UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

EFEITO DA MODULAÇÃO AGUDA DA CONCENTRAÇÃO
HORMONAL SISTÊMICA, NA REGULAÇÃO HORMONAL LOCAL E
DAS CÉLULAS SATÉLITES EM INDIVÍDUOS TREINADOS EM
FORÇA

Aluno: FELIPE CASSARO VECHIN

SÃO PAULO

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

EFEITO DA MODULAÇÃO AGUDA DA CONCENTRAÇÃO
HORMONAL SISTÊMICA, NA REGULAÇÃO HORMONAL LOCAL E
DAS CÉLULAS SATÉLITES EM INDIVÍDUOS TREINADOS EM
FORÇA

Aluno: FELIPE CASSARO VECHIN

SÃO PAULO
2019

FELIPE CASSARO VECHIN

EFEITO DA MODULAÇÃO AGUDA DA CONCENTRAÇÃO
HORMONAL SISTÊMICA, NA REGULAÇÃO HORMONAL LOCAL E
DAS CÉLULAS SATÉLITES EM INDIVÍDUOS TREINADOS EM
FORÇA

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

Área de concentração: Biodinâmica do
movimento humano

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ugrinowitsch

São Paulo
2019

Catálogo da Publicação

Serviço de Biblioteca
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Vechin, Felipe Cassaro

Efeito da modulação aguda da concentração hormonal
sistêmica na regulação hormonal local e das células satélites
em indivíduos treinados em força / Felipe Cassaro Vechin. --

São Paulo : [s.n.], 2019.

57p.

Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e Esporte da
Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ugrinowitsch

1. Treinamento de força 2. Hormônios I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VECHIN, Felipe Cassaro

Título: Efeito da modulação aguda da concentração hormonal sistêmica, na regulação hormonal local e das células satélites em indivíduos treinados em força.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esse trabalho a toda minha família e as pessoas queridas que fizeram e fazem parte dessa jornada estando comigo (pessoal ou mentalmente) em todos os momentos. Dedico ainda em especial aos voluntários que doaram, literalmente, seu sangue, suor e um pedaço de si.

AGRADECIMENTOS

Farei dessa sessão de agradecimentos algo breve e resumido, caso o contrário a mesma ficaria maior que a própria tese. Não se chega, absolutamente, a lugar nenhum ou a conquista de qualquer objetivo sozinho; é preciso outras pessoas iluminando nosso caminho e fazendo deste caminho, o caminho mais prazeroso possível.

Dessa forma queria agradecer a Deus (ou chamem como preferir) por tornar tudo possível me dando toda a saúde e condição necessária à vida e à realização desse trabalho. Agradecê-lo também por ter colocado em meus caminhos inúmeros seres que fizeram e fazem meu dia a dia mais leve e feliz.

Evitarei citar muitos nomes para não cometer injustiças esquecendo alguém. Mas para agradecer toda a família, gostaria de citar em especial minha esposa, Katarine Maria, meus pais, Maria de Jesus e Antonio José Vechin e minha irmã, Laís Cassaro Vechin. Vocês em particular e toda nossa família foram **ESPECIALMENTE** importantes para possibilitar não só a realização dessa tese, mas a finalização da mesma. Foi na fase mais difícil da minha vida pessoal, num momento também determinante para realização dessa tese, a coleta de dados, que vocês se fizeram ainda mais presentes. Foi o amor, a confiança e a força de vocês que me permitiram não só finalizar essa tese, mas fazer meu estágio de pesquisa no exterior por um ano durante um momento muito difícil. Faltam palavras para agradecer.

Gostaria também de agradecer de forma bastante especial e com todo carinho meu orientador Carlos Ugrinowitsch. Apesar de seus esforços em fazer com que seus relacionamentos com os orientados e colegas de profissão não passem muito pelo lado pessoal, seu grande coração muitas vezes lhe impede de ter sucesso nesse quesito (risos). Particularmente, para mim você sempre foi bem mais do que um orientador. Mais do que um orientador por que sim, você foi, e sabe disso, um orientador ferrenho, crítico, buscando sempre a excelência e tentando extrair de mim mais do que eu podia entregar. Por mais que isso pudesse ser momentaneamente doloroso. E isso fez com que eu me desenvolvesse pessoal e academicamente até aqui. Mas, foi nos momentos mais complicados (pessoalmente falando) que você se fez presente (e ausente) na medida certa. Mostrou-se um ser humano impar, particularmente especial para mim. Foi em meio os maiores desafios que as horas e horas de conversa na sua sala fizeram com que

o sucesso, ou o aprendizado fosse grande. Nossas reuniões, particulares ou em grupo, foram as maiores e melhores aulas que tive, e sei que não falo só por mim.

Não foram poucos os amigos e colegas de trabalho que tornaram essa tese possível e mais do que isso, fizeram que não só a chegada, mas todo o caminho fosse SENSACIONAL. Meus amigos da minha cidade natal, Taubaté no interior de SP que mesmo distante se fizeram sempre presente, e fizeram da volta para casa momentos de alegria. Os amigos de Campinas, da época da graduação na nossa querida FEF/UNICAMP. Os amigos das tantas repúblicas em Barão Geraldo e São Paulo, família que a vida nos deu. Os colegas de laboratório e de EEF/USP que fazem da nossa rotina, as vezes difícil, algo leve de se viver. Aqui peço licença mais uma vez para citar alguns poucos nomes que representam a todos pela proximidade do dia a dia e pela comunhão na forma de pensar, agir e ser. Espero que agente consiga, ainda que bem pouco, fazer um mundo melhor como agente deseja Cleiton Augusto Libardi, Miguel Soares Conceicao, Felipe Damas, Manelix (risos), Rick Martin (Berton), Guilherme Telles. Não vou agradecer a cada um pessoalmente para não me estender, mas nesse caminho chamado pós-graduação, nós estamos juntos desde minha iniciação científica ainda na graduação. Lá se vai aproximadamente DEZ anos. Muita coisa aconteceu, cada um vem trilhando seu caminho acadêmico e pessoal, muitos desafios apareceram, a vida às vezes nos levou para cidades e ainda continentes totalmente distantes, colocou situações conflitantes, mas apesar de tudo isso nós permanecemos juntos, trabalhando e compartilhando sonhos. Não acho que sejamos muito inteligentes ao insistir em algumas coisas, mas fazer o que SE NÓS TEMIOSOS SOMOS ASSIM? (Cassaro et al. 2000 e alguma coisa) (risos).

Gostaria também de agradecer imensamente aos parceiros que ajudaram muito a essa Tese acontecer. Ao Dr. Luiz Augusto Riani Costa (vulgo e famoso DOC) que brilhou nas biopsias, ajudou a desenvolver a coleta no músculo Deltoide e fez de todas as coletas momentos de muita seriedade e competência, mas também de MUITA diversão. Em nome da Prof. Dr(a) Patricia Brum agradeço ao Lab. de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício e a Telminha (Dra. Telma Cunha) que fez com que as análises de expressão gênica fossem possíveis. Os Prof. Dr. Silvio Consoni e Prof. Dr. Daniel Martins-de-Souza do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual do Instituto de Biologia / UNICAMP que respectivamente permitiram e possibilitaram que as análises

de imuno-histoquímica da presente tese e de proteômica do nosso projeto piloto fossem realizadas. Ao Prof. Dr. Jakob Vingren que confiou no nosso trabalho e abriu as portas do *Applied Physiology Laboratory* na Universidade do Norte do Texas (UNT; Denton/Texas - EUA) para que pudéssemos aprender e desenvolver habilidades fundamentais para essa tese e para a vida acadêmica. Meus colegas de laboratório na UNT e em Denton/Texas - EUA que me receberam muito bem, deixando o desafio e a rotina de ir para um lugar desconhecido e distante mais leve, me ensinaram muitas coisas durante um ano inteiro.

O agradecimento será certamente eterno aos voluntários que doaram o suor, o sangue, o músculo, mas o mais importante, o tempo, a disposição e a confiança a esse projeto. Vocês foram especiais e fizeram das nossas rotinas de treinos e avaliações momentos de muita seriedade e comprometimento, mas também de muita diversão e alegria. Faltam palavras para agradecer.

Por fim, este trabalho não seria possível sem seus financiamentos. Portanto, agradeço aos financiamentos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que proporcionou que eu me dedicasse integralmente ao doutorado por meio de bolsa regular de doutorado (2015/19526-8) além de tornar possível meu doutorado sanduiche nos EUA, por meio da bolsa BEPE (2017/18069-8).

RESUMO

Vechin, Felipe Cassaro. **Efeito da modulação aguda da concentração hormonal sistêmica, na regulação hormonal local e das células satélites em indivíduos treinados em força**. 2019. 65f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2019.

Hormônios como a testosterona, a desidroepiandrosterona (DHEA), o cortisol e o hormônio do crescimento (GH) e fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), são agudamente liberados no sangue logo após sessões de exercício de força (EF). Esses hormônios e fatores de crescimento estão relacionados com a modulação de processos fisiológicos na célula muscular esquelética. Mais recentemente, pesquisadores evidenciaram a presença de enzimas esteroidogênicas, responsáveis por metabolizar o colesterol em diferentes hormônios esteroides, no interior da célula muscular. Isso possibilitaria às células musculares regular a concentração hormonal intramuscular. Essa modulação intramuscular pode ser capaz de afetar diferentes processos fisiológicos nessas células, como a atividade das células satélites (CS). Contudo, o papel da modulação da concentração hormonal sérica induzida pelo EF em regular as concentrações intracelular de hormônios nas células musculares, regulando a atividade das CS ainda não é bem conhecido em humanos. Para investigar esse fenômeno, indivíduos treinados em força foram submetidos a duas diferentes sessões de EF com o objetivo de modular diferentemente as respostas hormonais séricas entre elas. Uma sessão (HH) que elevaria expressivamente as concentrações agudas séricas da testosterona total e livre, do DHEA, do cortisol, do GH, e do IGF-1, enquanto outra sessão não induziria elevações expressivas desses hormônios (LH). Indivíduos treinados foram escolhidos por apresentarem menor impacto de sessões de exercício de força na modulação de processos fisiológicos nas células musculares por serem mais acostumados às mesmas. Isso favorece relacionar os processos da modulação hormonal sistêmica e local com a possível regulação da atividade das CSs. As sessões de EF foram efetivas em modular agudamente as concentrações séricas da testosterona total, DHEA, GH e cortisol. Contudo, apenas o Cortisol foi elevado mais para sessão HH comparado com a sessão LH. Consequentemente, apenas o cortisol teve sua concentração diferentemente alterada nas células musculares, estando mais aumentado também após a sessão HH. A ausência de elevação na célula muscular de hormônios androgênicos foi suportada pela ausência de mudança na expressão gênica das enzimas esteroidogênicas como a 5α redutase e a 17β Hidroxiesteróide Desidrogenase. Interessantemente, a expressão gênica da miostatina e da miogenina aumentaram aproximadamente nove e quatro vezes, respectivamente, 72 horas após as sessões de EF. Por fim, possivelmente afetados pelos níveis de cortisol elevado na célula muscular, que pode ter favorecido um expressivo aumento de expressão gênica da miostatina, a quantidade de CS e consequentemente de mionúcleos não sofreram nenhum efeito das sessões de EF. Essa ausência de modulação da quantidade de CS ocorreu mesmo com o aumento da expressão da miogenina que poderia ter favorecido um processo de diferenciação das CS. Assim, é possível sugerir que quando o hormônio é elevado agudamente no sangue de forma expressiva como o cortisol, o mesmo afetará sua concentração na célula muscular. Esse aumento da concentração hormonal no músculo pode regular a atividade das CS, já que não foi observada a esperada mudança na quantidade de CS nas células musculares após as sessões de EF.

Palavras chave: músculo esquelético; andrógenos, cortisol, miostatina, mionúcleo.

ABSTRACT

Vechin, Felipe Cassaro. **Effects of RE-induced acute systemic hormonal concentration changes on local hormonal concentration and satellite cell content in trained individuals.** 2019. 65p. Thesis (Doctor in Science) – Scholl of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo. 2019.

Hormones such as testosterone, dehydroepiandrosterone (DHEA), cortisol and growth hormone (GH), as well as growth factors such as insulin-like growth factor (IGF-1) are acutely released into the blood after resistance exercise (RE). These hormones are related to the regulation of physiological processes in skeletal muscle cells. Recently, researchers have shown the presence of steroidogenic enzymes, responsible for metabolizing cholesterol in different steroid hormones, inside the muscle cell. This metabolization would enable muscle cells to regulate intramuscular hormone concentration. This intramuscular modulation may affect different physiological processes in these cells, such as satellite cell activity (SC). However, the role of acute RE-induced changes in serum hormone concentrations in regulating intracellular hormonal concentrations in muscle cells and, consequently, activity of SC is yet unknown in humans. To investigate this phenomenon, resistance-trained individuals underwent two different RE sessions to differently modulate serum hormonal responses. One session (HH) should significantly elevate serum concentrations of total and free testosterone, DHEA, cortisol, GH, and IGF-1, while the other session should not induce expressive elevations in these hormones (LH). Trained individuals were chosen because muscle cells are less impacted by RE as these individuals are more accustomed to RE. This design allows relating systemic and local hormonal modulation with possible modulations on SC activity. RE sessions were effective in acutely modulating the serum concentration of total testosterone, DHEA, GH, and cortisol. However, only cortisol was significantly raised for HH compared to LH. Consequently, only cortisol had its concentration differently modulated in muscle cells, being higher also after the HH session. The lack of elevations in muscle cell androgenic hormones was supported by the absence of changes in the steroidogenic enzymes gene expression such as 5 α reductase and 17 β Hydroxysteroid Dehydrogenase. Interestingly, myostatin and myogenin gene expression increased approximately nine and four times, respectively, 72 hours after the RE sessions. Finally, high cortisol levels in the muscle cell may have favored an expressive increase in myostatin gene expression, did not induce the expected changes in SC activity. This lack of modulation in the amount of SC and myonuclear content occurred regardless of the increase in myogenin expression, which could have favored the SC differentiation. Therefore, it is possible to suggest that when systemic hormones are expressively elevated like cortisol, there is a parallel increase in hormonal concentration in the muscle cell. The increase in muscle cell hormone concentration may have regulated the SC activity based as we did not observe the expected changes in the SC content after the RE sessions.

