON & WILSON, 2009).

Dois estudos tentaram explorar as mudanças intracelulares com a aplicação do TFOV de forma aguda. No primeiro estudo, foram realizadas duas condições experimentais. Na primeira, os sujeitos executaram quatro séries no exercício extensão de joelhos a 20% 1RM com oclusão e na segunda condição foi realizado o mesmo protocolo sem oclusão vascular. Os resultados deste estudo mostraram que 3 horas após a realização dos protocolos, houve um aumento significativo na fosforilação da proteína *S6 kinase* (S6K1) e um aumento na síntese protéica somente na condição com oclusão (FUJITA et al., 2007). Os autores associaram os resultados aos aumentos na fosforilação das proteínas *protein kinase B* (PKB/Akt) e da *mammalian target of rapamycin* (mTOR), as quais estão diretamente envolvida na síntese de protéica (GLASS, 2005). No segundo estudo, foram reproduzidas as mesmas condições experimentais do estudo anterior, porém, os resultados foram divergentes. Não foi observada mudança na expressão das proteínas PKB/Akt, mTOR e S6K1 nas condições com e sem oclusão associadas ao TF, evidenciando que, ao menos de forma aguda, não ficou clara a participação dessas proteínas na sinalização intracelular em resposta ao TFOV (DRUMMOND et al., 2008). No entanto, um resultado interessante observado nesse estudo, foi à diminuição na expressão da proteína miostatina (MSTN) e um aumento das proteínas MyoD (*myogenic differentiation factor D*) e da p21 nas condições com e sem oclusão.

A proteína MSTN é conhecida como um regulador negativo do crescimento muscular que age na diminuição da expressão dos fatores de transcrição musculares específicos e diferenciação miogênica. Por outro lado, as

proteínas MyoD e p21 estão diretamente relacionadas à ativação do ciclo celular como marcadores de atividade das células satélites (HILL, QIU, HEWICK & WOLFMAN, 2003). Dessa forma, como mostrou o estudo de DRUMMOND et. al. (2008) parece que o TF pode representar um importante estímulo para o crescimento muscular mediante o bloqueio/diminuição da atividade da MSTN mesmo em baixa intensidade de TF.

A sinalização intracelular da MSTN é regulada por outras proteínas que podem antagonizar sua ação biológica. As proteínas folistatina (FLST); *follistatin-like-3* (FLST-3), SMAD-7 e a GASP-1 (*“growth and differentiation factor-associated serum protein-1”*), tem alta afinidade em se ligar a MSTN e inibir sua atividade. Na presença dessas proteínas, a MSTN é impedida de se ligar aos receptores Activina IIB, bloqueando assim sua ação proteolítica (FORBES, JACKMAN, BISHOP, THOMAS, KAMBADUR & SHARMA, 2006 AOKI, 2009, 571; LEE, 2004).

Estudos têm investigado os efeitos agudos (HULMI, KOVANEN, LISKO, SELANNE & MERO, 2008; KIM, CROSS & BAMMAN, 2005) e crônicos do TF na diminuição da expressão da MSTN e no aumento de seus antagonistas (HULMI, AHTIAINEN, KAASALAINEN, POLLANEN, HAKKINEN, ALLEN, SELANNE, KOVANEN & MERO, 2007; ROTH, MARTEL, FERRELL, METTER, HURLEY & ROGERS, 2003; SAREMI, GHARAKHANLOO, SHARGHI, GHARAATI, LARIJANI & OMIDFAR, 2009; WALKER, KAMBADUR, SHARMA & SMITH, 2004; WILLOUGHBY, 2004). KIM, CROSS & BAMMAN (2005) mostraram que uma sessão aguda de TF em três séries de 8-12 repetições até a fadiga diminuiu a expressão MSTN em 44%. Em outro estudo, após a realização de uma sessão composta de cinco séries de 10 repetições no exercício *leg-press*, houve uma diminuição na MSTN e um aumento na expressão da FLST-3 48 horas após a realização do exercício (HULMI et al., 2008).

Outros estudos mostraram que as adaptações hipertróficas decorrentes do TF de alta intensidade foram ocasionadas pela diminuição da expressão da MSTN e aumento de seus antagonistas. De acordo com ROTH et al. (2003) após a aplicação de TF de alta intensidade (80% 1RM) por nove semanas, houve uma diminuição de 37% na expressão da MSTN e um aumento da força dinâmica em 30% e da AST em 7,5% nos músculos extensores do joelho. WILLOUGHBY (2004) demonstrou que após 12 semanas de TF a 85-90% de 1RM em jovens saudáveis, houve um aumento

de 127% na expressão da FLST-3 e diminuição de 18% dos receptores Activina IIB, o que segundo o autor contribuiu para o aumento de 41% da força muscular do músculo quadríceps femoral e o 67% no conteúdo de proteína miofibrilar. Em outro recente estudo, SAREMI et al. (2009) mostraram que o TF aplicado na intensidade de 60-70% 1RM, por oito semanas, promoveu a diminuição na concentração plasmática da MSTN e o aumento na proteína GASP-1, as quais contribuíram para o aumento da massa magra nos sujeitos pesquisados.

De acordo com os resultados dos estudos anteriores, parece evidente que a diminuição na expressão da MSTN associada ao aumento de seus antagonistas pode responder em parte pelo aumento da força e hipertrofia decorrentes do TF de alta intensidade; porém, nesses estudos, a intensidade mínima utilizada foi $\geq 40\%$ 1RM. Apenas um estudo de efeito agudo mostrou que a expressão da MSTN foi diminuída com o TF em baixa intensidade com e sem oclusão (DRUMMOND et al., 2008), no entanto, não foi avaliada a expressão dos genes antagonistas da MSTN. Além disso, estudos com TFOV em baixa intensidade mostraram uma superioridade nos aumentos da força e hipertrofia comparada a estudos com a mesma intensidade de TF sem oclusão. Portanto, seria importante investigar o efeito crônico do TF em baixa intensidade com e sem oclusão na expressão da MSTN e de seus antagonistas, bem como as respostas nos aumentos da força e massa musculares.

A hipótese deste estudo foi que os aumentos da força e da hipertrofia com a aplicação do TFOV de baixa intensidade e o TF de alta intensidade sejam equivalentes entre si e superiores do TF de baixa intensidade sem oclusão vascular. Estas respostas seriam mediadas pela diminuição da atividade da MSTN e aumento de seus antagonistas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral de presente estudo foi verificar o efeito do treinamento de força com e sem oclusão vascular sobre parâmetros funcionais, estruturais e moleculares do músculo esquelético.

2.2 Objetivo específico

O objetivo específico do presente estudo foi verificar as respostas da aplicação do treinamento de força com e sem oclusão vascular sobre:

- a força dinâmica máxima no exercício de extensão de joelhos;
- a área de secção transversa muscular do músculo quadríceps femoral;
- a expressão gênica da proteína miostatina;
- a expressão gênica da proteína Activina IIB;
- a expressão gênica da proteína SMAD-7;
- a expressão gênica da proteína FLST-3;
- a expressão gênica da proteínas GASP-1.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A seqüência dos tópicos proposta na revisão de literatura pretende abordar primeiramente sobre os efeitos agudo e crônico do treinamento de força com e sem oclusão na ativação muscular. Logo em seguida, serão abordadas as adaptações neuromusculares e as respostas endócrinas deste modelo de treinamento. Posteriormente, dissertaremos sobre as vias de sinalização do IGF-1, da proteína miostatina e os genes que antagonizam sua atividade no controle do crescimento muscular. Em seqüência, serão apresentadas as evidências presentes na literatura quanto à influência do treinamento de força na atividade da miostatina e seus antagonistas. Por fim, abordaremos um modelo proposto da sinalização intracelular mediada pela hipóxia e as respostas ao treinamento de força com oclusão vascular.

3.1 Efeito agudo e crônico do treinamento de força com oclusão vascular na ativação muscular

Vários estudos investigaram o efeito agudo da aplicação do TFOV sobre a ativação muscular (KARABULUT, CRAMER, RYAN, ANDERSON, HULL, SATO,

ABE & BEMBEN, 2006; MORITANI et al., 1992; SUGA, OKITA, MORITA, YOKOTA, HIRABAYASHI, HORIUCHI, TAKADA, TAKAHASHI, OMOKAWA, KINUGAWA & TSUTSUI, 2009; TAKARADA et al., 2000b; WERNBOM, JARREBRING, ANDREASSON & AUGUSTSSON, 2009; YAMADA et al., 2004; YASUDA, BRECHUE, FUJITA, SHIRAKAWA, SATO & ABE, 2009). Na maioria desses estudos foi observado um maior aumento da atividade eletromiográfica (EMG) na condição ocluída comparado com a condição não ocluída (COOK, CLARK & PLOUTZ-SNYDER, 2007; MORITANI et al., 1992; SUGA et al., 2009; YAMADA et al., 2004; YASUDA et al., 2006). Porém, outros estudos não apresentaram mudança na ativação muscular em resposta ao TFOV (KARABULUT et al., 2006; KUBO et al., 2006; MOORE, BURGOMASTER, SCHOFIELD, GIBALA, SALE & PHILLIPS, 2004; WERNBOM et al., 2009).

A maior ativação muscular na condição de oclusão seria consequência do acúmulo de metabólitos durante a execução do exercício, com isso aumentaria a participação de metaborreceptores periféricos que estimulariam a via simpática nervosa muscular. Uma vez estimulada, essa via afetaria o padrão de recrutamento muscular, aumentando a participação de unidades motoras (UMs) compostas de fibras do tipo II, as quais são mais responsivas ao TF. Além disso, a redução na disponibilidade de oxigênio e substratos energéticos causados pela oclusão exigiria que mais UMs fossem recrutadas para sustentar o déficit na produção de força entre as séries de exercícios (MORITANI et al., 1992; TAKARADA et al., 2000b; YAMADA et al., 2004).

MORITANI et al. (1992) mostraram que a oclusão da circulação do braço a 200 mmHg combinada com exercício isométrico intermitente a 20% da contração voluntária máxima (CVM) por 4 minutos, resultou no aumento progressivo da amplitude e frequência de disparo das UMs compostas por fibras tipo II e da concentração de lactato. TAKARADA et al. (2000b) mostraram que a equivalência no padrão de ativação muscular entre o TFOV em baixa intensidade (40% 1RM) comparado ao TF de alta intensidade (80% 1RM), seria causada pelo maior acúmulo de lactato ocorrido na condição ocluída.

O efeito da oclusão no aumento da ativação muscular parece ser dependente da intensidade do TF. YAMADA et al. (2004) mostraram que o aumento

na ativação do músculo vasto lateral somente foi visto nas intensidades de 30 e 50% da CVM com oclusão em contrações isométricas de 10 segundos, mas o mesmo evento não aconteceu com a intensidade de 70% da CVM com oclusão. A oclusão não aumentou a ativação a 70% da CVM provavelmente porque nessa intensidade a diminuição do suprimento de sangue para o músculo já alcançou um nível elevado pelo efeito da própria intensidade da carga, anulando o papel da oclusão. Os autores destacaram que em intensidades acima de 40-50% da CVM a pressão intramuscular excede a pressão sistólica e o fluxo de sangue para o músculo é suprimido.

Por outro lado, dois estudos de efeito agudo não apresentaram mudança na ativação muscular com a aplicação do TFOV. No primeiro estudo, foi investigada a ativação dos músculos extensores do joelho em duas condições experimentais separadas por 48 horas. Na condição experimental foram executadas cinco séries de 20 contrações isométricas intermitentes (2 segundos contraído e 1 segundo relaxado) a 20% da CVM com oclusão (~183 mmHg) com intervalo de 30 segundos entre as séries. Para a condição controle foi realizado o mesmo protocolo, porém sem oclusão. Os resultados desse estudo mostraram que a ativação muscular não foi diferente entre as condições experimental e controle (KARABULUT et al., 2006). Os autores justificaram os resultados afirmando que contrações isométricas a 20% da CVM com ou sem oclusão vascular não são suficientes para causar fadiga e aumentar a ativação muscular. No segundo estudo, 11 atletas de diferentes modalidades esportivas (velocistas, saltadores, jogadores de futebol) com vários anos de experiência em TF foram submetidos a dois protocolos experimentais de TF com e sem oclusão. Foram executadas três séries no exercício extensão de joelhos unilateral a 30% 1RM com e sem oclusão até a falha de execução do movimento, com um intervalo de 45 segundos entre as séries. Os resultados mostraram que não houve diferença no aumento da ativação muscular entre as condições ocluída e não ocluída (WERNBOM et al., 2009). A justificativa dos autores para esse resultado é que o grau de esforço exigido nas condições ocluída e não ocluída dos atletas foi próximo da ativação isométrica voluntária máxima (86-107%), promovendo um alto nível de ativação.

As diferenças dos resultados na ativação muscular apresentada nos estudos anteriores podem ser atribuídas aos diferentes tipos de protocolos

experimentais, tempo de avaliação entre as condições experimentais, grupos musculares avaliados, o nível de pressão de oclusão utilizada, métodos de avaliação da força e a população investigada.

No entanto, seria muito importante determinar o quanto o grau de ativação muscular visto em alguns dos estudos agudos reflete um mecanismo de adaptação em longo prazo. Dois estudos crônicos mostraram a ausência de efeito da oclusão sobre a ativação muscular em diferentes grupos musculares. No primeiro estudo, a aplicação de TF com e sem oclusão vascular a 50% 1RM em jovens sem experiência em TF, por oito semanas, não resultou em diferença significativa entre as condições no aumento da ativação dos músculos flexores do cotovelo (MOORE et al., 2004). Resultado semelhante ao estudo anterior foi mostrado por KUBO et al. (2006). Após doze semanas de treinamento no exercício extensão dos joelhos, os autores não observaram mudanças na ativação muscular e na tensão específica na perna ocluída que treinou a 20% 1RM. do músculo quadríceps femoral entre as condições ocluída e não ocluída. Com os resultados dos estudos anteriores, podemos inferir que as alterações neurais decorrentes do TFOV podem contribuir em menor proporção para o aumento da força e hipertrofia a longo prazo.

3.2 Adaptações neuromusculares ao treinamento de força com oclusão vascular

Considerando que os efeitos crônicos da aplicação do TFOV nos aumentos da força e da AST comparado com o TF de alta intensidade são similares, três estudos investigaram as adaptações neuromusculares decorrentes desses modos de treinamento (KARABULUT et al., 2009; KUBO et al., 2006; TAKARADA et al., 2000b).

