UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTES

AUDREI DOS REIS SANTOS

Expressão de genes envolvidos na sinalização da miostatina (GDF-8) em resposta a diferentes modelos de treinamento de força

São Paulo

2013

AUDREI DOS REIS SANTOS

Expressão de genes envolvidos na sinalização da miostatina (GDF-8) em resposta a diferentes modelos de treinamento de força

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biodinâmica do Movimento Humano

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Saldanha Aoki

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Santos, Audrei dos Reis

Expressão de genes envolvidos na sinalização da miostatina (GDF-8) em resposta a diferentes modelos de treinamento de força/ Audrei dos Reis Santos. - São Paulo: [s.n.], 2013. 92p.

Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Saldanha Aoki

1. Miostatina 2. Treinamento de força 3. Especificidade do treinamento. I. Título.

Nome: SANTOS, Audrei dos Reis

Título: Expressão de genes envolvidos na sinalização da miostatina (GDF-8) em resposta a diferentes modelos de treinamento de força

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu avô paterno, Sebastião dos Santos, que partiu sem que eu pudesse me despedir, pois a essa pesquisa me dedicara. Assim sendo, faço deste estudo a minha homenagem. Descance em paz ao lado de Deus nosso senhor.

Aos meus pais, José dos Reis Santos e Sirlei dos Santos, pelo amor incondicional e por competentemente me educar.

A minha companheira, Luciana Alvarenga, por sua paciência, confiança e inegável apoio aos meus objetivos.

A minha irmã e cunhado, Gleize dos Reis Santos e Marcelo Godoi, por estar ao meu lado independente das adversidades.

A vocês, com imenso carinho e admiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me abençoar incondicionalmente e permitir que eu evolua com competência e sabedoria.

Ao meu orientador, Marcelo Saldanha Aoki, por conceder oportunidade de prosseguir meus estudos em nível *stricto senso*, pela paciência e ensinamentos, sem os quais não poderia desenvolver e concluir este trabalho com tanta competência.

Ao Antônio Garcia Soares, técnico de laboratório do departamento de farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo (ICB-USP), por ensinar as técnicas aplicadas neste estudo, as quais permitiram seu desenvolvimento.

A prof^a Dra. Elen Haruka Miyabara, por gentilmente me receber em seu laboratório (Plasticidade Muscular, 109 - ICB-3 USP), cedendo o local para a realização dos procedimentos experimentais da minha pesquisa.

Aos orientandos da prof^a Dra. Elen Haruka Miyabara, Marcelo G. Pereira, Tabata L. Nascimento, Meiricris T. Silva e Lucila H. Silva, por contribuírem para o desenvolvimento dos procedimentos referentes ao meu estudo e, principalmente, de outros que compõem a rotina de um laboratório de pesquisa experimental.

Ao Glauco Antônio dos Santos, por me ensinar o valor do trabalho competente, inteligente, humilde e consciente. Quesitos que contribuíram, sem igual, a minha formação acadêmico-profissional e pessoal.

RESUMO

SANTOS, A. R. **Expressão de genes envolvidos na sinalização da miostatina (GDF-8) em resposta a diferentes modelos de treinamento de força**. 2013. 92f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O treinamento de força promove hipertrofia muscular esquelética e aumento da capacidade de gerar força. É preconizado que a ocorrência dessas adaptações depende da especificidade do estímulo de treinamento. De acordo com esse princípio, é esperado que as respostas adaptativas fossem específicas ao estímulo aplicado. Entretanto, tem sido observado, por exemplo, que os modelos de treinamento de força e treinamento de potência, relacionados especificamente a adaptações centrais, induzem semelhantes ganhos em força e hipertrofia. Diante dessas evidências, surgiram questionamentos sobre a validade desse princípio. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do treinamento de força e potência sobre a expressão do gene da miostatina (MSTN), associada ao controle do tamanho do músculo esquelético, e de genes relacionado a essa via de sinalização: FLST, FL3, GASP-1, ActIIB, SMAD-7 e FOXO-3A. Homens saudáveis, fisicamente ativos, foram randomicamente distribuídos, de forma balanceada, em três grupos: controle, força e potência. Os grupos treinados foram submetidos a oito semanas de intervenção (treinamento de força e treinamento de potência). Foram coletadas amostras de tecido muscular (vasto lateral) via biópsia percutânea nas condições pré e pós-treinamento. Essas amostras foram utilizadas para a análise da expressão de genes envolvidos na sinalização da MSTN por meio da PCR em tempo real. Não foi verificada alteração na expressão gênica de MSTN, ActIIB, GASP-1 e FOXO-3A após o treinamento de força e o treinamento de potência. Porém, foram observadas alterações no conteúdo de RNAm para FLST, FL3 e SMAD-7. Essas alterações foram semelhantes entre os distintos protocolos de treinamento. Os resultados do presente estudo sugerem que ambos os modelos de treinamento de força são capazes de induzir resposta similar sobre a expressão de genes envolvidos na sinalização da MSTN. A ausência de respostas específicas dentro do período investigado aponta para a necessidade de investigar o curso temporal das adaptações aos diferentes modelos de treinamento de força em longo prazo.

Palavras chave: Miostatina, treinamento de força e especificidade do treinamento.

ABSTRACT

SANTOS, A. R. **Gene's expression involved in myostatin signaling (GDF-8) in response to different types of resistance training.** 2013. 92f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Resistance training promotes skeletal muscle hypertrophy and increased ability to generate force. It is recommended that the occurrence of these adaptations depend on the specificity of the training stimulus. According to this principle, it is expected that the adaptive responses were specific to stimuli applied. However, it has been observed, for example, that models of strength training and power training, specifically related to central adaptations, induce similar gains in strength and hypertrophy. Given this evidence, questions arose about the validity of this principle. In this sense, the present study aimed to evaluate the effect of strength training and power on the expression of the myostatin gene (MSTN) associated with the control of skeletal muscle size and genes related to this signaling pathway: FLST, FL3, GASP-1, ActIIB, SMAD-7 and FOXO-7-3A. Men healthy, physically active, were randomly divided into three groups: control, strength and power. The trained groups underwent eight weeks of intervention (strength training and power training). Samples pre-and post-training were collected from muscle tissue by percutaneous biopsy of the vastus lateralis. These samples were used for analysis of the expression of genes involved in signaling MSTN by real time PCR. No change was observed in gene expression of MSTN, ActIIB, GASP-1 and FOXO-3A after strength training and power training. However, changes were observed in the content of mRNA for FLST, FL3 and SMAD-7. These changes were similar among the different training protocols. The results of this study suggest that both models of resistance training are able to induce a similar response on the expression of genes involved in signaling MSTN. The absence of specific responses within the investigated period points to the need to investigate the time course of adaptations to different models of resistance training in the long term.

Keywords: Myostatin, strength training and training specificity.

LISTA DE FIGURAS

Figura - 1	Expressão, síntese, ativação e ação da MSTN (adaptado de REBBAPRAGADA et al., 2003; RODINO-KAPLAC et al., 2009; ELKINA et al., 2011).....	28
Figura - 2	Ação da MSTN durante a miogênese e no tecido muscular esquelético diferenciado (Adaptado de LANGLEY et al., 2002; MCCROSKERY et al., 2003).....	30
Figura - 3	Ação inibitória da FLST e FL3 sobre a sinalização da MSTN (Adaptado de (HARRISON; CHAN; ROBERTSON, 2006; RODINO-KLAPAC et al., 2009).....	33
Figura - 4	Ação inibitória da GASP-1 sobre a sinalização da MSTN (Adaptado de BONALA et al., 2012).....	35
Figura - 5	Figura 5. Ação do receptor ActIIB ao se ligar a MSTN (Adaptado de SHI; MASSAGUÉ, 2003, RODINO-KLAPAC et al., 2009; ELKINA et al., 2011).....	37
Figura - 6	Ação inibitória sobre a sinalização da MSTN e mecanismos de retroalimentação positiva e negativa da SMAD-7 (Adaptado de KOLLIAS et al., 2006).....	39
Figura - 7	Ciclo inibição-ativação e ação transcricional de FOXO-3A (Adaptado de ZHANG et al., 2011; REED et al., 2012).....	40
Figura - 8	Sequência experimental.....	49
Figura - 9	Percentual médio das intensidades de treinamento para os grupos TFF e TP. Dados expresso em $M \pm DP$	51
Figura - 10	Expressão gênica da MSTN nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP). * Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P < 0,05$).....	60
Figura - 11	Expressão gênica da FLST nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP). * Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P < 0,05$).....	61

Figura - 12	Expressão gênica da FL3 nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP).* Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P<0,05$).....	62
Figura - 13	Expressão gênica da GASP-1 nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP).* Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P<0,05$).....	63
Figura - 14	Expressão gênica da ActIIB nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP).* Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P<0,05$).....	64
Figura - 15	Expressão gênica da SMAD-7 nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP).* Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P<0,05$).....	65
Figura - 16	Expressão gênica de FOXO-3A nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP).* Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P<0,05$).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características dos participantes.....	45
Tabela 2 -	Protocolo de treinamento do Grupo Potência.....	47
Tabela 3 -	Protocolo de treinamento do Grupo Força.....	48
Tabela 4 -	Número de séries e repetições semanais para o grupo TP.....	50
Tabela 5 -	Número de séries e repetições semanais para o grupo TFF.....	50
Tabela 6 -	Percentual médio da carga utilizada por cada um dos grupos de treinamento.....	51
Tabela 7 -	Genes alvo e sequência dos <i>primers</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
ActIIB	Receptor activina dois beta
AI	Treinamento de força com alta intensidade
ARP	Proteína rica em arginina
AST	Área de secção transversa
BI	Treinamento de força com baixa intensidade
BIO	Treinamento de força com baixa intensidade e oclusão vascular
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i> (Proteína morfogênica do osso)
C	Grupo controle
CT	<i>Cicle threshold</i> (Limiar de ciclo)
C-terminal	Região carbono terminal
dATP	desoxiAdenosina Trifosfatada
dCTP	desoxiCitidina Trifosfatada
dGTP	desoxiGuanosina Trifosfatada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementar
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DP	Desvio padrão
DPEC	Água dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotreitol
dTTP	desoxiTimidina Trifosfatada
EF	Exercício de força (estímulo de curto prazo)

EtOH	Etanol
FL3	<i>Folistatin-like three</i>
FLST	Folistatina
FOXO-3A	Fator de transcrição <i>Forkhead Box</i> - isoforma 3A
GASP-1	<i>Growth and differentiation factor-associated serum protein-1</i> (Fator de crescimento e diferenciação associado à proteína 1 no soro)
GDF-8	<i>Growth and differentiation factor 8</i> (Fator 8 de crescimento e diferenciação)
MD	Média
MMP	Metaloprotease
MSTN	Miostatina
N-terminal	Amino terminal
Oligo-dT	Oligo-desoxitimidina
PA	Potência absoluta
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PH	Potencial hidrogeniônico
PR	Potência relativa
Rb	Proteína retinoblastoma
RM	Repetição máxima
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotação por minuto
RT	<i>Reverse transcription</i> (Transcrição reversa)
SMAD-7	<i>Mothers against decapentaplegic</i> - isoforma 7
TA	Temperatura ambiente

TF	Treinamento de força (estímulo de longo prazo)
TFF	Treinamento de força organizado para o desenvolvimento da força máxima
TGF- β	<i>Transforming growth factor</i> - β (Fator beta de crescimento e transformação)
TP	Treinamento de potência (estímulo de longo prazo)

LISTA DE SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
cm	Centímetro
Δ	Delta
g	Grama
°	Grau – referente ao ângulo articular
°C	Graus Celsius
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Micrograma por microlitro
μL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
U/ μL	Unidade por microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	JUSTIFICATIVA.....	21
3	OBJETIVO.....	22
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
4.1	Treinamento de força.....	23
4.2	Miostatina como inibidor do crescimento do músculo esquelético.....	26
4.3	Folistatina – inibidora da miostatina.....	31
4.4	GASP-1.....	33
4.5	ActIIB.....	35
4.6	SMAD-7.....	37
4.7	FOXO-3A.....	39
4.8	Miostatina e treinamento de força.....	41
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.1	Amostra.....	45
5.2	Protocolos de treinamento.....	46
5.3	Biópsias musculares.....	52
5.4	Expressão gênica.....	53
5.4.1	Extração do RNA total.....	53
5.4.2	RT-PCR.....	53
5.4.3	Método de detecção da expressão gênica em tempo real.....	54
5.5	Análise estatística.....	56

6	RESULTADOS	58
6.1	Alterações na força máxima (1RM) e área de secção transversa muscular depois de oito semanas de TFF e TP – resultados previamente publicados (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009).....	58
6.2	Expressão de genes após oito semanas de TFF e TP.....	58
7	DISCUSSÃO	67
8	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXO A	92

1 INTRODUÇÃO

O treinamento de força (TF), reconhecidamente, induz a hipertrofia do músculo esquelético e aumenta a capacidade de gerar força (KRAEMER et al., 2002; REEVES et al., 2004; SEYNNES et al., 2007). Essas respostas adaptativas aumentam o desempenho físico, garantindo constante e difundida participação desse método de treinamento físico no esporte. Tais adaptações também têm sido associadas com a manutenção da saúde (WINETT; CARPINELLI, 2001; RATAMESS et al., 2009; ZAVANELA et al., 2012), o que permite utilizar o TF como uma estratégia não farmacológica de prevenção primária, secundária e terciária (CAKT et al., 2010; MARTINS et al., 2010; STRASSER et al., 2010).

O TF é utilizado para os mais diferentes fins, contudo, sua prescrição visa principalmente o ganho/desenvolvimento de força, potência e resistência muscular localizada (RML), bem como hipertrofia do músculo esquelético. A promoção dessas adaptações depende da manipulação das seguintes variáveis: intensidade, volume, número de repetições, ação muscular, velocidade da ação muscular, período de repouso e frequência (FRY, 2004; CREWETHER et al., 2005; RATAMESS et al., 2009). As recomendações atuais atestam que a organização dessas variáveis é fundamental para atingir adaptações específicas (KRAEMER et al., 2002; RATAMESS et al., 2009).

Nesse sentido, a recomendação para o desenvolvimento da hipertrofia é: sobrecarga moderada a alta, correspondente a cerca de 70 a 85% do valor de uma repetição máxima (1 RM), uma a três séries de seis a 12 RM realizadas com velocidade de ação muscular lenta a moderada, um a dois minutos de repouso e frequência de duas a quatro vezes por semana. A inclusão de diferentes velocidades de ação muscular (lenta, moderada e rápida) para indivíduos avançados parece potencializar a resposta hipertrófica em longo prazo, porém existem poucas evidências para suportar essa recomendação (RATAMESS et al., 2009). Em contraste, é indicada para a promoção da RML de praticantes em diferentes níveis de treinamento, a sobrecarga leve a moderada e o volume correspondente a 15 a 25 repetições, realizadas com velocidade de ação muscular lenta a moderada, múltipla séries, um a dois minutos de repouso e frequência de duas a seis vezes por semana (RATAMESS et al., 2009). Já para ganho de força, a organização recomendada das variáveis seria sobrecarga mais elevada (80 a 100% do valor de 1 RM), uma a três séries de um a seis RM, realizadas com

velocidade lenta a moderada, dois a três minutos de intervalo, duas a quatro vezes por semana para os indivíduos iniciantes e intermediários e quatro a seis ou mais vezes por semana para os indivíduos em nível mais avançado (RATAMESS et al., 2009). As recomendações para o desenvolvimento da potência muscular são: sobrecarga leve a moderada, aproximadamente 30 a 60% do valor de 1 RM para membros superiores e 0 (peso corporal) a 60% de 1 RM para membros inferiores, uma a três séries de três a seis repetições realizadas em velocidade máxima, dois a três minutos de repouso e frequência de duas a três, três a quatro e quatro a cinco vezes por semana para os indivíduos iniciantes, intermediários e avançados, respectivamente (RATAMESS et al., 2009).

Além da organização das variáveis agudas do treinamento, é imprescindível observar alguns princípios básicos para a prescrição do TF, destacando-se sobrecarga, variação, e especificidade do estímulo (KRAEMER et al., 2002; RATAMESS et al., 2009). O princípio da sobrecarga se refere ao nível de estresse aplicado no corpo durante a realização do exercício, enquanto a variação corresponde ao processo sistemático de alteração das variáveis agudas ao longo do tempo, a fim de permitir que o estímulo permaneça desafiante e efetivo. Finalmente, a especificidade consiste no pressuposto de que as adaptações induzidas pelo treinamento físico são específicas ao estímulo aplicado. Portanto, considerando o princípio da especificidade, o máximo ganho de força seria atingido com o treinamento prescrito seguindo as recomendações para aquisição de força (TFF). Em contraste, o pleno desenvolvimento da capacidade de potência seria alcançado por meio do treinamento orientado ao ganho de potência (TP). Dessa maneira, é plausível assumir que a especificidade do estímulo garantiria o surgimento de adaptações distintas entre os modelos de TF (por exemplo, TFF vs. TP). Contudo, alguns estudos têm questionado a validade desse princípio do treinamento físico (JONES et al., 2001; MCBRIDE et al., 2002). De maneira geral, estes estudos têm observado a ocorrência de adaptações funcionais semelhantes entre os protocolos de treinamento TP e TFF.