Key Words: skeletal muscle, androgens, cortisol, miostatin, myonuclei

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Resposta hormonal aguda ao exercício de força.....	15
3.1.1 Resposta hormonal sistêmica.....	15
3.1.2 Resposta hormonal local: Intracrinologia.....	18
3.2 Influência do exercício de força na modulação aguda das células satélites	20
3.2.1 Fatores moduladores da atividade das células satélites.....	23
3.2.1.1 Tensão mecânica, inflamação e estresse metabólico	23
3.2.2.2 Respostas hormonais	25
4. MÉTODOS.....	30
4.1 Voluntários	30
4.2 Desenho experimental	30
4.3 Controle Alimentar	31
4.4 Sessões de exercício de força	32
4.5 Análise Hormonal	32
4.6 Biópsia muscular.....	33
4.7 Análise hormonal na célula muscular	33
4.8 Análise da expressão gênica:	34
4.8.1 - Extração do RNA.....	34
4.8.2 - Transcrição reversa	34
4.8.3 - PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	35
4.9 Tipagem das fibras musculares.....	36
4.10 Células satélites.....	37
4.11 Análise Estatística	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Volume total dos exercícios	39
5.2 Resposta hormonal sistêmica.....	39
5.3 Resposta hormonal no tecido muscular.....	40
5.4 Expressão gênica.....	41
5.5 Conteúdo de células satélites e mionúcleos por tipo de fibra.....	42
6. DISCUSSÃO	43
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	50
8. REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

Classicamente, os exercícios de força (EF) para grandes grupos musculares, realizados com intensidade e volume elevados e com pausas de 30 a 90 segundos entre as séries de exercícios, promovem um aumento transitório na concentração sanguínea de hormônios esteroides como a testosterona e o cortisol, do hormônio do crescimento e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (SMILIOS *et al.*, 2003; AHTIAINEN *et al.*, 2004; AHTIAINEN *et al.*, 2005; KRAEMER e RATAMESS, 2005; LINNAMO *et al.*, 2005; SMILIOS *et al.*, 2007; WEST *et al.*, 2010; RONNESTAD, NYGAARD e RAASTAD, 2011; MANGINE *et al.*, 2017). O aumento transitório da concentração sérica desses hormônios foi por bastante tempo relacionado com as adaptações promovidas pelo treinamento de força (TF), sobretudo com o aumento da massa muscular esquelética (hipertrofia muscular) (AHTIAINEN *et al.*, 2005; KRAEMER e RATAMESS, 2005; VELLOSO, 2008; RONNESTAD, NYGAARD e RAASTAD, 2011; MANGINE *et al.*, 2017). Pesquisadores e profissionais do TF sustentavam essa relação pelo fato de que protocolos de TF que buscavam maximizar a hipertrofia muscular também apresentavam maiores elevações agudas na concentração sérica desses hormônios. Entretanto, nos últimos anos, o trabalho seminal do grupo do professor Stuart Phillips (WEST *et al.*, 2009; WEST *et al.*, 2010) e outros trabalhos (WILKINSON *et al.*, 2006; WEST e PHILLIPS, 2012; MITCHELL *et al.*, 2013; MORTON *et al.*, 2016) refutaram a relação entre o aumento agudo da concentração sérica de hormônios esteroides e a hipertrofia muscular em indivíduos destreinados. Protocolos de TF desenvolvidos para induzir uma baixa e uma alta resposta hormonal sérica após EF produziram aumentos semelhantes tanto na taxa de síntese proteica como na adaptação hipertrófica após o período de treinamento (WEST *et al.*, 2009; WEST *et al.*, 2010). Em conjunto, essas evidências sugeriram que, para indivíduos sem experiência previa em TF, o aumento agudo da concentração sérica de hormônios esteroides, peptídicos e de fatores de crescimento não é determinante para a hipertrofia muscular.

Interessantemente, indivíduos treinados em força apresentam essa resposta hormonal aguda ao exercício de força preservada, apesar dos dados serem relativamente escassos nessa população (AHTIAINEN *et al.*, 2003; SMILIOS *et al.*, 2003; AHTIAINEN *et al.*, 2004; MANGINE *et al.*, 2017). Nesses indivíduos algumas

alterações fisiológicas agudas após o exercício de força (i.e. dano muscular e a consequente inflamação), que não tem relação direta com a hipertrofia muscular (DAMAS *et al.*, 2016), mas que ativam vias de regulação de funções celulares semelhantes (i.e.via AKt,mTOR), são atenuadas. Corroborando com as atenuações de processos fisiológicos após cada sessão de EF, a expressão gênica global é menos afetada por uma sessão de EF em indivíduos treinados (GORDON *et al.*, 2012; DAMAS *et al.*, 2018b). Apesar da menor quantidade de genes com a expressão alterada pelo EF, a expressão de genes reguladores de processos relacionados à hipertrofia muscular continua sendo alterada significativamente após as sessões de EF nos indivíduos com experiência em TF (DAMAS *et al.*, 2018b). Em conjunto, esses dados sugerem que indivíduos treinados têm um menor número de processos fisiológicos e moleculares alterados após sessões de EF ocorrendo simultaneamente. Isso faz com que esses indivíduos sejam experimentalmente importantes para entender os possíveis papéis da modulação hormonal sistêmica aguda nos processos relacionados à hipertrofia. Isso se deve ao fato de que 1) há uma especialização do programa gênico para hipertrofia muscular (DAMAS *et al.*, 2018b), 2) a modulação hormonal sistêmica aguda permanece ocorrendo em indivíduos treinados em força, e 3) processos fisiológicos, modulados agudamente pelo EF e que poderiam afetar a regulação hipertrofica, estão atenuados (i.e. dano e inflamação induzida pelo dano). Em conjunto, essas condições permitem isolar de maneira mais efetiva (i.e. diminuindo a influência de variáveis intervenientes e, conseqüentemente, a variabilidade das respostas) o efeito da modulação hormonal sistêmica aguda em processos moduladores da hipertrofia muscular.

Apesar de diversos autores sugerirem uma relação entre a modulação das respostas hormonais sistêmicas agudas com a hipertrofia muscular induzida pelo EF, evidências indicam que essas relações são mais influenciadas por fatores intracelulares (locais) do que sistêmicos (MITCHELL *et al.*, 2013; MOBLEY *et al.*, 2018; MORTON *et al.*, 2018b), como descrito acima. Nesse sentido, há evidências de que o TF aumenta a concentração intracelular de hormônios esteroides e de suas respectivas enzimas esteroidogênicas (SATO *et al.*, 2014). As diferentes enzimas esteroidogênicas estão envolvidas na metabolização do colesterol nos diferentes hormônios esteroides como a testosterona e da di-hidrotestosterona (DHT), bem como na conversão de um esteroide em outro como de desidroepiandrosterona (DHEA) em testosterona e da testosterona em

DHT (LABRIE, 1991; SATO e IEMITSU, 2015). Frente ao exposto, é possível que alterações sistêmicas de hormônios esteroides como a testosterona, o DHEA e o cortisol afetem os níveis locais de hormônios esteroides. A modulação local desses hormônios poderia então afetar diretamente os processos intracelulares que regulam o aumento da massa muscular, e não são atenuados pelo nível de treinamento, como a atividade das CS que se mostra preservada em indivíduos treinados após sessões de EF (NEDERVEEN *et al.*, 2017). As CSs são células tronco musculares, mononucleares, precursoras das células musculares, localizadas entre o sarcolema e a lamina basal, que quando ativadas, se proliferam, diferenciam e se fundem às células musculares doando seus núcleos às mesmas (MAURO, 1961; MUIR, KANJI e ALLBROOK, 1965; HAWKE e GARRY, 2001). O principal papel das CS é o de auxiliar no reparo dos microtraumas no músculo (i.e. dano muscular induzido pelo exercício) causados por um exercício desacostumado ou por ações musculares excêntricas (CRAMERI *et al.*, 2004; O'REILLY *et al.*, 2008; DAMAS *et al.*, 2016). Contudo, ainda que a resposta das CS esteja bem descrita e o dano muscular aparentemente seja um dos principais moduladores da ativação e proliferação das CS, aumentos importantes na atividade das mesmas continuam sendo observados em indivíduos treinados. Porém, indivíduos treinados apresentam uma atenuação do dano muscular e, consequente, da resposta inflamatória decorrente do dano. Assim, as CSs parecem responder a outros estímulos induzidos pelo EF, como o aumento nos níveis de hormônios sistêmicos e fatores de crescimento (SINHA-HIKIM *et al.*, 2003). Já é sabido que hormônios esteroides androgênicos, como a testosterona, podem interagir diretamente com as CS, uma vez que as mesmas apresentam receptores androgênicos (CHEN, ZAJAC e MACLEAN, 2005; DUBOIS *et al.*, 2014). Já o Cortisol parece agir indiretamente na atividade das CS estimulando a produção de Miostatina, um contraregulador da atividade das CS (LANGLEY *et al.*, 2002; ALLEN e LOH, 2011). Contudo, a testosterona pode indiretamente reduzir o efeito do Cortisol nas CS uma vez que esses hormônios competem por receptores de glicocorticoides, diminuindo a quantidade de Cortisol que atuará na modulação da atividade das CS. Hormônios androgênicos proteicos, como o GH, podem potencialmente agir indiretamente na modulação das CS via aumento da síntese de fatores de crescimento mecânico (i.e. IGF-1 e MGF) (IMANAKA *et al.*, 2008; MCKAY *et al.*, 2008; APERGHIS *et al.*, 2009; GRUBB *et al.*, 2014).

Uma vez que indivíduos treinados em força têm um menor número de processos fisiológicos e moleculares alterados após sessões de EF, essa população parece a mais adequada para testar a hipótese de que o efeito da resposta hormonal aguda sistêmica induzida pelo TF modulará o nível local desses hormônios. E, adicionalmente, uma vez que a resposta aguda module as respostas locais dos hormônios, será possível testar a hipótese de que as modulações da resposta hormonal nas células musculares também podem afetar a atividade das CS, outro processo fisiológico preservado em indivíduos treinados que parece ter relação com a hipertrofia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da modulação aguda dos níveis sistêmicos de testosterona total e livre, DHEA, GH, e cortisol, promovidos por uma sessão de exercício de força, na modulação dos níveis locais (i.e. fibras musculares) desses hormônios e de algumas enzimas esteroidogênicas na possível regulação da ativação, proliferação e diferenciação das células satélites em indivíduos treinados em força.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Resposta hormonal aguda ao exercício de força

3.1.1 Resposta hormonal sistêmica

Classicamente, os exercícios de força que envolvem grandes grupos musculares, quando realizados com intensidade e volume elevados, e com pausas de 30 a 90 segundos entre as séries de exercícios, promovem um aumento transitório na secreção de hormônios (SMILIOS *et al.*, 2003; AHTIAINEN *et al.*, 2004; AHTIAINEN *et al.*, 2005; KRAEMER e RATAMESS, 2005; LINNAMO *et al.*, 2005; SMILIOS *et al.*, 2007; WEST *et al.*, 2010; RONNESTAD, NYGAARD e RAASTAD, 2011; MANGINE *et al.*, 2017). Esses hormônios são, didaticamente, separados em três categorias de acordo com suas estruturas bioquímicas: I) hormônios esteroides (i.e androgênicos: testosterona e dehidroepiandrosterona - DHEA); glicocorticoide: (Cortisol) (VINGREN *et al.*, 2010; BRAUN e MARKS, 2015), II) hormônios

compostos por aminoácidos (i.e Adrenalina e noradrenalina) e III) hormônios peptídicos (i.e hormônio do crescimento [GH] e fator de crescimento insulínico [IGF-1]) (VELLOSO, 2008). Dependendo da estrutura do hormônio, o mesmo atuará de diferentes formas nas células alvo. Especificamente, hormônios esteroides androgênicos permeiam a membrana celular e se ligam aos receptores androgênicos no sarcoplasma sendo assim transportados para o núcleo e exercendo sua ação local (VINGREN *et al.*, 2010). Transporte e ação similares acontecem com o cortisol que, através dos receptores de glicocorticoide, é transportado para o interior dos núcleos (BRAUN e MARKS, 2015). Por outro lado, hormônios peptídicos como o GH, ao invés de agirem no sarcoplasma, ativam uma cascata de eventos via receptores desse hormônio na membrana celular que culminará em suas ações finais (BIRZNIECE, SATA e HO, 2009; HOFFMAN *et al.*, 2009). Além disso, outra ação do GH é estimular a produção de IGF-1 no fígado e no músculo esquelético (IMANAKA *et al.*, 2008; APERGHIS *et al.*, 2009), favorecendo assim a elevação dos níveis de IGF-1 e MGF (*mechano growth factor*; fator de crescimento mecânico), uma isoforma do IGF expressa na musculatura esquelética, logo com uma ação mais direta nas modulações de processos celulares (YANG e GOLDSPINK, 2002). Dessa forma, com diferentes tipos de hormônio agindo na célula muscular por diferentes vias moleculares e em diferentes processos celulares ao mesmo tempo, fica claro que a ação endócrina de hormônios, modulados transitória e agudamente após o exercício de força, pode ser complexa e possivelmente sinérgica.