No primeiro estudo, (TAKARADA et al. 2000b) idosos foram divididas em dois grupos: G50 e GO50. Os grupos G50 e GO50 executaram o exercício de flexão do cotovelo a 50% 1RM sem oclusão e com oclusão, respectivamente. No grupo GO50, o braço contralateral foi treinado a 80% 1RM sem oclusão (G80). Após um período de 16 semanas de treinamento, houve um aumento de 18,4% na força dinâmica dos músculos flexores de cotovelo no grupo GO50, e 22,6% no grupo G80

respectivamente, não havendo diferença significativa entre grupos. Entretanto, não houve mudança significativa na força para o grupo G50 (1,4%). Resultado semelhante foi apresentado com relação à hipertrofia. Não houve diferença significativa nos aumentos da AST do músculo bíceps braquial nos grupos GO50 (20,3%) e G80 (18,4%) ($p>0,05$). No grupo G50 houve aumento da AST de 6,7%, porém não foi significativo ($p>0,05$). A similaridade dos resultados apresentados nesse estudo sobre o aumento da força nos diferentes grupos (GO50 e G80) pode ter como fator determinante o aumento da AST.

Um segundo estudo, envolvendo jovens, comparou o efeito de duas estratégias de TFOV: um grupo treinou com 20% 1RM, com oclusão (GO20), e o outro, com 80% 1RM (G80), sem oclusão. Foi utilizado o exercício extensão dos joelhos unilateral por um período de 12 semanas. Os resultados desse estudo mostraram que os grupos GO20 e G80 aumentaram a força isométrica (7,8% e 16,8%, respectivamente) e a AST (5,9% e 7,4%, respectivamente) na mesma proporção (KUBO et al., 2006).

Seis anos depois, com jovens, KUBO et al. (2006) investigaram os efeitos do TFOV a 20% 1RM (GO20) e do TF a 80% 1RM (G80) nos aumentos da força e massa musculares. Foi utilizado o exercício de extensão dos joelhos unilateral por um período de 12 semanas. Os resultados desse estudo mostraram que os aumentos da força isométrica nos grupos GO20 (7,8%) e G80 (16,8%) e da AST (GO20 - 5,9%) e (G80 - 7,4%) não foram diferentes entre os grupos na condição pós-treinamento. Porém, nesse estudo, a força dinâmica (1RM) no exercício extensão de joelhos somente foi avaliada no grupo G80 (37%) ($p<0,05$).

O estudo mais recente que comparou o TFOV a 20% 1RM (GO20) com o TF convencional (G80) mostrou uma similaridade o aumento na força dinâmica entre os grupos (GO20 19,3% e G80 20,4%) no exercício leg press. Porém, no exercício extensão de joelhos os aumentos de 1RM foram superiores no grupo G80 comparado com o grupo GO20 (31,2% vs 19,1%, respectivamente) (KARABULUT et al., 2009). Apesar de serem identificados alguns problemas metodológicos na condução do estudo anteriores que compararam duas estratégias de TF como controle intra-sujeito na condição ocluída e não ocluída (KUBO et al., 2006; TAKARADA et al., 2000b), diferença significativa da força entre grupos (1RM) no

início do estudo e mudança da força no grupo controle pós-treinamento (KARABULUT et al., 2009,), ficou evidente a contribuição da oclusão vascular associada ao TF de baixa intensidade para os ganhos de força e hipertrofia em diferentes populações.

Dois estudos investigaram o efeito do TFOV no desempenho de força e hipertrofia musculares em atletas. No primeiro estudo, atletas de rúgbi foram divididos em dois grupos os quais executaram quatro séries (média de 16.3 repetições) no exercício de extensão de joelhos bilateral a 50% 1RM sem oclusão (G50), enquanto o outro grupo fez o mesmo exercício, com oclusão (GO50), por oito semanas. Os resultados mostraram aumento de 14% na força isométrica dos músculos extensores de joelho que foi acompanhada do aumento de 12,3% da AST somente no grupo GO50 (TAKARADA, SATO & ISHII, 2002). O segundo estudo utilizou o mesmo protocolo de treinamento com um grupo de 18 atletas de diferentes modalidades, no entanto, a intensidade do TF foi reduzida para 10-20% 1RM. Após um período de oito semanas de treinamento, houve um aumento de 10,3% da AST dos músculos extensores de joelhos no grupo GO20 e não houve mudança da mesma variável no grupo G20. A força isométrica aumentou em 9,2% no GO20 ($p < 0,05$) e em 3,1% no grupo G20 ($p > 0,05$) (TAKARADA, TSURUTA & ISHII, 2004).

Tipicamente, o tempo necessário para que haja aumento na hipertrofia muscular com aplicação de TF de alta intensidade situa-se ao redor de 8-12 semanas (ANTONIO, 2004; KRAEMER et al., 2002). No entanto, alguns estudos em TFOV em baixas intensidades apontam para o aumento da hipertrofia muscular com poucos dias de aplicação do TFOV. Um estudo com homens experientes em TF verificou aumento de 3,5% da AST do quadríceps femoral após sete dias de TFOV a 20% de 1RM ($p < 0,05$) (ABE, BEEKLEY, HINATA, KOIZUME & SATO, 2005).

Outro estudo de curta duração foi realizado com apenas cinco sujeitos por um período de 12 dias. Nesse estudo, três sujeitos fizeram parte do grupo que treinou com oclusão (GO20) e dois sujeitos fizeram parte do grupo controle. Os sujeitos executaram três séries de TF a 20% 1RM nos exercícios agachamento e extensão de joelhos, com intervalo de 30 segundos entre as séries. Após o período de treinamento, houve um aumento de 7,8% na AST do músculo quadríceps femoral no grupo GO20 ($p < 0,05$), ao passo que no grupo controle houve um aumento 1,8%

($p > 0,05$) (YASUDA, ABE, SATO, MIDORIKAWA, KEARNS, INOUE, RYUSHI & ISHII, 2005). Um resultado que chamou a atenção nesse estudo, foi um aumento da AST das fibras tipo II em 27,6% ($p < 0,05$) no grupo GO20, enquanto que no grupo controle não houve mudança significativa na AST das fibras tipo I e II. Com esse resultado, pode-se concluir que o TFOV foi mais efetivo sobre as fibras musculares tipo II, como destacado em outros estudos (MORITANI et al., 1992; TAKARADA et al., 2000a; TAKARADA et al., 2000b).

O efeito da hipóxia sobre as fibras tipo II ficou evidente em um estudo utilizando modelo animal. Os animais foram submetidos à oclusão da veia femoral por 30 minutos, por duas semanas. Após esse período, foi observado aumento de 15% no peso absoluto do músculo plantar do animal (KAWADA & ISHII, 2008). Além disso, o estudo mostrou uma transição de fibras musculares causada pela hipóxia, com o aumento na porcentagem das fibras tipo IIb e diminuição da porcentagem das fibras tipo I. Porém, a porcentagem das fibras tipo IIa não foi alterada. Apesar do modelo de oclusão vascular usado no estudo de KAWADA & ISHII (2008) não se aplicar ao modelo humano, parece evidente a atuação da hipóxia nas fibras tipo II e essa adaptação pode ser um ponto crucial que determina o grau de hipertrofia evidenciado nos vários estudos.

Estudos de adaptação ao TFOV mostraram ausência do efeito da oclusão vascular em intensidades $\geq 50\%$ 1RM. MOORE, BURGOMASTER, SCHOFIELD, GIBALA, SALE & PHILLIPS (2004) não observaram diferença significativa no aumento da força dinâmica dos músculos flexores do cotovelo entre as condições ocluída e não ocluída (22% e 23%) na intensidade de 50% 1RM. Além disso, outro estudo mostrou o aumento da resistência de força dinâmica no exercício de extensão de joelhos somente nas intensidades de 20, 30 e 40% 1RM com oclusão vascular, mas não a 50% 1RM (WERNBOM, AUGUSTSSON & THOME, 2006).

Corroborando os resultados dos estudos anteriores, (LAURENTINO, UGRINOWITSCH, AIHARA, FERNANDES, PARCELL, RICARD & TRICOLI, 2008) analisaram o efeito da aplicação do TFOV nas intensidades de 60% e 80% 1RM nos ganhos de força e hipertrofia. Os sujeitos desse estudo foram divididos em dois grupos: intensidade moderada (IM) e alta intensidade (AI). Os grupos IM e AI treinaram a 60% 1RM e 80% 1RM respectivamente, ambos com oclusão vascular

executando três a quatro séries de 12RM e 6RM respectivamente, no exercício de extensão de joelho por um período de oito semanas. Os resultados mostraram aumentos na força no grupo IM (34,5%) e no grupo AI (35,2%) na perna ocluída ($p < 0,05$). Na perna não ocluída, os aumentos da força dos grupos IM e AI foram de 36,9% e 37,5%, respectivamente ($p < 0,05$). Os aumentos da AST na perna ocluída nos grupos IM e AI foram de 5% e 4,5% respectivamente. Na perna não ocluída, os aumentos da AST nos grupos IM e AI foram 6,1% e 3,2%, respectivamente. Não houve diferença significativa na força e na AST entre as condições ocluída e não ocluída entre os grupos IM e AI no pós-treinamento. Os resultados mostraram que não houve efeito aditivo da oclusão em moderada e alta intensidade de TF.

Uma limitação desse estudo foi que durante a execução das séries de exercício houve a liberação da pressão de oclusão, o que pode ter facilitado a reperfusão local no intervalo entre as séries. Nesse sentido, se o acúmulo de metabólitos é um fator determinante para os efeitos da oclusão, a liberação da pressão no descanso entre as séries pode ter minimizado esse efeito.

Baseado nos resultados dos estudos anteriores podemos deduzir que os efeitos da oclusão vascular são exclusivos das baixas intensidades de TF e que intensidades $\geq 50\%$ 1RM por si desenvolvam um papel determinante no aumento da força e hipertrofia musculares. Dessa forma, o TFOV de baixa intensidade (20-50% 1RM) apresenta-se como uma estratégia alternativa para promover o aumento da força e hipertrofia em diferentes populações; exemplo: idosos (TAKARADA et. al., 2000b), na reabilitação de lesões musculares e articulares (KUBOTA, SAKURABA, SAWAKI, SUMIDE & TAMURA, 2008) ou em pessoas com doenças musculares degenerativas (GUALANO, NEVES, LIMA, DE SA PINTO, LAURENTINO, BORGES, BAPTISTA, ARTIOLI, AOKI, MORISCOT, LANCHI, BONFA & UGRINOWITSCH, 2009)

3.3 Mecanismos intracelulares de modulação da massa muscular

O crescimento muscular é dependente do balanço positivo/negativo dos reguladores da síntese de proteínas. O IGF-1 e a MSTN são reconhecidos como os dois maiores reguladores da homeostase muscular (HEINEMEIER, OLESEN,

SCHJERLING, HADDAD, LANGBERG, BALDWIN & KJAER, 2007). O IGF-1 é um regulador positivo do crescimento muscular e parece agir em vários níveis celulares, incluindo a ativação de células satélites, a transcrição de genes e a tradução de proteínas (HAYASHI & PROUD, 2007). Ele é essencial na mediação da hipertrofia muscular induzida pela sobrecarga (GLASS, 2005). Contrário aos efeitos do IGF-1, a MSTN regula de maneira negativa o ganho de massa muscular e sua ausência está associada ao fenótipo hipermuscular em camundongos e em bovinos (LEE, 2004). In vitro, estudos indicam que a MSTN inibe a proliferação durante a miogênese bem como a ativação de células satélites e a síntese de proteínas (MATSAKAS & PATEL, 2009; MCPHERRON & LEE, 1997).

3.3.1 Mecanismos envolvidos na modulação da massa muscular pela via de sinalização do insulin-like growth factor 1 (IGF-1) e da miostatina

Os mecanismos moleculares ligados à síntese de proteínas envolvem um grupo de enzimas chamadas quinases, que consistem de proteínas que transferem grupos de fosfato (um processo conhecido como fosforilação) de uma molécula doadora para substratos específicos que podem subsequente regular a iniciação da tradução (MATSAKAS & PATEL, 2009). O conhecimento atual indica que uma das vias de sinalização que regula a síntese de proteína no músculo esquelético através da sobrecarga mecânica é a via do IGF-1 (MATSAKAS & PATEL, 2009).

O IGF-1 se liga a um receptor de membrana tirosina quinase (rIGF) na membrana plasmática que em seqüência recruta um receptor insulínico de substrato “*insulin receptor substrate*” (IRS-1) dentro da célula, ativando a via das proteínas “*phosphatidylinositol 3 kinase*” (PI3K), da *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK-1) e da “*proteína kinase b*” (Akt). A ligação dessas proteínas forma a via PI3K-Akt que, uma vez ativada, fosforila uma série de proteínas que bloqueiam a apoptose; induz a síntese de proteína; a transcrição de genes e a proliferação celular (GLASS, 2005). A via da PI3/Akt é considerada a maior via ativada pela estimulação do IGF-1 durante a miogênese e manutenção da massa muscular. A ativação da Akt induz o

aumento da AST das fibras musculares em resposta à ativação da síntese de proteínas (MATSAKAS & PATEL, 2009).

A fosforilação da Akt pela proteína PI3K inibe a atividade do “*tuberous sclerosis complex 1 e 2*” (TSC1/2) envolvido na inibição da síntese protéica e ativa mais duas proteínas: a proteína “*mammalian target of rapamycin*” (mTOR) e a proteína “*p70S6K1 kinase*” que são duas serinas treoninas quinases, as quais formam uma via linear PI3K/Akt-mTOR/p70S6K1 (GLASS, 2005; MATSAKAS & PATEL, 2009) (FIGURA 1).

Experimentos em que foram utilizados inibidores da mTOR (rapamicina) mostraram um bloqueio na hipertrofia compensatória e na ativação da proteína p70S6K1 (GLASS, 2005; MATSAKAS & PATEL, 2009). A estimulação p70S6K1 pela mTOR, inibiria a atividade da “*phosphorylated heat- and acid-stable protein*” (PHAS-1) também conhecida como 4E-BP1, a qual é um regulador negativo “*eukaryotic translation initiation factor 2B*” (eIF-2B). O “*eukaryotic translation initiation factor 4E*” (eIF-4E) é inibido pela mTOR via inibição da 4E-BP1.

A proteína “*glycogen-synthase kinase 3 β* ” (GSK3 β) é um substrato da Akt que pode modular negativamente a hipertrofia. A atividade da GSK3 β é inibida pela fosforilação da Akt, induzindo o aumento do processo de hipertrofia. A GSK3 β bloqueia a iniciação da tradução protéica pela proteína eIF-2B. Dessa forma, a inibição da GSK3 β pode induzir a hipertrofia pela estimulação da síntese protéica via PI3K-Akt-GSK3 β independente da via da mTOR (FIGURA 1).