O similar ganho de força entre os dois modelos de TF (TFF vs. TP) pode, pelo menos em parte, ser explicado por meio de alterações em processos centrais de comando: maior recrutamento, sincronização e frequência de disparo de unidades motoras; redução da ação de mecanismos reflexos de proteção; e melhor coordenação entre grupos musculares agonistas, antagonistas e sinergistas (CREWETHER et al., 2005). Essas adaptações neurais são rapidamente desencadeadas em resposta ao TF, sendo observadas logo nas primeiras semanas

(MORITANI; DEVRIES, 1979). Posteriormente, à medida que o treinamento avança, são esperadas adaptações no tecido muscular, destacando-se a hipertrofia do músculo esquelético (MORITANI; DEVRIES, 1979). Essa alteração morfológica envolve o acréscimo, por exemplo, de proteínas contráteis, cuja quantidade máxima está diretamente relacionada ao aumento da força (AAGAARD et al., 2001). A intensidade ideal para promover a maior resposta hipertrófica tem sido motivo de controvérsia. Enquanto algumas recomendações priorizam ênfase na zona de intensidade moderada a alta (seis a 12 RM) (KRAEMER et al., 2002; RATAMESS et al., 2009), outras sugerem intensidades mais elevadas (> 80 a 95% de 1 RM) (FRY, 2004). Na revisão realizada por Fry (2004), a intensidade sugerida para maximizar a hipertrofia é muito próxima à intensidade utilizada para maximizar a força máxima. A tensão muscular gerada com a utilização de sobrecargas próximas do máximo constituiria um potente estímulo para a hipertrofia muscular (DREYER et al., 2006). Entretanto, a hipertrofia do músculo esquelético também tem sido observada em resposta ao estímulo do TP (MALISOUX et al., 2006). Nesse modelo de treinamento não são utilizadas elevadas cargas (0 a 60% do valor de 1 RM). Porém, grandes tensões musculares são geradas na frenagem dos movimentos durante a transição das fases concêntrica e excêntrica (CON - EXC). Como consequência, estima-se que a força gerada durante as fases de transição seja um potente estímulo para o crescimento do músculo esquelético (FARTHING; CHILIBECK, 2003; SHEPSTONE et al., 2005). Apesar do grande interesse sobre os mecanismos que promovem o ganho de força e a hipertrofia, pouco se sabe sobre as respostas moleculares que determinam as adaptações induzidas pelos diferentes modelos de TF. Diante dessas evidências, é possível afirmar que a hipertrofia do músculo esquelético pode ser induzida por meio da aplicação de diferentes modelos de treinamento (por exemplo, TFF e TP), mesmo que esses modelos não sigam as recomendações específicas do TF direcionado para a hipertrofia. O conjunto desses dados reforça a ideia de que o princípio da especificidade precisa ser analisado com cautela.

2 JUSTIFICATIVA

É preconizado que as respostas adaptativas decorrentes do TF dependem da organização das variáveis agudas dentro do programa de treinamento (RATAMESS et al., 2009). Esse pressuposto está baseado no princípio da especificidade, o qual sugere que as adaptações são específicas ao estímulo aplicado. Nessa perspectiva, seria plausível assumir que distintos modelos de TF geram adaptações diferenciadas e benefícios específicos. Entretanto, estudos relativamente recentes questionam a validade do princípio da especificidade ao demonstrarem que diferentes protocolos de TF (TFF e TP) induzem adaptações morfofuncionais similares: ganho de força e hipertrofia muscular esquelética (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009; LEAL et al., 2011). Mais especificamente, com relação ao processo de hipertrofia, diversos estudos têm investigado os mecanismos moleculares e celulares envolvidos nesse processo. No entanto, dados sobre a comparação de respostas moleculares aos diferentes modelos de TF são escassos. Já é sabido que o processo de síntese ou degradação de proteínas é influenciado por diversos genes capazes de controlar o trofismo do músculo esquelético. Recentemente, tem crescido o interesse sobre o TP, devido a evidências que demonstram a ocorrência de respostas adaptativas semelhantes às demonstradas para o treinamento organizado para o desenvolvimento da capacidade de força (TFF). Diante desse cenário, emergem alguns questionamentos: 1) os diferentes modelos de TF, que supostamente causariam adaptações distintas, induzem um padrão de expressão gênica específico? 2) o ganho de força e a hipertrofia observados no TP poderiam ser explicados pela ativação de genes envolvidos no processo de hipertrofia? E ainda: 3) o princípio da especificidade é válido para o TF? Indubitavelmente, buscar as respostas a todos esses questionamentos garantirá muitos anos de pesquisa. Entretanto, esse avanço no conhecimento será fundamental para prescrição eficiente do TF. Longe de fornecer todas essas respostas, o presente estudo tem como principal objetivo contribuir para a construção desse conhecimento e, mais especificamente, comparar o efeito dos diferentes modelos de TF (TFF e TP) sobre a expressão de genes envolvidos na via de sinalização da miostatina (MSTN).

3 OBJETIVO

Avaliar o efeito de diferentes modelos de TF (TFF e TP) sobre a expressão de genes relacionados à via de sinalização da miostatina: MSTN, folistatina (FLST), *folistatin-like three* (FL3), *growth and differentiation factor-associated serum protein-1* (GASP-1), activina II beta (ActIIB), *mothers against decapentaplegic 7* (SMAD-7) e a isoforma 3A do fator de transcrição *forkhead Box* (FOXO-3A).

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Treinamento de força

O TF tem sido amplamente adotado para os mais diversos fins, desde o aumento de desempenho até a promoção da saúde. Nas últimas décadas, esta estratégia de treinamento físico conquistou um grande espaço nos programas voltados para promoção/manutenção da saúde e também está sendo adotada no tratamento de algumas patologias (FEIGENBAUM; POLLOCK, 1999). Algumas entidades, como o *American College of Sports Medicine*, o *American Heart Association*, o *American Association for Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation* e o *Surgeon General Office*, desenvolveram guias para prescrição de exercícios de força (EF) para diversas populações (adultos, idosos, cardiopatas, hipertensos e diabéticos) (FEIGENBAUM; POLLOCK, 1999; KRAEMER et al., 2002; KRAEMER; RATAMESS, 2004). A elaboração destas recomendações/diretrizes é fruto do reconhecimento da importância do TF para prevenir/retardar o aparecimento de doenças e melhorar a qualidade de vida.

Apesar do crescente interesse nas últimas décadas, pouco é sabido sobre os efeitos dos diferentes modelos de TF sobre as respostas moleculares. Essa estratégia de treinamento é utilizada com diferentes finalidades: hipertrofia, RML, força e potência. Estes objetivos são atingidos a partir de manipulações específicas na prescrição das variáveis agudas do treinamento (KRAEMER et al., 2002; KRAEMER; RATAMESS, 2004; RATAMESS et al., 2009). As diretrizes recomendadas para o desenvolvimento de cada objetivo estão disponíveis na literatura e também já foram apresentadas na introdução deste trabalho. Resumidamente, a hipertrofia muscular seria maximizada por sessões de TF com volume moderado (seis a 12 RM) e intensidade moderada a alta. Já o trabalho para desenvolver RML deve ser realizado, segundo as recomendações vigentes, com sobrecarga leve a moderada associada às repetições que variam entre 15 e 25, configurando elevado volume. Para o desenvolvimento da capacidade de força, é recomendado o TF em alta intensidade (um a 6 RM) e volume reduzido. Por fim, o objetivo de desenvolver a potência muscular tem como diretrizes o trabalho de baixa intensidade, baixo volume, porém executado em velocidade máxima (KRAEMER et al., 2002; KRAEMER; RATAMESS, 2004; RATAMESS et al., 2009).

Estes dois últimos modelos de treinamento são bastante difundidos no esporte por sua capacidade de modular adaptações importantes relacionadas à aptidão musculoesquelética, as quais possibilitam o aumento do desempenho atlético. Embora os modelos de TFF e TP sejam

diferentes, tem sido demonstrado que ambas as estratégias de treinamento resultam em similar ganho de força e potência (JONES et al., 2001; MCBRIDE et al., 2002). Por exemplo, Jones et al. (2001) compararam as mudanças na máxima produção de potência de atletas de *baseball* submetidos ao TFF e ao TP. Esses atletas realizaram o exercício agachamento nas seguintes intensidades: 70 a 90% de 1 RM (zona de intensidade preconizada para o TFF) vs. 40 a 60% de 1 RM em velocidade máxima (zona de intensidade utilizada no TP). Após 10 semanas de treinamento, a capacidade de força e os picos de velocidade, força e potência, aumentaram de maneira similar para grupos treinados em força (TFF) e potência (TP). De maneira semelhante, McBride et al. (2002) investigaram o efeito do TFF e do TP sobre as medidas de desempenho físico e mudanças na atividade eletromiográfica (EMG). Homens com experiência no TF treinaram saltos com agachamento em grupos separados por intensidade: 30% (TP) vs. 80% (TFF) do valor de 1RM. Ao final de oito semanas, ambos os grupos apresentaram semelhante aumento dos picos de velocidade, força e potência, além de aumento similar nos valores da EMG e da força máxima. Mais recentemente, Lamas et al. (2007) compararam os efeitos do TFF e do TP sobre as alterações morfofuncionais (ganho de força e hipertrofia). Nesse estudo, homens fisicamente ativos¹ foram distribuídos em dois grupos e treinados em dois modelos de treinamento. Durante oito semanas, foi realizado o exercício agachamento com intensidades progressivas: 10 a 4 RM (TFF) vs. 30 a 60% do valor de 1 RM (TP). Após o período de treinamento, foram demonstrados ganhos semelhantes na força máxima e na hipertrofia do músculo esquelético em resposta aos dois modelos de treinamento (TFF e TP).

Além das adaptações funcionais (ganho de força e potência), alguns estudos recentes também têm investigado/comparado o efeito dos diferentes protocolos de TF sobre a hipertrofia do músculo esquelético. Estes estudos têm como objeto de investigação os eventos celulares e moleculares (vias de sinalização, enzimas, fatores de transcrição e fatores de crescimento) que governam esse processo. Tais eventos, por sua vez, são influenciados por genes que codificam proteínas capazes de ativar ou inibir, direta ou indiretamente, os processos de síntese e/ou degradação proteica. A sobrecarga mecânica induzida, por exemplo, pelo TF consiste em um potente estímulo para o acréscimo de proteínas musculares (DREYER et al., 2006), assim como a velocidade da ação muscular (CON-EXC) também poderia promover hipertrofia muscular (MALISOUX et al., 2006). Dessa forma, alguns estudos têm direcionado a sua atenção às respostas moleculares a essa estratégia de

¹ Indivíduos com diferentes hábitos de prática de exercício

treinamento. Nessa perspectiva, Lamas et al. (2009) compararam o efeito do TFF e do TP sobre a expressão de genes que controlam a plasticidade do músculo esquelético. Nesse estudo, homens fisicamente ativos foram treinados em intensidades distintas por oito semanas: 10 a 4 RM (~75 a 90% de 1 RM) (TFF) vs. 30 a 60% de 1 RM (TP). Os genes estudados foram mTOR, RICTOR e RAPTOR, proteínas responsáveis pela formação do complexo enzimático TORC – ativador da tradução proteica. Foi evidenciado que ambos os TFF e TP aumentaram de forma similar o nível de RNAm para mTOR e RICTOR. Com relação ao gene que codifica a proteína RAPTOR – proteína chave para o reconhecimento do substrato pelo complexo TORC – foi detectado maior aumento após o TFF (três vezes) em comparação ao TP (duas vezes). Posteriormente, Leal et al. (2011) investigaram o efeito desse mesmo protocolo de TFF e TP sobre a expressão gênica e tradução de proteínas da via de sinalização WNT. Essa via está relacionada à hipertrofia muscular induzida por sobrecarga mecânica. O estudo envolveu homens fisicamente ativos que foram distribuídos nos grupos força (TFF) e potência (TP). Assim como no estudo de Lamas et al. (2009), no estudo conduzido por Leal et al. (2011) foi realizado o exercício agachamento (10 a 4 RM vs. 30 a 60% de 1 RM) durante oito semanas. Após esse período, o resultado das análises demonstrou que tanto TFF quanto TP ativaram a expressão de componentes da via de sinalização WNT, sendo observado aumento do nível de RNAm para WNT1, LEF1 (fator de transcrição) e SFRP1, inibidor da via. Curiosamente, o TP promoveu maior aumento sobre expressão de alguns genes relacionados a essa via. Portanto, apesar de induzir adaptações morfofuncionais semelhantes, os protocolos (TFF e TP) podem ativar (ou potencializar) a expressão de genes de forma seletiva. É possível especular que essas respostas, em longo prazo, podem conferir a especificidade do estímulo do treinamento.

Entre o conjunto de genes capazes de controlar as alterações no volume do músculo esquelético por meio do estímulo do TF, destaca-se o gene que codifica a MSTN, também conhecida como *Growth and differentiation factor 8* (GDF-8) (GONZALEZ-CADAVID et al., 1998; ZIMMERS et al., 2002). Essa proteína pertencente à família dos *Transforming growth factor – β* (TGF- β) e quando associada ao seu receptor de membrana, ActIIB, exerce efeito repressor sobre o crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético (MCPHERRON et al., 1997; MCPHERRON; LEE, 1997). Em experimentos realizados por Willoughby (2004), Roth et al. (2003), Kim, Cross e Bamman (2005) e Hulmi et al. (2007), foram observadas alterações na expressão gênica e proteica da MSTN, ActIIB e dos inibidores endógenos deste fator de crescimento após o TF. Sendo o TP e o TFF capazes de induzir adaptações morfofuncionais e moleculares, seria plausível assumir que ambas as

estratégias de treinamento pudessem também influenciar a expressão/atividade da MSTN, bem como o seu receptor de membrana (ActIIB), o fator de transcrição FOXO-3A e alguns inibidores endógenos, como a FLST, FL3, GASP-1 e SMAD-7 (HILL et al., 2002).

4.2 Miostatina como inibidor do crescimento do músculo esquelético

A MSTN, ou GDF-8, pertence à superfamília TGF- β (MCPHERRON et al., 1997; MCPHERRON; LEE, 1997). Essa proteína participa da via de sinalização proteolítica (MCFARLANE et al., 2006; LOKIREDDY et al., 2012) e, consequentemente, do processo de atrofia do músculo esquelético (DURIEUX et al., 2007; LEGER et al., 2008; AMIROUCHE et al., 2009). Experimentos conduzidos em laboratório com camundongos nocaute para a MSTN permitiram observar que a deleção do gene que codifica essa proteína está associada tanto à hipertrofia quanto à hiperplasia muscular esquelética (MCPHERRON et al., 1997). O aumento da massa muscular observado no modelo animal mencionado, sugere que essa proteína exerça a função de reguladora negativa do crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético (MCPHERRON et al., 1997). Essa função foi comprovada no final da década de 90 (MCPHERRON et al., 1997; MCPHERRON; LEE, 1997). Em 1997, foi demonstrado que mutações no gene que codifica esta proteína são capazes de promover um ganho extraordinário de massa muscular em bovinos (MCPHERRON; LEE, 1997), o que posteriormente, foi também constatado em cães da raça *Whippet* (MOSHER et al., 2007; SHELTON; ENGVALL, 2007). Além dos fenótipos relacionados à mutação no gene da MSTN observados em animais, em 2004 foi descrito o primeiro caso identificado de mutação em um ser humano (SCHUELKE et al., 2004). Descrita como uma substituição de um nucleotídeo “g” para um “a” no gene da MSTN (g IVS1+5), essa mutação foi caracterizada pela perda de função no gene que codifica a MSTN, sugerindo que a sua inativação tenha efeito semelhante em animais e humanos (SCHUELKE et al., 2004).

A síntese da MSTN ocorre no músculo esquelético. Na fase pré-natal, essa proteína é produzida durante o desenvolvimento embrionário (MCPHERRON et al., 1997). Nesse período, o conteúdo dessa proteína aumenta à medida que os mioblastos primários iniciam sua fusão e diferenciação (MCPHERRON; LEE, 1997). Já na fase pós-natal, a MSTN é sintetizada em níveis variados entre os diferentes grupos musculares. (MCPHERRON; LEE, 1997; HENNEBRY et al., 2009). O efeito da MSTN sobre o crescimento do músculo esquelético parece ser específico às fibras de contração rápida, uma vez que foi constatada acelerada atrofia de fibras do tipo II, à medida que o nível dessa proteína está elevado

(JESPERSEN et al., 2011). Em adição, a MSTN parece regular também a composição do tipo de fibra muscular. A ausência de MSTN em camundongos nocaute para essa proteína foi associada à redução de fibras do tipo I e IIA (oxidativas lenta e rápida) e aumento do número de fibras do tipo IIB (glicolíticas – IIX em humanos) (HENNEBRY et al., 2009). O mecanismo responsável por essa mudança na composição dos tipos de fibras ainda não está totalmente elucidado. Entretanto, foi demonstrado que a MSTN pode alterar a composição dos tipos de fibras musculares durante a miogênese pré e pós-natal por meio do controle do número de mioblastos e/ou via regulação da expressão de MEF2 e MyoD (fatores de transcrição responsáveis pela formação de fibras do tipo I e II, respectivamente) (HENNEBRY et al., 2009). Além disso, foi detectado baixo nível de MSTN em outros tecidos como: adiposo, túbulo alveolar, glândula mamária, anticorpos, encéfalo e nas células de Purkinje no coração. Entretanto, a sua ação nesses sistemas ainda não é bem conhecida (SHARMA et al., 2001).

A MSTN é sintetizada associada ao seu propeptídeo, o qual a mantém em estado latente (LEE; MCPHERRON, 2001; HILL et al., 2002). Em sua forma precursora (proproteína), essa proteína é constituída por um conjunto de 375 aminoácidos (aa) (MCPHERRON et al., 1997) e apresenta em sua estrutura um núcleo hidrofóbico próximo a região N-terminal que funciona como uma sequência de sinais responsáveis pelo seu envio ao espaço extracelular (SHARMA et al., 2001). Quando secretada, a MSTN passa por dois processos de clivagens, induzidos provavelmente por metaloproteases (MMP) (HUET et al., 2001), para se tornar biologicamente ativa (MCPHERRON et al., 1997). Primeiro, um conjunto de 23 aa é removido e em seguida ocorre uma clivagem nos aminoácidos 263-266, gerando os fragmentos C-terminal (forma não-glicosilada, constituída de 109 aa) e N-terminal (forma glicosada, constituída de 243 aa) (MCPHERRON et al., 1997; MCPHERRON; LEE, 1997). O peptídeo C-terminal (267-375 aa) é a forma ativa da MSTN. Quando inativa, essa molécula é dimerizada por meio de pontes dissulfeto e enrolada em de nós de cisteína, mantendo, assim, seus sítios de ligação bloqueados para a interação com seu receptor de membrana. Esse processo é induzido pelo próprio fragmento N-terminal (24-266 aa), conhecido como o propeptídeo, que, dessa forma, inibe a atividade do dímero C-terminal (LEE; MCPHERRON, 2001; THIES et al., 2001).

A ação da MSTN sobre o controle da massa muscular esquelética é exercido de maneira autócrina-parácrina. Em sua forma ativa, ou seja, livre de seu propeptídeo, essa proteína é capaz de interagir com seu receptor de membrana ActIIB (receptor quinase do tipo serina/treonina) que recruta receptores do tipo I (receptor quinase 4 e ou 5 semelhantes a

activina). A sinalização modulada pela MSTN ocorre por meio de uma cascata de eventos envolvendo a fosforilação de receptores tipo II-I, ActIIB e ALK4/ALK5, que por sua vez fosforilam as proteínas SMAD-2 e 3 (BOGDANOVICH et al., 2002; REBBAPRAGADA et al., 2003; ZHU et al., 2004). As SMADs são proteínas que agem como transdutores de sinais intracelulares e, quando fosforiladas, funcionam como fatores de transcrição, ativando ou inibindo a síntese de proteínas envolvidas na regulação da massa muscular (por exemplo, E3 ligases) (ZHU et al., 2004).