Corroborando com essa ideia de complexidade e sinergismo da ação endócrina, Kraemer et al. (1990) evidenciaram uma elevação aguda de diferentes hormônios com estruturas e ações distintas nas células musculares, após sessão de exercícios de força. Apesar dos autores terem testado o efeito de diferentes organizações da sessão de exercícios (i.e diferentes pausas, cargas e trabalho total) a sessão de exercícios com maior volume e intensidade associada à pausas curtas (60 segundos) produziu aumentos nos níveis de testosterona, GH e IGF-1. Para testosterona, os valores de área sobre a curva de todos os pontos analisados (0, 5, 15, 30 60, 90 e 120 min. após o exercício) apresentou sua maior elevação, ≈ 400 nmol/L, no protocolo de elevada intensidade com volume moderado e pausa curta (5RM com 1 min. de pausa), mas também foi elevado, ≈ 180 nmol/L, sem diferença entre as situações, no protocolo de moderada intensidade com maior volume e pausa curta (10RM com 1 min. de pausa). Como esperado o GH apresentou sua maior elevação, $\approx 800\mu\text{g/L}$, no protocolo de moderada intensidade com

maior volume e pausa curta (10RM com 1 min. de pausa). Essa elevação do GH foi maior comparado com todas as demais situações. Para o IGF-1, o maior aumento na sua concentração, $\approx 500\text{nmol/L}$, aconteceu após o protocolo de intensidade moderada com maior volume e pausas longas (10RM com 3 min. de pausa). Esse foi um dos trabalhos pioneiros na área de resposta hormonal ao TF, servindo de base para inúmeros trabalhos que vieram na sequência. Com o avançar das pesquisas na área do treinamento de força e resposta endócrina aguda, inúmeros estudos em indivíduos destreinados confirmaram a efetividade de exercícios de força em elevar os hormônios em questão, bem como outros como o DHEA, principalmente quando os mesmos são realizados com altos volumes e intensidades, porém com pausas curtas (KRAEMER *et al.*, 1990; KRAEMER e RATAMESS, 2005; SPIERING *et al.*, 2008; WEST *et al.*, 2010; RONNESTAD, NYGAARD e RAASTAD, 2011). Como visto até o presente momento, a resposta hormonal aguda induzida pelo EF está bem estabelecida em indivíduos destreinados. Em indivíduos treinados e/ou bem treinados em força essa resposta aguda parece ser preservada, apesar dos dados serem relativamente escassos nessa população. Um estudo clássico de ATHIAINEM *et al.* (2003) investigou as respostas hormonais agudas e crônicas (após 21 semanas de treino) induzidas pelo EF em indivíduos destreinados e previamente treinados. Agudamente, os hormônios em questão aumentaram para ambos os grupos após uma sessão de EF, antes e após as 21 semanas de treino. Além disso, Smilios *et al.* (2003) ao modular as sessões de EF, aumentando número de séries e repetições modularam diferentemente também a resposta hormonal sérica agudamente. Dessa forma, esses achados, junto com outras investigações da resposta endócrina aguda ao exercício de força em indivíduos treinados evidenciam uma manutenção dessa resposta aguda mesmo em indivíduos altamente treinados e parece possível modular essas respostas modulando a sessão de EF.

Uma vez que alterações fisiológicas agudas após o exercício de força como o dano muscular e a consequente inflamação são atenuadas com o aumento do nível de treinamento dos indivíduos, enquanto outras respostas, como o aumento agudo de hormônios sistêmicos, pode continuar ocorrendo, investigar as ações desses hormônios no tecido muscular esquelético parece fundamental para melhor compreender o possível papel desses hormônios na plasticidade do músculo esquelético. Para isso, uma nova área de investigação, chamada intracrinologia, vem estudando a modulação hormonal em células alvo, como o músculo esquelético, em diferentes condições fisiológicas,

entre elas, em resposta ao exercício físico (LABRIE, 1991; SATO *et al.*, 2014; SATO e IEMITSU, 2015).

3.1.2 Resposta hormonal local: Intracrinologia

O termo intracrinologia foi proposto por Labrie e seu grupo ainda nos anos 80 (LABRIE, BELANGER e LABRIE, 1988) e mais bem descrito por ele no começo da década de 1990 (LABRIE, 1991). O termo intracrinologia denomina um processo de síntese de hormônios esteroides em tecidos periféricos (ex: célula muscular), e que têm ação local (Figura 1). Essa proposição veio de investigações de Labrie *et al.* (1980) em homens com câncer de próstata, que tiveram o hormônio liberador de gonadotrofina inibido. O hormônio liberador de gonadotrofina é responsável pela sinalização da secreção do hormônio luteinizante que age estimulando a produção de esteroides nas gônadas, no caso dos homens, nos testículos. Mesmo com a inibição do hormônio liberador de gonadotrofina, os indivíduos homens do estudo citado apresentavam a existência de hormônios esteroides na próstata, evidenciando uma produção independente dos testículos. A existência de esteroides em tecidos periféricos, como a próstata e o músculo esquelético, mesmo após a inibição do hormônio liberador de gonadotrofina, ocorre em função de enzimas esteroidogênicas presentes nesses tecidos. Essas enzimas são capazes de converter, dentro da célula, esteroides como o DHEA e o DHEA-S, sintetizados pelas glândulas adrenais e precursores da testosterona, em outros hormônios esteroides como a própria testosterona (Labrie *et al.* 1991).

Figura 1: Adaptado de Labrie 1991. Tipos de sinalizações celulares.

Uma vez que o DHEA pode ser convertido dentro da célula muscular em outros hormônios androgênicos como a testosterona e o DHT, espera-se que esses hormônios androgênicos tenham seus níveis celulares aumentados quando hormônios androgênicos

sistêmicos sofrem alguma modulação. Uma vez que hormônios esteroides estão elevados sistemicamente após exercícios de força, é plausível esperar que os níveis locais de hormônios esteroides como a testosterona e o DHT também estejam aumentados. Isso por que esses hormônios permeiam a membrana celular passando para o interior da célula muscular, além de poderem ser sintetizados no interior das células musculares.

A modulação da concentração de hormônios androgênicos como a testosterona e o DHT e das enzimas esteroidogênicas, repensáveis pela metabolização desses hormônios no interior da célula muscular, após o exercício, já foi evidenciada em modelo animal. Aizawa et al. (2010) submeteram ratos a 30 minutos de corrida em esteira com velocidade de 30 m/min. Imediatamente após o exercício, os ratos foram anestesiados e o gastrocnêmio foi removido para análise o mais rápido possível. Os animais apresentaram níveis elevados de hormônios androgênicos como DHEA, testosterona e DHT bem como da enzima esteroidogênica 5- β reductase e de receptores androgênicos após o exercício. Esses resultados sugerem que mecanismos locais de produção de hormônios estejam presentes na célula muscular, e sejam afetados por exercício agudo. Entretanto a resposta intracrina aguda desses hormônios ainda não é bem conhecida em humanos após uma sessão de treinamento de força.

Uma vez que o músculo parece secretar hormônios androgênicos e aumentar o conteúdo de enzimas esteroidogênicas após exercício aeróbio em ratos, é razoável levantar a hipótese de que em humanos essa secreção também seja possível após o exercício, e que o exercício de força tem potencial para modular esses hormônios e enzimas, uma vez que já está bem estabelecido o aumento sistêmico de hormônios esteroides após exercícios de força. Apesar de a presente hipótese parecer plausível, apenas um estudo em humanos investigou as alterações de hormônios esteroides na célula muscular até o presente momento. Vingren et al. (2008) submeteram indivíduos bem treinados em força a uma sessão de EF de alta intensidade composto por seis séries de 10 repetições a uma intensidade de 80% de 1RM no exercício agachamento, com dois minutos de pausa entre as séries. Os autores fizeram biopsias musculares no músculo vasto lateral antes do teste, 10 e 70 minutos após o teste. Não foram observados aumentos significantes da testosterona e das enzimas esteroidogênicas no tecido muscular após o EF. Vingren et al. (2008) sugerem com esses achados que

indivíduos bem treinados em força não apresentam modulações intracelulares de testosterona bem como das enzimas esteroidogênicas, e que esses achados devem ser restritos a estudos com animais. Contudo, uma vez que a elevação sistêmica aguda da testosterona atinge seu pico por volta de 15 min. após o exercício, retornando aos seus níveis basais 30 min. após o exercício, o tempo exato no qual os níveis de hormônios e da expressão proteica das enzimas estavam aumentados significativamente pode ter sido perdido. Isso por que as biopsias foram feitas 10 e 70 min. após o exercício, sendo 10 min. possivelmente cedo para identificar alterações significantes e 70 min. possivelmente tarde para isso. Além disso, o protocolo de teste agudo escolhido pelos autores é geralmente aplicado em indivíduos destreinados (seis séries de 10 repetições a uma intensidade de 80% de 1RM), e em indivíduos treinados esse teste pode não ter causado o estresse necessário para produzir elevações hormonais sistêmicas importantes, capazes de modular os níveis musculares de testosterona e das enzimas esteroidogênicas.

Apesar de o estudo descrito anteriormente não ter evidenciado elevações locais agudas após exercícios de força tanto dos hormônios esteroides quanto das respectivas enzimas esteroidogênicas na célula muscular, sugerindo que essa resposta seria restrita aos animais, SATO et al. (2014) submeteram indivíduos idosos a 12 semanas de TF. Os autores observaram, após 12 semanas de treino aumentos no nível intracelular basal de hormônios como DHEA, testosterona livre e DHT e das enzimas esteroidogênicas (ex: 3-HSD; 17-HSD). Considerando que o TF foi capaz de modular esse mecanismo de secreção de hormônios androgênicos na célula muscular, aumentando o nível dos hormônios e enzimas em idosos nessas células, parece razoável sugerir que um estímulo suficiente de exercício de força pode modular esse mecanismo no músculo esquelético de humanos. Assim, novas investigações que modulem agudamente as concentrações hormonais séricas e avaliem a resposta dos hormônios e das enzimas esteroidogênicas na musculatura em função da mudança sérica se justificam para entender os efeitos do exercício de força na modulação dos níveis de hormônios androgênicos e enzimas esteroidogênicas, em indivíduos treinados.

3.2 Influência do exercício de força na modulação aguda das células satélites

Como citado anteriormente, células satélites (CS) são células tronco musculares, mononucleares, precursoras das células musculares, localizadas entre o sarcolema e a

lamina basal, em estado quiescente e, quando ativadas, se proliferam, diferenciam e se fundem às células musculares doando seus núcleos às mesmas (MAURO, 1961; MUIR, KANJI e ALLBROOK, 1965; HAWKE e GARRY, 2001). É importante destacar que as CS são arquétipos de células-tronco, uma vez que, apesar de terem capacidade de se dividirem, elas parecem apenas poder se diferenciar em mioblastos, e não em outros tipos de células, característica básica das células-tronco (ZAMMIT e BEAUCHAMP, 2001). O principal papel das CS é o de auxiliar no reparo dos microtraumas no músculo (i.e. dano muscular induzido pelo exercício) causados por um exercício desacostumado ou por ações musculares excêntricas (CRAMERI *et al.*, 2004; O'REILLY *et al.*, 2008; DAMAS *et al.*, 2016). Em resposta a esses microtraumas, as CS são ativadas, deixando o estado quiescente, para entrar em processo de divisão celular podendo se diferenciar e doar seus núcleos para regeneração da área lesada (CICILIOT e SCHIAFFINO, 2010). Para demonstrar o papel do dano muscular na ativação das CS musculares, O'Reilly *et al.* (2008) submeteram homens jovens não treinados em força a 300 ações excêntricas máximas com intuito de gerar elevado grau de dano muscular. Consequentemente, 24 horas após a sessão de exercício, a quantidade de CS se encontrava significativamente elevada em comparação à condição pré-exercício, atingindo seus maiores níveis entre 24 e 72 horas (aumentos de 138 %, 148% e 119% respectivamente 24h, 48h e 72h após o exercício) e permanecendo elevada por até 120 horas após o exercício. Corroborando com esses achados, Crameri *et al.* (2007) demonstrou um dano muscular acentuado oito dias após a realização de 210 ações excêntricas máximas e um aumento de 196% na quantidade de CS 96 horas após o exercício.

Apesar de o dano muscular induzir a ativação e proliferação das CS, os estudos supracitados utilizaram protocolos de exercício que não mimetizam os protocolos de treinamento de força normalmente utilizados. Nesse sentido, inúmeros estudos testaram protocolos menos estressantes, ou seja, que induzem um dano muscular menor, mas que são utilizados na prática do treinamento de força, e encontraram um aumento significativo na atividade e na quantidade das CS (KADI *et al.*, 2004a; KADI *et al.*, 2004b; MCKAY *et al.*, 2008; PETRELLA *et al.*, 2008; BELLAMY *et al.*, 2014). Um estudo muito bem conduzido que evidencia a modulação da quantidade de CS após exercícios de força frequentemente utilizados é o de Bellamy *et al.* (2014). Os autores investigaram o efeito da realização de quatro exercícios de força para membros inferiores com quatro séries de oito repetições cada um (leg press, cadeira extensora,

cadeira flexora e extensão plantar do tornozelo) na modulação da quantidade de CS após os exercícios nos tipos de fibra específicos. Setenta e duas horas após a sessão de exercício, a quantidade de células satélites aumentou 22% nas fibras do tipo I e 34% nas fibras tipo II. Evidentemente, o protocolo utilizado por Bellamy et al. (2014) produziu um dano muscular menos severo que protocolos realizados com um número elevado de ações excêntricas máximas, e a elevação das CS foi menor nesse estudo do que nos estudos citados anteriormente ($\approx 31\%$ x $\approx 148\%$), refletindo uma resposta biológica mais próxima à normalmente esperada em praticantes de TF.