FIGURA 1 - Representação esquemática dos eventos intracelulares de ativação e inibição do crescimento muscular mediados pelo IGF-1 e a miostatina (adaptado de MATSAKAS & PATEL, 2009)

O IGF-1 e a MSTN funcionam de maneira oposta para manter a homeostase celular por comunicação pela via PI3K/Akt/GSK-3 β (MATSAKAS & PATEL, 2009). O modelo proposto por MATSAKAS & PATEL (2009), fornece uma evidência direta para um novo papel da MSTN na regulação do crescimento e proliferação celular, o qual funciona por meio da ativação da proteína GSK-3 β e sua inibição é independente da via Smad2/3. Mais especificamente, a MSTN inibe a ação da Akt por impedir a fosforilação na Ser473, a qual em seqüência impede a fosforilação na Ser9 e inativação da GSK-3 β . Não fosforilada e desta forma ativa, a GSK-3 β controla a proliferação celular (FIGURA 1) (MATSAKAS & PATEL, 2009). A proteína GSK-3 β , uma vez ativada se transporta para o núcleo da célula e fosforila a proteína ciclina D1, a qual em seqüência é transportada do núcleo para o citoplasma, sendo fosforilada e degradada pela via mediada pelo proteasoma. A perda da ciclina D1 reduz a taxa de proliferação da célula. Assim, embora o IGF-1 e a MSTN

funcionem de maneira oposta no controle do crescimento celular, eles agem através da mesma via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 β . O IGF-1 pode potencialmente induzir a expressão da MSTN, mas não o contrário. A MSTN funciona como uma molécula de proteína inibitória local que limita o crescimento celular, mas é regulada por fatores de crescimento (MATSAKAS & PATEL, 2009).

3.3.2 Mecanismo de ação dos agonistas e antagonistas da MSTN

A MSTN é uma proteína que foi identificada em camundongos como um membro da família do “*transforming growth factor β* ” (TGF- β) que age como reguladora negativa do crescimento muscular (AOKI, SOARES, MIYABARA, BAPTISTA & MORISCOT, 2009; LEE, 2004; MATSAKAS & PATEL, 2009; ROTH & WALSH, 2004). Durante a vida adulta, a MSTN é produzida pelo músculo esquelético, circula no sangue e age para limitar o crescimento da fibra muscular. No sangue, apresenta-se numa forma latente que pode ser ativada pela clivagem de um pró-peptídeo. Uma vez ativada, a MSTN é capaz de se ligar a seus e ativar a cascata de sinais de tradução nas células alvo. A maioria dos membros da família dos TGF- β se liga aos receptores serina/treonina kinase do tipo I e II (Activina I e IIB). A MSTN fosforila o receptor Activina IIB e ativa o receptor do activina do tipo I, formando um complexo receptor ativado. Em seguida, inicia a sinalização intracelular por meio da ligação com a proteína denominada “*Mothers against decapentaplegic*” (MAD). As MADs são uma classe de proteínas que freqüentemente formam um complexo com outras MADs inibitórias (SMAD-2, SMAD-3 e SMAD-4). A associação da SMAD-2 com a SMAD-4 através do complexo receptor ativado transporta SMAD2 para o núcleo da célula, onde interage com o DNA e proteínas alvo e confere a correspondência com a MSTN, servindo como um fator de transcrição que regula a expressão de genes ligados a apoptose e inibição do crescimento muscular (FIGURA 1). Tratamento de células em cultura com MSTN purificada causaram um aumento nos níveis de ambas SMAD-2 e SMAD-3 (HAYASHI, ABDOLLAH, QIU, CAI, XU, GRINNELL, RICHARDSON, TOPPER, GIMBRONE, WRANA & FALB, 1997; KOLLIAS, PERRY, MIYAKE, AZIZ & MCDERMOTT, 2006; LEE, 2004)

Contrariamente às SMADs inibitórias, as SMADs-6 e SMAD-7 apresentam estrutura divergente e antagonizam a sinalização do TGF- β . A SMAD-6 funciona primariamente nas vias de sinalização de proteínas morfogênicas do osso, proteínas através da competição com os receptores regulados pelas SMADs 1 e 5, enquanto a SMAD-7 está envolvida na inibição da sinalização dos membros da família dos TGF- β . A transcrição da SMAD-7 é iniciada pela MSTN ou membros do TGF- β , que após a sua ligação com os receptores tipo I e a fosforilação da SMAD-2/3, induz o aumento da expressão da SMAD-7. A SMAD-7 compete com as SMADs-2, SMAD-3 e SMAD-4 para se ligar ao receptor tipo I ativado e inibir a sinalização intracelular e o acúmulo nuclear da SMAD-2, funcionando através de um *feedback* negativo iniciado pela MSTN (HAYASHI et al., 1997; MATSAKAS & PATEL, 2009).

Estudos têm demonstrado que o aumento na expressão da SMAD-7 bloqueou a associação da SMAD-2 a SMAD-4 e o acúmulo nuclear da SMAD-2 em resposta à sinalização do TGF- β (FORBES et al., 2006; HAYASHI et al., 1997; KOLLIAS et al., 2006). Além disso, o aumento na expressão da SMAD-7 inibiu a expressão da MSTN endógena (FIGURA 1) (MATSAKAS & PATEL, 2009). A SMAD-7 foi inicialmente caracterizada como um fator induzido pelo estresse em células do endotélio vascular. Essa proteína acelera a iniciação e diferenciação miogênica levando à hipertrofia celular por meio da interação com a proteína MyoD, a qual ativa os promotores da SMAD-7 às suas potenciais propriedades. Dessa forma, o papel fundamental para da SMAD-7 na iniciação da miogênese é mediante o *feedback* positivo entre a SMAD-7-MyoD e anulação da via de sinalização da MSTN (KOLLIAS et al., 2006). A SMAD-7 tem habilidade em resgatar os genes que regulam a iniciação e diferenciação miogênica específicas da supressão pela MSTN e não por outros membros da família do TGF- β (KOLLIAS et al., 2006).

Outras proteínas são capazes de se ligar a MSTN e inibir sua atividade. Uma dessas proteínas é a follistatina (FLST), a qual pode se ligar a outros membros da família dos TGF- β . Os domínios da proteína FLST têm sido categorizados em duas subfamílias, com base na sequência de similaridade e sua habilidade de se ligar e neutralizar a activina (HILL, DAVIES, PEARSON, WANG, HEWICK, WOLFMAN & QIU, 2002). A primeira superfamília contém FLST e a segunda contém “*follistatin-related-gene*” (FLRG), ambos se ligam na activina e à MSTN e inibem sua

atividade. Estudos sugerem que a FLST e FLRG podem funcionar como potentes antagonistas da MSTN e desenvolver um papel importante na modulação de sua atividade *in vivo*. A FLST é capaz de bloquear ambos receptores activina IIA (ActRIIA) e activina IIB (ActRIIB) que se ligam à MSTN para regular o crescimento celular.

As isoformas da FLST são codificadas por um único gene através de divisões alternativas gerando as FLST288 e FLST315. Uma terceira isoforma, a FLST303 é um produto da clivagem da calda C-terminal da FLST315 entre os resíduos 300 e 303. Além disso, a proteína que tem função estrutural e funcional com a FLST é a “*follistatin-like 3*” (FLST-3), chamada também de FLRG, tendo sido descoberta há quase uma década (AOKI et al., 2009).

FIGURA 2 - Diferentes ações da FLST e da FLST-3 neutralizando a ação da activina
(Adaptado de SCHNEYER et al., 2004)

Experimentos que induziram o aumento na expressão da FLST-3 promoveram o aumento da hipertrofia muscular. Na presença da FLST-3, a MSTN foi

impedida de se ligar aos receptores Activina IIB, bloqueando sua atividade na indução da proteólise muscular (AOKI et al., 2009; HULMI et al., 2007; LEE & MCPHERRON, 2001; WILLOUGHBY, 2004).

A “*growth and differentiation factor-associated serum protein-1*” (GASP-1), presente no sangue de animais e humanos, tem alta afinidade em se ligar a MSTN e inibir sua atividade (HILL et al., 2003). A GASP-1 é uma nova proteína que contém um domínio de FLST, desenvolvendo múltiplos domínios sobre as proteinases inibitórias.

O significado biológico do domínio das proteases inibitórias pela GASP-1 permanece incerto. Especula-se que a GASP-1 possa desenvolver um papel no bloqueio da ligação de uma proteína proteolítica com a forma inativa da MSTN (forma latente) diferentemente da proteína FLST-3, que se liga e inibe a MSTN impedindo a associação com os receptores celulares. O papel que as proteínas FLST, FLST-3 e GASP-1 desenvolvem na regulação da MSTN não é muito claro. Uma possibilidade é que junto com um pró-peptídeo podem formar um complexo ternário com a MSTN e que cada uma dessas proteínas tem um único papel regulatório neste complexo que é manter a latência da MSTN (HILL et al., 2003; LEE, 2004) (FIGURA 3).

FIGURA 3 - Inibição da atividade da MSTN pela ligação extracelular com pró-peptídeo, FLST, FLST-3 e GASP-1 (adaptado de LEE, 2004).

Como podemos observar neste capítulo, foi demonstrado que os genes das proteínas antagonistas da MSTN desenvolvem um papel específico no seu bloqueio. A SMAD7 interfere diretamente na ativação intracelular da ligação da MSTN por meio dos receptores Activina IIB com a SMAD-2, impedindo sua fosforilação e a interação com a SMAD-4, evitando assim o acúmulo nuclear da SMAD-2, reduzindo a quantidade de receptores ativados. Além disso, a SMAD-7 acelera a diferenciação miogênica levando à hipertrofia celular através de um *feedback* positivo com a proteína MyoD. A FLST-3 inibe a expressão da activina endógena, evidenciando um principal regulatório do bloqueio da MSTN extracelular com os receptores celulares. Somado a esses efeitos, especula-se que a GASP-1 desenvolva um papel no bloqueio da ligação de uma proteína proteolítica com a forma inativa da MSTN (forma latente).

Investigar estratégias de bloqueio/diminuição da atividade da MSTN seria importante para otimizar o crescimento muscular. Vários estudos têm mostrado que o TF foi efetivo no bloqueio da atividade da MSTN.

3.3.3 Efeito do treinamento de força nos genes agonistas e antagonistas da MSTN

Há evidências que o TF promove a diminuição na expressão da MSTN muscular e plasmática de forma aguda e crônica e contribua para o aumento da força e massa musculares (HULMI et al., 2007; HULMI et al., 2008; KIM, CROSS & BAMMAN, 2005; KIM, PETRELLA, CROSS & BAMMAN, 2007; ROTH et al., 2003; ROTH & WALSH, 2004; SAREMI et al., 2009; WALKER et al., 2004).

O mecanismo pelo qual a MSTN negativamente regula o crescimento muscular é a supressão da proliferação dos mioblastos mediante inibição da progressão do ciclo celular. A MSTN na sua forma autócrina aparece para inibir a progressão das células satélites e conseqüente inibição das proteínas “*cyclin-dependent kinase 1 e 2*” (cdk1 e cdk2) e do ciclo celular que é necessário para diferenciação (ROTH & WALSH, 2004). Um estudo mostrou que após uma única sessão de TF em a 80% 1RM houve uma diminuição da expressão MSTN em aproximadamente 52%, com um aumento da expressão da cdk1 em 74%. Os autores desses estudos sugeriram que estas mudanças foram preditivas de ativação das células satélites (KIM et al., 2007).

Outros estudos investigaram o efeito crônico do TF na diminuição da MSTN e as respostas nos aumentos da força e hipertrofia em diferentes grupos musculares. ROTH et al. (2003) demonstraram que após nove semanas de TF de alta intensidade no exercício de extensão de joelhos, houve uma diminuição na expressão da MSTN em 37% e a força dinâmica e a AST aumentaram em 30% e 7,5%, respectivamente.

Em outro estudo, WALKER et al. (2004) avaliaram os níveis plasmáticos de MSTN e IGF-1 com a aplicação do TF a 80% 1RM, por dez semanas. Ocorreu uma diminuição de 20,3% na concentração plasmática de MSTN sem mudança nos níveis de IGF-1. A força dinâmica e a AST dos músculos flexores do cotovelo

aumentaram em 30,5% e 12,6%, respectivamente. Com os resultados desse estudo, sugere-se que a diminuição da MSTN contribuiu diretamente no aumento da força e AST sem que houvesse participação do IGF-1.

Um dos pontos cruciais para inibição da atividade da MSTN é o bloqueio da sua ligação com seus receptores (Activina IIB) e o aumento da participação de outras proteínas antagonistas da MSTN como a FLST-3, a GASP-1 e a SMAD-7.

WILLOUGHBY (2004), após um período de 12 semanas de TF a 85-90% 1RM, mostrou uma diminuição de 18% nos receptores Activina IIB e um aumento na expressão da FLST-3 em 127%. Esse resultado pode ter contribuído com o aumento força dinâmica em 41% e de 67% no conteúdo de proteína. Porém, deve ser destacado que houve um aumento na expressão da MSTN. Este fato pode ter sido causado pelo tempo de coleta da amostra do tecido muscular na biópsia. Por exemplo, nos estudos que mostraram a diminuição da MSTN após um período de treinamento, a biópsia muscular foi realizada 48 horas após a última sessão de treino. No estudo de WILLOUGHBY (2004), a biópsia muscular foi realizada 15 minutos após a terceira sessão de treino da semana, sob influência dos aumentos na concentração plasmática de cortisol em 40% e dos receptores de glicocorticóide em 104%. É possível que o estresse provocado pela sessão de TF promoveu a elevação dos níveis de cortisol e nos receptores de glicocorticóide, podendo ter estimulado o aumento da expressão da MSTN (AOKI et al., 2009; MA, MALLIDIS, BHASIN, MAHABADI, ARTAZA, GONZALEZ-CADAVID, ARIAS & SALEHIAN, 2003).

Existe uma escassez de estudos que analisaram o efeito do TF sobre as proteínas GASP-1 e SMAD-7. Apenas um estudo avaliou o efeito do TF nas intensidades de 60-70% 1RM nas concentrações plasmáticas da MSTN e da GASP-1 após oito semanas. Os sujeitos foram divididos em dois grupos TFPL (placebo) e um grupo suplementado com creatina TFCr. Após o período de treinamento houve um aumento da força dinâmica no exercício supino e *leg-press*, respectivamente, de 18,2% e 10,04% no grupo TFPL, ao passo que no grupo TFCr os aumentos foram de 31,5% e 14,4% ($p < 0,05$) respectivamente. O TF causou significativa diminuição na MSTN e aumento na GASP-1 em ambos os grupos no pós- treinamento ($p < 0,05$). A redução da MSTN plasmática foi maior no grupo TFCr comparada com o grupo TFPL ($p < 0,05$), mas não houve efeito adicional da suplementação de creatina sobre a

GASP-1 ($p>0,05$). O aumento da massa magra foi maior no grupo TFCr no pós-treinamento ($p<0,05$). O efeito do TF na maior diminuição da expressão da MSTN no grupo TFCr pode explicar o aumento da massa muscular que foi amplificada com a suplementação de creatina (SAREMI et al., 2009).