Figura 1- Expressão, síntese, ativação e ação da MSTN (adaptado de REBBAPRAGADA et al., 2003; RODINO-KAPLAC et al., 2009; ELKINA et al., 2011).

Durante a miogênese, a MSTN regula a progressão do ciclo celular de mioblastos por meio do controle de quinases dependentes de ciclina (Cdks), ou seja, enzimas que catalisam eventos requeridos para a transição das fases do ciclo celular de G_1 para S e de G_2 para M e de seus inibidores, como, por exemplo, a proteína p21 (THOMAS et al., 2000). Nesse processo, a MSTN estimula o aumento da p21 e a redução do nível proteico e atividade da Cdk2,

induzindo, assim, a inativação do complexo Ciclina-E-Cdk2 (THOMAS et al., 2000). Isso resulta na supressão da fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb) e na consequente interrupção do ciclo celular de mioblastos na fase G_1 (THOMAS et al., 2000). Na célula muscular diferenciada, a MSTN atua como inibidora da ativação e proliferação de células satélites, mantendo-as em estado quiescente (inativa) (MCCROSKERY et al., 2003). Essas células são capazes de reparar o tecido após o dano muscular. Assim, a MSTN teria, portanto, um papel na regeneração muscular (SHARMA et al., 2001). Porém, não há consenso sobre essa proposição na literatura.

A) Ação da MSTN durante miogênese. Durante a embriogênese miogênica, Myf5 e MyoD exercem um papel chave no início da diferenciação de mioblastos. A ação dessas proteínas induz a expressão de miogenina e fatores de transcrição a partir da família dos fatores 2 de potencialização de miócitos (E2F). A proliferação de mioblastos é regulada pela MSTN via regulação ascendente da p21, que inibe a atividade da Cdk2, resultando em hipofosforilação da Rb. A Rb hipofosforilada é responsável por manter as células na fase G1 por meio da sequestração de E2F, provocando, no caso, a interrupção do ciclo celular dos mioblastos. Porém, quando fosforilada pelo complexo Ciclina-E-Cdk2, a Rb é inativada, o que induz a libertação de E2F e consequente estímulo para a transcrição de genes miogênicos. Em resposta a um sinal para a diferenciação, MyoD se torna funcional e ativa a expressão de genes que estão abaixo da via miogênica, como a miogenina. Isso resulta na fusão de mioblastos em miotubos multinucleados. Nesse processo, a MSTN inibe a expressão de MyoD por meio da SMAD-3 após o sinal para a diferenciação. Reduzindo, assim, a expressão, de genes abaixo da cadeia miogênica, e a diferenciação miogênica. **B) Ação da MSTN no tecido muscular esquelético diferenciado.** Em condições fisiológicas normais, as células satélites estão inativas. Porém, quando de eventos lesivos, por exemplo, essas células são ativadas para dar origem a mioblastos, os quais podem se fundir a fibras pré-existentes ou se diferenciar em novos miotubos. A proporção de proliferação dos mioblastos age também como um mecanismo de autorregulação que pode retornar as células satélites à condição inativa. Além disso, a MSTN, em nível elevado, bloqueia a ativação das células satélites, mantendo-as em estado quiescente.

Figura 2 - Ação da MSTN durante a miogênese e no tecido muscular esquelético diferenciado (Adaptado de LANGLEY et al., 2002; MCCROSKERY et al., 2003).

Estudos mostraram que a expressão da MSTN é regulada em situações de alteração na massa muscular (LEE et al., 2004; PATEL; AMTHOR, 2005). Patologias que promovem intenso catabolismo, como câncer e AIDS, estão positivamente relacionadas ao aumento na

expressão da MSTN (GONZALEZ-CADAVID et al., 1998; ZIMMERS et al., 2002). Em contrapartida, seria esperado que o estímulo do TF pudesse exercer algum tipo de modulação sobre a expressão/atividade da MSTN, uma vez que esta estratégia é capaz de promover a hipertrofia do músculo esquelético. Embora o efeito do TF sobre a manutenção/ganho da massa muscular seja bem reconhecido, pouco se sabe a respeito da regulação de genes relacionados com o processo de hipertrofia em resposta a este poderoso estímulo mecânico. Entre os genes mais estudados, destacam-se os que codificam a MSTN e outras proteínas que podem influenciar a atividade da mesma, como: o seu receptor de membrana, ActIIB; os seus inibidores endógenos, FLST, FL3, GASP-1 e SMAD-7; e o fator de transcrição FOXO-3A.

4.3 Folistatina – inibidor da Miostatina

Conhecida como uma proteína ligante de activina e MSTN, a FLST é uma glicoproteína extracelular expressa no miótomo (CURRIE; INGHAM, 1998). A FLST é um importante antagonista de numerosos membros da superfamília TGF- β , como a MSTN e as *bone morphogenic protein* (BMP) (AMTHOR et al., 2002; AMTHOR et al., 2004). Essa proteína também pode exercer similar função inibitória para a activina e receptores do tipo II, como a ActIIB (SUGINO et al., 1993; LINK; NISHI, 1997; HARRISON; CHAN; ROBERTSON, 2006). Inicialmente isolada em fluídos gonadais, a FLST atua de maneira autócrina – parácrina, exercendo inúmeros papéis fisiológicos como a regulação endócrina (produção) do hormônio pituitário folículo estimulante (FSH), maturação do folículo ovariano, homeostase hepática, reparo de lesões e espermatogênese, além de responder também ao estímulo inflamatório (SIDIS et al., 2006). O seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido, mas sabe-se que a ausência da FLST está associada ao desenvolvimento anormal: queda de cabelo, enfraquecimento muscular e morte prematura (SIDIS et al., 2006). Além do mais, sua deficiência também induz uma total redução da massa muscular esquelética, sugerindo exercer importante papel na morfogênese do miótomo (MATZUK et al., 1995).

Existem diversas isoformas de FLST. Por exemplo, via *splicing* alternativo dos genes codificadores da FLST humana, pré-FLST-317 e pré-FLST-344, são produzidos respectivamente os transcritos FLST-288 e FLST-315 (SHIMASAKI et al., 1988). Um terceiro transcrito, FLST-303, parece surgir da clivagem da FLST-315, entre os aminoácidos 300 e 303 de sua região C-terminal (SUGINO et al., 1993). Essas isoformas da FLST apresentam um domínio N-terminal (ND) e três domínios FLST (FSD1, 2 e 3), que unem a

molécula aos seus respectivos ligantes, e uma região de resíduos básicos (sítios de ligação a heparina) conhecidos como *heparin-binding sequence* – HBS, que permitem a sua ligação a proteoglicanas heparina-sulfatadas (SUMITOMO et al., 1995; SIDIS et al., 2005; CASH et al., 2012). A interação com essas proteoglicanas (via ligação a heparina) permite a sua ligação na membrana celular e consequente ação local (HILEMAN et al., 1998). Além dessas isoformas, um gene semelhante ao da FLST codifica a *folistatin-like three* (FL3). Inicialmente descoberta como uma molécula envolvida na leucemia (HAYETTE et al., 1998), essa proteína possui função homóloga a da exercida pela FLST (TSUCHIDA et al., 2000). Em sua estrutura, entretanto, ocorre ausência do domínio FSD3 e do HBS (SIDIS et al., 2005). Isso indica que os domínios FSD1, FSD2 e ND são os meios de interação com seus ligantes (MSTN, por exemplo) (CASH et al., 2012). Além do mais, a ausência do HBS em sua estrutura sugere que a FL3 e a FSTN associem-se a heparina por meio de diferentes vias (TSUCHIDA et al., 2000). Contudo, ambas as isoformas da FLST e a FL3 suprimem a ação dos fatores inibitórios da morfogênese, porém cada uma possui capacidade inibitória (SIDIS et al., 2006) e de ligação a diferentes ligantes (CASH et al., 2012) potencialmente distintas.

O mecanismo de ligação entre FLST/FL3 e MSTN ainda é incerto. No entanto, estima-se que essas proteínas interajam por alta afinidade, de maneira direta e concentração dependente (AMTHOR et al., 2004). A interação entre MSTN e ActIIB induz fosforilação e consequente ligação das R-SMAD-2/3 e Co-SMAD-4 e posterior migração desse complexo para o núcleo. O complexo SMAD formado modula a transcrição de genes alvo envolvidos no desenvolvimento do músculo esquelético, como pax-3 e MyoD. No entanto, a FLST e a FL3 parecem inibir completamente a ativação da MSTN, prevenindo sua ação inibitória sobre o desenvolvimento muscular (AMTHOR et al., 2004). Portanto, é possível afirmar que a FLST e a FL3 são potentes inibidores da sinalização exercida pela MSTN. Isso foi comprovado pelo estudo conduzido por Lee et al. (2001). Estes autores demonstraram que a superexpressão da FLST em ratos transgênicos maximizou o ganho de massa muscular. Willoughby (2004) demonstrou aumento do conteúdo proteico da FL3 (127%), concomitante ao ganho de massa muscular após 12 semanas de TF realizado por homens, reforçando o papel da FLST/FL3 no processo de hipertrofia.

Figura 3 – Ação inibitória da FLST e FL3 sobre a sinalização da MSTN (Adaptado de (HARRISON; CHAN; ROBERTSON, 2006; RODINO-KLAPAC et al., 2009).

4.4 GASP-1

A *growth and differentiation factor-associated serum protein-1* (GASP-1), é uma inibidora de proteases pertencente à família das proteínas dotadas de domínios FLST (HILL et al., 2003). Essas proteínas são capazes de se ligar a certos membros da superfamília TGF- β e prevenir que estes se associem aos seus receptores celulares (NAKAMURA et al., 1990; DE WINTER et al., 1996; FAINSOD et al., 1997; THIES et al., 2001). A GASP-1 é altamente expressa no músculo esquelético e cardíaco, além de ser também produzida no encéfalo, pulmão, testículo e, em baixo nível, nos rins e fígado (HILL et al., 2003). Estruturalmente, essa proteína possui 571 aminoácidos, um sítio para sinal sequência/clivagem na região N-terminal, um domínio FLST e dois possíveis locais para N-glicosilação nos aminoácidos 314 e 514 (HILL et al., 2003). A presença dos domínios conservados: WAP; Kazal (semelhante ao domínio FLST); imunoglobulina; dois Kunitz; e uma netrina no C-terminal, confere-lhe

provável ação inibitória da atividade de proteases (ALTSCHUL et al., 1990; BANYAI; PATTHY, 1999; MOTT et al., 2000; BATEMAN et al., 2002). Embora o significado biológico dos domínios inibitórios em GASP-1 não seja amplamente conhecido, especula-se que estes possibilitem a participação dessa proteína em processos que, provavelmente, envolvam a participação de proteases, como: a ativação do complexo latente de MSTN; e o processamento da proproteína MSTN para a formação da proteína madura e ativa (HILL et al., 2003). Por exemplo, os membros da família TGF- β são processados por clivagem proteolítica de uma proproteína em um sítio de clivagem furina². Esse processo resulta na produção de duas cadeias polipeptídicas: o propeptídeo e a proteína madura/ativa, que permanecem associadas de maneira não covalente (HILL et al., 2003). Após o processo de clivagem, a TGF- β é secretada como um complexo latente constituído de duas moléculas da proteína ativa e de dois propeptídeos (HILL et al., 2003). A MSTN também é secretada como um complexo latente, sendo igualmente ativada pela proteólise de seu propeptídeo. Nesse caso, a GASP-1 pode inibir esse processo, mantendo, assim, a MSTN em sua forma latente/inativa (HILL et al., 2003). Além disso, a GASP-1 pode impedir o processamento da proproteína MSTN via inibição de uma protease semelhante à furina, resultando na inibição da clivagem e, portanto, mantendo a MSTN inativa (HILL et al., 2003). Ao tratar mioblastos C₂C₁₂ com inibidores de metaloproteases à base de hidroxamato, Hill et al. (2003) observaram aumento da fusão dessas células, o que levou a hipertrofia. Com esse tratamento, observaram também aumento do conteúdo de MSTN não processada, sugerindo que a hipertrofia pode ser resultado da inibição do processamento da MSTN (HILL et al., 2003). Sendo assim, ao regular o processamento dessa proteína, a GASP-1, então, contribuiria para o processo de hipertrofia do músculo esquelético. Ao contrário da FLST e FL3, a GASP-1 inibe, direta e de maneira concentração-dependente, apenas a MSTN e as BMPs (HILL et al., 2003). Portanto, a GASP-1 parece ser o primeiro exemplo de proteína dotada de domínios FLST capaz de inibir um membro específico da superfamília TGF- β sem bloquear activina (HILL et al., 2003). Essa seletividade pode ser atribuída a regiões fora do domínio FLST, que facilitam a ligação com a MSTN e seu propeptídeo. Isso sugere uma possível regulação negativa da ação da MSTN via mecanismo adicional independente do domínio FLST. Essas características específicas da GASP-1 a classificam como uma nova classe de proteínas inibitórias ligantes de TGF- β (HILL et al., 2003).

² Proproteína convertase que processa proteínas precursoras latentes em sua forma biologicamente ativa.

Figura 4 - Ação inibitória da GASP-1 sobre a sinalização da MSTN (Adaptado de BONALA et al., 2012).

4.5 ActIIB

A ActIIB é um receptor transmembrana para os membros da superfamília TGF- β (MANNING et al., 2002). Entre os receptores do tipo II identificados: ActRIIA; ActRIIB; BMPRII; TGFBRII; e MISRII, a ActIIB representa maior interesse, pois reconhece múltiplas formas de ligantes – como activina, *Growth and differentiation factors* (GDFs), e subgrupos da BMP (SAKO et al., 2010). A estrutura deste receptor compreende 500 aminoácidos distribuídos entre um domínio extracelular ligação-ligante na porção N-terminal, um domínio quinase serina/treonina na porção C-terminal e uma região transmembrana (SHI; MASSAGUE, 2003). Expresso no encéfalo, fígado, gônadas, músculos cardíaco e esquelético (GARG et al., 1999), o receptor ActIIB está envolvido no desenvolvimento embriogênico e na regulação pós-natal de vários processos: vascularização, osteogênese e crescimento do

músculo esquelético (TSUCHIDA et al., 2008). A ausência do receptor ActIIB induz malformações cardíacas e renais, defeitos no padrão axial e perturbações de assimetria direita-esquerda (OH; LI, 1997). A sinalização via receptor ActIIB inicia com a formação do complexo hexamérico ligante-receptor, que permite fosforilar receptores do tipo I, os quais fosforilam proteínas SMAD, subsequentemente translocadas ao núcleo, onde controlam a expressão de diferentes genes (TSUCHIDA et al., 2008). O referido receptor exibe alta afinidade e especificidade a MSTN, unindo-se a esse ligante por meio do domínio extracelular (SAKO et al., 2010). Após essa ligação, é formado o complexo com receptor do tipo I, ALK4 ou ALK5, que induz a fosforilação das SMAD-2 e SMAD-3, que, por sua vez, ativam uma via de sinalização intracelular de genes alvo dependentes de TGF- β /activina (REBBAPRAGADA et al., 2003). Esse processo induz a regulação descendente de várias proteínas chave ao processo da hipertrofia muscular, concomitantemente ao estímulo das vias de degradação (MCCROSKERY et al., 2003; JOULIA-EKAZA; CABELLO, 2006). Portanto, é possível afirmar que a ActIIB tem expressiva participação no controle do trofismo do músculo esquelético (REBBAPRAGADA et al., 2003).

Figura 5. Ação do receptor ActIIB ao se ligar a MSTN (Adaptado de SHI; MASSAGUÉ, 2003, RODINO-KLAPAC et al., 2009; ELKINA et al., 2011).

4.6 SMAD-7

As *Mothers against decapentaplegic* (MADs) formam um grupo de oito moléculas importantes na transdução de sinais intracelulares por meio da fosforilação/ativação de receptores quinase serina do tipo I (ATTISANO; WRANA, 2000; ROSENDAHL et al., 2001; ZHU et al., 2004). As MADs, ou SMADs, são ativadas pelos receptores da superfamília TGF- β e estão divididas em três subfamílias de acordo com as suas funções: SMAD regulada por receptor (R-SMAD-1, 2, 3, 5 e 8); SMAD de par comum (Co-SMAD-4); e SMAD inibitória (I-SMAD-6 e 7). As R-SMADs-1, 5 e 8 medeiam sinais para as BMPs, as SMADs-2 e 3 atuam sobre a via activina e TGF- β e a Co-SMAD-4 regula positivamente as SMADs mencionadas (LIU et al., 1996; NAKAO et al., 1997; DERYNCK et al., 1998; ATTISANO; WRANA, 2000; FENG et al., 2000). As I-SMADs ligam-se ao domínio intracelular do receptor tipo I e inibem a ação dos membros da superfamília TGF- β . A SMAD-6 age primariamente sobre as BMPs, competindo com receptores regulados pelas SMADs-1, 5 e 8,

enquanto a SMAD-7 anula a sinalização da activina e TGF- β , impedindo a formação do complexo SMAD-2, 3 e 4 (CHEN et al., 1996; HAYASHI et al., 1997; IMAMURA et al., 1997; HATA et al., 1998; ISHISAKI et al., 1998; ISHISAKI et al., 1999). Inicialmente, a SMAD-7 foi caracterizada como um fator induzido por estresse em células do endotélio vascular. No geral, sua ação estimula a diferenciação de mioblastos, induzindo hipertrofia muscular esquelética por meio da retroalimentação positiva com o fator de transcrição MyoD (KOLLIAS et al., 2006). Nesse processo, a MyoD ativa o promotor da SMAD-7, aumentando a expressão do gene que codifica essa proteína, a qual, ao inibir o complexo SMAD (formado pelas moléculas 2, 3 e 4), potencializa as propriedades miogênicas da MyoD (KOLLIAS et al., 2006). Além do mais, a SMAD-7 exerce um papel fundamental na iniciação da miogênese por meio da anulação da via de sinalização da MSTN (KOLLIAS et al., 2006). Em contraste, quando a MyoD está menos ativa durante a proliferação de mioblastos, a expressão de SMAD-7 não é aumentada. Assim, a ausência ou nível reduzido dessa proteína permite a ação repressora da MSTN sobre o crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético (KOLLIAS et al., 2006). Durante a ação da MSTN, receptores do tipo II (ActIIB) e I ativados induzem a formação do complexo SMAD-2/3 e hétero-oligômeros (R-SMAD-2/3 com a Co-SMAD-4), que se translocam para o núcleo, onde interagem com distintos parceiros celulares, ligando-se ao DNA e regulando a transcrição de vários genes. A SMAD-7 interage com receptores do tipo I, bloqueando a sinalização para a formação do complexo R-SMAD, além de interferir na interação entre as R-SMADs-2/3 e a Co-SMAD-4, prevenindo a propagação do sinal iniciado pela MSTN (NAKAO et al., 1997; ISHISAKI et al., 1998). Além disso, a activina e os membros da TGF- β , como a MSTN, induzem a transcrição/expressão da SMAD-7 por meio do elemento de ligação SMAD – SBE (presente na região promotora da SMAD-7), via interação direta entre a SMAD-2/3 e a região promotora da SMAD-7. Promove, assim, um mecanismo de retroalimentação negativa que cessa a sinalização desses atrogenes (NAKAO et al., 1997; ROSENDAHL et al., 2001; ZHU et al., 2004).