Ainda que a resposta das CS esteja bem descrita e o dano muscular aparentemente seja um dos principais moduladores da ativação e proliferação das CS, elas parecem responder a outros estímulos, como o aumento nos níveis de hormônios sistêmicos e fatores de crescimento (SINHA-HIKIM *et al.*, 2003). Essa última afirmação, a respeito da ocorrência de outros fenômenos fisiológicos modulando as CS, se dá pelo fato de que o dano muscular após poucas sessões de exercício é fortemente atenuado, fenômeno conhecido como efeito da carga repetida (MCHUGH, 2003). Uma vez que o dano é atenuado em sessões subsequentes de exercício de força, seria esperado que as CS não fossem mais expressivamente ativadas e, conseqüentemente, não tivessem seu conteúdo aumentado. Entretanto, indivíduos treinados em força, que não apresentam dano muscular significativo após sessões de exercício de força, continuam apresentando modulação das CS e aumento do seu conteúdo (JOANISSE *et al.*, 2015; NEDERVEEN *et al.*, 2017), evidenciando que outros fatores podem contribuir para a modulação das CS.

Nederveen et al. (2017) mostraram que indivíduos jovens treinados em força (16 semanas de treino), apresentavam um aumento de aproximadamente 30% na quantidade de CS após a realização de uma sessão de exercício de força. Além do aumento na quantidade de CS após a sessão de exercícios de força, os indivíduos treinados apresentaram também uma maior ativação das CS quando comparados com o momento destreinado (35% vs. 55%, respectivamente), ou seja, um maior nível de treinamento pode levar a uma maior ativação das CS após exercício de força. Contudo, vale ressaltar que os dados do nosso grupo (DAMAS *et al.*, 2018a) não corroboram com um maior aumento na quantidade de CS no momento treinado, pois não observamos alterações na CS 48h após a vigésima sessão de treinamento de força. Finalmente,

considerando as informações dos estudos supracitados, com o avançar do nível de treinamento, quando o dano muscular é atenuado, parece que as CS continuam sendo ativadas, porém agora com uma função mais relacionada, possivelmente, ao acréscimo de novos mionúcleos as fibras musculares, favorecendo a hipertrofia muscular, contudo essas respostas ainda são contraditórias.

3.2.1 Fatores moduladores da atividade das células satélites

3.2.1.1 Tensão mecânica, inflamação e estresse metabólico

Resumidamente, junto a um estresse mecanismo imposto à musculatura, estímulos nervosos, denominados potencial de ação, percorrem a musculatura e promovem alterações físico-químicas nas células musculares (TIDBALL, 2005). Essas alterações físico-químicas como, por exemplo, a mudança da conformação das cabeças das miosinas e o influxo de cálcio no meio intracelular, ativam cascatas de eventos que promovem mudanças no perfil de expressão de genes relacionados ao crescimento celular, ativação de vias moleculares que iniciam a tradução proteica, inibição de vias relacionadas com a degradação de proteínas e a ativação das células satélites musculares (TIDBALL, 2005; TOIGO e BOUTELLIER, 2006). Adicionalmente, é fato que uma redução abrupta na tensão mecânica, a qual a célula muscular é normalmente exposta, leva ao aumento do catabolismo proteico e, conseqüentemente, a um processo de atrofia muscular, já bem documentado em astronautas e pessoas que tiveram membros imobilizados (FITTS, RILEY e WIDRICK, 2000; TAKARADA, TAKAZAWA e ISHII, 2000). Essas evidências apontam para a importância da tensão mecânica na manutenção da massa muscular esquelética. Assim, apesar de não ser possível estabelecer precisamente os mecanismos pelos quais a tensão mecânica leva ao crescimento ou à atrofia muscular, alguns indícios mostram a sua capacidade de modular as CS. Como já discutido acima, a musculatura quando submetida a um elevado número de ações excêntricas máximas apresenta um dano muscular exacerbado o que resulta numa potente elevação da atividade e da quantidade das CS (CRAMERI *et al.*, 2004; O'REILLY *et al.*, 2008).

O principal fenômeno induzido pela tensão muscular que se acredita modular as CS é o dano muscular. Contudo, apesar do dano ser considerado o fator primário para modulação das CS, a inflamação decorrente do mesmo parece ser a principal

responsável por modular as CS (HAWKE e GARRY, 2001; PAULSEN *et al.*, 2012). Na ocorrência de dano muscular, o tecido é permeado por fatores inflamatórios que auxiliam na sua recuperação. Esses fatores são compostos por citocinas pró e anti-inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 15 (IL-15) que atuam, respectivamente, na ativação/proliferação e diferenciação das CS (Vierk 2000). Contudo, como o dano muscular e a consequente resposta inflamatória promovida pelo exercício de força ocorrem de maneira mais ou menos simultânea, não é possível determinar qual fenômeno mais influencia a modulação das CS em humanos (PAULSEN *et al.*, 2012). Apesar da dificuldade de se isolar o fenômeno dano muscular/inflamação após o exercício de força, é sabido que o dano muscular, e consequentemente respostas inflamatórias sistêmicas, é atenuado após as primeiras sessões de TF, enquanto que as CSs continuam, possivelmente, sendo moduladas após sessão de exercício de força. A atenuação do dano muscular bem como da resposta inflamatória sistêmica no decorrer do TF, com concomitante modulação das CS após esse exercício, evidenciam que essas células são reguladas por outros fatores que não só o dano muscular e o processo inflamatório.

Junto dessas alterações que acontecem em função da tensão mecânica, alterações de caráter metabólico ocorrem devido à utilização de energia pela célula muscular para a sua contração (SCHOENFELD, 2013). Essas alterações metabólicas também provocam os ajustes supracitados como mudança na expressão gênica da célula muscular e em vias moleculares (DRUMMOND *et al.*, 2008; FRY *et al.*, 2010). Apesar de não ser claro um possível papel do estresse metabólico sobre a modulação das CS, o estresse metabólico parece um potente modulador das respostas hormonais agudas após uma sessão de exercícios, principalmente do GH. Um trabalho clássico de Goto et al. (2005) demonstrou que um maior estresse metabólico sistêmico, determinado pelo nível de lactato sanguíneo após sessão de exercício, promoveu maiores elevações séricas do GH, comparado com o grupo que teve menor estresse metabólico sistêmico. Resposta similar foi obtida por Takarada et al. (2000), que ao submeter indivíduos a um treino de força de baixa intensidade, associado à restrição parcial do fluxo sanguíneo, observou aumentos significantes nos níveis de lactato e de GH após a sessão de exercício. Apesar da medida de lactato sanguíneo não ser um bom marcador de estresse metabólico quando usada isoladamente, trabalhos subsequentes avaliaram o estresse metabólico, provocado pelo treino de força de baixa intensidade associado à restrição parcial do

fluxo sanguíneo e mostraram um estresse metabólico local, pela quantidade de fosfato inorgânico e pelos valores de pH intramuscular, elevados e diminuídos, respectivamente, após sessão de exercício (SUGA *et al.*, 2012). Além disso, protocolos que elevam os níveis de testosterona e IGF, por exemplo, têm como característica elevado estresse mecânico e estresse metabólico (WEST *et al.*, 2010; RONNESTAD, NYGAARD e RAASTAD, 2011). Assim, junto com o estresse mecânico e a inflamação, o estresse metabólico pode regular a atividade das CS via modulação sistêmica de hormônios.

3.2.2.2 Respostas hormonais

Uma vez que o dano muscular e a inflamação sistêmica são atenuados com o processo de treinamento, outros fatores devem regular a atividade das CS após o exercício de força. Outra possível resposta fisiológica ao exercício de força que pode modular as CS são as respostas endócrinas. Isso se deve à ação direta ou indireta que hormônios androgênicos como a testosterona, o GH e o MGF podem exercer nas CS. Além disso, o cortisol, hormônio contrarregulador da síntese proteica e do crescimento muscular, pode atuar indiretamente na modulação da CS (LANGLEY *et al.*, 2002; SINHA-HIKIM *et al.*, 2003; CHEN, ZAJAC e MACLEAN, 2005; ALLEN e LOH, 2011; GRUBB *et al.*, 2014).

Considerando as ações diretas de hormônios nas CS, os hormônios androgênicos esteroides, como a testosterona, por exemplo, podem interagir diretamente com as CS, uma vez que as mesmas apresentam receptores androgênicos (CHEN, ZAJAC e MACLEAN, 2005; DUBOIS *et al.*, 2014). Já hormônios não esteroides, como o GH, podem potencialmente agir indiretamente nas CS via aumento dos níveis de fatores de crescimento (i.e. IGF-1 e MGF), que atuam diretamente na modulação das CS (IMANAKA *et al.*, 2008; MCKAY *et al.*, 2008; APERGHIS *et al.*, 2009; GRUBB *et al.*, 2014). Além disso, hormônios androgênicos podem indiretamente reduzir o efeito do Cortisol nas CS uma vez que esses hormônios competem pelos mesmos receptores de glicocorticoides, diminuindo a quantidade de Cortisol que será transportada para o núcleo e/ou para as CS. O Cortisol, potencialmente, pode agir indiretamente na atividade das CS aumentando os níveis de Miostatina, reconhecido inibidor da atividade dessas células (LANGLEY *et al.*, 2002; ALLEN e LOH, 2011). Contudo, é importante

destacar que a ação desses hormônios na atividade das CS foi evidenciada *in vitro* ou em modelos animais, sendo necessário buscar evidências desses efeitos em humanos, onde a secreção é concomitante, podendo todos os hormônios supracitados estarem elevados no sangue após uma sessão de TF, sendo suas ações possivelmente sinérgicas.

Objetivando evidenciar o papel dos hormônios androgênicos esteroides na modulação das CS em humanos, Sinha-Hikin et al. (2003) submeteram indivíduos jovens saudáveis a um tratamento com testosterona exógena. Os sujeitos foram divididos em três grupos que receberam distintas doses de testosterona semanais, via injeção intramuscular, de 150, 300 e 600 mg. Os sujeitos que receberam semanalmente as doses de 300 e 600 mg de testosterona apresentaram aumento na quantidade de CS e mionúcleos nas células musculares após 21 semanas. Interessante destacar que o aumento no conteúdo de CS e de núcleos na célula muscular foi proporcional à dose de testosterona administrada, sendo o dobro de aumento para os sujeitos que foram tratados com 600mg. Os aumentos nos níveis basais de testosterona induzidos pela administração de testosterona exógena mostraram um coeficiente de determinação de 29% e 28% para o aumento no conteúdo de CS e de mionúcleos respectivamente. Concomitante com o aumento na quantidade de CS e mionúcleo, os sujeitos que receberam 300 e 600 mg de testosterona apresentaram hipertrofia significativa das fibras musculares (respectivamente 18% e 43% nas fibras tipo II). Esses achados fornecem evidências de que a testosterona tem efeito sobre a modulação das CS e consequentemente na adição de mionúcleos à fibra muscular em humanos. O que não é possível ainda determinar é se o aumento da área das fibras, em indivíduos treinados e já com área das fibras elevadas, está relacionado com o aumento na quantidade de CS e núcleos e é facilitado por hormônios como a testosterona; ou se a testosterona é quem determina a elevação da quantidade de CS e núcleo, e consequentemente, o aumento da área das fibras. Até o momento, a primeira explicação parece ser a única possível. Contudo, teoricamente, a segunda explicação não deve ser totalmente excluída uma vez que a testosterona pode agir diretamente nas CS, o que possibilita a proliferação e diferenciação da mesma, aumentando a quantidade de núcleos. O aumento na quantidade de mionúcleos pode favorecer assim a síntese proteica, que parece estar elevada quando níveis elevados de testosterona exógena são encontrados (SINHA-HIKIM *et al.*, 2003; GUNDERSEN, 2016). É importante destacar ainda que o trabalho em questão modulou os níveis basais de testosterona de forma suprafisiológica, que

permaneciam elevados durante todo o dia, e essa elevação é que promoveu os efeitos nas CS e mionúcleos. A modulação hormonal aguda promovida por uma sessão de TF é transitória e volta aos seus níveis basais em aproximadamente 30 minutos, apesar de promover aumentos séricos similares aos promovidos pelo estudo de Sinha-Hikin et al. 2003. Assim, não se sabe ainda se esses estímulos agudos promovidos por sessões de TF também têm efeito na modulação das CS e consequentemente na quantidade de mionúcleos na célula muscular após um período de treino.