AOKI et al. (2009) utilizando um modelo de alongamento crônico em ratos, mostraram uma diminuição dos receptores Activina IIB e o aumento dos genes da FLST-3, GASP-1 e SMAD-7. Esse resultado foi associado ao aumento de 28% no peso do músculo sóleo em ratos. Apesar do modelo de estímulo usado nesse estudo não ter relação direta com a sobrecarga de compressão exercida no TF, foi possível inferir que o aumento na expressão dos genes antagonistas da MSTN pode contribuir diretamente para a hipertrofia muscular.

Não há relatos de estudos sobre o efeito do TF no gene da proteína SMAD-7. Somente o estudo anterior mostrou a relação entre o estímulo mecânico com o aumento na expressão dessa proteína (AOKI et al., 2009).

Resumidamente podemos destacar que os genes da FLST-3 e GASP-1 apresentam-se como fortes candidatos para a modulação da MSTN extracelular com a aplicação do TF.

3.3.4 Sinalização intracelular mediada pela hipóxia e as respostas ao treinamento de força com oclusão vascular

Vários mecanismos intrínsecos do músculo estão envolvidos nas respostas hipertróficas ao TF, incluindo fatores de crescimento autócrino/parácrino, sinalização intracelular induzidas por mudanças no ambiente local (por exemplo: hipóxia, tensão mecânica) e mudanças no conteúdo de receptores de hormônios (WERNBOM, AUGUSTSSON & RAASTAD, 2008). Alguns desses mecanismos podem estar envolvidos no aumento da síntese de proteínas a partir do estímulo oclusivo, contribuindo para o aumento da hipertrofia muscular.

Sob condição de hipóxia, a transcrição e a tradução de muitos genes responsivos ao estresse estão aumentadas (BRUGAROLAS, LEI, HURLEY, MANNING, REILING, HAFEN, WITTERS, ELLISEN & KAEIN, 2004; CORRADETTI

& GUAN, 2006; FUJITA et al., 2007; LIU, CASH, JONES, KEITH, THOMPSON & SIMON, 2006).

CORRADETTI & GUAN (2006) propuseram um modelo de eventos de sinalização intracelulares onde a mTOR pode ser inibida por vários mecanismos na condição de hipóxia. O primeiro mecanismo seria pela diminuição no estado energético da célula. Essa condição levaria à ativação da proteína “*AMP-activated protein kinase*” (AMPK). A proteína AMPK é um complexo heterotrimérico, cuja função é monitorar o estado energético da célula. Uma vez ativada, a AMPK fosforila e ativa o complexo TSC1/2 promovendo em seqüência a inibição da atividade da mTOR. A segunda possibilidade destacada no modelo é que sob condição de hipóxia, ocorre a ativação da iniciação da transcrição e tradução do HIF-1 e nessa condição, a mTOR poderia regular a modulação do HIF-1 de maneira dependente. Uma terceira possibilidade é que a inibição da mTOR poderia ser mediada pelo aumento da proteína “*reducing emissions from deforestation and forest degradation*” (REDD-1) talvez induzida pela fosforilação da AMPK. No entanto, A REDD1 é uma proteína que anula o comando das proteínas PDK/Akt, agindo entre a Akt e o complexo TSC1/2 suprimindo o crescimento celular. O fator de transcrição da proteína REDD1 é induzido pelo HIF-1 sob condições de hipóxia e é determinante para a inibição da mTOR. O mecanismo pelo qual a REDD1 inibe a mTOR em resposta ao HIF-1 permanece incerto. A quarta possibilidade é que a REDD-1 pode sofrer influência de dano ao DNA, aos glicocorticóides e a outros agentes estressores que poderiam modular negativamente a expressão da mTOR (FIGURA 4).

FIGURA 4 - Regulação da proteína mTOR sob condições de baixo nível energético e hipóxia (adaptado de CORRADETTI & GUAN, 2006)

Experimentos com células utilizando baixo nível de oxigênio com supressão do complexo TSC1/2 obtiveram como resultado um alto nível de proliferação celular, sugerindo que o complexo TSC1/2 desenvolve papel chave no controle da proliferação celular em hipóxia. Especula-se que as adaptações decorrentes da oclusão vascular poderia envolver uma menor participação o complexo TSC1/2 na condição de hipóxia e conseqüentemente o aumento da participação da mTOR na síntese de proteína.

Um estudo, em células isoladas, mostrou que a aplicação de rapamicina (um inibidor da atividade da mTOR) adicionada a hipóxia inibiu a síntese de proteínas em maior extensão comparado com a hipóxia sozinha. Isso demonstra que sob condições de hipóxia apesar da inibição na via da mTOR, alguma atividade dessa proteína continua funcionalmente ativa em suporte a tradução de proteínas seletiva em uma maneira dependente da rapamicina (HUI, BAUER, STRIET, SCHNELL & CZYZYK-KRZESKA, 2006). Diante disso, os estudos anteriores não deixaram claro

qual a principal via de sinalização intracelular que está diretamente envolvida na resposta à hipóxia.

Dois estudos de efeito agudo ao TF mostraram a participação da sinalização intracelular da proteína mTOR e síntese de proteína muscular com a aplicação de TFOV. No primeiro estudo, foram aplicadas duas sessões de TF a 20% de 1RM com e sem oclusão, no exercício de extensão de joelhos. As sessões consistiram de quatro séries (1 x 30 + 3x15 repetições) com intervalo de 30 segundos entre elas. Três horas após a realização dos protocolos de treinamento foi demonstrado um aumento de 46% na síntese de proteína muscular na condição ocluída. Segundo os autores, a elevação na síntese de proteína foi decorrente do aumento na fosforilação da proteína p70S6K1, sugerindo o aumento da tradução do mRNA. Não houve mudança significativa nas proteínas estudadas na condição sem oclusão. Houve uma tendência de aumento da fosforilação da proteína mTOR nas duas condições, porém não foi significativa (FUJITA et al., 2007).

Resultados divergentes foram observados no segundo estudo. O protocolo de TF e o tempo de coleta das amostras da biópsia foram idênticos ao estudo anterior, porém, não foram observadas mudanças na expressão das proteínas Akt, mTOR e P70S6k1 três horas após os protocolos de TF em nenhuma das condições (GO20 e G20) (DRUMMOND et al., 2008). Os autores destacaram que a inibição da atividade da mTOR/p70S6K1 pode ter sido ocasionada pelo aumento da expressão do HIF-1 na condição de hipóxia. No entanto, com a elevação do HIF-1 na condição de hipóxia, esperava-se que houvesse o aumento na expressão da REDD-1 para justificar a inibição da expressão da mTOR, porém isso não ocorreu. Outro resultado importante no estudo de DRUMMOND et al. (2008) foi a diminuição de aproximadamente 40% na expressão da MSTN e os aumentos na expressão das proteínas MyoD e da p21. As proteínas MyoD e a p21 são marcadores de transcrição e diferenciação miogênica e estão ligadas a ativação das células satélites. Por outro lado, a MSTN está diretamente à inibição da diferenciação e progressão do ciclo celular. Apesar de não ter havido diferença significativa entre as condições ocluída e sem oclusão, a expressão da proteína p21 foi quase duas vezes maior na condição ocluída se comparada com o controle. Especula-se então, que apesar do estudo de DRUMMOND et al. (2008) ter utilizado uma baixa intensidade de TF é possível que

esse estímulo tenha provocado alterações na ativação de células satélites viabilizado pela diminuição da atividade MSTN.

Nos estudos com TF de alta intensidade sem oclusão vascular ficou evidente a participação da MSTN e seus antagonistas nos aumentos da força e hipertrofia musculares. É possível também que a via de sinalização intracelular da MSTN esteja envolvida na resposta crônica da aplicação do TFOV, preferencialmente do que a via da AMPK/mTOR/HIF/REDD-1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

Participaram do estudo 29 sujeitos fisicamente ativos do sexo masculino, que não estavam envolvidos com qualquer tipo de treinamento de força nos últimos seis meses prévios ao estudo e sem antecedentes de lesões neuro-músculo-articulares nos membros inferiores.. As características dos sujeitos estão indicadas abaixo na Tabela 1. Os sujeitos foram randomicamente alocados em três grupos, balanceados pelo nível de força dinâmica máxima (1RM) no exercício extensão de joelho e pela medida da área de secção transversa (AST) do músculo quadríceps femoral. Os grupos foram definidos como baixa intensidade (BI) e alta intensidade (AI) sem oclusão vascular e baixa intensidade com oclusão vascular (BIO). Os grupos BI e BIO executaram o TF a uma intensidade correspondente a 20% 1RM e o grupo AI a 80% 1RM. Como critério de exclusão para continuidade no estudo, duas ausências às sessões de treinamento de forma alternada ou consecutiva foram permitidas

Todos os procedimentos do estudo, possíveis riscos e benefícios foram explicados aos sujeitos os quais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para participação (Anexo1). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

TABELA 1 - Características físicas dos indivíduos dos grupos BI, BIO e AI.

Variáveis	Grupos		
	BI (n=10)	BIO (n=10)	AI (n=9)
Idade (anos)	20,3 ± 4,2	20,0 ± 4,5	23,6 ± 6
Peso (kg)	75,3 ± 15,4	72,1 ± 11,9	73,8 ± 12
Estatura (cm)	175,7 ± 4,9	175,2 ± 9,0	173,6 ± 6

Valores apresentados como média ± desvio padrão. BI= grupo baixa intensidade; BIO= grupo baixa intensidade com oclusão; AI= grupo alta intensidade sem oclusão (p>0,05).

4.2 Procedimentos experimentais

Antes de iniciar as sessões de familiarização, os sujeitos foram submetidos à medida da AST do músculo quadríceps femoral por meio de imagem obtida pelo uso de ressonância magnética. Após esse procedimento, foi obtida uma amostra do músculo vasto lateral pela técnica de biópsia de agulha. Na semana seguinte os sujeitos foram familiarizados ao exercício e ao teste de força dinâmica máxima (1RM) de extensão dos joelhos. Foi também determinada a pressão de oclusão vascular de treinamento. Posteriormente à primeira sessão de familiarização os sujeitos foram submetidos ao teste de 1RM no exercício extensão dos joelhos para determinação da carga de treinamento. A medida da AST, a biópsia muscular e o teste de 1RM foram realizados antes e após oito semanas de TF com e sem oclusão vascular.

4.3 Medida da área de secção transversa muscular (AST)

A AST do músculo quadríceps femoral foi determinada através de imagem por ressonância magnética (RMI). Os sujeitos foram colocados na posição supina no aparelho de ressonância magnética (Signa LX 9.1, GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) com os joelhos estendidos. Uma visualização inicial dos membros inferiores foi

feita para determinar a distância entre o trocanter maior do fêmur e o epicôndilo lateral da tíbia em um ângulo de 0°. Essa imagem serviu de referência para a medida dos cortes proximal, medial e distal de ambas as coxas dos sujeitos. A espessura do corte de escaneamento para a medida da AST foi de 0,8 cm. A extensão do mapeamento foi marcada a cada 50 mm com um tempo de exposição de três segundos para aumentar a qualidade de resolução. A imagem e a escala associada foram então impressas sobre um padrão de transparência de imagem e transferidas para um computador. O corte foi segmentado em quatro componentes (músculo esquelético, tecido adiposo subcutâneo, osso e tecido residual). A AST do músculo quadríceps femoral foi determinada usando planimetria computadorizada através de um software de análise de imagens (Advantage Workstation 4.3, GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA). Foi adotada como medida da AST o corte medial do quadríceps femoral (ponto médio da distância entre o trocanter maior do fêmur e o epicôndilo lateral da tíbia). A medida do contorno da AST do corte medial foi repetida três vezes e a média dos valores da perna dominante dos sujeitos foi usada para análise dos dados. Foi estabelecido um coeficiente de variação (CV) inferior a 1% entre as três medidas do corte medial. As medidas da AST foram feitas uma semana antes do período de familiarização e 48 horas após o término da última sessão de treinamento (LAURENTINO et al., 2008). A medida da AST do músculo quadríceps femoral foi feita posteriormente a biópsia muscular a fim de assegurar que nenhum efeito causado por este procedimento (por exemplo: formação de edema) pudesse interferir diretamente na medida da AST.

4.4 Biópsia muscular

Uma semana antes da sessão de familiarização e 48 horas após a última sessão de treinamento foi retirada uma amostra de tecido muscular. Essa amostra serviu para a análise da expressão gênica da miostatina (MSTN), receptores Activina IIB, proteínas SMAD-7, FLST-3 e GASP-1.

As amostras pré e pós-treinamento foram retirados da perna dominante dos sujeitos. Foi utilizada a técnica de biópsia de agulha na porção medial do músculo vasto lateral. Anteriormente à extração do tecido, a área foi tricotomizada,

limpa com líquido anti-séptico e anestesiada com xilocaína (2%) injetada no tecido subcutâneo ao redor do ponto escolhido para a incisão. Uma pequena incisão (cerca de 5 mm) foi feita com um bisturi até a fáscia do músculo. A agulha de biópsia foi inserida três centímetros no músculo e um pequeno pedaço do tecido muscular (aproximadamente 70 a 100 mg) foi retirado. Após a biópsia, a incisão foi fechada com ponto falso e coberta com uma bandagem. As amostras do tecido foram limpas de sangue e tecido conectivo e congeladas em nitrogênio líquido para análise. O procedimento de biópsia foi realizado por um médico cirurgião treinado para essa finalidade.

Todos os sujeitos foram questionados quanto o uso de suplementos alimentares e drogas que pudessem afetar os resultados do estudo. Nenhum participante fez uso de qualquer substância que pudesse alterar os resultados, e todos foram solicitados a anotar as refeições nos dois dias anteriores a biópsia inicial. Um café da manhã padronizado duas horas antes do procedimento foi solicitado aos sujeitos e eles foram instruídos a repetirem o mesmo padrão alimentar na biópsia pós-treino.

4.5 Sessões de Familiarização

Os sujeitos foram submetidos a três sessões de familiarização ao exercício e ao teste de força dinâmica máxima (1RM). Na primeira sessão, os sujeitos foram familiarizados ao exercício extensão dos joelhos com e sem oclusão vascular. Na segunda sessão foi realizado o teste de 1RM para determinação da carga de treinamento dos grupos. Uma terceira sessão foi utilizada para testar a reprodutibilidade do teste de 1RM.