Figura 6. Ação inibitória sobre a sinalização da MSTN e mecanismos de retroalimentação positiva e negativa da SMAD-7 (Adaptado de KOLLIAS et al., 2006).

4.7 FOXO-3A

FOXO é um fator de transcrição proteolítico pertencente ao subgrupo O da superfamília dos fatores de transcrição *Forkhead Box*. Em mamíferos, a superfamília é composta de quatro elementos, FOXO-1, 3, 4 e 6 (TUTEJA; KAESTNER, 2007). Os transcritos 1 e 4 são expressos no tecido adiposo e no músculo esquelético, enquanto a isoforma 3 é abundante também no encéfalo, coração, rins e baço. A isoforma 6 está presente na fase de desenvolvimento e no tecido encefálico adulto (FU; TINDALL, 2008). FOXO-1, 3 e 6 possuem 650 aminoácidos e FOXO-4 cerca de 500 aminoácidos. Ambos possuem quatro domínios altamente conservados: um domínio *forkhead* (DBD); um sinal de localização nuclear (NSL), abaixo da via do DBD; uma sequência de exportação nuclear (NES); e um domínio de transativação C-terminal (OBSIL; OBSILOVA, 2008). A localização subcelular e a atividade transcricional de FOXO são controladas por fosforilação, acetilação e

ubiquitinação. Essas reações celulares condicionam modificações na estrutura dessa proteína, o que resulta em sua inativação pós-transcricional. Entre essas reações, a fosforilação, por exemplo, é diretamente induzida pela via de sinalização *phosphatidylinositol 3-kinase/AKT* (PI3K/AKT). Quando ativadas, essas quinases iniciam uma reação em cadeia que ativa a síntese de proteínas, por meio da via mTOR, por exemplo, e inibe a degradação ao fosforilar diretamente os fatores de transcrição FOXO. Quando fosforiladas, as isoformas desse transcrito criam sítios de ligação para a proteína 14-3-3, o que permite a formação de um complexo com essa proteína. Isso faz com que FOXO seja enviado ao citosol, onde é mantido inativo pela proteína 14-3-3, a qual impede a sua reentrada no núcleo – provavelmente por interferir com a função de seu NSL (BRUNET et al., 1999; BROWNAWELL et al., 2001; CAHILL et al., 2001; ZHAO et al., 2004; OBSILOVA et al., 2005). Por outro lado, quando desfosforilado, FOXO permanece no núcleo, onde estimula a transcrição de vários genes relacionados com o controle do ciclo celular, apoptose, autofagia, metabolismo, estresse oxidativo, reparo de DNA (ZHANG et al., 2011; GREER; BRUNET, 2005) e atrofia muscular esquelética (KANDARIAN; JACKMAN, 2006). Entre as isoformas do referido fator de transcrição, a FOXO-3A tem sido indicada como dominante no músculo esquelético (BRAUN; GAUTEL, 2011). A superexpressão desse transcrito tem sido indicada como suficiente para causar significativa atrofia muscular *in vivo* (REED et al., 2012). A ação de FOXO-3A é capaz de ativar o promotor de proteínas ubiquitinas ligases (E3 ligases, MURF e Atrogin), aumentando, assim, o seu nível de RNAm no músculo (REED et al., 2012). Além de controlar a transcrição dessas ubiquitinas ligases, a FOXO-3A condiciona a ativação dessas proteínas, as quais são requeridas para a degradação proteica no proteassoma. Isso indica uma importante participação do referido fator de transcrição sobre o *turnover* de proteínas musculares (BRAUN; GAUTEL, 2011). Além do mais, a FOXO-3A é capaz de alterar a expressão de fatores anticrescimento muscular, como a MSTN (ALLEN; UNTERMAN, 2007). A ação desse fator de transcrição altera, portanto, a atividade transcricional da MSTN por meio da ativação de seu promotor, aumentando a expressão do seu RNAm. Assim, a expressão da MSTN via FOXO-3A amplificaria a resposta atrófica na célula muscular esquelética (ALLEN; UNTERMAN, 2007).

Figura 7 - Ciclo inibição-ativação e ação transcricional de FOXO-3A (Adaptado de ZHANG et al., 2011; REED et al., 2012).

4.8 Miostatina e treinamento de força

O TF é bastante conhecido por induzir hipertrofia do músculo esquelético e ganho de força (KRAEMER et al., 2002). No entanto, conforme mencionado anteriormente, pouco é conhecido a respeito dos mecanismos celulares e moleculares que governam tais adaptações neste tecido em resposta a esta estratégia específica de treinamento. Considerando que o TF é capaz de promover alteração da massa muscular, seria plausível assumir que o mesmo, de alguma forma, pudesse influenciar a expressão/atividade da MSTN e de genes relacionados à sua via como: FLST, FL3, GASP-1, ActIIB, SMAD-7 e FOXO-3A.

Há evidências que o TF afeta a expressão da MSTN de forma aguda e crônica (ROTH et al., 2003; WILLOUGHBY, 2004; KIM; CROSS; BAMMAN, 2005; HULMI et al., 2007). Analisando o efeito de longo prazo, Roth et al. (2003) demonstraram redução na expressão gênica da MSTN (37%) em amostras do vasto lateral coletadas após nove semanas de TF

dinâmico realizado por homens e mulheres (jovens e idosos) em equipamento isocinético (extensão unilateral de joelho, três vezes por semana; cinco séries, 1ª - aquecimento com 5 repetições a 50% de 1 RM, 2ª – 5 RM, 3ª - 10 repetições, 4ª - 15 repetições e 5ª - 20 repetições, cujas 4-5 primeiras repetições foram realizadas com uma carga equivalente a 5 RM e para as restantes a carga foi reduzida para que o total de repetições [10, 15 e 20] fosse completado). Em contraste, Willoughby (2004) evidenciou aumento no conteúdo do RNAm para a MSTN (32%) e da sua proteína no vasto lateral (53%) e no plasma (56%) após seis e 12 semanas de TF (três séries de seis a oito repetições a 85 a 90% de 1 RM nos exercícios *Leg press*, extensão e flexão de joelhos, realizados três vezes por semana). Além disso, o nível de FL3 (antagonista da MSTN) no soro estava 127% aumentado, enquanto o conteúdo do receptor ActIIB estava reduzida em 18% (WILLOUGHBY, 2004).

Em relação à realização de sessões agudas, Kim, Cross e Bamman (2005), avaliaram homens e mulheres entre jovens (20 a 35 anos) e idosos (60 a 75 anos). Após 24 horas de uma única sessão de EF (três séries de oito a 12 repetições até fadiga nos exercícios: agachamento, *leg press* e extensão de joelhos com 90s de intervalo entre as séries), demonstraram decréscimo de 56%, 40% e 48% no conteúdo do RNAm para a MSTN em amostras do vasto lateral de homens jovens e idosos e mulheres jovens, respectivamente. Embora, o efeito do treinamento tenha sido conduzido principalmente pelo gênero masculino, não houve diferença na redução de MSTN entre os grupos etários. Segundo esses autores, a falha em reduzir a expressão de MSTN poderia explicar a limitação em promover a hipertrofia induzida por sobrecarga em mulheres idosas (KIM; CROSS; BAMMAN, 2005).

O efeito agudo e crônico do TF sobre a expressão de MSTN, ActIIB e FL3 foi avaliado de maneira elegante por Hulmi et al. (2007). Neste trabalho, homens idosos realizaram um programa de treinamento para os extensores do joelho (cinco séries de 10 RM no *leg press* em máquina isocinética). Biópsias do vasto lateral foram colhidas uma hora antes, uma hora após e 48 horas após a sessão de TF, em duas condições diferentes: pré-treinamento (sujeitos destreinados) e pós-treinamento (sujeitos treinados). Seguida a sessão aguda, não foi observada alteração significativa na expressão de MSTN entre os períodos analisados. Porém, ao final de 21 semanas, o conteúdo de seu RNAm reduziu após uma hora e esteve ainda menor 48 horas após a última sessão de treinamento. Contudo, é importante destacar que o nível de MSTN depois de 21 semanas de TF estava maior do que na condição pré-treinamento. Em relação à ActIIB, foi observado uma redução do nível gênico depois de uma hora, permanecendo reduzido após 48 horas do estímulo agudo. Em longo prazo (21 semanas), este efeito foi atenuado, observando-se apenas uma tendência de queda na

expressão de ActIIB. Nenhuma mudança foi encontrada para a FL3 no estado pré e pós-treinamento (HULMI et al., 2007). Recentemente, Aoki et al. (2009) demonstraram aumento na expressão de MSTN em amostras do sóleo após 12 e 24 horas de alongamento crônico. No entanto, após 48 e 96 horas, sua expressão foi atenuada. Apesar do modelo experimental utilizando ratos não apresentar alguma relação com a questão prática do TF, é importante ressaltar que o pico de crescimento do músculo ocorreu após 96 horas do alongamento, coincidindo com a menor expressão da MSTN (AOKI et al., 2009).

O estudo conduzido por Willoughby (2004), também evidenciou aumento na expressão do RNAm para a MSTN após 12 semanas de TF. Esse aumento foi associado à elevação da concentração de cortisol e do conteúdo de receptores para o mesmo no músculo esquelético. A elevação deste hormônio ativa a transcrição do gene da MSTN, em um mecanismo mediado por receptores de glicocorticoides. Isto provavelmente ocorre devido à presença de supostos elementos responsivos aos glicocorticoides no promotor do gene que codifica a MSTN (MA et al., 2001). Mesmo com o conteúdo de MSTN aumentado a força, a massa muscular e o volume da coxa estavam com valores maiores no grupo experimental vs. controle (WILLOUGHBY, 2004). Esses dados indicam que o nível elevado de MSTN no soro não parece necessariamente afetar o ganho de força e de massa muscular, além de confirmar a eficiência do TF em promover hipertrofia e aquisição de força. Embora, a MSTN estivesse aumentada, houve também aumento de FL3 e redução do receptor ActIIB (WILLOUGHBY, 2004). Isto sugere a ocorrência de uma resposta coordenada: quando a expressão de MSTN é aumentada, ocorre redução do seu receptor e aumento dos inibidores. Esses dados sugerem que é necessário analisar não somente o comportamento da MSTN, mas também dos outros componentes dessa via de sinalização, a fim de estimar o seu grau de atividade. É possível que esse padrão de resposta coordenada, no qual a expressão do ligante (MSTN) é reduzida, e a dos seus inibidores, aumentada, maximize a resposta de hipertrofia.

Em um estudo sobre o efeito do alongamento crônico sobre genes envolvidos na sinalização da MSTN, Aoki et al. (2009) observaram aumento da expressão de FLST, GASP-1 e SMAD-7 durante todo período analisado (12, 24, 48 e 96 horas) e redução no conteúdo do RNAm para a ActIIB e MSTN em distintos períodos, 12 a 24 horas e 48 a 96 horas respectivamente. Outro estudo, conduzido por Gharakhanlou et al. (2009), suporta essa ideia sobre a necessidade de investigar múltiplos componentes dessa via de sinalização a fim de avaliar a sua atividade. Gharakhanlou et al. (2009) demonstraram redução do nível sérico de MSTN e aumento do nível sérico da GASP-1 após quatro e oito semanas de TF realizado por homens jovens (três séries de oito a 10 repetições a 60 a 70% de 1 RM no *bench press*, *lat*

pull down, biceps curl, leg press, knee extension, e knee flexion, dois minutos de repouso, três vezes por semana). Os dados apresentados confirmam uma possível ação coordenada para maximizar a hipertrofia. Vale ressaltar que os estudos mencionados foram um dos únicos que, até então, relacionaram o efeito do TF e do alongamento sobre a GASP-1 e SMAD-7.

O papel específico da intensidade do TF sobre a expressão de genes envolvidos com o trofismo do músculo esquelético ainda não é bem conhecido. Os únicos estudos que relacionaram diretamente os efeitos da intensidade têm demonstrado efeitos distintos sobre a expressão da MSTN (ROTH et al., 2003; WILLOUGHBY, 2004; KIM et al., 2005; HULMI et al., 2007).

Apesar destes achados sobre MSTN e TF, é importante ressaltar que não existe um consenso sobre o padrão de resposta deste gene ao estímulo do treinamento físico e ainda existem dúvidas sobre o quanto a MSTN participa e contribui para o processo de desenvolvimento da massa muscular em resposta ao TF. Também é possível afirmar que não existem estudos comparando o efeito de diferentes protocolos de treinamento de força (TFF vs. TP) sobre a expressão dos componentes da via de sinalização da MSTN.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostra

Participaram do estudo 33 homens fisicamente ativos, ou seja, engajados na prática de exercícios físicos, com idade entre 20 e 30 anos. Todos os participantes possuíam experiência mínima de dois anos com TF para os membros inferiores. Entretanto, foi solicitado a não aderência em quaisquer programas de treinamento por um período de seis meses antes do início do estudo. A fim de garantir condições iniciais similares aos grupos experimentais, os participantes foram classificados em quartis de acordo com a força relativa dos membros inferiores medida no exercício agachamento (1 RM/peso corporal). Em seguida foram distribuídos aleatoriamente em três grupos homogêneos: força (TFF), n=12; potência (TP) n=12; e controle (C), n= nove. Posteriormente, os grupos de treinamento realizaram distintos protocolos, enquanto, o grupo controle foi submetido apenas às avaliações. A diferença fundamental entre os dois grupos submetidos ao treinamento foi a zona de intensidade utilizada nas sessões de treino e, conseqüentemente, a velocidade de execução entre as ações CON e EXC durante o exercício. Para a caracterização da amostra foram obtidos o peso corporal e a estatura (TABELA 1). Todos os participantes foram informados sobre os riscos e benefícios antes de assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo obteve aprovação do comitê de ética da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (2010/36). Os participantes do estudo foram interrogados em relação ao uso de drogas ou suplementos alimentares possivelmente capazes de alterar os resultados do estudo. Todos os participantes garantiram a não utilização de quaisquer substâncias que pudessem afetar de alguma forma os resultados.

Tabela 1 - Característica dos participantes

Variáveis	Controle	Força	Potência
Idade	24,1 ± 2,7 anos	22,5 ± 3,8 anos	24,2 ± 4,1 anos
Estatura, cm	178,9 ± 11,0 cm	178,7 ± 4,3 cm	177,0 ± 5,9 cm
Peso corporal, kg	74,1 ± 9,6 kg	75,2 ± 7,3 kg	76,0 ± 8,9 kg

Os dados estão expressos como média (M) ± o desvio padrão (DP).

5.2 Protocolos de treinamento

Dois programas distintos de TF foram adotados no estudo para avaliar o efeito do treinamento sobre a expressão dos genes que codificam proteínas relacionadas a via da MSTN: o TFF, organizado para o desenvolvimento da capacidade de força; e o TP, destinado ao desenvolvimento da capacidade de potência (TABELAS 2 e 3). Ambos os protocolos de treinamento consistiram no exercício agachamento realizado de maneira livre. Esse exercício foi realizado três vezes por semana durante dois meses (FIGURA 8). A amplitude articular dos joelhos determinada para a execução do exercício foi de aproximadamente 90-95° para ambos os grupos.

Tabela 2- Protocolo de treinamento do Grupo Potência.

Grupo Potência (TP)			
	Segunda	Quarta	Sexta
Sem 1	4 ⁸ (30%)	4 ⁸ (30%)	4 ⁸ (30%)
Sem 2	2 ⁸ (30%); 2 ⁸ (40%)	3 ⁸ (40%); 2 ⁶ (50%)	2 ⁸ (30%); 2 ⁸ (40%)
Sem 3	3 ⁸ (40%); 3 ⁶ (50%)	3 ⁸ (40%); 3 ⁶ (50%)	3 ⁸ (40%); 3 ⁶ (50%)
Sem 4	2 ⁸ (30%); 2 ⁸ (40%); 2 ⁶ (50%)	2 ⁸ (30%); 2 ⁸ (40%); 2 ⁶ (50%)	2 ⁸ (30%); 2 ⁸ (40%); 2 ⁶ (50%)
Sem 5	2 ⁸ (30%); 3 ⁸ (40%); 2 ⁶ (50%)	3 ⁸ (40%); 4 ⁶ (60%)	3 ⁸ (30%); 2 ⁶ (50%); 2 ⁶ (60%)
Sem 6	4 ⁸ (30%); 4 ⁶ (60%)	4 ⁸ (40%); 4 ⁶ (50%)	4 ⁸ (30%); 4 ⁶ (60%)
Sem 7	3 ⁸ (40%); 3 ⁶ (60%)	2 ⁸ (40%); 4 ⁶ (60%)	2 ⁸ (40%); 4 ⁶ (60%)
Sem 8	2 ⁸ (40%); 2 ⁶ (50%)	2 ⁸ (40%); 2 ⁶ (50%)	2 ⁸ (40%); 2 ⁶ (50%)

A **Base** representa o número de séries e o **Expoente** o número de repetições realizadas. O percentual destacado entre parênteses está relacionado ao valor de 1 RM. Desta forma, o treinamento foi realizado três vezes por semanas em dias intercalados (segundas, quartas e sextas feiras).

Tabela 3 - Protocolo de treinamento do Grupo Força.