Apesar do papel da elevação aguda e transitória de hormônios androgênicos na modulação das CS não ser conhecido, há evidências da presença de receptores androgênicos nas CS, sugerindo que esses hormônios têm alguma função no funcionamento das CS (Chen et al. 2005). Outra evidência da ação dos hormônios nas CS foi obtida em um modelo experimental interessante. DUBOIS *et al.* (2014), usando ratos *knockouts* para receptores androgênicos nas CS, apresentou uma redução da massa muscular do músculo perineal desses ratos. Concomitantemente, os ratos sem receptores androgênicos nas CS apresentaram uma diminuição nos níveis de miostatina. Apesar de parecer contraditório a primeira vista, os dados evidenciam um papel dos receptores androgênicos na regulação da miostatina. A miostatina é um fator de transcrição que quando expresso parece inibir a hipertrofia muscular, logo, a diminuição dos seus níveis favorece o aumento da célula muscular (MATSAKAS *et al.*, 2009; JESPERSEN *et al.*, 2011). Esses achados sugerem que uma vez os receptores androgênicos estando ligados aos hormônios quando a oferta dos mesmos é elevada, a expressão da miostatina seria inibida, favorecendo a ação dos hormônios nas células e inibindo um fator contraregulador do crescimento muscular, respectivamente. Assim, a presença de receptores androgênicos nas CS, regulando a ação dos hormônios androgênicos e os níveis de miostatina nas mesmas, junto com a evidência trazida por Sinha-Hikin et al. (2003) sugerem a possível modulação da atividade das CS após elevações agudas de hormônios anabólicos promovidos por uma sessão de EF. Logo não só a testosterona pode afetar a modulação das CS, mas outros hormônios androgênicos esteroides como a deidroepiandrosterona (DHEA).

Além das CS apresentarem potencial para serem ativadas por hormônios androgênicos, como visto anteriormente, fatores de crescimento como o IGF-1 e IGF-1Ec (conhecido como fator de crescimento mecânico - MGF), parecem também capazes

de estimular as CS a entrar no ciclo celular, estando o MGF mais ligado à proliferação das CS e o IGF1 relacionado com a diferenciação e fusão das CS (YANG e GOLDSPINK, 2002). Ainda que em humanos isolar os fenômenos biológicos seja uma tarefa complexa e pouco provável, MCKAY *et al.* (2008) submeteram indivíduos jovens a um protocolo de exercício de força com 300 ações excêntricas, induzindo um aumento na quantidade de CS e dos fatores regulatórios miogênicos MyoD, Myf5 e MRF4, concomitante com aumentos na quantidade de expressão gênica de MGF e IGF-1. A novidade do presente estudo foi demonstrar que o curso temporal das elevações pós-exercício dos reguladores miogênicos, da expansão do *pool* de CS e da expressão gênica do IGF-1 e MGF coincidiam, apresentando coeficientes de determinação entre o aumento de MGF e o de Myf5 de $r^2 = 0.83$ ($P = 0.03$) e do IGF-1 com o MRF4 de $r^2 = 0.90$ ($P < 0.05$). Adicionalmente a expressão proteica de IGF-1 se colocou com as CS 24 e 72 horas após o exercício, resultados confirmados por Grubb *et al.* (2014), que também mostraram um aumento na colocalização do IGF-1 com as CS. Por limitações metodológicas, ainda não é possível identificar qual isoforma do IGF-1 se colocaliza com as CS, entretanto parece certo que o IGF-1 promove aumento na atividade das CS.

Além dos hormônios esteroides e do IGF-1 que podem atuar diretamente nas CS e tem seus papéis mais bem definidos nesse processo, hormônios como o GH e o Cortisol podem ter um papel indireto e secundário na modulação das CS, contudo, os achados nesse sentido ainda são escassos e controversos. Para evidenciar essas ações indiretas dos referidos hormônios, estudos *in vitro* e em animais mostram um papel do GH na regulação dos níveis de IGF-1 e do MGF, reguladores diretos das CS. Imanaka *et al.* (2008) usaram cultura de células C2C12 tratadas com GH para observar os efeitos desse hormônio na modulação dos níveis de IGF-1 e de MGF e reportaram elevações nos níveis de MGF e IGF-1 uma hora e quatro horas após o tratamento, respectivamente. Esses aumentos coincidiram com a elevação da expressão gênica de MyoD uma e seis horas após o tratamento. Uma vez que a expressão de MyoD é um marcador de proliferação de CS, esses achados apontam para um papel indireto do GH na atividade das CS. Por outro lado, quando a relação GH/IGF-1 foi estudada em humanos saudáveis (sem deficiências hormonais), Aperghis *et al.* (2009) mostraram que a administração exógena de GH apresentou uma tendência de aumentar os níveis de MGF, uma vez que os níveis basais de MGF foram mais de duas vezes superiores nesse grupo comparado com o placebo. Adicionalmente, o nível basal de IGF-1 sérico estava

elevado no grupo que recebeu a administração exógena de GH. Esses resultados conflitantes encontrados em estudo com humanos são esperados uma vez que os mecanismos celulares são redundantes e sofrem ação de inúmeros fatores que não só dos hormônios administrado exogenamente. Por fim, os estudos *in vitro*, em animais e em humanos sugerem que o GH pode apresentar um papel indireto na modulação da atividade das CS (IMANAKA *et al.*, 2008; VELLOSO, 2008; APERGHIS *et al.*, 2009; SCHOENFELD, 2013).

Assim como o GH pode exercer uma modulação indireta na modulação das CS, o cortisol, hormônio contrarregulador do crescimento muscular, parece também exercer essa ação. Um estudo em cultura de células C2C12 evidenciou um aumento na expressão gênica da miostatina quando glicocorticoides (e.g. cortisol) foram administrados à cultura (ALLEN e LOH, 2011). Uma das formas pela qual a miostatina pode afetar o crescimento muscular é por meio das CS. Langley *et al.* (2002) demonstrou uma modulação da atividade das CS por meio da miostatina via inibição da expressão de MyoD, necessário para proliferação das CS, em cultura de células. Consequentemente, uma vez que a miostatina pode ter sua expressão gênica aumentada por glicocorticoides, e níveis aumentados de miostatina podem afetar a modulação das CS, o cortisol também se apresenta como um hormônio com potencial modulador indireto das CS.

Como visto anteriormente, as evidências sugerem que hormônios como a testosterona, IGF-1, GH e cortisol podem ser agudamente modulados por uma sessão de EF em indivíduos treinados em força (AHTIAINEN *et al.*, 2003). Adicionalmente, a elevação sistêmica aguda de hormônios esteroides induzida pelo TF pode modular os níveis desses hormônios na célula muscular que podem também ser secretados pela mesma. Uma vez que esses hormônios sejam aumentados nas células musculares, influenciados em parte pelo aumento sistêmico, é possível que os mesmos exerçam um papel direto e indireto importante na modulação da atividade das CS.

4. MÉTODOS

4.1 Voluntários

Fizeram parte da pesquisa 12 voluntários homens (idade de 26 ± 5 anos; peso: 79 ± 8 Kg; Altura: 179 ± 10 cm e IMC: 25 ± 2), clinicamente saudáveis, sendo os mesmos previamente treinados em força em média por 5 ± 2 anos. Como critérios iniciais de inclusão, os voluntários deveriam estar treinando força regularmente (i.e. pelo menos duas vezes por semana) por pelo menos um ano e não fazer uso de suplementos ergogênicos. Os voluntários deveriam realizar semanalmente aproximadamente 10 séries dos exercícios elevação lateral e agachamento, ou pelo menos, realizar 10 séries de exercícios que tinham como motores primários os músculos deltoide, glúteos, quadríceps e flexores plantares. Nenhum dos voluntários apresentou qualquer lesão ou condição que limitasse o desenvolvimento do treinamento proposto para participação no estudo. O presente protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer: 2.757.268) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo. Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, que descreve os protocolos e testes que foram realizados neste projeto, bem como os riscos e benefícios para os voluntários.

4.2 Desenho experimental

O presente trabalho utilizou um desenho experimental *cross-over* e intra-sujeito constituído por duas sessões agudas de exercícios de força; uma sessão para não induzir elevações hormonais sistêmicas importantes (sessão Baixo Hormônio - LH) e outra sessão para induzir elevações expressivas na resposta hormonal sistêmica (sessão Alto Hormônio - HH). A ordem da realização das sessões experimentais foi contrabalanceada e aleatorizada. As sessões experimentais foram compostas por procedimentos pré-exercícios de força ($Pré_{EF}$), exercícios de força (i.e. LH e HH) e pós-exercícios de força ($Pós_{EF}$). No $Pré_{EF}$ foi coletado sangue e realizada uma biópsia do músculo deltoide na sua porção medial, aproximadamente 30 min. antes do início do EF. No EF-LH, os sujeitos realizaram o exercício para os músculos abdutores do ombro de um dos braços (elevação lateral unilateral). No EF-HH os sujeitos realizaram o mesmo exercício para o ombro contralateral seguido por um exercício para os músculos extensores do quadril, joelho e tornozelo (agachamento guiado no aparelho *Smith*). Já no $Pós_{EF}$ foi coletado sangue 15 e 30 min. após a sessão de exercício de força e as biópsias musculares do

músculo deltoide medial foram realizadas 45 min. e 72 h após as sessões de EF. As sessões experimentais foram separadas por sete dias de intervalo para que as variáveis dependentes pudessem retornar a seus níveis basais. (figura 2).

Figura 2. Desenho experimental. LH: baixo hormônio; HH: alto hormônio.

4.3 Controle Alimentar

Foi solicitado a todos os voluntários um recordatório alimentar de três dias (dois dias da semana não consecutivos e um dia do fim de semana) na semana anterior ao início das coletas. Assim, foi sugerido aos voluntários manterem o mesmo padrão na alimentação antes das biopsias pré-protocolos. Uma vez que os sujeitos realizaram as coletas pré-exercício e o exercício em jejum de seis horas, uma alimentação padronizada (79% carboidratos; 13% proteínas; 8% gorduras) foi fornecida após cada sessão de exercício (CONCEICAO *et al.*, 2016; SMILES *et al.*, 2017). Adicionalmente, durante todo o período de coleta (após o dia inicial de exercícios até o dia da última biopsia após a realização dos dois protocolos) os sujeitos consumiram aproximadamente 20 gramas de proteína do soro do leite (Max Titanium; 80% concentrada) antes de dormirem. O consumo proteico diário dos voluntários avaliado pelo recordatório alimentar, somado à proteína oferecida, foi de 1.5 ± 0.5 gramas $\cdot$ Kg⁻¹. Essa estratégia foi adotada para garantir que cada voluntário consumisse uma dose adequada de proteínas, garantindo que a síntese proteica fosse maximizada (MORTON *et al.*, 2018a) durante o período de experimental.

4.4 Sessões de exercício de força

Tanto no LH como no HH, os voluntários realizaram o mesmo exercício para o músculo Deltoide, garantindo um estímulo local semelhante (e.g. estresse mecânico, metabólico e inflamação). Porém, para não submeter o deltoide a inúmeras biópsias, evitar respostas inflamatórias locais decorrentes das mesmas e não ter alterações na quantidade das CS basal na sessão subsequente, os protocolos foram aleatorizados e balanceados entre os membros superiores direito e esquerdo. Em cada sessão (LH e HH), foram realizadas 10 séries de 10-12 repetições máximas (i.e. aproximadamente 80% de 1-RM) no exercício elevação lateral unilateral, com intervalos de três minutos entre as séries. Na sessão HH, além da elevação lateral, os sujeitos realizaram 10 séries de 10-12 repetições máximas a aproximadamente 80% de 1-RM no exercício agachamento, com um minuto de intervalo entre as séries. O objetivo das séries no exercício agachamento foi envolver grandes grupos musculares na realização do exercício, com intensidade e volume elevados e pausas curtas, condição dita necessária para haver um aumento significativo dos hormônios sistêmicos de interesse (KRAEMER e RATAMESS, 2005).

4.5 Análise Hormonal

Foram coletados 20 ml de sangue da veia antecubital nos momentos pré-intervenção e 15 e 30 minutos após protocolo de exercício para as análises hormonais sistêmicas (Figura 1). Em cada momento de coleta, o sangue foi colocado em um tubo de 5ml para sorologia (VACUETTE® Greiner Bio-One, Brasil). As amostras foram centrifugadas (Excelsa, Baby I – 206, Fanem, Brasil) no local durante 15 minutos a 4000 rpm separando-se o soro do plasma e em seguida o plasma foi estocado em biofreezer a -20°C, para posterior análise, utilizando-se o método de ELISA, para os hormônios testosterona total (TT), testosterona livre (TL) e DHEA e de Quimioiluminescência para o hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento insulínico (IGF-1) e cortisol. As amostras foram tratadas para isolar os hormônios de interesse e diminuir a concentração de proteínas que pudessem interferir nos resultados. Na sequência, as amostras diluídas nos tampões de ensaio indicados pelos kits foram pipetadas nas placas junto com os controles. Nos passos seguintes, a interação com as soluções específicas e as lavagens necessárias foi executada. Todas as técnicas e os

materiais utilizados para as análises foram desenvolvidos e utilizados em conformidade com o protocolo do fabricante.

4.6 Biópsia muscular

As biópsias foram realizadas na porção medial do músculo Deltoide utilizando-se agulhas de Bergstron. Antes da extração do tecido, a pele foi tricotomizada e limpa com antisséptico. Uma pequena área sobre a região selecionada foi então anestesiada com xilocaína a 2%, injetada subcutaneamente. Após a anestesia, uma incisão de aproximadamente (0,5 cm de comprimento) foi feita utilizando bisturi cirúrgico. A agulha de biópsia foi então introduzida no músculo numa profundidade aproximada de três centímetros para obtenção da amostra de tecido muscular (~70 a 150 mg). Após a retirada do tecido, a incisão foi fechada com fita estéril e coberta por bandagens. As amostras foram limpas (foi retirado o excesso de sangue, de tecido conectivo e gordura), separadas em alíquotas para análises posteriores e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido até o momento das análises; exceção feita à amostra para histologia que foi congelada inicialmente em isopentano pré-resfriado e depois no nitrogênio.