4.6 Teste de força dinâmica máxima (1RM) no exercício extensão dos joelhos

Para realização do teste de força dinâmica máxima (1RM) no exercício extensão dos joelhos foram adotadas as recomendações do “American Society of Exercise Physiologists” (BROWN & WEIR, 2001). Para iniciar o teste, foi realizado um aquecimento geral com corrida em esteira ergométrica a nove km/h por cinco

minutos. Em seguida foi realizada uma série de exercícios de alongamento de membros inferiores e um aquecimento específico. Na primeira série de aquecimento específico utilizaram-se cinco repetições de extensões dos joelhos, com 50% da carga estimada para 1RM. Na segunda, três repetições, com 70% da carga estimada para 1RM. Entre as séries de aquecimento foi respeitado um intervalo de dois minutos. Entre o final do aquecimento específico e o início do teste os sujeitos descansaram três minutos. Para realização do teste, o sujeito foi firmemente fixado à cadeira extensora (SL 1030, Righetto[®], Campinas, SP, Brasil) por cintas na região da coxa e tronco, evitando assim o uso de movimentos adicionais. Os sujeitos realizaram uma extensão completa dos joelhos iniciando o movimento com 90° de flexão e posteriormente retornaram a posição inicial. O peso foi progressivamente adicionado em aproximadamente 5% a partir da última sessão de aquecimento específico até que a carga máxima fosse alcançada em não mais que cinco tentativas, com intervalos de três minutos entre elas. Durante a realização do teste de 1RM foi dado ao avaliado encorajamento verbal. A maior carga alcançada durante as tentativas foi considerada como valor de 1RM. Foi solicitado aos sujeitos que não realizassem atividade física ou esforços extenuantes pelo menos 24 h antes da aplicação do teste.

4.7 Determinação da pressão de oclusão vascular de treinamento

A determinação da pressão de oclusão vascular (mmHg) foi feita com a utilização de um esfigmomanômetro de pressão sangüínea e de um aparelho *doppler* vascular (DV-600, Marted, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Os sujeitos permaneceram deitados em decúbito dorsal e o esfigmomanômetro (18 cm de largura x 80 cm de comprimento) foi colocado na região inguinal da coxa e inflado até o ponto em que o pulso auscultatório da artéria tibial fosse interrompido (LAURENTINO et al., 2008). Para as sessões de TFOV, foi adotada uma pressão equivalente a 80% da pressão de oclusão total.

4.8 Programa de treinamento de força

O treinamento teve duração total de oito semanas. Os sujeitos executaram o exercício extensão dos joelhos com intensidade correspondente a 20% 1RM nos grupos BI e BIO e 80% 1RM no grupo AI. Nas primeiras quatro semanas de treinamento, os grupos BI e BIO realizaram três séries de 15 repetições e o grupo AI realizou três séries de oito repetições. Todos os grupos obedeceram um intervalo de 60 segundos entre as séries. Após esse período, o treinamento foi alterado para quatro séries de 15 repetições para os grupos BI e BIO e quatro séries de oito repetições para o grupo AI, as quais foram mantidas até o final do estudo. A intensidade do treinamento foi ajustada a cada quatro semanas de acordo com a evolução no nível de força individual.

Para os sujeitos do grupo BIO um esfigmomanômetro foi colocado próximo à prega inguinal em ambas as coxas. O esfigmomanômetro foi inflado até uma pressão correspondente a 80% da pressão de oclusão total do fluxo sanguíneo da perna. A pressão de oclusão foi mantida durante toda a sessão de exercício, inclusive nos intervalos de descanso e liberada somente ao final da mesma. A média da pressão de oclusão utilizada nas sessões de treinamento para o grupo BIO foi de 94.8 ± 10.3 mmHg.

4.9 Análise molecular (expressão gênica)

4.9.1 Extração do RNA

Para extração do RNA total do tecido muscular foi utilizado o reagente TRIZOL (Gibco®). Para confirmação da qualidade do processo de extração foi utilizada a relação RNA/DNA, determinada no espectrofotômetro, sendo somente utilizadas amostras que atingiam o intervalo de 1.6 a 2.0. A integridade do RNA também foi verificada em gel de agarose 1%, não denaturante, corado com brometo de etídeo.

4.9.2 RT-PCR

O método de RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) foi adotado para quantificação da concentração de RNAm para as proteínas estudadas.

Uma pequena alíquota (0,5 µl) do RNA total foi submetida à técnica RT-PCR. Para isso, foi empregada a enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega Corporation) em 20 µl de reação contendo 5 µl do tampão fornecido pelo fabricante, 0,8 mM dNTPs, 1 mM MgCl₂, 0,02 µg/µl oligo-desoxitimidina *primer* (iniciador), 4 mM DTT. A reação foi realizada em termociclador de DNA (Mastercycler Gradient - Eppendorf).

Para amplificação do cDNA das proteínas de interesse foram utilizados iniciadores (*primers*) já descritos na literatura e previamente padronizados. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1.0% corado com brometo de etídeo. O gel foi fotografado pelo sistema de aquisição de imagem *Kodak Digital Science™ Eletrophoresis Documentation and Analyses System 120*. Posteriormente, a densitometria das bandas foi medida no *Kodak Digital Science™ 1D Image Analyses Software*.

4.9.3 Método de detecção da expressão gênica em tempo real

Após a obtenção do cDNA, as diferentes frações das RTs foram utilizadas na amplificação em cadeia por Polimerase (PCR) em um equipamento que monitora a amplificação em tempo real (PCR *real-time*, Applied Biosystems- GeneAmp 5700). Nesse equipamento foi determinado o início da fase de amplificação exponencial (CT, *cycle threshold*) que foi utilizado como dado para a análise da expressão gênica.

Os iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação dos genes de interesse (MSTN, Activina IIB, SMAD-7, FLST-3, GASP-1), foram desenhados com o software Primer Express. As seqüências dos primers são apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 - Seqüência de iniciadores (primers) utilizados para amplificação dos genes da proteína miostatina, Activina IIB, SMAD-7, FLST-3 e GASP-1.

mRNA (genes)		Seqüência dos primers do PCR
MSTN	5'→3' sense	GACCAGGAGAAGATGGGCTGAATCCGTT
	3'→5' anti-sense	GCTCATCACAGTCAAGACCAAAATCCCTT
ActivinIIB	5'→3' sense	GTACGAGCCACCCCCGACAGC
	3'→5' anti-sense	AGCGCCCCCGAGCCTTGAT
SMAD-7	5'→3' sense	CAGATACCCGATGGATTTTCTCA
	3'→5' anti-sense	CCCTGTTTCAGCGGAGGAA
FLST-3	5'→3' sense	TGGTGCTCCAGACTGATGTCA
	3'→5' anti-sense	CAGTGGACAAGGCCCAAGA
GASP-1	5'→3' sense	GGATTTCTGGAGGCCTGCTT
	3'→5' anti-sense	TCCAGAGGTGTGAGCCAGTCT

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do estudo são apresentados de acordo com a estatística descritiva (média e desvio padrão). Após ter verificado a normalidade dos dados, o modelo misto para medidas repetidas foi aplicado para comparar o efeito dos diferentes protocolos de TF nas variáveis dependentes (força dinâmica máxima, área de secção transversa e expressão gênica das proteínas) apresentando tempo (pré e pós) e grupos (BI, BIO e AI) como fatores fixos e os sujeitos como fator randômico.

A fim de comparar o percentual de mudanças (%) do pré e pós-treinamento para as variáveis força dinâmica máxima (1RM) e área de secção transversa (AST), foi usada a análise de variância one way (ANOVA) entre os grupos BI, BIO e AI. A porcentagem de mudança foi calculada com a seguinte equação:

$$\% \text{ Mudança} = \frac{(\text{pós} - \text{pré})}{\text{pré}} \times 100.$$

Sempre que um valor significativo de F foi obtido, um teste *post hoc* com ajustamento de Tukey foi aplicado para comparações múltiplas. O nível de

significância adotado foi de $p < 0,05$. Os dados foram analisados usando o pacote estatístico SAS 8.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

6 RESULTADOS

Inicialmente serão apresentados os resultados nas variáveis dependentes força dinâmica máxima (1RM) e área de secção transversa (AST). Em seguida serão apresentados os resultados dos dados da variação percentual (%) de mudança dos grupos para as mesmas variáveis em estudo.

Em um segundo momento, apresentaremos os resultados dos efeitos de tempo e grupo da expressão dos genes da miostatina (MSTN), Activina IIB, SMAD-7, FLST-3 e GASP-1.

6.1 Força dinâmica máxima no exercício extensão dos joelhos

Na Tabela 3 estão indicadas as mudanças nos valores absolutos de força dinâmica máxima (1RM) dos grupos BI, BIO e AI. Não houve diferença significativa nos valores iniciais de 1RM entre os grupos no pré-treinamento ($p = 0,933$). O TF promoveu um aumento significativo na força dinâmica máxima nos grupos BI, BIO e AI, comparado com os valores pré-treinamento ($p > 0,001$). No entanto, não houve diferença significativa nos valores absolutos de 1RM entre os grupos BI, BIO e AI no pós-treinamento ($p > 0,05$).

TABELA 3 - Valores absolutos de força dinâmica máxima (1RM) no exercício de extensão de joelhos dos grupos BI, BIO e AI.

1RM (Kg)	Grupos		
	BI	BIO	AI
Pré	86,2 ± 9,51	84,7 ± 14,4	86,9 ± 15,2
Pós	106,7 ± 10,8*	118,7 ± 16,3*	118,3 ± 18,9*

Valores apresentados como média ± desvio padrão. * $p < 0,05$ diferença significativa do pré-treinamento

6.2 Área de secção transversa (AST) do quadríceps femoral

Na Tabela 4 são apresentados os valores das alterações na AST para os grupos BI, BIO e AI. Não houve diferença significativa nos valores absolutos pré-treinamento de AST do músculo quadríceps femoral entre os grupos ($p = 0,691$). Houve um aumento significativo da AST nos grupos BIO e AI no pós-treinamento ($p < 0,05$), porém não foi observada diferença entre os dois grupos ($p > 0,05$). Não houve mudança significativa da AST no grupo BI pós-treinamento ($p = 0,965$). Não foi observada diferença significativa nos valores absolutos de AST entre os grupos BI, BIO e AI no pós-treinamento ($p > 0,05$).

TABELA 4 - Valores de área de secção transversa (cm^2) do quadríceps femoral para os grupos BI, BIO e AI.

	Grupos		
	BI	BIO	AI
Pré	8188 $\pm$ 1358	7720 $\pm$ 1298	8087 $\pm$ 1118
Pós	8264 $\pm$ 1174	8182 $\pm$ 1230*	8601 $\pm$ 1396*

Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.* $p < 0,05$ diferença significativa do pré-treinamento

Embora não tenham sido identificadas diferenças significantes entre os grupos BI, BIO e AI para as variáveis 1RM e AST na condição pós-treinamento, foram detectadas consideráveis variações percentuais de aumento entre os grupos para as variáveis em estudo, como observado nas figuras 5 e 6.

FIGURA 5 - Percentual de mudança na força dinâmica máxima (1RM) no exercício extensão de joelhos nos grupos BI, BIO e AI. * diferente dos grupos BIO e AI ($p < 0,05$).

A FIGURA 5 mostra a variação percentual dos valores de 1RM nos grupos BI (19,3%), BIO (33%) e AI (30,4%). Não houve diferença significativa no percentual de aumento de 1RM entre os grupos BIO e AI ($p=0,956$), porém para ambos os grupos foi observado um aumento significativo no percentual de 1RM comparado com o grupo BI no pós-treinamento ($p<0,05$).

FIGURA 6 - Percentual de mudança na área de secção transversa (AST) do músculo quadríceps femoral nos grupos BI, BIO e AI. * diferente dos grupos BIO e AI ($p<0,05$).

A FIGURA 6 representa a variação percentual dos valores de AST do músculo quadríceps femoral dos grupos BI (2%), BIO (6,3%) e AI (6,1%). Não houve diferença significativa no aumento da AST entre os grupos BIO e AI ($p=0,977$), contudo, ambos os grupos foram diferentes do grupo BI no pós-treinamento ($p<0,05$).

6.3 Expressão gênica da miostatina (MSTN)

Na FIGURA 7 está representado o efeito dos diferentes protocolos de TF na expressão gênica da MSTN. Não houve diferença significativa entre os grupos BI, BIO e AI no pré-treinamento ($p=0,965$). Houve uma diminuição significativa da MSTN

nos grupos BIO (45%) e AI (41%) ($p < 0,001$) no pós-treinamento, todavia, os grupos não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,992$). O grupo BI (16%) não demonstrou alteração significativa comparada aos valores pré-treinamento ($p > 0,05$). Foi detectada diferença significativa entre os grupos BI e BIO ($p = 0,023$), no entanto, apenas uma tendência foi observada entre os grupos BI e AI ($p = 0,065$).

FIGURA 7 - Expressão gênica da miostatina nos grupos BI, BIO e AI. *diferença significativa entre os grupos BI e BIO no pós-treinamento ($p < 0,05$).

6.4 Expressão gênica dos receptores Activina IIB

A FIGURA 8 mostra os resultados de alteração na expressão gênica dos receptores activina IIB. Não houve diferença significativa entre os grupos BI, BIO e AI no pré e no pós-treinamento ($p > 0,05$).

FIGURA 8 - Expressão gênica dos receptores Activina IIB nos grupos BI, BIO e AI nas condições pré e pós-treinamento ($p > 0,05$).

6.5 Expressão gênica da proteína SMAD-7

O efeito dos diferentes protocolos de TF na expressão da SMAD-7 está representado na FIGURA 9. Não houve diferença significativa da SMAD-7 entre os grupos BI, BIO e AI no pré-treinamento ($p = 0,474$). Houve um aumento significativo na expressão da SMAD-7 nos grupos BIO (86%) e AI (66%) no pós-treinamento ($p < 0,05$), no entanto, a diferença não foi significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Não houve mudança na expressão da SMAD-7 no grupo BI (27%) ($p = 0,356$) do pós-treinamento. Somente o grupo BIO apresentou diferença significativa comparado com o grupo BI ($p = 0,01$) no pós-treinamento.

FIGURA 9 - Expressão gênica da SMAD-7 nos grupos BI, BIO e AI. *diferença significativa entre os grupos BI e BIO no pós-treinamento ($p < 0,05$).