Grupo Força (TFF)			
	Segunda	Quarta	Sexta
Sem 1	4 ¹⁰	4 ¹⁰	4 ¹⁰
Sem 2	2 ¹⁰ ; 3 ⁸	3 ⁸ ; 2 ⁶	2 ¹⁰ ; 3 ⁸
Sem 3	3 ⁸ ; 3 ⁶	3 ⁸ ; 3 ⁶	3 ⁸ ; 3 ⁶
Sem 4	2 ¹⁰ ; 2 ⁸ ; 2 ⁶	2 ¹⁰ ; 2 ⁸ ; 2 ⁶	2 ¹⁰ ; 2 ⁸ ; 2 ⁶
Sem 5	1 ⁸ ; 3 ⁶ ; 3 ⁴	3 ⁶ ; 4 ⁴	4 ⁶ ; 3 ⁴
Sem 6	3 ⁶ ; 3 ⁴	4 ⁶ ; 4 ⁴	4 ⁶ ; 4 ⁴
Sem 7	3 ⁶ ; 3 ⁴	3 ⁶ ; 3 ⁴	3 ⁶ ; 3 ⁴
Sem 8	2 ⁶ ; 2 ⁴	2 ⁶ ; 2 ⁴	2 ⁶ ; 2 ⁴

A **Base** representa o número de séries e o **Expoente** o número de repetições máximas

Figura 8 - Sequência experimental

No início dos programas de treinamento, a progressão da sobrecarga ocorreu por meio do acréscimo do volume. Em seguida, a intensidade é que foi sendo aumentada. Entretanto, a partir da 7ª semana de treinamento, a sobrecarga foi reduzida via decréscimo do volume. Devido à diferença da sobrecarga de treino para cada grupo, o volume total (trabalho muscular) foi maior para o grupo TFF. O número de séries foi utilizado como parâmetro de controle do volume para ambos os grupos. Para a intensidade, os parâmetros adotados foram: o número máximo de repetições para o grupo TFF; e o percentual da sobrecarga determinada no teste de 1 RM para o grupo TP. Para este grupo, o número de repetições por série foi determinado pelo percentual da sobrecarga empregada em cada sessão de treino. Sendo assim, para os percentuais referentes a 30% e 40% de 1 RM, foram realizadas oito repetições e, para 50% e 60% de 1 RM, seis repetições. Esse procedimento foi adotado com a finalidade de evitar o declínio da potência produzida ao longo das séries. Isso porque, recentemente, foi observado um declínio na produção de potência absoluta (PA) e relativa (PR) em função do nível de força absoluta (PAULO et al., 2010). Indivíduos mais fortes produzem maior potência. Porém, apresentam menor resistência (capacidade de manutenção) na PA e PR durante o exercício, pois fadigam antes em maiores intensidades de sobrecarga (PAULO et al., 2010).

Tabela 4 - Número de séries e repetições semanais para o grupo TP

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8
Séries	12	15	18	18	21	24	18	12
Repetições	96	116	126	132	148	168	126	84

Tabela 5 - Número de séries e repetições semanais para o grupo TFF

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8
Série	12	15	18	18	21	24	18	12
Repetições	120	124	126	144	108	120	90	60

Os participantes de cada grupo de treinamento foram orientados a realizarem o exercício com a maior velocidade possível. A velocidade dos movimentos no agachamento (ações CON e EXC) durante as repetições do exercício ocorreu em função da intensidade da sessão de treinamento. Sendo velocidade e intensidade grandezas inversamente proporcionais, o grupo TP, que treinou com menores sobrecargas, conseguiu alcançar maiores velocidades em relação ao grupo TFF. Essa estratégia foi adotada devido ao fato de que a velocidade de condução interna do músculo pode ser independente da velocidade externa de movimento. Assim, a intenção em mover uma sobrecarga em alta velocidade pode ser mais importante do que a própria velocidade de movimento alcançada (BEHM; SALE, 1993; ZEHR; SALE, 1994). Além do mais, pode ser que a sobrecarga tenha menor importância para que as adaptações ao treinamento em velocidades específicas ocorram, particularmente se os movimentos são realizados com máximo esforço e intenção em mover a sobrecarga rapidamente (CREWETHER et al., 2005).

A amplitude ou a zona de intensidade de treinamento para o grupo TFF foi determinada pelo número máximo de repetições efetuadas em cada série. Entretanto, por meio do teste de 1 RM, foi observado distinto nível de força entre os integrantes desse grupo (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009). Sendo assim, o percentual referente ao valor de 1 RM também foi diferente. Ao longo do período de treinamento houve diferença entre o percentual da carga utilizada por ambos os grupos experimentais (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009) (TABELA 6). Para garantir que as intensidades de treinamento fossem

diferentes entre os grupos de TFF e TP, a progressão dessa variável foi semanalmente analisada através do teste *t* de *student* para dados não pareados (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009). A média semanal de intensidade do TF (TFF e TP) é apresentada na FIGURA 9.

Tabela 6. Percentual médio da carga utilizada por cada um dos grupos de treinamento

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8
TP	30%	38,6%	35%	40%	45,2%	49,5%	52,2%	45%
TFF	58,8%	69,4%	75,3%	77,2%	87,5%	83,6%	85,6%	87,3%

Figura 9 - Percentual médio das intensidades de treinamento para os grupos TFF e TP. Dados expressos em $M \pm DP$.

5.3 Biópsias musculares

As amostras de tecido do músculo vasto lateral foram coletadas da porção média da coxa direita em dois momentos distintos: pré-treinamento e pós-treinamento. Essas amostras foram utilizadas para a análise da expressão dos respectivos genes de interesse para o estudo: MSTN, FLST, FL3, GASP-1, ActIIB, SMAD-7 e FOXO-3A.

A coleta do tecido muscular foi realizada utilizando-se uma técnica de biópsia percutânea por sucção (BERGSTROM, 1962). Essa técnica foi efetuada por um médico cirurgião habilitado para essa finalidade. Antes da realização do procedimento, os participantes foram preparados como se segue: tricotomização da área determinada para a biópsia, limpeza do local com líquido antisséptico e anestesia com xilocaína 2% injetada no tecido subcutâneo ao redor da região escolhida para a incisão. Para a inserção da agulha, foi realizada uma incisão de cerca de 5 mm com bisturi até a fáscia muscular. Em seguida, a agulha para biópsia foi introduzida cerca de 3 cm no músculo e uma pequena porção de aproximadamente 70 a 100 mg de tecido foi retirada. Ao fim do procedimento, a incisão foi fechada por meio de um ponto falso e coberta por uma bandagem. As amostras de tecido muscular foram em seguida retiradas da agulha com pinças esterilizadas, limpas de sangue e tecido conectivo, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até serem utilizadas em posterior análise de expressão gênica. A biópsia pré-treinamento foi realizada 48 horas após o teste de força dinâmica máxima e cerca de quatro dias antes do início do período de treinamento. Para o momento pós-treinamento, a coleta de tecido muscular foi feita 48 horas depois da última sessão de treinamento e realizada por meio de uma incisão adjacente ao local da biópsia pré-treinamento.

Todos os participantes anotaram as refeições correspondentes a 48 horas antes do procedimento da biópsia. O procedimento foi realizado pela manhã, duas horas após a ingestão de uma refeição matinal padronizada. Todos os participantes foram orientados a repetirem o mesmo padrão alimentar para a biópsia pós-treinamento, que ocorreu também após duas horas da ingestão do café da manhã.

5.4 Expressão gênica

5.4.1 Extração do RNA total

As amostras de tecido muscular esquelético foram homogeneizadas com o reagente Trizol (Invitrogen[®]; Life Technologies Corporation, Carlsbad, Estados Unidos). Logo após, foi adicionado 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha), utilizado para manter ácidos nucleicos em solução. Em seguida, o homogenato foi submetido à centrifugação por 15 minutos a 13000 rpm a 4°C. Ao final desse processo, foi retirado o sobrenadante (fase inicial) contendo RNA total. Para obter apenas o material desejado, evitou-se a fase intermediária (contendo DNA genômico) e final (contendo fenol e proteínas). Na etapa seguinte, foi adicionado 500 µL de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), a solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada por 10 minutos a 13000 rpm a 4°C. O RNA total se apresenta agora precipitado no fundo do tubo em forma de *pellet*. Assim, a solução sobrenadante foi desprezada e o *pellet* ressuspensão com 1000 µL de etanol a 75% (Merck, Darmstadt, Alemanha), diluído em água dietilpirocarbonato (DEPC) (Amresco, Ohio, Estados Unidos). Em seguida, a solução foi centrifugada por cinco minutos a 4°C. Após o processo de centrifugação, a solução de EtOH 75% foi desprezada, e o *pellet* foi secado por aproximadamente cinco minutos a temperatura ambiente (TA). Após a secagem, foi adicionado 10 µL de Tris EDTA (TE pH 7.4) (Amresco, Ohio, Estados Unidos) para a diluição do *pellet*. A solução final foi aquecida a 55°C por 10 minutos e homogeneizada para a quantificação do material genético.

Para a confirmação da qualidade do processo de extração, foi utilizada a relação RNA/DNA (260/280 nm), determinada em espectrofotômetro (Eppendorf[®]; Eppendorf, São Paulo, Brasil), sendo somente utilizadas as amostras que atingissem o intervalo de 1.6 a 2.0. A integridade do RNA também foi verificada via eletroforese em gel de agarose 1%, não denaturante, corado combrometo de etídeo.

5.4.2 RT-PCR

O método da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) foi adotado para a quantificação do RNA mensageiro (RNAm) de interesse. Na transcrição reversa, é sintetizada uma fita

complementar de RNAm. Nesse processo, obtém-se o DNA complementar (DNAc), que é uma molécula mais estável do que o RNA. Ao DNAc, se aplica a técnica da PCR. Sendo assim, inicialmente o RNAm foi isolado dos demais (RNA ribossômico e transportador) a partir da adição de 0,5 µg/µL de oligo-desoxitimidina (oligo-dT) em 1 µg de RNA total, completados com água DEPC (Amresco, Ohio, EUA) para uma solução total de 12 µL. Em seguida, a solução foi encubada a 70°C por 10 minutos. Na etapa seguinte (transcrição reversa), foi adicionado 0,5 µL (200 U/µL) da enzima transcriptase reversa SuperScript® II (Invitrogen®; Life Technologies Corporation, Carlsbad, Estados Unidos) em uma reação contendo 4 µL de tampão (5X First Stand Buffer, Invitrogen®; Life Technologies Corporation, Carlsbad, Estados Unidos), 10 µL de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP 0,8 mM), 1 mM MgCl₂ e 2 µL de ditioneitol (DTT 4 mM). Esse MIX (mistura) foi adicionado à solução contendo a amostra de RNAm, a qual foi, então, encubada por 60 minutos a 42°C e 10 minutos a 95°C.

5.4.3 Método de detecção da expressão gênica em tempo real

Após a obtenção do DNAc, as diferentes frações das RTs foram utilizadas na amplificação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com a metodologia de Bustin (2002). A PCR foi realizada no equipamento Rotor-Gene® Q (Qiagen, São Paulo, Brasil), o qual monitora a amplificação em tempo real. Neste equipamento, é determinado o início da fase de amplificação exponencial (C_T , *cycle threshold*), que foi utilizado como dado para a análise da expressão gênica, assim como descrito pelo manual do usuário nº 2 (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos). Para amplificação do DNAc dos genes de interesse, foram utilizados iniciadores (*primers*) previamente desenhados com o software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) e padronizados em nosso laboratório (TABELA 7). A PCR foi preparada com 0,5 µL de amostra (DNAc), 0,5 µL de *primer* (*forward* e *reverse*), 11 µL de Platinum® SYBR® Green (Invitrogen®; Life Technologies Corporation, Carlsbad, Estados Unidos) e 9,5 µL de água ultrapura (Gibco®; Life Technologies Corporation, Carlsbad, Estados Unidos). Totalizando 22 µL de solução final. Para maior confiabilidade dos resultados, a PCR foi realizada em duplicatas, cada uma contendo 10 µL da solução final.

Tabela 7 - Genes alvo e sequência dos *primers*

RNAm alvo	Sequência do <i>primer</i> (5' → 3')
ARP	F - CGACCTGGAAGTCCAACACTAC R - ATCTGCTGCATCTGCTTG
MSTN	F - GACCAGGAGAAGATGGGCTGAATCCGTT R - GCTCATCACAGTCAAGACCAAAATCCCTT
FLST	F - CCAGGCTGGGAAGTCTGGC R - TCCTCGGTCCACGAGGTGCT
FL3	F - TGGTGCTCCAGACTGATGTCA R - CAGTGGACAAGGCCCAAGA
GASP-1	F - GGATTTCTGGAGGCCTGCTT R - TCCAGAGGTGTGAGCCAGTCT
ActIIB	F - TACGAGCCACCCCGACAGC R - AGCGCCCCCGAGCCTTGAT
SMAD-7	F - CAGATACCCGATGGATTTTCTCA R - CCCTGTTTCAGCGGAGGAA
FOXO-3A	F - GAACGTGGGGAAGTTCCTGCTGCTA R - GGTCTGCTTTGCCCACTTCCCCTT

F, *Forward*; R, *Reverse*; ARP, Proteína rica em arginina; MSTN, miostatina; FLST, Folistatina; FL3, *Folistatin-like three*; GASP-1, *growth and differentiation factor-associated serum protein-1*; ActIIB, receptor Activina II Beta; SMAD-7, *Mother against decapentaplegic 7*; FOXO-3A, *Forkhead box 3A*.

No sistema de amplificação em tempo real, as fases de anelamento, extensão e desnaturação ocorrem durante os ciclos de maneira similar quando da utilização do termociclador convencional; a diferença é que a amplificação da sequência alvo é detectada em tempo real pela emissão de um fluoróforo, que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de *primers* (BITTENCOURT; ELIAS, 2007). A quantificação da amplificação é feita pela fluorescência detectada pela unidade óptica do aparelho. Neste sistema, em um gráfico hipotético em que a ordenada corresponderia ao número de cópias, e a

abscissa, ao número de ciclos, o resultado teórico esperado é uma curva do tipo sigmóide (BITTENCOURT; ELIAS, 2007). O ideal na PCR tradicional é efetuar uma reação em que o número de ciclos escolhido se encontre dentro do trecho linear da curva, evitando-se, assim, os extremos assintóticos. Pelas características do sistema, na PCR em tempo real, é possível determinar todo o perfil de amplificação, o que representa uma das vantagens metodológicas (BITTENCOURT; ELIAS, 2007). O ponto na abscissa correspondente ao início do trecho linear é chamado de C_T , e este valor é utilizado para a comparação relativa da expressão gênica: quanto menor o C_T , mais expressa é determinada mensagem (BITTENCOURT; ELIAS, 2007).

O C_T representa o início do trecho linear do ciclo na PCR em tempo real, em que o aumento da fluorescência do gene alvo, acima de um sinal basal, pode ser primeiramente detectado. Os valores de C_T foram calculados para todas as amostras e para cada gene de interesse, como se segue: $\Delta C_T = C_{T \text{ gene alvo}} - C_{T \text{ normalizador}}$. A proteína ribossomal ARP foi utilizada como controle interno. Esse gene tem sido utilizado como normalizador em estudos prévios sobre exercícios físicos com humanos (LEGER et al., 2006; SORENSEN et al., 2009). Além do mais, temos consistentemente encontrado que a sua expressão não se altera após ambos os TFF e TP, sendo evidenciado que a média (M) $\pm$ o desvio padrão (DP) do C_T para o gene ARP em condições pré e pós-teste foi: 20.15 ± 1.02 e 20.19 ± 0.74 respectivamente (dado não mostrado).

A mudança relativa no nível de expressão de cada gene de interesse foi calculada pela subtração do ΔC_T da condição pré-teste (usado como calibrador) para os correspondentes ΔC_T s dos dois grupos experimentais. Os valores e intervalos obtidos foram determinados como se segue: $2^{-\Delta\Delta C_T}$ com $\Delta\Delta C_T \pm DP = (C_{T \text{ gene alvo}} - C_{T \text{ normalizador}}) \text{ Pós-teste} - (C_{T \text{ gene alvo}} - C_{T \text{ normalizador}}) \text{ Pré-teste}$, com o DP sendo o desvio padrão do valor médio do $\Delta\Delta C_T$ (média do ΔC_T Todas as amostras - ΔC_T Amostra específica) (manual do usuário nº 2; Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos). Os valores da expressão gênica estão apresentados como $M \pm DP$ das diferenças, expressa em vezes, relativas à condição pré-teste, a qual foi arbitrariamente aproximada para um.

5.5 Análise estatística

Os resultados do estudo foram inicialmente submetidos aos testes de homogeneidade (*Levene tests*) e normalidade (*Shapiro-Wilk*). Comprovada a distribuição normal dos dados, foi aplicada a análise de variância (ANOVA 3 x 2) para comparação múltipla entre os grupos

C, TFF e TP. Esse procedimento visou comparar o efeito dos diferentes modelos de treinamento sobre a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à via de sinalização da MSTN. Foi utilizado um modelo misto para a variável dependente (genes alvo), tendo os grupos (C – TFF – TP) e o tempo (pré – pós) como fatores fixos e os sujeitos como um fator randômico (UGRINOWITSCH et al., 2004). Sempre que um valor de F fosse significativo, um teste *post hoc* com ajustamento de *Tukey* era aplicado para fins de comparação múltipla. O nível de significância estabelecido foi $P < 0,05$. Os dados foram analisados por meio do programa estatístico SPSS 17.0.

6 RESULTADOS

6.1 Alterações na força máxima (1 RM) e área de secção transversa muscular depois de oito semanas de TFF e TP – resultados previamente publicados (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009).

Ambos os grupos de TFF e TP apresentaram semelhante aumento da força máxima do pré para o pós-teste ($P < 0.05$) (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009). Os valores de 1 RM dos grupos que realizaram o TFF e TP foram superiores aos do grupo C no pós-teste ($P < 0.05$) (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009). A área de secção transversa muscular (AST) aumentou significativamente para os grupos experimentais no pós-teste quando comparados à condição pré-teste ($P < 0.05$). Além do mais, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos TFF e TP ($P < 0.05$) (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009). O aumento da AST apresentou apenas efeito principal de tempo. Sendo verificado, portanto, hipertrofia muscular quando comparando as médias dos grupos C, TFF e TP para as fibras do tipo I, IIa e IIb ($P < 0.05$) (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009). Os resultados para a análise do efeito do tamanho para cada tipo de fibra demonstraram os seguintes valores: 15%, 18% e 41% para o grupo TFF e -5%, 15% e 19% para o grupo TP, para as fibras do tipo I, IIa e IIb respectivamente (LAMAS et al., 2007; LAMAS, et al., 2009).