4.7 Análise hormonal na célula muscular

Os níveis de testosterona, DHEA, DHT e cortisol no músculo esquelético foram determinados utilizando kits de ELISA (Cayman – USA; ENZO Life Sciences – USA; IBL international - Germany e R&D Systems – USA). O protocolo sugerido em cada kit foi seguido para as respectivas análises. As amostras de músculo foram homogeneizadas no gelo, com tampão específico contendo 20 mM de Tris-HCl, pH 7,8; NaCl 300 mM; 2 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ; 2 mM de ditioneitol (DTT); 2% Nonidet P-40; 0,2% de lauril éter sulfato de sódio; desoxicolato de sódio a 0,2%; 0,5 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); 60 g/ml de aprotinina; e 1 g/ml de leupeptina (SATO *et al.*, 2014) utilizando o aparelho *fasttrap* (*Sample preparation system* 24. M.P. Biomedicals, Irvini, Califórnia. USA). Na sequência, o homogenato foi misturado e centrifugado a 4°C e 4000 rpm por 15 minutos. A concentração de proteína em cada amostra foi mensurada usando o método de Bradford. A porção sobrenadante foi separada em tubos de Eppendorf e armazenada em freezer -80 °C. Foram feitas diferentes alíquotas para as análises dos diferentes hormônios.

Para a determinação dos níveis de hormônios (testosterona, DHEA, DHT e cortisol), as amostras foram diluídas respectivamente 200, 20, 10 e 200 vezes. As amostras foram diluídas nos tampões de ensaio indicados pelos kits. Todas as técnicas e os materiais utilizados para as análises foram desenvolvidos e utilizados em conformidade com o protocolo do fabricante. A densidade óptica para leitura das placas utilizando um leitor de microplacas foi de 405, 405, 450, 450 nm para testosterona, DHEA, DHT e cortisol respectivamente. Todas as amostras foram testadas em duplicata. O CV das duplicatas para testosterona, DHEA, DHT e cortisol foram respectivamente 7,4%, 2,2%, 2,6% e 9,4%. Já o CV inter-sujeito foi respectivamente 11,7%, 34,5%, 23,7% e 28,5%.

4.8 Análise da expressão gênica:

4.8.1 - Extração do RNA

O isolamento do RNA tecidual total foi realizado com a utilização do reagente TRIZOL (Life Technologies, Califórnia, EUA) segundo recomendações do fabricante. As concentrações e pureza do RNA foram determinadas espectrofotometricamente por medida de absorbâncias a 260 e 280 nm. Razões A_{260}/A_{280} entre 1,8 – 2,0 foram consideradas de pureza satisfatória. A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose. O RNA isolado foi armazenado à -80°C para posterior utilização.

4.8.2 - Transcrição reversa

A síntese de cDNA por transcrição reversa foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA total numa reação contendo 500µg/mL de oligo dT, 10mM de cada dNTP, 5x first-strand buffer, 0,1M DTT, inibidor de ribonuclease (RNase OUT), 200u de transcriptase reversa Superscript II dT e random primers seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Life Technologies, Califórnia, EUA). Inicialmente foi realizada uma digestão com DNase para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. O cDNA foi diluído e utilizado para as reações de análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.

4.8.3 - PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Os níveis de expressão, no músculo, dos genes previamente selecionados foram determinados por qRT-PCR. As reações para miogenina e miostatina foram realizadas pelo método de incorporação de *SyBR Green* em aparelho ABI 7500 (Life Technologies, California, EUA). Os *primers* foram desenhados em *exons* diferentes para evitar amplificações de DNA com o auxílio do software *Primer Express* e sintetizados pela empresa Life Technologies. A Tabela 1 mostra as sequências dos *primers* utilizados nesse estudo. Para cada gene foram testadas diferentes concentrações finais de *primers* e a eficiência da amplificação ($E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$) foi calculada utilizando-se diluições seriadas de um *pool* de cDNAs. As reações foram realizadas em duplicata, em um volume final de 10µL, contendo 5µL de *SyBR Green Master Mix* (Applied Biosystems Life Technologies, Califórnia, EUA), 1µL de cDNA e 1µL de *primers*. A análise do PCR em tempo real foi realizada utilizando-se os seguintes parâmetros de ciclos: 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min. Para os genes das enzimas esteroideogênicas a expressão dos mesmos foi avaliada utilizando sondas específicas e TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). A análise do PCR em tempo real foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: 1 ciclo de incubação a 50°C por 2 minutos, 1 ciclo de ativação da enzima a 95°C por 20 segundos, seguidos por 40 ciclos de denaturação e anelamento; sendo a cada ciclo, 95°C por 3 segundos para denaturação; e 60°C por 30 segundos para o anelamento. A quantificação da fluorescência e análise da amplificação das bandas foi realizada pelo Sistema de Detecção de Sequências ABI Prism 5700 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (Ct) como descrito pelo produtor do sistema. Os valores de delta Ct (ΔCt) foram calculados para cada amostra e para cada gene de interesse como o Ct do gene de interesse menos o Ct do gene normalizador, no caso, a ciclofilina (Tabela 2). A equação $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizada para o cálculo da expressão relativa dos genes nas amostras avaliadas. Os resultados de expressão gênica foram normalizados pela média do momento pré.

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados para as reações de PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Senso	Antisenso
SRD5A1	CGGCTTTTGCTTTCTTCACG	GGCCAAAGCACAGAATAAACT
AKR1C3	TCAGACAAGTGACAGGGAATGG	ACAACCCAATACGGGTTCAC
Miogenina	CAGTGCACTGGAGTTCAGCG	TTCATCTGGGAAGGCCACAGA
Miostatina	GACCAGGAGAAGATGGGCTG AATCCGTT	GCTCATCACAGTCAAGACCAA AATCCCTT
Ciclofilina	AATGCTGCACCAAACACAAA	CCTTCTTTCACCTTCCCAAA

SRD5A1: 5 α redutase 1; AKR1C3: Aldo-keto redutase 3 (17 β Hidroxiesteróide Desidrogenase 5).

4.9 Tipagem das fibras musculares

Para determinar a composição das fibras musculares foi realizada uma análise de imunofluorescência. As secções transversas foram fixadas com formalina (Sigma-Aldrich, HT501128, Brasil) a 10% por 10 minutos em temperatura ambiente, permeabilizadas em 0,2% de Triton X-100 (Bio- 27rad, 01-0407, EUA) e 1% de albumina sérica bovina (BSA; Amresco, E588, EUA) diluída em PBS (Tampão Fosfato Salino; Sigma-Aldrich, P4417, Brasil) por 10 minutos. O bloqueio foi feito em 10% de soro de cabra (Sigma-Aldrich, G9023, Brasil) diluído em PBS, por 45 minutos. As lâminas foram incubadas com solução contendo os anticorpos primários (Tabela 1) com 1,5% de soro de cabra diluído em PBS por 1h e 30 minutos em temperatura ambiente para Laminina. Após novas lavagens e bloqueio a MHCI foi incubada por 3h. Após a lavagem com 0,2% de Triton X-100 em PBS (3 vezes de 10 minutos cada), os cortes foram incubados por 40 minutos em sala escura com uma solução PBS contendo 1,5% de soro de cabra, o anticorpo secundário fluorescente com diferentes comprimentos de onda (Tabela 1) e DAPI (diluição 1:1000, para visualização dos núcleos). Após 30 minutos de lavagem em 0,2% de Triton X-100 em PBS as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando-se glicerol tamponado (60% Glicerol, 40% Tris-HCl 0.1M pH 9.3). O registro das imagens foi feito em computador acoplado a um microscópio de luz ou fluorescente (dependendo da coloração) e conectado ao sistema fotográfico. A captura das imagens foi realizada com aumento de 200x e objetiva de 20x. A tipagem e quantificação dos diferentes tipos de fibras foram feitas considerando a marcação com laminina e MHCI para as fibras tipo I e laminina e ausência de marcação com MHC

para as fibras tipo II. Essas análises foram realizadas com o programa FIJI (Image J) (figura 3).

4.10 Células satélites

Para quantificar as células satélites musculares, bem como os mionúcleos nas fibras musculares de forma específica (fibras tipo I e II) foi realizada uma análise de imunofluorescência, descrita a seguir. As secções foram previamente fixadas com formol (Sigma-Aldrich, HT501128, Brasil) por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com solução contendo o anticorpo primário para Pax7 (Tabela 1) com 0,01% de Triton X-100 em PBS por 1 hora e 30 minutos, em temperatura ambiente. Após a lavagem com 0,01% de Triton X-100 em PBS (3 vezes de 10 minutos cada), os cortes foram incubados por 40 minutos em sala escura com uma solução PBS contendo 1,5% de soro de cabra, o anticorpo secundário fluorescente com diferentes comprimentos de onda (Tabela 1) e DAPI (diluição 1:1000, para visualização dos núcleos). Após 30 minutos de lavagem em 0,2% de Triton X-100 em PBS, as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando-se glicerol tamponado (60% Glicerol, 40% Tris-HCl 0.1M pH 9.3). O registro das imagens foi feito em computador acoplado a um microscópio de luz ou fluorescente (dependendo da coloração) e conectado ao sistema fotográfico. A captura das imagens obtidas pelas técnicas de coloração foi realizada com aumento de 200x e objetiva de 20x. A montagem das imagens obtidas das células satélites e mionúcleos por tipo de fibra foi realizada por meio do programa FIJI (Image J). A contagem das mesmas foi realizada por um pesquisador cego e experiente (figura 3).

Tabela 1: Anticorpos para imunofluorescência

Anticorpo	Especie	Marca	Primário	Secundário
Anti-Pax7	Rato	DSHB	1:2	Alexa Fluor 594, goat anti-mouse, 1:500
Anti-Laminia	Coelho	Abcam	1:500	Alexa Fluor 488, goat anti-mouse, 1:500
Anti-MHCI	Rato	Abcam	1:5000	Alexa Fluor 488, goat anti-mouse, 1:500

Figura 3. Imagem representativa de Imunofluorescência. A) DAPI; B) Pax7; C) DAPI/Pax7 e D) DAPI/PAX7/MHCI. As setas amarelas indicam as células satélites.

4.11 Análise Estatística

Inicialmente os dados serão analisados quanto a normalidade e homogeneidade de variâncias, através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Na ocorrência de distribuições não-normais foram testadas diferentes transformações para normalizar a distribuição dos dados. Observações extremas foram lidadas com procedimentos padrão (Ramsey & Schafer, 1997). Um modelo misto tendo condição (i.e. alta e baixa) e tempo (pré- e pós-exercício de força) como fatores fixos e sujeitos como fator aleatório foi usado para comparar as respostas hormonais, gênicas e das CSs entre as condições de alta e baixa resposta hormonal e os tempos pré e pós EF. No caso de valores de F significantes, foi realizado um ajustamento de Tukey para efeito de comparações múltiplas. O valor de P adotado foi de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Volume total dos exercícios

O volume total de exercício realizado para o músculo Deltoide (elevação lateral unilateral) foi similar entre as sessões LH e HH ($P=0,99$). Como esperado, o volume total de exercício no agachamento foi maior comparado com o volume total da elevação lateral unilateral em ambos os protocolos ($P=0,0001$) (Figura 4).

Figura 4. Volume total dos diferentes exercícios. # diferença significante entre as condições HH e LH. Dados apresentados em média e desvio padrão.

5.2 Resposta hormonal sistêmica

Para os hormônios analisados no sangue, não houve diferença entre os protocolos nos momentos pré-protocolo ($P>0,05$). O teste de Levine foi executado e os grupos apresentaram variância homogênea para todos os hormônios no sangue. Quando o teste de normalidade apontou para ausência de distribuição normal, uma transformação logarítmica foi utilizada e a normalidade novamente testada. Todos os hormônios passaram a apresentar distribuição normal em todos os momentos após a transformação.

Os níveis sanguíneos da maioria dos hormônios analisados apresentaram mudanças similares após as sessões de EF [efeito de tempo para testosterona ($F=7,3$; $P=0,001$), DHEA ($F=4,1$; $P=0,02$), GH ($F=8,8$; $P=0,0006$) e cortisol ($F=4,5$; $P=0,01$)] sem diferença entre os protocolos, com exceção do cortisol que apresentou um aumento significativamente maior após o protocolo HH (interação grupo e tempo $F=11,4$; $P=0,0001$). A testosterona livre e o IGF não apresentaram nenhuma alteração após as sessões de EF (Tabela 3).

Tabela 3: Quantidade de hormônios circulantes no sangue antes e após os protocolos de exercício LH e HH

Hormônios	Tempo	Média (DP)		CV%	ET
		LH	HH		
DHEA ng/mL	Pre	3.28 (1.09)	3.83 (1.93)	44	1.03
	15'*	4.05 (2.62)	5.38 (4.06)		
	30'*	3.85 (1.54)	5.5 (4.72)		
testo total ng/dL	Pre	572 (253)	589 (299)	47	100
	15'*	502 (243)	512 (271)		
	30'*	478 (208)	483 (238)		
testo livre pg/mL	Pre	10.7 (6.5)	10.4 (7.3)	64	3
	15'	10 (6.1)	11.3 (11.1)		
	30'	10.2 (6.9)	10 (8.5)		
GH ng/mL	Pre	1.95 (1.98)	1.93 (1.77)	94	1
	15'*	3.55 (2.54)	5.89 (4.29)		
	30'*	2.45 (1.46)	3.73 (3.4)		
IGF-1 ng/mL	Pre	325 (176)	335 (148)	48	101
	15'	335 (151)	322 (143)		
	30'	308 (195)	317 (155)		
Cortisol µg/dL	Pre	6.1 (2.94)	6.5 (6.18)	76	3.96
	15'	8.89 (5.71)	14.14 (6.4) #		
	30'	8.4 (6.15)	12.8 (6.04) #		

DHEA: desidroepiandrosterona; GH: hormônio do crescimento; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina; LH: baixo hormônio; HH: alto hormônio; CV: coeficiente de variação; ET: erro típico. * efeito de tempo, diferença significativa em relação aos valores pré; # diferença significativa entre as condições HH e LH. Dados apresentados em média e desvio padrão.