6.6 Expressão gênica da FLST-3

A FIGURA 10 mostra o efeito dos protocolos de TF na expressão da FLST-3. Não houve diferença significativa na expressão da FLST-3 nos grupos BI, BIO e AI no pré-treinamento ($p = 0,784$). Houve aumento significativo na expressão da FLST-3 nos grupos BI (58%), BIO (65%) e AI (94%) ($p < 0,001$) no pós-treinamento. Não houve diferença significativa entre os grupos BI e BIO ($p > 0,05$), porém a resposta no aumento da expressão da FLST-3 no grupo AI foi superior comparado com os grupos BI e BIO ($p < 0,05$) no pós-treinamento.

FIGURA 10 - Expressão gênica da FLST-3 nos grupos BI, BIO e AI. *diferença significativa entre os grupos BI, BIO e AI no pós-treinamento ($p < 0,05$).

6.7 Expressão gênica da GASP-1

A FIGURA 11 mostra o efeito dos protocolos de TF na expressão da GASP-1. Não houve diferença significativa na expressão da GASP-1 nos grupos BI, BIO e AI no pré-treinamento ($p = 0,661$). Houve um aumento significativo da GASP-1 nos grupos BIO (82%) e AI (79%) no pós-treinamento ($p < 0,001$), porém não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,996$). Não houve mudança significativa na expressão da GASP-1 no grupo BI (23%) no pós-treinamento ($p > 0,05$). Houve diferença significativa no aumento da GASP-1 dos grupos BIO e AI comparado com o grupo BI no pós-treinamento ($p < 0,001$).

FIGURA 11 - Expressão gênica da GASP-1 nos grupos BI, BIO e AI. *diferença significativa entre os grupos BI, BIO e AI no pós-treinamento ($p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

O presente estudo verificou o efeito de três modelos de TF, 20% 1RM (BI) e 80% 1RM (AI) sem oclusão; e 20% 1RM (BIO) com oclusão sobre o desempenho de força dinâmica máxima, a massa muscular de membros inferiores e a expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo de proteínas. Os resultados do estudo foram consistentes com a hipótese levantada anteriormente mostrando que os percentuais de aumento na força e hipertrofia musculares no grupo que treinou com oclusão (BIO) foi superior ao grupo que treinou na mesma intensidade sem oclusão (BI). Além disso, os percentuais dos aumentos na força e hipertrofia entre os grupos BIO e AI não foram diferentes entre si, no entanto, foram superiores ao grupo BI. Esses resultados podem ser justificados pela diminuição na expressão da MSTN e aumento na expressão dos genes que antagonizam sua atividade (SMAD-7, FLST-3 e GASP-1) nos grupos BIO e AI se comparado com o grupo BI.

É bem conhecido que o TF de baixa intensidade induz o aumento da capacidade oxidativa do músculo sem grande contribuição para os aumentos da força e hipertrofia (ACSM, 2009; TAKARADA et al., 2000b). A diferença no ganho de

força do grupo BIO foi aproximadamente 42% maior se comparado com o grupo BI. Outros estudos têm mostrado que a aplicação da compressão externa associada ao TF de baixa intensidade promove um estímulo adicional (acúmulo de metabólitos e diminuição na disponibilidade de oxigênio para o músculo) para que mais fibras musculares sejam recrutadas para manter os níveis de força entre as contrações. (MORITANI et al., 1992; TAKARADA et al., 2000b). Além disso, a adição da oclusão levaria ao aumento da intensidade do exercício promovendo a solicitação de vias anaeróbias de energia, induzindo ao aumento do conteúdo de glicogênio muscular para a mesma carga relativa comparada com a condição sem oclusão (BURGOMASTER, MOORE, SCHOFIELD, PHILLIPS, SALE & GIBALA, 2003).

TAKARADA et al. (2004) mostraram que o grupo que treinou na intensidade de TF entre 10-20% 1RM, por oito semanas, no exercício de extensão de joelhos com oclusão, aumentou a força dinâmica quase três vezes mais e a AST do músculo quadríceps femoral em 10,3% comparado com o grupo que sem oclusão. Em nosso estudo, o aumento do grupo BIO foi três vezes maior se comparado com o grupo BI (TAKARADA, TAKAZAWA & ISHII, 2000). A diferença no ganho de força dinâmica entre os grupos BI e AI foram de aproximadamente 40%, e a hipertrofia no grupo AI (6,1%) foi três vezes maior comparada com o grupo BI (2,0%). Este resultado já era esperado, pois a sobrecarga específica para promover aumentos na força e hipertrofia, estão ao redor de 70-85% 1RM (ACSM, 2009). É bem conhecido que a proporção de fibras tipo II são recrutadas quando a intensidade do exercício é elevada, gerando um maior potencial de força. Além disso, o aumento da taxa de síntese protéica foi identificado quando as intensidades de TF foram superiores a 60% 1RM (KUMAR, SELBY, RANKIN, PATEL, ATHERTON, HILDEBRANDT, WILLIAMS, SMITH, SEYNNES, HISCOCK & RENNIE, 2009).

Os resultados do presente estudo mostraram uma similaridade na magnitude dos ganhos de força dinâmica de extensores de joelhos (33% vs 30,4%) e da AST (6,3% vs 6,1%) dos grupos BIO e AI, não havendo diferença significativa entre eles. Nossos resultados foram consistentes aos apresentados por outros estudos. KUBO et al. (2006) mostraram um aumento de 5,9% na AST do músculo quadríceps femoral na perna que treinou a 20% 1RM com oclusão e 7,4% na perna que treinou sem oclusão. Não houve diferença significativa nos ganhos de hipertrofia

entre as condições após um período de oito semanas de treino. O ganho de força dinâmica dos extensores de joelhos foi de 37% na perna sem oclusão, valor este, muito próximo dos percentuais atingidos em nosso estudo, nos grupos BIO (33%) e AI (30,4%), respectivamente. Porém, no estudo de KUBO et al. (2006) não foi avaliada a força dinâmica na perna ocluída.

LAURENTINO et al. (2008) mostraram que após oito semanas de TF, nas intensidades de 60-80% 1RM, a força dinâmica e AST do músculo quadríceps femoral aumentaram em aproximadamente 35% e 6,1%, respectivamente. Outro estudo mostrou que o mesmo protocolo de TF nas intensidades de 80-90% 1RM e exercício, houve um aumento da AST em 5,4% dos músculos extensores de joelhos. Este resultado foi acompanhado do aumento da AST das fibras tipo IIb e IIa em 22% e 13%, respectivamente, porém não houve mudança na AST das fibras tipo I (WILKINSON, TARNOPOLSKY, GRANT, CORREIA & PHILLIPS, 2006). Em outro estudo, com duração de nove semanas (5-10RM) foi observado um aumento de 31% na força dinâmica (1RM) dos extensores de joelhos e o aumento da AST das fibras tipo IIa e IIb em 21% e 41%, (MARTEL, ROTH, IVEY, LEMMER, TRACY, HURLBUT, METTER, HURLEY & ROGERS, 2005).

No estudo de YASUDA et al. (2005) com a realização TFOV a 20% 1RM, por 2 semanas, foi demonstrado um aumento de 27,6% na AST das fibras tipo II e 7,8% de hipertrofia do músculo quadríceps femoral no grupo que treinou com oclusão, porém não foram observadas mudanças na AST das fibras do tipo I e II e na AST do quadríceps femoral (1,8%) no grupo que treinou sem oclusão.

Desta forma, é possível que as diferenças encontradas nos percentuais de aumento da força dinâmica entre os grupos BI, BIO e AI após o período de treinamento, sejam explicadas por mudanças na AST das fibras musculares tipo II com concomitante hipertrofia do músculo quadríceps femoral. A maior intensidade atingida no exercício induzida pela oclusão no grupo BIO e a alta carga no grupo AI, devem ter promovido um maior estímulo para que as fibras do tipo II fossem recrutadas comparadas ao grupo BI e favorecesse a maior resposta hipertrófica nestes dois grupos..

Outros importantes resultados deste estudo foram a diminuição na expressão da MSTN e o aumento significativo dos genes das proteínas inibitórias da

MSTN. Esses resultados explicariam em parte os ganhos de força e hipertrofia entre os grupos BI, BIO e AI após o período de treinamento. A MSTN é reconhecida como um potente regulador negativo da hipertrofia muscular e sua ausência está associada ao fenótipo hipermuscular em camundongos, bovinos e em humanos (LEE, 2004; SCHUELKE, WAGNER, STOLZ, HUBNER, RIEBEL, KOMEN, BRAUN, TOBIN & LEE, 2004). Por outro lado, o aumento na expressão da MSTN está diretamente associado a processo de atrofia muscular principalmente de fibras do tipo II (CARLSON, BOOTH & GORDON, 1999; JESPERSEN, NEDERGAARD, ANDERSEN, SCHJERLING & ANDERSEN, 2009).

Se a MSTN está mais expressa principalmente nas fibras tipo II, então a redução na expressão da MSTN contribui diretamente para hipertrofia muscular. Sendo assim, uma possível explicação para a similaridade de resposta na hipertrofia nos grupos BIO e AI e a diferença para o grupo BI, envolveu a redução significativa na expressão da MSTN apresentada pelos grupos BIO (45%) e AI (41%) comparados com o grupo BI (16%) que não apresentou mudança da expressão da MSTN pós-treinamento. O TFOV em baixa intensidade e o TF de alta intensidade induz preferencialmente o recrutamento e o aumento da AST das fibras tipo II para maior produção de força (ACSM, 2009; MORITANI et al., 1992; TAKARADA et al., 2000b; YASUDA et al., 2005). Estudos com o TF de moderada a alta intensidade mostraram a relação entre a diminuição na expressão da MSTN e os aumentos na força e hipertrofia (ROTH et al., 2003; SAREMI et al., 2009; WALKER et al., 2004).

O aumento da atividade da MSTN se dá pela ligação com os receptores de membrana (Activina IIB) ativando uma cascata de tradução para inibir o crescimento muscular. As diferenças entre as respostas na hipertrofia apresentadas nesse estudo nos grupos BI, BIO e AI não podem ser atribuídos a alteração na Activina IIB. Apesar de ter havido uma redução na sua expressão nos grupos BI (27%), BIO (23%) e AI (14%), após o período de treinamento, essa diferença não foi significativa no pré-treinamento e no pós-treinamento entre os grupos. Esses resultados sugerem que genes de outras proteínas antagonistas à função da MSTN podem ter contribuído para a redução de sua atividade.

A proteína SMAD-7 é apresentada como um potencial inibidor de ativação da MSTN. No presente estudo, os resultados mostraram um aumento na expressão

da SMAD-7 em 27% no grupo BI ($p>0,05$), 86% no grupo BIO e 66% no grupo AI ($p<0,05$). Os aumentos foram similares entre os grupos BIO e AI e superiores ao grupo BI, justificando a participação da SMAD-7 no bloqueio da atividade da MSTN e a possível contribuição nas respostas hipertróficas dos grupos BIO e AI e dos grupos BI e BIO. Estudos indicam que a atividade da MSTN, mediada pelas SMADs-2, 3 e 4, estimula o aumento intracelular na expressão da SMAD-7, indicando que a expressão da MSTN é auto regulada de forma dependente da SMAD-7 (FORBES et al., 2006; HAYASHI et al., 1997; KOLLIAS et al., 2006). FORBES et al. (2006) reportaram que o aumento na expressão da proteína SMAD-7 inibiu a região promotora da atividade da MSTN. Provavelmente em nosso estudo, a SMAD-7 bloqueou o aumento da transcrição da MSTN no receptor ativado I, impedindo que as SMADs 2 e 3 se ligassem a SMAD-4 e promovesse o acúmulo nuclear da SMAD-2, o que levaria à inibição do crescimento muscular (HAYASHI et al., 1997; MATSAKAS & PATEL, 2009). Um ponto muito importante destacado por MATSAKAS & PATEL (2009), é que o aumento na expressão da SMAD-7 pode inibir a expressão da MSTN endógena pela supressão da via inicializada pela MSTN exógena (FIGURA 1).

A SMAD-7 acelera e inicia a diferenciação miogênica levando a hipertrofia celular por meio da interação com a proteína MyoD, a qual ativa os promotores da SMAD-7 às suas potenciais propriedades. Desta forma, o papel fundamental para da SMAD-7 na iniciação da miogênese é através do *feedback* positivo entre a SMAD-7-MyoD e anulação da via de sinalização da MSTN (KOLLIAS et al., 2006). As diferenças no aumento de hipertrofia entre os grupos BI e BIO, podem estar diretamente relacionadas ao aumento de mais de três vezes na expressão da SMAD-7 no grupo BIO comparado ao grupo BI. Esse resultado seria causado primeiramente pelo bloqueio intracelular da MSTN através do aumento na expressão da SMAD-7. Posteriormente, pela ligação da SMAD-7 com a proteína MyoD com uma possível ativação de células satélites e por fim, todo esse processo seria viabilizado pelo recrutamento preferencial de fibras tipo II na condição de oclusão. A MSTN atua diretamente na inibição da ativação das células satélites e na diferenciação miogênica e o seu bloqueio favorece aos processos de diferenciação e proliferação celular (HARRIDGE, 2007).

Houve um aumento significativo na expressão da SMAD-7 entre os grupos BIO e AI do pré-treinamento, no entanto, não foram diferentes entre si. Somente o grupo BIO foi diferente do BI no pós-treinamento. É possível que o aumento da SMAD-7 no grupo BIO seja necessário para compensar o efeito da sobrecarga tensão gerada no TF de alta intensidade para obter o mesmo nível de hipertrofia.

Não podemos comparar nossos resultados ao estudo que investigou as respostas intracelulares ao TF de baixa intensidade com e sem oclusão na expressão da MSTN e MyoD (DRUMMOND et al., 2008). Nesse estudo de efeito agudo, os pesquisadores mostraram a diminuição em aproximadamente 40% na expressão da MSTN nas condições ocluída e sem oclusão. Somente podemos especular com nossos resultados, que as respostas na diminuição da expressão da MSTN e a possível ativação das células satélites mediadas pela expressão da SMAD-7 podem responder em parte as diferenças na resposta hipertrófica entre as condições ocluída e não ocluída em baixa intensidade de TF de forma crônica.