6.2 Expressão de genes após oito semanas de TFF e TP

O presente estudo analisou o efeito de diferentes protocolos de TF sobre a expressão de genes relacionados com a via de sinalização da MSTN. As mudanças no nível de RNAm para os genes selecionados foram normalizadas pelo gene ARP e suas alterações em função do TFF e TP foram comparadas com o nível pré-teste para os grupos C, TFF e TP. Após oito semanas de TFF e TP, não foi observada mudanças estatisticamente significantes no conteúdo de RNAm para MSTN, GASP-1, ActIIB e FOXO-3A (FIGURAS 10, 13, 14 e 16). No entanto, os genes para FLST e FL3, que codificam proteínas de efeito inibitório sobre a MSTN, tiveram o seu nível de RNAm aumentados em ~5.5 vezes em relação ao grupo C

(FIGURAS 11 e 12). Esse efeito foi conduzido por ambos os modelos de TF avaliados. Da mesma maneira, a expressão do gene que codifica a SMAD-7 aumentou para ambos os protocolos de treinamento (FIGURA 15). Sendo observado um aumento de ~2.5 vezes para o TFF e ~2.8 vezes para o TP.

Figura 10 - Expressão gênica da MSTN nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP).
*Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P < 0,05$).

Figura 11 - Expressão gênica da FLST nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP).

*Valores pós-treino dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treino ($P < 0,05$).

Figura 12 - Expressão gênica da FL3 nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP).
*Valores pós-treino dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treino ($P < 0,05$).

Figura 13 - Expressão gênica da GASP-1 nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP). *Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P < 0,05$).

Figura 14 - Expressão gênica da ActIIB nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP).

*Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P < 0,05$).

Figura 15 - Expressão gênica da SMAD-7 nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP). *Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P < 0,05$).

Figura 16 - Expressão gênica de FOXO-3A nos grupos controle (C), força (TFF) e potência (TP). *Valores pós-treinamento dos grupos TFF e TP são maiores do que os valores pré-treinamento ($P < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou diferentes modelos de TF com objetivo de determinar seus efeitos sobre a expressão de genes relacionados à via da MSTN, os quais têm sido associados à hipertrofia do músculo esquelético: MSTN, FLST, FL3, GASP-1, ActIIB, SMAD-7 e FOXO-3A. Pouco se sabe sobre a resposta molecular de genes envolvidos no controle do trofismo muscular em resposta aos diferentes protocolos de TF. De fato, esse é o primeiro estudo a comparar o efeito de diferentes modelos de TF (TFF e TP) sobre a via de sinalização da MSTN em humanos.

No grupo TP, os participantes treinaram com intensidades de 30 a 60% de 1 RM, o que permitiu realizar os movimentos do exercício agachamento em elevada velocidade. Enquanto isso, o grupo de TFF treinou com sobrecargas próximas do máximo (10 a 4 RM), o que, consequentemente, condicionou maior tempo sobre tensão e menor velocidade de execução dos movimentos. Embora seja preconizado que essas diferenças na prescrição do TF promovam respostas específicas (KRAEMER et al., 2002; RATAMESS, et al., 2009), foi evidenciado semelhante padrão de resposta morfofuncional (força máxima e hipertrofia) e molecular (expressão gênica) para ambos os grupos de força (TFF) e potência (TP) após oito semanas de treinamento. Esses resultados não corroboram a hipótese inicial de que os diferentes modelos de TF (TFF e TP) modulam de maneira distinta a expressão de genes relacionados com a via da MSTN. Por exemplo, de acordo com as recomendações para o TF, o TFF promoveria maior resposta hipertrófica (FRY, 2004) e, provavelmente, maior modulação das respostas moleculares do que o TP. Entretanto, um estudo recente mostrou que diferentes modelos de TF (força máxima e potência) podem induzir semelhante resposta anabólica do músculo esquelético (BURD et al., 2010). Esses investigadores demonstraram que a resposta aguda de aumento da síntese de proteínas é similar entre os diferentes protocolos.

Apesar das diferenças em relação à organização/prescrição do treinamento, o TFF e o TP, aplicados no presente estudo, induziram semelhantes ganhos na capacidade de força máxima e aumento da AST (indicador de hipertrofia) na condição pós-treinamento (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009). Os achados sobre aquisição de força estão de acordo com estudos prévios, os quais também demonstraram ganhos semelhantes de força máxima por meio da realização de diferentes modelos de TF (força e potência) (HARRIS et al., 2000; JONES et al., 2001). Provavelmente, o aumento da força decorreu de adaptações centrais, próprias desses esquemas de treinamento: maior recrutamento, sincronização e frequência de

disparo de unidades motoras; redução da ação de mecanismos reflexos de proteção; e melhor coordenação entre grupos musculares agonistas, antagonistas e sinergistas (CREWETHER et al., 2005). Além disso, a alteração na AST constitui um fator preponderante para possíveis mudanças na força máxima. O aumento da AST, por exemplo, provém do aumento da densidade de unidades funcionais miofibrilares (actina e miosina), cuja quantidade máxima está diretamente relacionada ao aumento da força máxima (AAGAARD et al., 2001). É possível que o grau elevado de tensão muscular gerado por ambos os protocolos de TF, tenha constituído um potente estímulo para o aumento da AST (DREYER et al., 2006), induzindo, dessa maneira, similares ganhos de força máxima para o TFF (22%) e o TP (17%) (LAMAS et al., 2009). Além do mais, a similar melhora da capacidade de força entre os grupos de TFF e TP pode ter sido devida a maior resposta/adaptação neural produzida pelo protocolo de TP (KYROLAINEN et al., 2005).

Em relação ao aumento da AST do músculo esquelético, conforme mencionado anteriormente, pouco é conhecido a respeito dos mecanismos moleculares que governam tais adaptações neste tecido em resposta a esta estratégia específica de treinamento. É possível que a tensão muscular gerada com a utilização de sobrecargas próximas do máximo no TFF tenha constituído um potente estímulo para o aumento da AST (DREYER et al., 2006). Elevadas intensidades parecem induzir maior magnitude de dano muscular (microlesões) (NOSAKA; NEWTON, 2002), o que, por sua vez, estimularia mecanismos de reparo e aumento da massa muscular via ativação/diferenciação de células satélites (VIERCK et al., 2000; SCHOENFELD, 2012). Ao contrário do TFF, é provável que, para o TP, a tensão muscular gerada na frenagem dos movimentos, durante a transição das fases CON-EXC, e a alta velocidade da ação muscular tenham estimulado o aumento da síntese proteica e, conseqüentemente, da AST (FARTHING; CHILIBECK, 2003; SHEPSTONE et al. 2005). Ainda não se sabe ao certo porque a execução de movimentos em velocidade máxima induz maior resposta hipertrófica. Entretanto, tem sido evidenciado que as ações EXC realizadas tão rápido quanto possível, promovem maior crescimento muscular em relação às EXC lentas (FARTHING; CHILIBECK, 2003; SHEPSTONE et al. 2005). Foi constatada maior resposta hipertrófica realizando contrações excêntricas em alta velocidade (EXC rápidas > EXC lenta > CON lenta > CON rápida) (FARTHING; CHILIBECK, 2003). Deve ser destacado que as ações EXC constituem importante estímulo mecânico indutor de microlesões musculares (CHAPMAN et al., 2006; CHAPMAN et al., 2008). Conforme já mencionado, o dano muscular pode disparar os processos de remodelamento do músculo esquelético (SHEPSTONE et al., 2005; SCHOENFELD, 2012) e ativar os mecanismos de tradução

(O'NEIL et al., 2009), que podem estar associados com a síntese de proteínas e a hipertrofia muscular (MORGAN; PARTRIDGE, 2003).

No entanto, ainda não está claro qual é o efeito de diferentes protocolos de TF sobre as adaptações moleculares. Considerando que o treinamento de força é capaz de promover alteração na massa muscular, seria plausível assumir que o mesmo, de alguma forma, pudesse influenciar a expressão/atividade de genes envolvidos no processo de hipertrofia. Indubitavelmente, o fator de crescimento GDF-8, também conhecido como MSTN, é um potente regulador da massa muscular (MCPHERRON; LEE, 1997). A MSTN é uma proteína que exerce ação catabólica sobre o músculo esquelético (MCFARLANE et al., 2006; LEGER et al., 2008). Quando dissociada de seu propeptídeo, essa proteína pode ser reconhecida por um receptor do tipo II, desencadeando, assim, uma cascata de sinalização intracelular relacionada com a degradação proteica (MCFARLANE et al., 2006; LOKIREDDY et al., 2012) e com a redução do tamanho do músculo esquelético (BOGDANOVICH et al., 2002; REBBAPRAGADA et al., 2003; ZHU et al., 2004). A função da MSTN relacionada à degradação proteica tem recentemente estimulado a realização de pesquisas sobre a sua possível resposta molecular ao TF. Entretanto, não há relatos prévios comparando os efeitos de diferentes modelos desse tipo de treinamento (TFF e TP) sobre a expressão de genes envolvidos na sinalização da MSTN. Nessa perspectiva, o presente estudo comparou a expressão de genes envolvidos na sinalização da MSTN em resposta a diferentes modelos de TF, mais especificamente o TFF e o TP.

Os protocolos utilizados no presente estudo não induziram alteração no conteúdo do RNAm para MSTN. Em contraste, Roth et al. (2003) e Willoughby (2004) demonstraram efeito do TF sobre a expressão gênica da MSTN. Roth et al. (2003) demonstraram redução do conteúdo de RNAm para MSTN (37%) após 48 e 72 horas da última sessão de treinamento com duração de nove semanas. Enquanto Willoughby (2004) reportou aumento de 32% do RNAm para a MSTN, em amostras musculares coletadas 15 minutos depois da sessão final de treinamento, após seis e 12 semanas do TFF. O conflito de resultados entre o presente estudo e os demais citados ocorreu, provavelmente, em função das diferenças nos delineamentos experimentais dos referidos estudos (ex. diferentes momentos de coleta das amostras musculares e diferentes protocolos de treinamento de força). Esses resultados controversos indicam que a expressão do RNAm para a MSTN segue um curso temporal, havendo aumento ou redução em diferentes períodos. Previamente, Louis et al. (2007), investigando o comportamento temporal da expressão da MSTN, verificaram redução do seu RNAm em todos os momentos avaliados (uma, duas, quatro, oito, 12 e 24 horas) após a execução de uma

sessão de EF. Enquanto isso, Hulmi et al. (2007), analisando o efeito agudo e crônico do TF, não encontraram alterações em uma e 48 horas após a primeira sessão de EF. Porém, após 21 semanas, estes autores demonstraram redução do nível do RNAm para a MSTN em uma e 48 horas do TF (efeito crônico). Em contraste aos dados até então apresentados, Jespersen et al. (2011) não demonstraram qualquer alteração no conteúdo do RNAm para a MSTN após 24 horas da última sessão de exercício, avaliados em 30 e 90 dias dos três meses de TF. Os achados do presente estudo corroboram os resultados prévios reportados por Jespersen et al. (2011) ao não detectar mudanças na expressão gênica da MSTN após o TFF e o TP. Embora tenha sido demonstrado que a expressão de MSTN possa ser alterada pelo TF (HULMI et al., 2007), ainda permanecem desconhecidas as causas da inconsistência da sua resposta ao estímulo mecânico (ROTH et al., 2003; WILLOUGHBY, 2004).

A FLST exerce importante função antagonista aos efeitos da MSTN no músculo esquelético (AMTHOR et al., 2004). Embora a atividade biológica da FLST represente um papel relevante no controle da massa muscular, poucos estudos têm avaliado a sua expressão em resposta ao TF. Nessa perspectiva, Hansen et al. (2010) demonstraram que a concentração plasmática da proteína FLST aumentou sete vezes depois de três horas da realização do exercício aeróbio (ciclismo em bicicleta ergométrica a 50% do VO₂ máx.) e duas vezes após a realização do EF (duas horas de extensão unilateral de joelho a 50% de 1 RM realizada em um ergômetro modificado). Entretanto, estes pesquisadores não observaram alterações no conteúdo do RNAm para a FLST em amostras do vasto lateral após um período de seis, 12, 18 e 24 horas do EF (HANSEN et al., 2010). Previamente, Jentsky et al. (2007) também não encontraram alteração na expressão gênica da FLST em amostras do vasto lateral de homens jovens (23 a 35 anos) e idosos (60 a 75 anos), após 24 horas do exercício excêntrico (flexão de joelho, seis séries de 16 RM separadas por 120 a 180 s de intervalo). Recentemente, Jentsky et al. (2010) novamente não encontraram mudanças no nível do RNAm para FLST em amostras do vasto lateral de mulheres jovens oito horas após a primeira sessão de extensão isocinética unilateral de joelho e depois de oito horas da sétima e última sessão de ações CON vs. EXC. Em contraste, Dalbo et al. (2011) demonstraram aumento no conteúdo do RNAm para a FLST em amostras do vasto lateral de idosos 48 horas após o EF. Nesse estudo, foi avaliado o efeito de estímulos repetidos de EF (três séries de 10 repetições a 80% de 1 RM em três exercícios para membros inferiores e dois minutos de intervalo) em três momentos: T1 - basal; T2 - 48 horas após a primeira sessão de EF; T3 - 48 horas depois da segunda sessão de EF; e T4 - 24 horas após a terceira sessão de EF. Os efeitos do exercício foram evidenciados somente nos idosos em T2 (DALBO et al., 2011). Nos demais períodos, foram observadas

apenas uma tendência ao aumento da FLST em ambos os grupos (DALBO et al., 2011). Embora essa pesquisa tenha avaliado o estímulo de curto prazo, seus resultados reforçam o efeito positivo do TF sobre a expressão da FLST demonstrado pelo presente estudo (realizado com jovens saudáveis), o qual evidenciou aumento no conteúdo do RNAm para a FLST após 48 horas da última sessão de TFF e TP. Curiosamente, não houve diferença na expressão desse gene entre os distintos modelos de treinamento analisados, sugerindo capacidade semelhante em modular a resposta da expressão gênica da FLST. Com base nos resultados de Dalbo et al. (2011), o presente estudo também sugere que 48 horas seja um período de maior resposta da expressão gênica da FLST após o estímulo do TFF e TP.

Assim como a FLST, a FL3 exerce efeito inibitório sobre a MSTN (SIDIS et al., 2006), favorecendo, dessa forma, a atividade de fatores de transcrição chave ao crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético, como MyoD (AMTHOR et al., 2004). Embora a sua ação configure importante contribuição ao aumento da massa muscular, ainda existem poucos estudos que investigaram a resposta de expressão gênica da FL3 ao estímulo dos diferentes modelos do TF. Entre os estudos que o fizeram, Hulmi et al. (2007) não identificaram alterações no nível do RNAm para FL3 após uma e 48 horas do EF (uma única sessão) e do TF (21 semanas) em homens idosos. Em contraste, o presente estudo demonstrou aumento no conteúdo do RNAm para FL3 após 48 horas da última sessão de TFF e TP (oito semanas) em adultos jovens. Esses resultados estão de acordo com o estudo prévio de Dalbo et al. (2011), que demonstraram aumento no conteúdo do RNAm para a FL3 após 24 horas do terceiro estímulo do EF no grupo de idosos. Apesar de diferir em relação ao período do estímulo (agudo vs. crônico) e idade dos sujeitos (idosos vs. jovens), a presente investigação reforça o achado de Dalbo et al. (2011), ao indicar que o TFF pode alterar a expressão da FL3. Os resultados da análise da expressão gênica do atual estudo também sugerem que o TP seja igualmente capaz de induzir alterações na expressão do gene da FL3. Dessa forma, é possível afirmar que, assim como a FLST, a FL3 é responsiva a sobrecarga mecânica independentemente da configuração das variáveis do treinamento. O estímulo mecânico parece potencializar a expressão da FL3, conforme demonstrado anteriormente através do modelo experimental de alongamento crônico (AOKI et al., 2009). Embora não tenha sido analisado, esses dados também permitem especular sobre a possibilidade de aumento da tradução da FL3, o que contribuiria para a ocorrência da hipertrofia do músculo esquelético após o TFF e TP. Essa proposição é sustentada pelos achados de Willoughby (2004) e Willoughby e Taylor (2004), os quais demonstraram aumento da proteína FL3 no soro

seguidos 15 minutos da última sessão de TF em seis e 12 semanas e depois de 24 e 48 horas do EF respectivamente.

A GASP-1 é classificada como uma nova classe de proteínas inibitórias ligantes de TGF- β que, ao contrário da FLST e FL3, inibe especificamente a MSTN (HILL et al., 2003). A partir da ação da GASP-1, a MSTN é mantida ou condicionada ao estado latente/inativo, impedindo o seu efeito repressor sobre o crescimento do músculo esquelético (HILL et al., 2003). Embora sua atividade contribua para os processos que induzem o aumento da massa muscular e o TF seja um potente estímulo para a hipertrofia do músculo esquelético, poucos investigaram as relações ou resposta molecular da GASP-1 aos modelos de TF. Por exemplo, Aoki et al. (2009) demonstraram que o RNAm para GASP-1, em amostras do sóleo de ratos, foi elevado após 12, 24, 48 e 96 horas de alongamento crônico. Apesar de utilizar um modelo animal e não se referir propriamente ao TF, esse estudo demonstra que o estímulo mecânico de longo prazo é capaz de alterar a expressão da GASP-1. Em seres humanos, Laurentino et al. (2012) investigaram o efeito do TF progressivo de alta e baixa intensidade (AI e BI) sem e com oclusão do fluxo sanguíneo (BIO) sobre os genes envolvidos na via de sinalização da MSTN. Após oito semanas de treinamento (extensão de joelhos, três a quatro séries de 15 a oito repetições a 20% de 1 RM para BI, 80% para AI e 20% para BIO e um minuto de repouso), foi demonstrado aumento no conteúdo do RNAm para a GASP-1 em amostras do vasto lateral coletadas 48 horas depois da última sessão de treinamento. Esses resultados indicam que o aumento da massa muscular observada nos grupos AI e BIO pode ter sido favorecido pelo aumento da expressão da GASP-1, à medida que esta molécula exerce efeito repressor sobre a MSTN. Em contraste às investigações apresentadas, o estudo atual não constatou alteração no nível do RNAm para a GASP-1 depois de oito semanas de TFF e TP. Foi possível observar apenas uma tendência de aumento na expressão da GASP-1 em ambos os grupos experimentais. Assim como sugerido no estudo de Laurentino et. al (2012), essa tendência de aumento da GASP-1 poderia representar um efeito positivo do TFF e do TP sobre a expressão do RNAm para essa molécula. É possível também que a GASP-1 possa ter contribuído para a latência da MSTN (HILL et al., 2003), otimizando, assim, os processos envolvidos na hipertrofia muscular induzida por ambos os modelos TF avaliados.