5.3 Resposta hormonal no tecido muscular

No tecido muscular não houve diferença entre os protocolos nos momentos pré-protocolo ($P>0,05$) para os hormônios analisados (testosterona, DHEA, DHT e cortisol). Apesar de alguns hormônios no tecido muscular apresentarem distribuição não normal em alguns momentos, estatísticas análises com os dados transformados não mudaram os achados, assim os dados foram apresentados nas unidades originais para facilitar a interpretação. No tecido muscular apenas o DHEA apresentou um efeito de condição ($F=7,64$; $P=0,009$) e o cortisol interação entre grupo e tempo ($F=3,61$; $P=0,03$). Apesar

de o cortisol apresentar interação, apenas o *P* não ajustado apontou diferença (i.e. valor de significância foi marginal) entre os protocolos no momento 45 minutos (HH maior que o LH) e 72 horas (LH maior que HH). A testosterona e o cortisol não sofreram alterações significantes (Figura 5).

Figura 5. Resposta hormonal no tecido muscular. LH: baixo hormônio; HH: alto hormônio; DHEA: desidroepiandrosterona; DHT: di-hidrotestosterona. ‡ efeito de grupo; # interação grupo x tempo, HH maior que LH. Dados apresentados em média e desvio padrão.

5.4 Expressão gênica

Os dados de expressão dos genes analisados apresentaram alguns momentos e sujeitos sem valores de expressão. Logo, uma vez que LH e HH não apresentaram diferenças na modulação dos hormônios analisados, com exceção do cortisol, os dados de expressão gênica foram agrupados e analisados desconsiderando-se o fator condição. Esse procedimento possibilitou termos um número maior de dados nos tempos. Quando o teste indicou ausência de normalidade, uma transformação logarítmica foi realizada (a transformação foi feita para todos os quatro genes analisados). Todos os genes passaram a apresentar distribuição normal em todos os momentos após a transformação. Como a transformação dos dados não afetou os resultados estatísticos, eles foram analisados e apresentados nas unidades originais (Figura 4). Os genes das enzimas esteroidogênicas não apresentaram efeito significativo após os protocolos de EF (AKR1C3: $F=0,62$;

$P=0,54$ e SRD5A1: $F=1,68$; $P=0,20$). A miogenina apresentou uma elevação em relação ao momento pré-protocolo 72 horas após a realização dos mesmos ($F=3,73$; $P=0,03$). Além da miogenina, a miostatina apresentou uma elevação significativa 72 horas após os exercícios de força em relação ao momento pré-protocolo e 30 minutos após a realização do protocolo ($F=18,77$; $P=0,0001$) (Figura 6).

Figura 6. Expressão gênica 45 minutos e 72 horas após protocolos LH e HH com dados compilados. SRD5A1: 5 α redutase 1; AKR1C3: Aldo-keto redutase 3 (17 β Hidroxiesteróide Desidrogenase 5). *Diferença entre os tempos. U.A: unidades arbitrárias. Dados apresentados em média e desvio padrão.

5.5 Conteúdo de células satélites e mionúcleos por tipo de fibra

Algumas imagens para análise do conteúdo de CS e núcleos apresentaram falhas na imuno-histoquímica, não podendo ser analisadas. Logo, uma vez que LH e HH não apresentaram diferenças na modulação dos hormônios analisados, com exceção do cortisol, os dados de CS e núcleo foram agrupados e analisados desconsiderando-se o fator condição. Esse procedimento possibilitou termos um número maior de dados nos tempos. Nenhuma alteração foi detectada no conteúdo de CS e mionúcleo em nenhum dos tipos de fibra analisados (Fibras I e II) (Tabela 4).

Tabela 4. Número de célula satélites e mionúcleos por tipo de fibra antes e após 72 horas das sessões de EF. Dados das duas sessões compilados. Dados apresentados em média e desvio padrão.

	Fibras	Pré	72h
Número de células satélites	Tipo I	0,16 [0,10]	0,12 [0,03]
	Tipo II	0,15 [0,05]	0,12 [0,03]
Número de mionúcleos	Tipo I	3,4 [0,4]	3,7 [0,8]
	Tipo II	3,6 [1,0]	3,3 [0,7]

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo investigar se alterações induzidas pelo EF na concentração aguda de hormônios no sangue como a testosterona total e livre, o GH, o IGF-1 e o cortisol seriam capazes de afetar também as concentrações desses hormônios na célula muscular afetando então a atividade das CS em indivíduos treinados em força. Para isso foram utilizadas duas sessões de EF; uma sessão para induzir maiores elevações nas concentrações dos hormônios (HH) do que a outra sessão (LH). Tanto a HH quanto a LH foram eficientes em gerar elevações na concentração aguda sérica do DHEA do GH e do cortisol, e uma diminuição na concentração de testosterona total. Contudo, não houve diferença significativa entre as sessões de EF na modulação das concentrações de testosterona total e livre, GH e IGF-1. A exceção foi o Cortisol que teve sua concentração sérica aumentada apenas na sessão HH. Essa elevação sistêmica induziu também a um aumento na concentração local do Cortisol 45 minutos após a sessão de EF. A ausência de elevação na célula muscular de hormônios androgênicos foi suportada pela ausência de mudança na expressão gênica das enzimas esteroidogênicas como a 5α redutase e a 17β Hidroxiesteróide Desidrogenase. Interessantemente, a expressão gênica da miostatina e da miogenina aumentaram aproximadamente nove e quatro vezes, respectivamente, 72 horas após as sessões de EF. Por fim, possivelmente afetados pelos elevados níveis de cortisol na célula muscular, houve um expressivo aumento da expressão gênica da miostatina, mas não houve aumento na quantidade de CS e consequentemente de mionúcleos. Essa ausência de modulação da quantidade de CSs e mionúcleos ocorreu mesmo com o aumento da

expressão da miogenina que poderia ter favorecido o processo de diferenciação, caso as CS tivessem sido ativadas e proliferadas.

Trabalhos realizados com indivíduos destreinados foram capazes de modular diferentemente a concentração aguda sérica de hormônios induzida pela modulação do protocolo de EF. Para isso esses trabalhos separaram os indivíduos em dois grupos; um grupo no qual grandes grupos musculares e um volume alto de exercício foi utilizado com pausas mais curtas entre as séries de exercício, e outro grupo que realizou exercícios com grupos musculares menores e um volume baixo de exercício com pausas mais longas entre as séries. Consequentemente, o grupo que envolveu maiores grupos musculares e maior volume apresentou maiores respostas hormonais agudas séricas induzida pelo EF comparado com o outro grupo (SPIERING *et al.*, 2008; WEST *et al.*, 2009; RONNESTAD, NYGAARD e RAASTAD, 2011). Apesar de essa resposta ser bem descrita em indivíduos destreinados, em indivíduos treinados apenas o trabalho de Smilios *et al.* (2003) verificou os efeitos de diferentes combinações de séries e repetições (i.e. modificações de volume e intensidade) de EF nas alterações agudas da concentração de hormônios séricos. Os autores mostraram que aumentar o número de séries de protocolos classicamente prescritos para induzir hipertrofia (com 10 repetições máximas por série) é efetivo para elevar agudamente as concentrações séricas de GH e cortisol, porém, com efeito muito modesto em aumentar a testosterona. Assim, apesar de ainda não ser um conceito sólido, parece ser possível modular diferentemente a reposta hormonal sérica aguda com diferentes protocolos de EF. (AHTIAINEN *et al.*, 2003; VINGREN *et al.*, 2009; MORTON *et al.*, 2016; MANGINE *et al.*, 2017). Diferentemente da hipótese inicial, ambas as sessões de EF da presente tese modularam de maneira similar a concentração aguda dos hormônios séricos testados, exceto o Cortisol que se elevou mais após a sessão HH. Essa resposta se mostrou diferente da resposta apresentada por indivíduos destreinados, nos quais diferentes protocolos de EF modularam distintamente as respostas hormonais. Não é clara a razão pela qual nossos protocolos não modularam diferentemente a concentração dos hormônios testados, com a exceção do cortisol. Contudo, no estudo de Smilios *et al.* (2003) apesar de o aumento no número de séries induzir um aumento nos níveis hormonais séricos após o exercício, isso aconteceu quando as séries aumentam de duas para quatro séries, mas não para seis séries. É possível que exista um platô no aumento do número de séries, da intensidade e do volume de exercício que induz alterações nos níveis hormonais. Assim, o elevado

número de séries, repetições e consequentemente volume total do exercício para o músculo deltoide usado no presente trabalho pode ter sido suficiente para modular os hormônios séricos agudamente no seu máximo, sem efeito adicional promovido pelo agachamento. Além disso, se esse aumento aconteceu até aproximadamente metade da sessão de exercício de elevação lateral (entre as séries quatro e seis, por exemplo) a coleta de sangue aos 15 minutos (primeira coleta após EF) refletiu aproximadamente 30 minutos após a elevação máxima para a sessão LH (sem agachamento) e aproximadamente 45 minutos após a sessão HH (com agachamento). Isso poderia explicar a queda observada nos níveis séricos (não significativa) de testosterona total. Uma possível explicação adicional para esse fato é fornecida na seção de limitações. Por fim, parece claro que para o Cortisol, o maior volume de exercício promovido pela adição do exercício agachamento após a elevação lateral unilateral no grupo HH, foi efetivo para promover uma maior liberação do mesmo comparado com o grupo LH.

Como uma possível consequência da modulação sistêmica, os níveis locais de cortisol também apresentaram uma elevação significativa após a sessão HH. Apesar dos demais hormônios locais não terem sido modulados em decorrência de alterações sistêmicas (i.e. Testosterona e DHT), a resposta do Cortisol sugere que, uma vez que hormônios sistêmicos séricos sejam elevados de maneira expressiva, há também uma elevação nos níveis locais desses hormônios. A entrada do cortisol na célula muscular se dá sem a necessidade de receptores de membrana uma vez que o cortisol é um hormônio esteroide (BRAUN e MARKS, 2015). Apesar do DHEA sérico não ter sido diferentemente modulado entre as sessões (EF-LH e EF-HH), o aumento para o grupo HH foi de aproximadamente 44% enquanto para o grupo LH foi aproximadamente 24%. Essa diferença da resposta entre os grupos, somado a uma aparente diferença pré, não estatisticamente diferente, fez com que um efeito de grupo fosse apontado pelo teste estatístico. Hipoteticamente, o comportamento do DHEA sistêmico sugere que se tivesse havido uma resposta maior desse hormônio no sangue, induzido pelo EF, havendo uma diferença significativa entre os grupos, possivelmente isso confirmaria a sugestão de que uma modulação sistêmica expressiva pode afetar a concentração local dos hormônios esteroides. Logo, com a elevada concentração de cortisol no sangue e as diferenças significantes entre os protocolos, a resposta local parece acompanhar a resposta sistêmica. No presente trabalho avaliamos também a possível mudança em outros hormônios esteroides, os androgênicos, na célula muscular como a testosterona e

o DHT. Apesar da modulação sistêmica do DHEA, as concentrações musculares de testosterona e DHT permaneceram inalteradas. Esses achados enfraquecem nossa hipótese de que modulações sistêmicas afetariam os níveis musculares de esteroides androgênicos. Nossa hipótese se baseou em trabalhos recentes mostrando a presença de enzimas esteroidogênicas como a 17 β Hidroxiesteróide Desidrogenase e 5 α redutase que poderiam converter o DHEA e outros esteroides em testosterona e a testosterona em DHT respectivamente na célula muscular (LABRIE, 1991; Aizawa, 2010 #17631; AIZAWA *et al.*, 2010; SATO *et al.*, 2014). Com o objetivo de confirmar que as alterações locais de hormônios esteroides, que ocorreriam segundo nossa hipótese, seriam em parte por uma metabolização na célula muscular, nós medimos a expressão gênica de enzimas esteroidogênicas 17 β Hidroxiesteróide Desidrogenase e 5 α redutase. A expressão gênica dessas enzimas não mudou nos momentos analisados após as sessões de EF. É preciso ressaltar que o DHEA foi o único esteroide, metabolizado pelas enzimas avaliadas, que apresentou uma tendência de ter sua expressão diferente entre os grupos. Assim, seria esperado que, principalmente, a 17 β Hidroxiesteróide Desidrogenase apresentasse alguma alteração na sua expressão gênica. Contudo, os dados de expressão gênica dos dois grupos foram agrupados por questão de poder estatístico e esse possível efeito pode ter sido diluído. É possível ainda que indivíduos treinados já possuam quantidade elevada dessas enzimas esteroidogênicas não sendo necessário o aumento da expressão gênica das mesmas. Essa afirmação é possível baseado nos nossos dados e nos dados de Sato et al. (2014) que comparam os níveis hormonais e de enzimas esteroidogênicas entre indivíduos jovens e idosos. Os autores mostraram que um período de TF não modulou as concentrações musculares basais dos hormônios e das enzimas esteroidogênicas nos jovens. Por outro lado, os idosos apresentaram um aumento tanto dos níveis de testosterona e DHT basais na célula muscular bem como das enzimas 17 β Hidroxiesteróide Desidrogenase e 5 α redutase. Assim, é possível que sessões de EF tenham impacto na modulação de esteroides e enzimas esteroidogênicas no músculo quando a concentração das mesmas é reduzida, mas não em indivíduos treinados em força que possivelmente já tem níveis mais altos dessas enzimas. Dessa forma, a ausência de alteração aguda após sessões de EF na concentração muscular dos esteroides androgênicos bem como na expressão gênica das enzimas esteroidogênicas analisadas, sugere que esse mecanismo de esteroidogênese não é facilmente abalado de forma aguda por sessões de EF em indivíduos treinados.