A proteína FLST-3 é um importante regulador fisiológico da activina e outros membros da família dos TGF- β . A FLST-3 é um regulador extracelular da activina endócrina/parácrina que procura manter o estado latente da MSTN no sangue (HILL et al., 2003; LEE, 2004). Experimentos que induziram o aumento da expressão da FLST promoveram o aumento da hipertrofia muscular (AOKI et al., 2009; LEE & MCPHERRON, 2001; WILLOUGHBY, 2004). Em nosso estudo, não foi apresentada diferença significativa nos aumentos na expressão da FLST-3 entre os grupos BI (58%), BIO (65%) no pós-treinamento, porém a magnitude dos aumentos nos grupos BI (58%) e BIO (65%) foram inferiores ao grupo AI (94%) ($p < 0,05$). Esses resultados indicam que a oclusão não promoveu efeito aditivo para inibição da expressão MSTN extracelular pela FLST-3, apesar de ter havido um aumento significativo na expressão da FLST-3 em baixa intensidade de TF da condição pré-treinamento. Desta forma, não foi possível através da expressão da FLST-3 fazer inferências com relação às diferenças nos ganhos percentuais de hipertrofia nos grupos BI, BIO e compará-los com o grupo AI. De acordo com os resultados da expressão da FLST-3 em nosso estudo, parece que o aumento na expressão da FLST-3 seja dependente da intensidade do TF, uma vez que o grupo AI e BIO apresentou aumentos superiores aos grupos BIO e BI. Corroborando com esta

hipótese, WILLOUGHBY (2004) após 12 semanas de treinamento na intensidade de 85-90% de 1RM no exercício *leg-press*, mostrou um aumento de 127% na expressão da FLST-3. Os autores associaram o aumento de 41% na força dinâmica de membros inferiores (1RM) e 67% no conteúdo de proteína miofibrilar ao aumento da FLST-3. É importante destacar que a intensidade mínima utilizada nos estudos que investigaram a resposta da expressão da FLST-3 foi de 40% 1RM.

A proteína GASP-1 é um novo membro do domínio da família da FLST que também contém múltiplos domínios sobre proteases inibitórias. Proteínas com domínio da FLST se ligam a certos membros da família do TGF- β e impedem a associação com receptores celulares de activina. HILL et al. (2003) demonstraram que a GASP-1 inibe a atividade da MSTN sugerindo que ela seja um regulador negativo deste membro específico da superfamília do TGF- β . Em nosso estudo, houve um aumento significativo na expressão da GASP-1 somente nos grupos BIO (82%) e AI (79%) ($p < 0,05$). Este resultado permite especular que as respostas hipertróficas nos grupos BIO e AI foram também mediadas pelo aumento na expressão da GASP-1, uma vez que a GASP-1 é um potente inibidor extracelular da MSTN mantendo sua latência, impedindo sua entrada na célula. Estudo recente (SAREMI et al., 2009), mostrou o aumento da concentração plasmática da proteína GASP-1 com uma expressiva diminuição da MSTN sérica. Os autores atribuíram os ganhos de força e aumento da massa magra ao bloqueio da atividade da MSTN pela proteína GASP-1

Não podemos descartar a possibilidade de influência do GH no bloqueio da atividade da MSTN. Vários estudos com o TFOV destacam a participação do GH nos efeitos promovidos por este modo de treinamento (FUJITA et al., 2007; MADARAME, NEYA, OCHI, NAKAZATO, SATO & ISHII, 2008; TAKARADA et al., 2000a; TAKARADA et al., 2000b; TAKARADA, TSURUTA & ISHII, 2004). Além disso, como foi evidenciado em dois estudos, o GH pode ter influência na redução da expressão da MSTN (LIU, THOMAS, ASA, GONZALEZ-CADAVID, BHASIN & EZZAT, 2003; MARCELL, HARMAN, URBAN, METZ, RODGERS & BLACKMAN, 2001). Porém, não foi feita a medida da concentração do GH em nosso estudo. Portanto, não podemos fazer inferências sobre a participação do GH na inibição da atividade da MSTN.

8 CONCLUSÕES

O comportamento da expressão dos genes das proteínas inibitórias relacionada à sinalização da MSTN sugere que uma forte redução da atividade desta via em resposta ao TFOV (20% 1RM) e ao TF a 80% 1RM. Estas respostas foram evidenciadas principalmente pela expressão dos genes das proteínas SMAD-7 e GASP-1. Estas estratégias promoveram uma modulação sobre a expressão dos genes da MSTN favorecendo a hipertrofia. Desta forma, nossos resultados indicam que a via de sinalização da MSTN está envolvida na hipertrofia muscular crônica induzida pelo TFOV e TF de alta intensidade, o que pode explicar em partes a similaridade de respostas evidenciada nos estudos quando se comparou as duas estratégias de TF. Por outro lado, o reduzido efeito do TF de baixa intensidade na diminuição da expressão da MSTN e aumento de seus antagonistas, permite-nos afirmar que esta estratégia de TF foi menos efetiva para promover os aumentos de força e hipertrofia se comparado às estratégias usadas pelos grupos BIO e AI. Apesar de o grupo BI apresentar um aumento da força dinâmica após o período de treinamento, a magnitude de aumento foi inferior aos grupos BIO e AI.

Limitações do estudo:

Uma limitação do estudo foi que não medimos o nível de proteína, mas somente a expressão dos genes. Embora mudanças no mRNA pode não necessariamente corresponder a mudanças no nível de proteína traduzida. No entanto, estudos têm mostrado que uma boa relação entre mRNA e proteína para a MSTN.

Poderíamos acrescentar ao desenho experimental mais dois grupos: grupo controle/controle, o qual não realizaria nenhuma tarefa e o grupo controle de alta intensidade com oclusão para que possibilitássemos as múltiplas comparações.

Por fim, faltou a apresentação de dados da análise hormonal, os quais, em conjunto com os genes, poderiam esclarecer o quanto a resposta endócrina estaria envolvida no processo de inibição e ativação do crescimento muscular.

Aplicações práticas:

O TFOV torna-se uma estratégia alternativa, para que as pessoas que têm como objetivo aumentar a força e a hipertrofia utilize a carga baixa, evitando assim lesões articulares que são freqüentes no TF convencional.

Abre-se a possibilidade de aplicação terapêutica deste modo de treinamento em pacientes com sérios problemas musculares e articulares induzidos por doenças ou por desuso. Idosos que não conseguem treinar com uma sobrecarga elevada poderiam se beneficiar deste modo de treinamento sem prejuízos para as articulações. Atletas retornando aos treinamentos no início de temporada, após um processo de lesão ou pós-cirúrgico, necessitando de um ganho rápido de massa muscular com a utilização de carga baixa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T.; BEEKLEY, M.D.; HINATA, S.; KOIZUME, K.; SATO, Y. Day-to-day change in muscle strength and MRI-measured skeletal muscle size during 7 days KAATSU resistance training: A case study. **International Journal Kaatsu training research.**, Tokyo, v.1, p.71-76, 2005.

ACSM. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.41, n.3, p.687-708, 2009.

ANTONIO, J. Human skeletal muscle hypertrophy. **Sports Nutrition Review Journal**, New York, v.1, n.1, p.1-13, 2004.

AOKI, M.S.; SOARES, A.G.; MIYABARA, E.H.; BAPTISTA, I.L.; MORISCOT, A.S. Expression of genes related to myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth. **Muscle Nerve**, Hoboken, v.40, n.6, p.992-999, 2009.

BROWN, L.E.; WEIR, J.P. ASEP procedures recommendation I: accurate assessment of muscular strength and power. **Journal of Exercise Physiology**, Duluth, v.4, n.3, p.1-21, 2001.

BRUGAROLAS, J.; LEI, K.; HURLEY, R.L.; MANNING, B.D.; REILING, J.H.; HAFEN, E.; WITTERS, L.A.; ELLISEN, L.W.; KAELIN, W.G., JR. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. **Genes and Development**, Woodbury, v.18, n.23, p.2893-2904, 2004.

BURGOMASTER, K.A.; MOORE, D.R.; SCHOFIELD, L.M.; PHILLIPS, S.M.; SALE, D.G.; GIBALA, M.J. Resistance training with vascular occlusion: metabolic adaptations in human muscle. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.35, n.7, p.1203-1208, 2003.

CARLSON, C.J.; BOOTH, F.W.; GORDON, S.E. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. **American Journal of Physiology**, Stanford, v.277, n.2 Pt 2, p.R601-606, 1999.

COOK, S.B.; CLARK, B.C.; PLOUTZ-SNYDER, L.L. Effects of exercise load and blood-flow restriction on skeletal muscle function. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.39, n.10, p.1708-1713, 2007.

CORRADETTI, M.N.; GUAN, K.L. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? **Oncogene**, New York, v.25, n.48, p.6347-6360, 2006.

DRUMMOND, M.J.; FUJITA, S.; TAKASHI, A.; DREYER, H.C.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B.B. Human muscle gene expression following resistance exercise and blood flow restriction. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.40, n.4, p.691-698, 2008.

FORBES, D.; JACKMAN, M.; BISHOP, A.; THOMAS, M.; KAMBADUR, R.; SHARMA, M. Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. **Journal of Cellular Physiology**, Malden, v.206, n.1, p.264-272, 2006.

FUJITA, S.; ABE, T.; DRUMMOND, M.J.; CADENAS, J.G.; DREYER, H.C.; SATO, Y.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B.B. Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.103, n.3, p.903-910, 2007.

GLASS, D.J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Maryland Heights, v.37, n.10, p.1974-1984, 2005.

GUALANO, B.; NEVES, M., JR.; LIMA, F.R.; DE SA PINTO, A.L.; LAURENTINO, G.; BORGES, C.; BAPTISTA, L.; ARTIOLI, G.G.; AOKI, M.S.; MORISCOT, A.; LANCHI, A.H., JR.; BONFA, E.; UGRINOWITSCH, C. Resistance Training with Vascular Occlusion in Inclusion Body Myositis: A Case Study. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, 2009.

HARRIDGE, S.D. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. **Experimental Physiology**, Berlin, v.92.5, p.783-797, 2007.

HAYASHI, A.A.; PROUD, C.G. The rapid activation of protein synthesis by growth hormone requires signaling through mTOR. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, Stanford, v.292, n.6, p.E1647-1655, 2007.

HAYASHI, H.; ABDOLLAH, S.; QIU, Y.; CAI, J.; XU, Y.Y.; GRINNELL, B.W.; RICHARDSON, M.A.; TOPPER, J.N.; GIMBRONE, M.A., JR.; WRANA, J.L.; FALB, D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and

functions as an antagonist of TGF β signaling. **Cell**, London, v.89, n.7, p.1165-1173, 1997.

HEINEMEIER, K.M.; OLESEN, J.L.; SCHJERLING, P.; HADDAD, F.; LANGBERG, H.; BALDWIN, K.M.; KJAER, M. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.102, n.2, p.573-581, 2007.

HILL, J.J.; DAVIES, M.V.; PEARSON, A.A.; WANG, J.H.; HEWICK, R.M.; WOLFMAN, N.M.; QIU, Y. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. **Journal of Biological Chemistry**, London, v.277, n.43, p.40735-40741, 2002.

HILL, J.J.; QIU, Y.; HEWICK, R.M.; WOLFMAN, N.M. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. **Molecular Endocrinology**, London, v.17, n.6, p.1144-1154, 2003.

HUI, A.S.; BAUER, A.L.; STRIET, J.B.; SCHNELL, P.O.; CZYZYK-KRZESKA, M.F. Calcium signaling stimulates translation of HIF- α during hypoxia. **Faseb Journal**, New York, v.20, n.3, p.466-475, 2006.

HULMI, J.J.; AHTIAINEN, J.P.; KAASALAINEN, T.; POLLANEN, E.; HAKKINEN, K.; ALLEN, M.; SELANNE, H.; KOVANEN, V.; MERO, A.A. Postexercise myostatin and activin IIb mRNA levels: effects of strength training. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.39, n.2, p.289-297, 2007.

HULMI, J.J.; KOVANEN, V.; LISKI, I.; SELANNE, H.; MERO, A.A. The effects of whey protein on myostatin and cell cycle-related gene expression responses to a single heavy resistance exercise bout in trained older men. **European Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.102, n.2, p.205-213, 2008.

JESPERSEN, J.G.; NEDERGAARD, A.; ANDERSEN, L.L.; SCHJERLING, P.; ANDERSEN, J.L. Myostatin expression during human muscle hypertrophy and subsequent atrophy: increased myostatin with detraining. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, Stockholm, 2009.

KARABULUT, M.; ABE, T.; SATO, Y.; BEMBEN, M.G. The effects of low-intensity resistance training with vascular restriction on leg muscle strength in older men. **European Journal of Applied Physiology**, Bethesda, 2009.

KARABULUT, M.; CRAMER, J.T.; RYAN, E.D.; ANDERSON, R.L.; HULL, H.R.; SATO, Y.; ABE, T.; BEMBEN, M.G. Effects of KAATSU on muscular function during isometric exercise. **International Journal Kaatsu Training Research**, Tokyo, v.2, p.19-28, 2006.

KAWADA, S.; ISHII, N. Changes in skeletal muscle size, fibre-type composition and capillary supply after chronic venous occlusion in rats. **Acta Physiologica (Oxf)**, Oxford, v.192, n.4, p.541-549, 2008.

KIM, J.S.; CROSS, J.M.; BAMMAN, M.M. Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, Stanford, v.288, n.6, p.E1110-1119, 2005.

KIM, J.S.; PETRELLA, J.K.; CROSS, J.M.; BAMMAN, M.M. Load-mediated downregulation of myostatin mRNA is not sufficient to promote myofiber hypertrophy in humans: a cluster analysis. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.103, n.5, p.1488-1495, 2007.

KOLLIAS, H.D.; PERRY, R.L.; MIYAKE, T.; AZIZ, A.; MCDERMOTT, J.C. Smad7 promotes and enhances skeletal muscle differentiation. **Molecular Cell Biology**, Washington, v.26, n.16, p.6248-6260, 2006.

KRAEMER, W.J.; ADAMS, K.; CAFARELLI, E.; DUDLEY, G.A.; DOOLY, C.; FEIGENBAUM, M.S.; FLECK, S.J.; FRANKLIN, B.; FRY, A.C.; HOFFMAN, J.R.; NEWTON, R.U.; POTTEIGER, J.; STONE, M.H.; RATAMESS, N.A.; TRIPLETT-MCBRIDE, T. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.34, n.2, p.364-380, 2002.

KRAEMER, W.J.; MARCHITELLI, L.; GORDON, S.E.; HARMAN, E.; DZIADOS, J.E.; MELLO, R.; FRYKMAN, P.; MCCURRY, D.; FLECK, S.J. Hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise protocols. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.69, n.4, p.1442-1450, 1990.

KRAEMER, W.J.; RATAMESS, N.A. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. **Medicine & Science and Sports & Exercise**, Madison, v.36, n.4, p.674-688, 2004.

KUBO, K.; KOMURO, T.; ISHIGURO, N.; TSUNODA, N.; SATO, Y.; ISHII, N.; KANEHISA, H.; FUKUNAGA, T. Effects of low-load resistance training with vascular occlusion on the mechanical properties of muscle and tendon. **Journal of Applied Biomechanics**, Toronto, v.22, n.2, p.112-119, 2006.