A ActIIB é o receptor de membrana que reconhece a MSTN (MANNING et al., 2002) e, a partir da interação entre essas proteínas, é iniciada a cascata de fosforilação ativada por receptores do tipo I (ALK4/ALK5), que induz formação do complexo R-SMAD-2/3 e Co-SMAD-4. Posteriormente, essas SMADs são translocadas ao núcleo, onde inibem a ação de fatores de transcrição como a MyoD (TSUCHIDA et al., 2008), por exemplo, e/ou

possivelmente aumentam a expressão de Atrogin e MURF (ELKINA et al., 2011). Nesse processo de sinalização, a ActIIB exerce importante papel na consolidação do sinal intracelular da MSTN no músculo esquelético. Entretanto, os estudos produzidos têm apresentado dados conflitantes. Aoki et al. (2009), utilizando modelo experimental, demonstraram redução no conteúdo gênico de ActIIB depois de 12 e 24 horas de alongamento. Porém, após 48 e 96 horas do mesmo estímulo, foi detectado expressivo aumento do RNAm para esse receptor. Curiosamente, Dalbo et al. (2011) não observaram alterações no conteúdo do RNAm para ActIIB medido em quatro momentos: basal; 48 horas após a primeira sessão; 48 horas depois da segunda sessão; e após 24 horas da terceira sessão de EF. Enquanto isso, Hulmi et al. (2007) evidenciaram redução do nível do RNAm para ActIIB em uma e 48 horas após o EF. Porém, em 21 semanas esse efeito foi atenuado, sendo observada somente uma tendência de queda na expressão gênica avaliada uma e 48 horas depois da última sessão de TF (HULMI et al., 2007). De maneira semelhante, o presente estudo também não evidenciou alteração no conteúdo do RNAm para ActIIB após 48 horas da última sessão de TFF e TP. Aparentemente, há inconsistência na expressão da ActIIB em resposta ao TF. No entanto, os dados deste estudo, assim como os previamente produzidos, concordam sobre a condição favorável ao crescimento muscular gerada pela inalteração ou redução na expressão gênica desse receptor, tendo em vista o seu papel chave na sinalização da MSTN. Apesar da discreta tendência ao aumento do RNAm para ActIIB em resposta a ambos os modelos de treinamento avaliados no presente estudo, é provável que essa tendência não comprometa o efeito inibitório sobre a via da MSTN decorrente do TFF e TP, uma vez que o RNAm para a FLST e FL3 estiveram elevados. A possível interação entre a FLST/FL3 e a actIIB inibiria a sinalização da MSTN na fibra muscular.

Pertencente as I-SMADs, a SMAD-7 atua sobre a via da MSTN, impedindo a formação do complexo SMAD (R-SMAD-2/3 e Co-SMAD-4). Anula, assim, o efeito repressor da MSTN sobre o crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético (NAKAO et al., 1997; ISHISAKI et al., 1998). Sua ação também potencializa a atividade da MyoD, acelerando a diferenciação miogênica e favorecendo a hipertrofia muscular (KOLLIAS et al., 2006). Embora a SMAD-7 contribua para o crescimento muscular, quase não há estudos sobre o efeito da ação mecânica de treinamento físico sobre a expressão gênica dessa molécula. Os únicos que realizaram essa investigação, foram Aoki et al. (2009) e Laurentino et al. (2012). Aoki et al. (2009), investigaram o efeito do alongamento crônico induzido por imobilização do sóleo de ratos em 12, 24, 48 e 96 horas. Em todo o período avaliado foi constatado aumento no conteúdo do RNAm para a SMAD-7, enquanto a expressão da MSTN aumentou

em 12 e 24 horas e sofreu redução nos demais períodos. Já Laurentino et al. (2012) avaliaram em humanos a expressão de genes da via de sinalização da MSTN em resposta ao estímulo do TF com oclusão de fluxo sanguíneo (BIO) e sem oclusão (AI e BI). Em amostras coletadas 48 horas após a última sessão de treinamento de oito semanas, foi demonstrado semelhante aumento no nível do RNAm para a SMAD-7 e redução do conteúdo do RNAm para a MSTN em ambos os grupos AI e BIO. Esse efeito foi acompanhado pelo aumento da força e hipertrofia muscular observada nesses mesmos grupos. Esses dados indicam a participação da SMAD-7 no bloqueio da MSTN e sua contribuição sobre a resposta hipertrófica do músculo esquelético. De acordo com as investigações citadas, o presente estudo evidenciou semelhante aumento no conteúdo do RNAm para a SMAD-7 após 48 horas da última sessão de TFF e TP de oito semanas. Embora se diferencie dos demais em relação ao protocolo de investigação, a presente pesquisa concorda com o fato de que a SMAD-7 é responsiva ao estímulo mecânico do treinamento físico. Especificamente, estes dados corroboram os achados prévios de Laurentino et. al (2012), no que se refere a alteração do nível do RNAm para a SMAD-7 induzido pelo TF. Em adição, os dados do presente estudo indicam que o TP exerce efeito semelhante ao do TFF sobre a expressão gênica dessa molécula. Além do mais, o elevado conteúdo do RNAm para SMAD-7 provavelmente favoreceu a observada hipertrofia muscular induzida pelo TFF e TP. Isso porque a superexpressão da SMAD-7 inibe a atividade do promotor da MSTN, impedindo, assim, o aumento do nível de seu RNAm (NAKAO et al., 1997; ROSENDAHL et al., 2001; ZHU et al., 2004). Esses dados reforçam a ideia da ação inibitória da SMAD-7 sobre a sinalização da MSTN. A expressão da SMAD-7 é estimulada por um mecanismo de autorregulação negativa efetuado pela própria MSTN, a qual induz a interação direta entre a SMAD-2/3 fosforilada com o SBE da região promotora da SMAD-7 (NAKAO et al., 1997; ROSENDAHL et al., 2001; ZHU et al., 2004). Esse efeito decorre, por exemplo, do mecanismo contrarregulatório ao aumento da MSTN. Entretanto, não foi observada qualquer alteração no conteúdo de RNAm para a MSTN entre os grupos experimentais, sugerindo que o aumento do nível do RNAm para a SMAD-7 pode ter sido estimulado por outra(s) via(s). Durante o processo de hipertrofia muscular, a SMAD-7 potencializa o efeito da MyoD (KOLLIAS et al., 2006). Quando ativado, esse fator de transcrição miogênica é capaz de se ligar diretamente a – bem como ativá-lo – o promotor do gene que codifica a SMAD-7, dando origem a um mecanismo de retroalimentação positiva que induz o aumento da massa muscular (KOLLIAS et al., 2006). Além do mais, a região promotora da SMAD-7 é responsiva a muitos outros fatores de transcrição como E-box, Ap-1 e Sp1 (BRODIN et al., 2000; STOPA et al., 2000). Essas moléculas são essenciais para a

transcrição basal da SMAD-7 e para a eficiente indutibilidade da TGF- β sobre o promotor da SMAD-7 (BRODIN et al., 2000; STOPA et al., 2000). Evidências atestam, por exemplo, que a Ap-1 é capaz de interagir com outras proteínas independentemente dos membros da superfamília TGF- β e que a superexpressão de Sp1 é capaz de aumentar em mais de seis vezes a atividade basal do promotor da SMAD-7 (BRODIN et al., 2000). Não há qualquer estudo que tenha investigado o efeito do treinamento físico sobre a expressão/atividade de E-box, Ap-1 e Sp1. No entanto, é possível especular que o TFF e TP possam de alguma maneira influenciar ou ter influenciado (de maneira direta; via TGF- β /activina; ou alguma outra via ou por meio da ação de alguma proteína em específico) a expressão/atividade de E-box, Ap-1 e Sp1 no aumento do conteúdo do RNAm para SMAD-7. Isso pode ter aumentado o nível gênico da SMAD-7, favorecendo a hipertrofia do músculo esquelético. Contudo, cabe a investigações futuras elucidar ou refutar essa proposição.

Associado à via ubiquitina proteassoma, o fator de transcrição FOXO (*Forkhead Box*) induz, entre outras ações, a degradação de proteínas (LEE et al., 2004; SANDRI et al., 2004; STITT et al., 2004). Na célula muscular esquelética, essa função é exercida potencialmente pela isoforma 3A de FOXO, cuja atividade induz atrofia do músculo esquelético. Além disso, a atividade transcricional de FOXO-3A é capaz de ativar o promotor do gene que codifica a MSTN (ALLEN; UNTERMAN, 2007). O aumento da expressão gênico-proteica da MSTN, por meio do referido fator proteolítico, amplifica a resposta atrofica muscular (ALLEN; UNTERMAN, 2007). Mas, apesar de FOXO-3A contribuir para o processo de degradação de proteínas musculares e para a expressão da MSTN, há poucas investigações sobre a interação entre esses fatores proteolítico e miogênico e suas respostas ao TF. Nessa perspectiva, Louis et al. (2007) avaliaram o curso temporal da expressão gênica de FOXO-3A e MSTN em resposta ao EF. Foi observada redução no conteúdo do RNAm para a MSTN ao longo das 24 horas posteriores ao EF (uma, duas, quatro, oito, 12 e 24 horas), enquanto o conteúdo do RNAm para a FOXO-3A apresentou redução apenas em oito e 12 horas após o EF (três séries de 10 repetições a 70% de 1 RM, para a extensão de joelhos em aparelho isocínético, realizadas por homens e mulheres jovens). Por outro lado, Williamson et al. (2010) avaliaram o efeito crônico do TF entre mulheres jovens e idosas (extensão de joelhos em máquina isocínética – três séries de 10 repetições a 70 a 75% de 1 RM, dois minutos de repouso, três vezes por semana). Após 12 semanas, observaram redução no conteúdo do RNAm para a MSTN no grupo de jovens e aumento no grupo de idosas. No entanto, nenhuma alteração no conteúdo do RNAm para a FOXO-3A foi evidenciado em ambos os grupos, a não ser uma tendência a redução para as mulheres jovens. Embora amostra, protocolo e tempo de

treinamento sejam diferentes, o resultado do presente estudo concorda com Williamson et al. (2010), na medida em que não foi evidenciada alteração no conteúdo do RNAm para a FOXO-3A após a intervenção do TF (TFF vs. TP). Apesar de certa tendência ao aumento na expressão de FOXO-3A ter sido observada em função de ambos os modelos de treinamento, observou-se ausência de efeito do TFF e TP sobre a expressão gênica desse fator proteolítico durante o proposto período de treinamento (oito semanas). No entanto, é possível que durante esse período, o estímulo mecânico exercido por ambos os modelos de treinamento possa ter, de alguma maneira (direta talvez), mantido a expressão de FOXO-3A em condições basais. Essa resposta favoreceria o observado aumento da massa muscular, tendo em vista a ação proteolítica de FOXO-3A. Em relação à observada tendência ao aumento de FOXO-3A, é possível que a sua atividade possa ter sido anulada pela ativação da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR. Essas proteínas quinases regulam a atividade transcricional de FOXO-3A e demais isoformas. PI3K/AKT fosforila FOXO-3A, condicionando sua interação com a proteína 14-3-3, que, por sua vez, envia o respectivo fator proteolítico do núcleo ao citosol, onde é mantido inativo (BRUNET et al., 1999; BROWNAWELL et al., 2001; CAHILL et al., 2001; ZHAO et al., 2004; OBSILOVA et al., 2005). Tem sido demonstrado que a ação das quinases PI3K/AKT respondem ao estímulo mecânico do TF, induzindo/iniciando processos de hipertrofia muscular esquelética e consequente aumento da força muscular (IZUMIYA et al., 2008; SARTORI et al., 2009). Sendo assim, ao promoverem ganho de força e massa muscular, é possível que o TFF e o TP tenham estimulado a atividade da via PI3K/AKT (dado não mensurado), as quais provavelmente anulariam os possíveis efeitos de FOXO-3A sobre a degradação de proteínas musculares e a expressão gênica da MSTN.

Entre os princípios que regem a prescrição do treinamento físico, a especificidade do treinamento condiciona o surgimento de respostas adaptativas à aplicação de estímulos específicos. Sendo assim, seria esperado, por exemplo, para os modelos do TF, que a força máxima fosse desenvolvida pelo TFF e a potência pelo TP. Embora o princípio da especificidade seja reconhecido como preponderante ao surgimento de adaptações específicas, os resultados do presente estudo não confirmam a ocorrência de especificidade de resposta aos diferentes modelos de TF. Estudos prévios também questionam a validade desse princípio ao evidenciarem semelhantes adaptações morfológicas e funcionais como resposta a realização de diferentes modelos do TF. Jones et al. (2001), por exemplo, demonstraram semelhante aumento na capacidade de força e nos picos de velocidade, força e potência após 10 semanas de TF (TFF e TP). Comparando os efeitos desses mesmos modelos de TF após o período de oito semanas, McBride et al. (2002), também observaram ganhos semelhantes em

parâmetros do desempenho físico, como: picos de força, velocidade e potência, sendo evidenciado também, aumento similar nos valores percentuais da força máxima e eletromiografia (MCBRIDE et al., 2002). Nessa perspectiva, os dados sobre força e hipertrofia do presente estudo, sendo estes parte das investigações prévias de Lamas et al. (2007) e Lamas et al. (2009), reforçam as evidências demonstradas na medida em que identificou ausência de efeito específico entre o TFF e TP. Após oito semanas de treinamento, foram observados ganhos semelhantes em força máxima e hipertrofia do músculo esquelético entre os grupos experimentais realizando modelos distintos de TF. Isso indica que ambos os modelos de TFF e TP são capazes de induzir similares alterações morfofuncionais, mesmo com distintas sobrecargas de treinamento e diferentes velocidades de ação muscular. (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009).

O padrão de resposta molecular referente à expressão de genes pertencentes à via de sinalização da MSTN também não demonstrou qualquer especificidade ao TFF e TP. Ambos os modelos de TF induziram semelhante aumento do nível de RNAm para a FLST, FL3 e SMAD-7. Mesmo os genes que não tiveram a sua expressão alterada significativamente, apresentaram semelhantes tendências de aumento no seu conteúdo de RNAm, como: GASP-1, ActIIB e FOXO-3A. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios, os quais também não observaram alterações moleculares específicas após oito semanas do TFF vs. TP. Entre essas investigações, Lamas et al. (2009), por exemplo, demonstraram semelhante aumento no conteúdo do RNAm para o gene que codifica a quinase mTOR (enzima envolvida no processo de síntese proteica). Já Leal et al. (2011) evidenciaram que ambos os modelos de TF (força máxima e potência) ativaram alguns genes da via WNT de forma semelhante (WNT1, LEF1 e SFRP1), embora outros genes tenham sido mais transcritos após o TP (LEAL et al., 2011). Essas evidências sustentam os achados do presente estudo, o qual reforça a ideia de que o TFF e o TP, apesar das diferentes configurações de intensidade e velocidade, constituem estímulos mecânicos semelhantemente capazes de ativar mecanismos que podem estar associados à síntese de proteínas e hipertrofia muscular (MORGAN; PARTRIDGE, 2003; O'NEIL et al., 2009).

Embora o TFF e TP tenham promovido efeitos moleculares e morfofuncionais semelhantes, a magnitude das respostas de força, hipertrofia e expressão gênica foi discretamente distinta entre os grupos experimentais. Foi observado aumento de 22% e 17% da força máxima nos grupos de TFF e TP respectivamente (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009). Além disso, de acordo com a análise do efeito do tamanho, o aumento percentual da AST por tipo de fibra foi tendentemente maior para o TFF: 15,1%, 18,5%, e 41,3%, em

relação ao TP: -5%, 15,3%, e 19,4% para as fibras do tipo I, IIa e IIb respectivamente (LAMAS et al., 2007; LAMAS et al., 2009). É possível que essas diferenças, apesar de discretas até oito semanas, possam ser maximizadas pelo maior tempo de treinamento. Talvez a especificidade de resposta aos protocolos de TF, principalmente com relação ao músculo esquelético, necessite de um período superior a oito semanas para se manifestar em sua plenitude. Essa é uma limitação do presente estudo, que utilizou o período de oito semanas de treinamento.

O TF reconhecidamente induz hipertrofia do músculo esquelético, entretanto o período em que ocorre ganho de massa muscular após a realização dessa estratégia de treinamento ainda não está claro. Previamente, Moritani e Devries (1979), ao avaliarem o curso temporal do ganho de força no que se refere à contribuição dos fatores neurais e morfológico, identificaram a hipertrofia muscular como fator dominante depois de três a cinco semanas de um programa de TF isocinético realizado por homens e mulheres jovens em oito semanas. Nessa mesma perspectiva, Staron et al. (1994) observaram aumento da AST do vasto lateral de homens e mulheres jovens a partir de seis das oito semanas de TF. Já Abe et al. (2003) detectaram aumento da massa muscular total via ressonância magnética (membros superiores e inferiores) a partir de 12 das 16 semanas de TF realizado por homens jovens. Dados mais recentes, reportados por Mandy et al. (2006), demonstraram, porém, aumento da AST nas amostras do vasto lateral de homens jovens a partir de quatro das oito semanas de TF. Apesar de não haver um consenso sobre o curso temporal da resposta hipertrófica, os estudos sugerem, em média, tempo superior a oito semanas. Portanto, é plausível especular que as discretas diferenças na AST detectadas, principalmente pela análise do efeito do tamanho, possam atingir significância em períodos de treinamento mais prolongados. De qualquer forma, a relevância do princípio da especificidade precisa ser revista, principalmente na fase inicial do TF.

8 CONCLUSÃO

Apesar de serem especificamente distintos, os TFF e TP promoveram um similar padrão de resposta molecular e morfofuncional ao final de oito semanas de treinamento. O alto grau de tensão muscular gerado por ambos os modelos de TF, apesar de ter origens distintas, provavelmente foi um dos fatores preponderantes para o surgimento de adaptações semelhantes no período investigado. Tanto o TFF quanto o TP configuraram estímulos mecânicos capazes de ativar de forma similar a expressão de inibidores da via de sinalização da MSTN. Provavelmente, esses estímulos também desencadearam outras respostas moleculares relacionadas aos mecanismos de reparo e remodelamento do músculo esquelético, contribuindo para hipertrofia e consequente aumento da força máxima. A ausência de respostas adaptativas específicas até oito semanas de treinamento apontam para necessidade de investigar o curso temporal das adaptações ao TF em longo prazo. O avanço do conhecimento sobre a real importância do princípio da especificidade é fundamental para a prescrição eficiente do TF.