KUBOTA, A.; SAKURABA, K.; SAWAKI, K.; SUMIDE, T.; TAMURA, Y. Prevention of disuse muscular weakness by restriction of blood flow. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.40, n.3, p.529-534, 2008.

KUMAR, V.; SELBY, A.; RANKIN, D.; PATEL, R.; ATHERTON, P.; HILDEBRANDT, W.; WILLIAMS, J.; SMITH, K.; SEYNNES, O.; HISCOCK, N.; RENNIE, M.J. Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. **Journal Physiology**, London, v.587, n.Pt 1, p.211-217, 2009.

LAURENTINO, G.; UGRINOWITSCH, C.; AIHARA, A.Y.; FERNANDES, A.R.; PARCELL, A.C.; RICARD, M.; TRICOLI, V. Effects of strength training and vascular occlusion. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v.29, n.8, p.664-667, 2008.

LEE, S.J. Regulation of muscle mass by myostatin. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, Palo Alto, v.20, p.61-86, 2004.

LEE, S.J.; MCPHERRON, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v.98, n.16, p.9306-9311, 2001.

LIU, L.; CASH, T.P.; JONES, R.G.; KEITH, B.; THOMPSON, C.B.; SIMON, M.C. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. **Molecular Cell**, Massachusetts, v.21, n.4, p.521-531, 2006.

LIU, W.; THOMAS, S.G.; ASA, S.L.; GONZALEZ-CADAVID, N.; BHASIN, S.; EZZAT, S. Myostatin is a skeletal muscle target of growth hormone anabolic action. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Chavy Chase, v.88, n.11, p.5490-5496, 2003.

LOENNEKE, J.P.; WILSON, G.J.; WILSON, J.M. A mechanistic approach to blood flow occlusion. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v.31, n.1, p.1-4, 2009.

MA, K.; MALLIDIS, C.; BHASIN, S.; MAHABADI, V.; ARTAZA, J.; GONZALEZ-CADAVID, N.; ARIAS, J.; SALEHIAN, B. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, Stanford, v.285, n.2, p.E363-371, 2003.

MADARAME, H.; NEYA, M.; OCHI, E.; NAKAZATO, K.; SATO, Y.; ISHII, N. Cross-transfer effects of resistance training with blood flow restriction. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.40, n.2, p.258-263, 2008.

MARCELL, T.J.; HARMAN, S.M.; URBAN, R.J.; METZ, D.D.; RODGERS, B.D.; BLACKMAN, M.R. Comparison of GH, IGF-I, and testosterone with mRNA of receptors and myostatin in skeletal muscle in older men. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, Stanford, v.281, n.6, p.E1159-1164, 2001.

MARTEL, G.F.; ROTH, S.M.; IVEY, F.M.; LEMMER, J.T.; TRACY, B.L.; HURLBUT, D.E.; METTER, J.; HURLEY, B.F.; ROGERS, M.A. Age and sex affect human muscle fibre adaptations to heavy-resistance strength training. **Experimental Physiology**, Berlin, v.91.2, p.457-464, 2005.

MATSAKAS, A.; PATEL, K. Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. **Histology and Histopathology**, Murcia, v.24, n.2, p.209-222, 2009.

MCPHERRON, A.C.; LEE, S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v.94, n.23, p.12457-12461, 1997.

MOORE, D.R.; BURGOMASTER, K.A.; SCHOFIELD, L.M.; GIBALA, M.J.; SALE, D.G.; PHILLIPS, S.M. Neuromuscular adaptations in human muscle following low intensity resistance training with vascular occlusion. **European Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.92, n.4-5, p.399-406, 2004.

MORITANI, T.; SHERMAN, W.M.; SHIBATA, M.; MATSUMOTO, T.; SHINOHARA, M. Oxygen availability and motor unit activity in humans. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, Bethesda, v.64, n.6, p.552-556, 1992.

PIERCE, J.R.; CLARK, B.C.; PLOUTZ-SNYDER, L.L.; KANALEY, J.A. Growth hormone and muscle function responses to skeletal muscle ischemia. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.101, n.6, p.1588-1595, 2006.

REEVES, G.V.; KRAEMER, R.R.; HOLLANDER, D.B.; CLAVIER, J.; THOMAS, C.; FRANCOIS, M.; CASTRACANE, V.D. Comparison of hormone responses following light resistance exercise with partial vascular occlusion and moderately difficult resistance exercise without occlusion. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.101, n.6, p.1616-1622, 2006.

ROTH, S.M.; MARTEL, G.F.; FERRELL, R.E.; METTER, E.J.; HURLEY, B.F.; ROGERS, M.A. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v.228, n.6, p.706-709, 2003.

ROTH, S.M.; WALSH, S. Myostatin: a therapeutic target for skeletal muscle wasting. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolism Care**, London, v.7, n.3, p.259-263, 2004.

SAREMI, A.; GHARAKHANLOO, R.; SHARGHI, S.; GHARAATI, M.R.; LARIJANI, B.; OMIDFAR, K. Effects of oral creatine and resistance training on serum myostatin and GASP-1. **Molecular Cell and Endocrinology**, Massachusetts, 2009.

SATO, Y.; YOSHITOMI, A.; ABE, T. Acute growth hormone response to low-intensity KAATSU resistance exercise: Comparison between arm and leg. **International Journal Kaatsu Training Research**, Tokyo, v.1, p.45-50, 2005.

SCHUELKE, M.; WAGNER, K.R.; STOLZ, L.E.; HUBNER, C.; RIEBEL, T.; KOMEN, W.; BRAUN, T.; TOBIN, J.F.; LEE, S.J. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v.350, n.26, p.2682-2688, 2004.

SUGA, T.; OKITA, K.; MORITA, N.; YOKOTA, T.; HIRABAYASHI, K.; HORIUCHI, M.; TAKADA, S.; TAKAHASHI, T.; OMOKAWA, M.; KINUGAWA, S.; TSUTSUI, H. Intramuscular metabolism during low-intensity resistance exercise with blood flow

restriction. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.106, n.4, p.1119-1124, 2009.

TAKANO, H.; MORITA, T.; IIDA, H.; ASADA, K.; KATO, M.; UNO, K.; HIROSE, K.; MATSUMOTO, A.; TAKENAKA, K.; HIRATA, Y.; ETO, F.; NAGAI, R.; SATO, Y.; NAKAJIMA, T. Hemodynamic and hormonal responses to a short-term low-intensity resistance exercise with the reduction of muscle blood flow. **European Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.95, n.1, p.65-73, 2005.

TAKARADA, Y.; NAKAMURA, Y.; ARUGA, S.; ONDA, T.; MIYAZAKI, S.; ISHII, N. Rapid increase in plasma growth hormone after low-intensity resistance exercise with vascular occlusion. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.88, n.1, p.61-65, 2000a.

TAKARADA, Y.; SATO, Y.; ISHII, N. Effects of resistance exercise combined with vascular occlusion on muscle function in athletes. **European Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.86, n.4, p.308-314, 2002.

TAKARADA, Y.; TAKAZAWA, H.; ISHII, N. Applications of vascular occlusion diminish disuse atrophy of knee extensor muscles. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.32, n.12, p.2035-2039, 2000.

TAKARADA, Y.; TAKAZAWA, H.; SATO, Y.; TAKEBAYASHI, S.; TANAKA, Y.; ISHII, N. Effects of resistance exercise combined with moderate vascular occlusion on muscular function in humans. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.88, n.6, p.2097-2106, 2000b.

TAKARADA, Y.; TSURUTA, T.; ISHII, N. Cooperative effects of exercise and occlusive stimuli on muscular function in low-intensity resistance exercise with moderate vascular occlusion. **Japanese Journal of Physiology**, Tokyo, v.54, n.6, p.585-592, 2004.

TANIMOTO, M.M., H.; ISHII, N. Muscle oxygenation and plasma growth hormone concentration during and after resistance exercise: Comparison between "KAATSU" and other types of regimen. **International Journal Kaatsu Training Research**, Tokyo, v.1, p.51-56, 2005.

WALKER, K.S.; KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, H.K. Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in healthy men. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.36, n.5, p.787-793, 2004.

WERNBOM, M.; AUGUSTSSON, J.; RAASTAD, T. Ischemic strength training: a low-load alternative to heavy resistance exercise? **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, Stockholm, 2008.

WERNBOM, M.; AUGUSTSSON, J.; THOMEE, R. Effects of vascular occlusion on muscular endurance in dynamic knee extension exercise at different submaximal loads. **Journal of Strength and Conditioning Research**, Champaign, v.20, n.2, p.372-377, 2006.

WERNBOM, M.; JARREBRING, R.; ANDREASSON, M.A.; AUGUSTSSON, J. Acute effects of blood flow restriction on muscle activity and endurance during fatiguing dynamic knee extensions at low load. **Journal of Strength and Conditioning Research**, Champaign, v.23, n.8, p.2389-2395, 2009.

WILKINSON, S.B.; TARNOPOLSKY, M.A.; GRANT, E.J.; CORREIA, C.E.; PHILLIPS, S.M. Hypertrophy with unilateral resistance exercise occurs without increases in endogenous anabolic hormone concentration. **European Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.98, n.6, p.546-555, 2006.

WILLOUGHBY, D.S. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.36, n.4, p.574-582, 2004.

YAMADA, E.; KUSAKA, T.; TANAKA, S.; MORI, S.; NORIMATSU, H.; ITOH, S. Effects of vascular occlusion on surface electromyography and muscle oxygenation during isometric contraction. **Journal of Sport and Rehabilitation**, Lexington, v.13, p.287-299, 2004.

YASUDA, T.; ABE, T.; SATO, Y.; MIDORIKAWA, T.; KEARNS, C.F.; INOUE, K.; RYUSHI, T.; ISHII, N. Muscle fiber cross-sectional area is increased after two weeks of twice daily KAATSU-resistance training. **International Journal Kaatsu Training Research**, Tokyo, v.1, p.65-70, 2005.

YASUDA, T.; BRECHUE, W.F.; FUJITA, T.; SHIRAKAWA, J.; SATO, Y.; ABE, T. Muscle activation during low-intensity muscle contractions with restricted blood flow. **Journal of Sports Sciences**, Oxon, v.27, n.5, p.479-489, 2009.

YASUDA, T.; FUGITA, T.; MIYAGI, Y.; KUBOTA, Y.; SATO, Y.; NAKAJIMA, T.; BEMBEN, M.G.; ABE, T. Electromyographic responses of arm and chest muscle

during bench press exercise with and without KAATSU. **International Journal Kaatsu Training Research**, Tokyo, v.2, p.15-18, 2006.

ANEXO I - Termo de consentimento livre e esclarecido

ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

DA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO INDIVÍDUO
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº..... APTO.....
 BAIRRO:..... CIDADE
 CEP:..... TELEFONE:..... DDD(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:.....
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

“TREINAMENTO DE FORÇA COM OCLUSÃO VASCULAR: ADAPTAÇÕES NEUROMUSCULARES E MOLECULARES”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Prof. Dr. Valmor Tricoli

2. CARGO/FUNÇÃO

Professor Livre Docente

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO X

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA

O estudo terá duração de 15 semanas (junho – setembro 2009).

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO INDIVÍDUO OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

O objetivo deste estudo é verificar se o treinamento de força associado à oclusão vascular promove maior efeito no ganho de força e na hipertrofia muscular quando comparado ao treinamento de força isolado. Os resultados obtidos no estudo poderão ser úteis na prescrição do treinamento de força, pois se trata de uma nova proposta metodológica de treinamento que poderá ser utilizada em indivíduos saudáveis; atletas, idosos e na reabilitação de lesões. Este estudo será conduzido pelo Prof. Gilberto Cândido Laurentino – Doutorando em Educação Física pela EEFUEUSP..

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;

Antes do início do estudo, você responderá um questionário (anamnese) para identificar seu estado de saúde geral. O estudo consistirá num programa de treinamento de 10 semanas de duração. Você deverá treinar duas vezes por semana realizando o exercício de agachamento, num programa que terá como objetivo promover a melhora da força de membros inferiores, o desempenho do seu salto vertical e a hipertrofia de membros inferiores. Antes de iniciar o treinamento você passará por uma série de avaliações que serão repetidas ao final das dez semanas de treinamento. Você será avaliado no teste de 1 RM no exercício de agachamento, no salto vertical e fará um exame de ressonância magnética que servirá para avaliar o diâmetro de seu músculo da coxa. Além dessas avaliações, você será submetido a avaliações da excitabilidade reflexa. Esse teste consiste em aplicar uma estimulação elétrica sobre um nervo atrás do seu joelho e registrar a resposta a essa estimulação. Esse é um processo que causa um pequeno desconforto inicial, mas que é indolor.

3. Desconfortos e riscos esperados;

Você poderá sentir uma pequena sensação de dor no local da incisão da biópsia. Esta sensação de dor será semelhante aquela que ocorre após um treinamento físico intenso. Esta sensação não impedirá de maneira alguma a realização de tarefas diárias de rotina. Pode ocorrer também uma inflamação no local da biópsia. Além disso, deve ser feita a limpeza no local da biópsia para evitar o risco de infecção. Nos primeiros dias de treinamento, você poderá sentir dor muscular (24-72 hs após) decorrente do esforço no exercício de flexão e extensão do joelho, porém com o passar das primeiras sessões de treinamento as dores desaparecem. Para os indivíduos que treinarem com oclusão vascular, é esperado que sintam uma leve sensação de “queimação” durante a execução do exercício, que desaparece com a liberação da pressão de oclusão

4. Benefícios que poderão ser obtidos;

Não haverá compensação financeira pela sua participação neste estudo. Você receberá um relatório completo sobre seu desempenho e participação assim como do resultado final do estudo.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Não existem procedimentos alternativos aos propostos no estudo.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo se colocam a disposição para esclarecer, a qualquer momento, as possíveis dúvidas sobre os procedimentos, riscos e benefícios proporcionados pelo estudo. Caso ocorra a necessidade de atendimento médico, você será encaminhado para atendimento no Hospital Universitário ou no Hospital das Clínicas. Além disso, você tem o direito de se retirar a qualquer momento do estudo sem que isso lhe proporcione qualquer prejuízo ou transtorno. As informações obtidas durante o estudo ficarão guardadas sob sigilo e privacidade absolutos. Em caso de qualquer emergência médica, os responsáveis pelo estudo lhe acompanharão ao hospital mais próximo.

V - ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA:

Em caso de necessidade você poderá entrar em contato com o prof. Dr. Valmor Tricoli pelo telefone: 3091-2139 e/ou o Prof. Gilberto Cândido Laurentino pelo telefone: 9103391/35392446.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

Nenhuma

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.

São Paulo, de , de 2009.

assinatura do sujeito da pesquisa

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)