REFERÊNCIAS

- Aagaard, P. et al. A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: changes in muscle architecture. **The Journal of Physiology**, v. 534, n. 2, p. 613-623, 2001.
- Abe, T. et al. Whole body muscle hypertrophy from resistance training: distribution and total mass. **British Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 6, p.543-545, 2003.
- Allen, D. L.; Unterman, T. G. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. 188-199, 2007.
- Altschul, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- Amirouche, A. et al. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 150, n.1, p. 286-294, 2009.
- Amthor, H. et al. Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth. **Developmental Biology**, v. 243, n. 1, p. 115-127, 2002.
- _____. Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. **Developmental Biology**, v. 270, n. 1, p. 19-30, 2004.
- Aoki, M. S. et al. Expression of genes related to myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth. **Muscle & Nerve**, v. 40, n. 6, p. 992-999, 2009.
- Attisano, L.; Wrana, J. L. Smads as transcriptional co-modulators. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, n. 2, p. 235-243, 2000.
- Banyai, L.; Patthy, L. The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. **Protein Science**, v. 8, n. 8, p. 1636-1642, 1999.
- Bateman, A. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 276-280, 2002.
- Behm, D. G.; Sale, D. G. Intended rather than actual movement velocity determines velocity-specific training response. **Journal of Applied Physiology**, v. 74, n. 1, p. 359-368, 1993.
- Bittencourt, J. C.; Elias, C. F. (Ed.). **Métodos em Neurociência**. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2007. 223-234 p.
- Bogdanovich, S. et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. **Nature**, v. 420, n. 6914, p. 418-421, 2002.

Bonala, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta induces myogenesis by modulating myostatin activity. **The Journal Biological Chemistry**, v. 287, n. 16, p. 12935-12951, 2012.

Braun, T.; Gautel, M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 6, p.349-361, 2011.

Brodin, G. et al. Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 29023-29030, 2000.

Brownawell, A. M. et al. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 10, p. 3534-3546, 2001.

Brunet, A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, n. 6, p. 857-868, 1999.

Burd, N. A. et al. Low-load high volume resistance exercise stimulates muscle protein synthesis more than high-load low volume resistance exercise in young men. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. 12033, 2010.

Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23-39, 2002.

Cahill, C. M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 16, p. 13402-13410, 2001.

Cakt, B. D. et al. Cycling progressive resistance training for people with multiple sclerosis: a randomized controlled study. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 89, n. 6, p. 446-457, 2010.

Cash, J. N. et al. Structure of myostatin · follistatin-like 3: N-terminal domains of follistatin-type molecules exhibit alternate modes of binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 2, p. 1043-1053, 2012.

Chapman, D. et al. Greater muscle damage induced by fast versus slow velocity eccentric exercise. **International Journal of Sports Medicine**, v. 27, n. 8, p. 591-598, 2006.

Chapman, D. W. et al. Effect of lengthening contraction velocity on muscle damage of the elbow flexors. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 40, n. 5, p. 926-933, 2008.

Chen, Y. et al. Regulation of transforming growth factor beta- and activin-induced transcription by mammalian Mad proteins. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 93, n. 23, p. 12992-12997, 1996.

Crewther, B. et al. Possible stimuli for strength and power adaptation: acute mechanical responses. **Sports Medicine**, v. 35, n. 11, p. 967-989, 2005.

Currie, P. D.; Ingham, P. W. The generation and interpretation of positional information within the vertebrate myotome. **Mechanisms of Development**, v. 73, n. 1, p. 3-21, 1998.

Dalbo, V. J. et al. Acute loading and aging effects on myostatin pathway biomarkers in human skeletal muscle after three sequential bouts of resistance exercise. **The Journal of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 66, n. 8, p. 855-865, 2011.

De Winter, J. P. et al. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 105-114, 1996.

Derynck, R. et al. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. **Cell**, v. 95, n. 6, p. 737-740, 1998.

Dreyer, H. C. et al. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 576, n. 2, p. 613-624, 2006.

Durieux, A. C. et al. Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. **Endocrinology**, v. 148, n. 7, p. 3140-3147, 2007.

Elkina, Y. et al. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 2, n. 3, p. 143-151, 2011.

Fainsod, A. et al. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. **Mechanisms of Development**, v. 63, n. 1, p. 39-50, 1997.

Farthing, J. P.; Chilibeck, P. D. The effects of eccentric and concentric training at different velocities on muscle hypertrophy. **European Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 6, p. 578-586, 2003.

Feigenbaum, M. S.; Pollock, M. L. Prescription of resistance training for health and disease. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 31, n. 1, p. 38-45, 1999.

Feng, X. H. et al. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 19, p. 5178-5193, 2000.

Fry, A. C. The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. **Sports Medicine**, v. 34, n. 10, p. 663-679, 2004.

Fu, Z.; Tindall, D. J. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2312-2319, 2008.

Gharakhanlou, R. et al. Effect of resistance training on serum myostatin, GASP-1, IGF-I and IGFBP-3 in young men. **Journal of Movement Science Spring-Summer**, v. 7, n. 13, p. 67-79, 2009.

Garg, R. R. et al. Cloning of zebrafish activin type IIB receptor (ActRIIB) cDNA and mRNA expression of ActRIIB in embryos and adult tissues. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 153, n. 1-2, p. 169-81, 1999.

Gonzalez-Cadavid, N. F. et al. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14938-14943, 1998.

Greer, E. L.; Brunet, A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7410-7425, 2005.

Hansen, J. et al. Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine. **Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 164-171, 2010.

Harris, G. R. et al. Short-term performance effects of high power, high force, or combined weight-training methods. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 14, n. 1, p. 14-20, 2000.

Harrison, C. A.; Chan, K. L.; Robertson, D. M. Activin-A Binds Follistatin and Type II Receptors through Overlapping Binding Sites: Generation of Mutants with Isolated Binding Activities. **Endocrinology**, v. 14, n. 6, p. 2744-2753, 2006

Hata, A. et al. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. **Genes & Development**, v. 12, n. 2, p. 186-197, 1998.

Hayashi, H. et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. **Cell**, v. 89, n. 7, p. 1165-1173, 1997.

Hayette, S. et al. FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders. **Oncogene**, v. 16, n. 22, p. 2949-2954, 1998.

Hennebry, A. et al. Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 296, n. 3, p. 525-534, 2009.

Hileman, R. E. et al. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. **BioEssays**, v. 20, n. 2, p. 156-167, 1998.

Hill, J. J. et al. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 43, p. 40735-40741, 2002.

_____. 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**, v. 17, n. 6, p. 1144-1154, 2003.

Huet, C. et al. Skeletal muscle cell hypertrophy induced by inhibitors of metalloproteases; myostatin as a potential mediator. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 281, n. 5, p. 1624-1634, 2001.

Hulmi, J. J. et al. Postexercise myostatin and activin IIb mRNA levels: effects of strength training. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 2, p. 289-297, 2007.

Imamura, T. et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 622-626, 1997.

Ishisaki, A. et al. Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 38, p. 24293-24296, 1998.

_____. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13637-13642, 1999.

Izumiya, Y. et al. Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 2, p. 159-172, 2008.

Jensky, N. E. et al. The influence of eccentric exercise on mRNA expression of skeletal muscle regulators. **European Journal of Applied Physiology**, v. 101, n. 4, p. 473-480, 2007.

Jensky, N. E. et al. Exercise does not influence myostatin and follistatin messenger RNA expression in young women. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 24, n. 2, p. 522-530, 2010.

Jespersen, J. G. et al. Myostatin expression during human muscle hypertrophy and subsequent atrophy: increased myostatin with detraining. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 21, n. 2, p. 215-223, 2011.

Jones, K. et al. The effects of varying resistance-training loads on intermediate- and high-velocity-specific adaptations. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 15, n. 3, p. 349-356, 2001.

Jouliia-Ekaza, D.; Cabello, G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 13, p. 2401-2414, 2006.

Kandarian, S. C.; Jackman, R. W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. **Muscle & Nerve**, v. 33, n. 2, p. 155-165, 2006.

Kim, J. S. et al. Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. **American Journal of Physiol - Endocrinology and Metabolism**, v. 288, n. 6, p. 1110-1119, 2005.

_____. Load-mediated downregulation of myostatin mRNA is not sufficient to promote myofiber hypertrophy in humans: a cluster analysis. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 5, p. 1488-1495, 2007.

Kollias, H. D. et al. Smad7 promotes and enhances skeletal muscle differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 16, p. 6248-6260, 2006.

Kraemer, W. J. et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 34, n. 2, p. 364-380, 2002.

_____. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, n. 4, p. 674-688, 2004.

Kyrolainen, H. et al. Effects of power training on muscle structure and neuromuscular performance. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 15, n. 1, p. 58-64, 2005.

Lamas, L. et al. Treinamento de força máxima x treinamento de potência: alterações no desempenho e adaptações morfológicas. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 21, n. 4, p. 331-340, 2007.

_____. Expression of genes related to muscle plasticity after strength and power training regimens. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 20, n. 2, p. 216-225, 2009.

Langley, B. et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49831-49840, 2002.

Laurentino, G. C. et al. Strength training with blood flow restriction diminishes myostatin gene expression. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 44, n. 3, p. 406-412, 2012.

Leal, M. L. et al. Effect of different resistance-training regimens on the WNT-signaling pathway. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 10, p. 2535-2545, 2011.

Lee, S. J.; Mcpherron, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9306-9311, 2001.

Lee, S. W. et al. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. **Journal of the American Society Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 1537-1545, 2004.

Leger, B. et al. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **The Journal of Physiology**, v. 576, n. 3, p. 923-933, 2006.

_____. Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of Akt phosphorylation. **Rejuvenation Research**, v. 11, n. 1, p. 163-175, 2008.

Link, B. A.; Nishi, R. Opposing effects of activin A and follistatin on developing skeletal muscle cells. **Experimental Cell Research**, v. 233, n. 2, p. 350-362, 1997.

Liu, F. et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. **Nature**, v. 381, n. 6583, p. 620-623, 1996.

Lokireddy, S. et al. Identification of atrogin-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 303, n. 5, p. 512-529, 2012.

Louis, E. et al. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 5, p. 1744-1751, 2007.

Ma, K. et al. Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 281, n. 6, p. 1128-1136, 2001.

Malisoux, L. et al. Stretch-shortening cycle exercises: an effective training paradigm to enhance power output of human single muscle fibers. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 3, p. 771-779, 2006.

Manning, G. et al. The protein kinase complement of the human genome. **Science**, v. 298, n.5600, p. 1912-1934, 2002.

Martins, R. A. et al. The effect of aerobic versus strength-based training on high-sensitivity C-reactive protein in older adults. **European Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 1, p. 161-169, 2010.

Matzuk, M. M. et al. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. **Nature**, v. 374, n. 6520, p. 360-363, 1995.

Mcbride, J. M. et al. The effect of heavy- vs. light-load jump squats on the development of strength, power, and speed. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 16, n. 1, p. 75-82, 2002.

Mccroskery, S. et al. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. **The Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 6, p. 1135-1147, 2003.

Mcfarlane, C. et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. **Journal of Cellular Physiology**, v. 209, n. 2, p. 501-514, 2006.

Mcpherron, A. C. et al. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 83-90, 1997.

Mcpherron, A. C.; Lee, S. J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 94, n. 23, p. 12457-12461, 1997.

Morgan, J. E.; Partridge, T. A. Muscle satellite cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 8, p. 1151-1156, 2003.

Moritani, T.; Devries, H. A. Neural factors versus hypertrophy in the time course of muscle strength gain. **American Journal of Physical Medicine**, v. 58, n. 3, p. 115-130, 1979.

Mosher, D. S. et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 5, p. 779-786, 2007.

Mott, J. D. et al. Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 1384-1990, 2000.

Nakamura, T. et al. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. **Science**, v. 247, n. 4944, p. 836-838, 1990.

Nakao, A. et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 631-635, 1997.

_____. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 17, p. 5353-5362, 1997.

Nosaka, K.; Newton, M. Difference in the magnitude of muscle damage between maximal and submaximal eccentric loading. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 16, n. 2, p. 202-208, 2002.

O'neil, T. K. et al. The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 14, p. 3691-3701, 2009.

Obsil, T.; Obsilova, V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2263-2275, 2008.

Obsilova, V. et al. 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. **Biochemistry**, v. 44, n. 34, p. 11608-11617, 2005.

Oh, S. P.; Li, E. The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. **Genes & Development**, v. 11, n. 14, p. 1812-1826, 1997.

Patel, K.; Amthor, H. The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, n. 2, p. 117-126, 2005.

Paulo, A. C. et al. Influência do nível de força máxima na produção e manutenção da potência muscular. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 6, p. 422-426, 2010.

Ratamess, N. A. et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 3, p. 687-708, 2009.

Rebbapragada, A. et al. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 20, p. 7230-7242, 2003.

Reed, S. A. et al. Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 3, p. 987-1000, 2012.

Reeves, N. D. et al. Effect of resistance training on skeletal muscle-specific force in elderly humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 3, p. 885-892, 2004.

Rodino-Klapac, L. R. et al. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. **Muscle & Nerve**, v. 39, n. 3, p. 283-296, 2009.

Rosendahl, A. et al. Activation of the TGF-beta/activin-Smad2 pathway during allergic airway inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 60-68, 2001.

Roth, S. M. et al. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 6, p. 706-709, 2003.

Sako, D. et al. Characterization of the ligand binding functionality of the extracellular domain of activin receptor type IIb. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n.27, Jul 2, p. 21037-48. 2010.

Sandri, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399-412, 2004.

Sartori, R. et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 296, n. 6, p. 1248-1257, 2009.

Schoenfeld, B. J. Does exercise-induced muscle damage play a role in skeletal muscle hypertrophy? **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 26, n. 5, p. 1441-1453, 2012.

Schuelke, M. et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 26, p. 2682-2688, 2004.

Seynnes, O. R. et al. Early skeletal muscle hypertrophy and architectural changes in response to high-intensity resistance training. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 1, p. 368-373, 2007.

Sharma, M. et al. Myostatin in muscle growth and repair. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 29, n. 4, p. 155-158, 2001.

Shelton, G. D.; Engvall, E. Gross muscle hypertrophy in whippet dogs is caused by a mutation in the myostatin gene. **Neuromuscular Disorders**, v. 17, n. 9-10, p. 721-722, 2007.

Shepstone, T. N. et al. Short-term high- vs. low-velocity isokinetic lengthening training results in greater hypertrophy of the elbow flexors in young men. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 5, p. 1768-1776, 2005.

Shi, Y.; Massague, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 685-700, 2003.

Shimasaki, S. et al. Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 85, n. 12, p. 4218-4222, 1988.

Sidis, Y.; Schneyer, A. L.; Keutman, H. T. Heparin and activin-binding determinants in follistatin and FSTL3. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 130-136, 2005.

_____. Biological activity of follistatin isoforms and follistatin-like-3 is dependent on differential cell surface binding and specificity for activin, myostatin, and bone morphogenetic proteins. **Endocrinology**, v. 147, n. 7, p. 3586-3597, 2006.

Sorensen, B. et al. Transcriptional control of complement activation in an exercise model of chronic fatigue syndrome. **Molecular Medicine**, v. 15, n. 1-2, p. 34-42, 2009.

Staron, R. S. et al. Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, n. 3, p. 1247-1255, 1994.

Stitt, T. N. et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. **Molecular Cell**, v. 14, n. 3, p. 395-403, 2004.

Stopa, M. et al. Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. THE TGF-beta response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29308-29317, 2000.

Strasser, B. et al. Resistance training in the treatment of the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of the effect of resistance training on metabolic clustering in patients with abnormal glucose metabolism. **Sports Med**, v. 40, n. 5, p. 397-415, 2010.

Sugino, K. et al. Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 21, p. 15579-15587, 1993.

Sumitomo, S. et al. The heparin binding site of follistatin is involved in its interaction with activin. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 208, n. 1, p. 1-9, 1995.

Thies, R. S. et al. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. **Growth Factors**, v. 18, n. 4, p. 251-259, 2001.

Thomas, M. et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40235-40243, 2000.

Tsuchida, K. et al. Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 52, p. 40788-40796, 2000.

_____. Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. **Endocrine Journal**, v. 55, n. 1, p. 11-21, 2008.

Tuteja, G.; Kaestner, K. H. SnapShot: forkhead transcription factors I. **Cell**, v. 130, n. 6, p. 1160, 2007.

Ugrinowitsch, C. et al. Limitations of ordinary least squares models in analyzing repeated measures data. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, n. 12, p. 2144–2148, 2004.

Vierck, J. et al. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. **Cell Biology International**, v. 24, n. 5, p. 263-272, 2000.

Williamson, D. L. et al. Resistance exercise, skeletal muscle FOXO3A, and 85-year-old women. **The Journal of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 65, n. 4, p. 335-343, 2010.

Willoughby, D. S.; Taylor, L. Effects of concentric and eccentric muscle actions on serum myostatin and follistatin-like related gene levels. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 3, n. 4, p. 226-233, 2004.

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

Winett, R. A.; Carpinelli, R. N. Potential health-related benefits of resistance training. **Preventive Medicine**, v. 33, n. 5, p. 503-513, 2001.

Woolstenhulme, M. T. et al. Temporal response of desmin and dystrophin proteins to progressive resistance exercise in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 6, p. 1876-1882, 2006.

Zavanela, P. M. et al. Health and fitness benefits of a resistance training intervention performed in the workplace. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 26, n. 3, p. 811-817, 2012.

Zehr, E. P.; Sale, D. G. Ballistic movement: muscle activation and neuromuscular adaptation. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 19, n. 4, p. 363-378. 1994.

Zhang, X. et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, n. 11, p. 1978-1986, 2011.

Zhao, X. et al. Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. **Biochemical Journal**, v. 378, n. 3, p. 839-849, 2004.

Zhu, X. et al. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. **Cytokine**, v. 26, n. 6, p. 262-272, 2004.

Zimmers, T. A. et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. **Science**, v. 296, n. 5572, p. 1486-1488, 2002.

ANEXO A - Aprovação do comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Of.CEP/1142010/EEFE/30112010

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo **aprovou** "Ad Referendum" o Protocolo de Pesquisa nº 2010/36 – Expressão de genes envolvidos na sinalização da miostatina (GDF-8) em resposta a diferentes modelos de treinamento de força, sob sua responsabilidade.

Solicitamos a observância da apresentação do relatório final ao término do desenvolvimento da pesquisa, em maio de 2012.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Suely dos Santos
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo(a). Sr(a).
Prof(a). Dr(a). Marcelo Saldanha Aoki
EACHUSP