Alterações nos níveis de hormônios na célula muscular estão relacionadas com a possível modulação de processos que regulam a fisiologia celular (SINHA-HIKIM *et al.*, 2003; CHEN, ZAJAC e MACLEAN, 2005; IMANAKA *et al.*, 2008; SPIERING *et al.*, 2008; BRAUN e MARKS, 2015). No presente estudo, o cortisol foi o único hormônio que teve sua concentração significativamente alterada no músculo. Um dos processos fisiológicos que o cortisol pode regular no músculo esquelético é a atividade das CS (LANGLEY *et al.*, 2002; DUBOIS *et al.*, 2014). O aumento da atividade bem como da quantidade de CS está bem estabelecido após sessões de EF em indivíduos destreinados, nos quais o dano muscular e o processo inflamatório induzido pelo TF são elevados (CRAMERI *et al.*, 2004; O'REILLY *et al.*, 2008; DAMAS *et al.*, 2016). Em indivíduos treinados esse processo de dano muscular - inflamação é atenuado, e então o papel das CS passaria a estar mais relacionado a um processo de aumento de mionúcleos e, consequentemente, aumentar a síntese proteica (JOANISSE *et al.*, 2015; NEDERVEEN *et al.*, 2017). Apesar de não ser um consenso na literatura, existem resultados consistentes mostrando que uma sessão de EF pode aumentar a atividade e a quantidade de CS, mesmo em indivíduos com experiência em TF. Nederveen *et al.* (2017) mostraram que indivíduos jovens treinados em força (16 semanas de treino), apresentavam um aumento de aproximadamente 30% na quantidade de CS 72h após a realização de uma sessão de exercício de força. Apesar das evidências trazidas por Nederveen *et al.* (2017), nosso trabalho falhou em alterar a quantidade de CS 72 horas após as sessões de EF tanto nas fibras do tipo I quanto do tipo II. Dois pontos importantes podem ser discutidos a luz desses dados. I) o presente trabalho é o primeiro a analisar o efeito de EF na modulação das CS em indivíduos treinados em força por 5 ± 2 anos; É possível que para esses sujeitos, com ampla experiência em TF, a modulação da atividade e quantidade de CS só ocorra em situações específicas e extremas de crescimento celular e não mais após todas as sessões de EF; e II) um dos papéis conhecidos do cortisol é regular a atividade das CS via inibição da proliferação bem como da diferenciação dessas células (LANGLEY *et al.*, 2002; ALLEN e LOH, 2011). Especificamente, o cortisol aumenta a expressão de miostatina, que inibe a ativação, proliferação e diferenciação das CS através da fosforilação do fator de transcrição SMAD3 que inibe a expressão da myoD, miogenina e Myf5 (LANGLEY *et al.*, 2002; BRAUN e MARKS, 2015). Corroborando com essas sugestões, a expressão gênica da miostatina aumentou aproximadamente oito vezes após as sessões de EF nos indivíduos

do presente trabalho. Mesmo tendo sido observado um aumento de aproximadamente três vezes na expressão gênica da miogenina, o aumento de miostatina parece ter sido determinante para não modular a quantidade de CSs dos indivíduos treinados em força.

Por fim, é preciso discutir algumas possíveis limitações do presente estudo. Até o presente momento, apenas o trabalho de Smilios *et al.* (2003) modulou as concentrações hormonais agudas no sangue usando diferentes protocolos de EF em indivíduos treinados. Assim, as premissas utilizadas para elaborar as diferentes sessões de treino desse trabalho vieram desse estudo e de estudos com sujeitos não treinados (KRAEMER *et al.*, 1990; SPIERING *et al.*, 2008; WEST *et al.*, 2010; RONNESTAD, NYGAARD e RAASTAD, 2011; GUNDERSEN, 2016). Evidentemente, os resultados encontrados com indivíduos destreinados não foram linearmente reproduzidos nos indivíduos treinados. Além disso, uma análise do erro da medida entre os dois momentos pré EF da presente tese (pré LH e pré HH) demonstra uma variabilidade da medida da concentração hormonal sérica elevada para os hormônios avaliados nessa tese. Um exemplo claro é a concentração sérica de testosterona total. O erro típico (ET) da medida utilizada para esse hormônio é de 17%. O ET é uma medida de variabilidade intrassujeito, e aponta o erro da mesma medida feita sob as mesmas condições na mesma unidade experimental. Assim, ele dá uma ideia de variação esperada da medida quando o sujeito não é submetido a nenhum tratamento. Logo, o tratamento precisa produzir no mínimo um efeito maior do que o ET para que o mesmo possa ser considerado efetivo. Nosso grupo costuma considerar expressivo o efeito induzido por um tratamento na medida de ao menos uma vez e meia o erro típico (LIXANDRAO *et al.*, 2016). Ou seja, se o erro típico da medida de testosterona na presente tese é 17%, as sessões de EF deveriam produzir uma alteração de ao menos 26% para considerarmos um efeito de tratamento expressivo. Apesar de cada população, avaliador, instrumentos e reagentes químicos terem seus próprios erros e esse erro mudar de situação para situação, a população, intervenção e análise da testosterona sérica utilizados nessa tese são similares aos usados pelos estudos analisados na literatura. Dos estudos publicados em que a concentração de testosterona foi investigada em indivíduos treinados, sete estudos apresentam os dados de forma em que foi possível calcular o maior efeito produzido pelo EF logo após o mesmo (figura 7).

Figura 7. Maior mudança percentual induzida pelo exercício de força na resposta aguda sistêmica de testosterona e 1.5 vezes o erro típico dos dados de testosterona da presente tese (linha pontilhada). $ET = DP_{dif} / \sqrt{2} / M_{pré}$. ET: erro típico; DP_{dif} : desvio padrão da diferença dos valores pré; $M_{pré}$: média dos momentos pré.

Em média, os trabalhos publicados apresentam uma elevação de 21% nos níveis séricos de testosterona após o exercício de força. Uma vez que precisaríamos de aproximadamente 26% para termos um efeito do tratamento detectável, isso faz com que seja difícil identificar qualquer diferença na resposta desses hormônios entre as sessões limitando conclusões mais sólidas a respeito do tema. Considerando a dificuldade de modular a resposta hormonal aguda induzida por diferentes sessões de TF e a alta variabilidade na concentração dos hormônios basais séricos bem como na resposta aguda induzida pelo TF, um número muito maior de sujeitos deveria ser utilizado (i.e. provavelmente centenas). Isso permitiria entender a real variabilidade dos dados ou ainda usar estratégias de estratificação dos sujeitos em grupos nos quais diferentes modulações foram provocadas (i.e. alto e baixos respondedores). Finalmente, mas não menos importantes, diferentes ferramentas de análises de concentração

hormonal sérica precisam ser investigadas e comparadas a fim de se encontrar medidas mais consistentes e com erros de medidas menores do que a modulação induzida pelo tratamento, no caso sessões de EF. Todas essas estratégias juntas podem deixar a investigação desse tópico mais robusta e ajudar futuramente a elucidar as possíveis funções dos hormônios induzidos por diferentes tratamentos como sessões de EF nos processos fisiológicos das células musculares.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando o conjunto dos dados da presente tese é possível afirmar que a concentração sérica de cortisol aumentou significativamente após as duas sessões de EF, LH e HH, sendo significativamente maior após a sessão HH. Essa maior elevação do Cortisol no sangue fez com que a concentração de cortisol no músculo também fosse maior. Assim é possível sugerir que quando o hormônio é elevado agudamente no sangue de forma expressiva, o mesmo afetará sua concentração na célula muscular. Esse aumento da concentração de cortisol no músculo pode ter favorecido a elevação da expressão gênica da miostatina que inibiu a atividade das CSs, já que não foi observado a esperada mudança na quantidade de CSs nas células musculares após as sessões de EF. Contudo, diferente do comportamento do cortisol as diferentes sessões de EF, LH e HH, falharam em modular diferentemente a concentração dos demais hormônios analisados. Assim, houve um aumento na concentração sérica de hormônios induzido independente da sessão de EF como o GH e o DHEA, mas sem a modulação local significativa da concentração dos esteroides e das enzimas esteroideogênicas analisadas no músculo. Essa ausência de modulações diferentes entre as sessões de EF para os hormônios locais impossibilita inferir se os mesmos afetam de alguma forma a atividade e a quantidade das CSs. Novas investigações com um número elevado de sujeitos e que se utilizem de melhores técnicas para medir a concentração de hormônios séricos são necessárias para elucidar se a resposta hormonal sérica quando modulada além do erro da medida e de maneira diferente entre condições pode afetar agudamente processos fisiológicos na célula muscular.

8. REFERÊNCIAS

ALLEN, D. L.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. **Muscle Nerve**, v. 22, n. 10, p. 1350-60, 1999.

AHTIAINEN, J. P. *et al.* . Muscle hypertrophy, hormonal adaptations and strength development during strength training in strength-trained and untrained men. **Eur J Appl Physiol**, v. 89, n. 6, p. 555-63, 2003.

_____. Short vs. long rest period between the sets in hypertrophic resistance training: influence on muscle strength, size, and hormonal adaptations in trained men. **J Strength Cond Res**, v. 19, n. 3, p. 572-82, 2005.

AHTIAINEN, J. P. *et al.* . Acute hormonal responses to heavy resistance exercise in strength athletes versus nonathletes. **Can J Appl Physiol**, v. 29, n. 5, p. 527-43, 2004.

AIZAWA, K. *et al.* . Acute exercise activates local bioactive androgen metabolism in skeletal muscle. **Steroids**, v. 75, n. 3, p. 219-23, 2010.

ALLEN, D. L.; LOH, A. S. Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 300, n. 1, p. C124-37, 2011.

APERGHIS, M. *et al.* . Serum IGF-I levels and IGF-I gene splicing in muscle of healthy young males receiving rhGH. **Growth Horm IGF Res**, v. 19, n. 1, p. 61-7, 2009.

BELLAMY, L. M. *et al.* . The acute satellite cell response and skeletal muscle hypertrophy following resistance training. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109739, 2014.

BIRZNIECE, V.; SATA, A.; HO, K. K. Growth hormone receptor modulators. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 10, n. 2, p. 145-56, 2009.

BRAUN, T. P.; MARKS, D. L. The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. **Front Physiol**, v. 6, p. 12, 2015.

CHEN, Y.; ZAJAC, J. D.; MACLEAN, H. E. Androgen regulation of satellite cell function. **J Endocrinol**, v. 186, n. 1, p. 21-31, 2005.

CICILIOT, S.; SCHIAFFINO, S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 8, p. 906-14, 2010.

CONCEICAO, M. S. *et al.* . Attenuated PGC-1alpha Isoforms following Endurance Exercise with Blood Flow Restriction. **Med Sci Sports Exerc**, v. 48, n. 9, p. 1699-707, 2016.

CRAMERI, R. M. *et al.* . Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. **J Physiol**, v. 558, n. Pt 1, p. 333-40, 2004.

DAMAS, F. *et al.* . Early- and later-phases satellite cell responses and myonuclear content with resistance training in young men. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0191039, 2018a.

DAMAS, F. *et al.* . Resistance training-induced changes in integrated myofibrillar protein synthesis are related to hypertrophy only after attenuation of muscle damage. **J Physiol**, v. 594, n. 18, p. 5209-22, 2016.

DAMAS, F. *et al.* . Resistance training in young men induces muscle transcriptome-wide changes associated with muscle structure and metabolism refining the response to exercise-induced stress. **Eur J Appl Physiol**, 2018b.

DRUMMOND, M. J. *et al.* . Human muscle gene expression following resistance exercise and blood flow restriction. **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 4, p. 691-8, 2008.

DUBOIS, V. *et al.* . A satellite cell-specific knockout of the androgen receptor reveals myostatin as a direct androgen target in skeletal muscle. **FASEB J**, v. 28, n. 7, p. 2979-94, 2014.

FITTS, R. H.; RILEY, D. R.; WIDRICK, J. J. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 89, n. 2, p. 823-39., 2000.

FRY, C. S. *et al.* . Blood flow restriction exercise stimulates mTORC1 signaling and muscle protein synthesis in older men. **Journal of applied physiology**, v. 108, n. 5, p. 1199-209, 2010.

GORDON, P. M. *et al.* . Resistance exercise training influences skeletal muscle immune activation: a microarray analysis. **J Appl Physiol (1985)**, v. 112, n. 3, p. 443-53, 2012.

GRUBB, A. *et al.* . IGF-1 colocalizes with muscle satellite cells following acute exercise in humans. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 39, n. 4, p. 514-8, 2014.

GUNDERSEN, K. Muscle memory and a new cellular model for muscle atrophy and hypertrophy. **J Exp Biol**, v. 219, n. Pt 2, p. 235-42, 2016.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**, v. 91, n. 2, p. 534-51, 2001.

HOFFMAN, J. R. *et al.* . Position stand on androgen and human growth hormone use. **J Strength Cond Res**, v. 23, n. 5 Suppl, p. S1-S59, 2009.

IMANAKA, M. *et al.* . Growth hormone stimulates mechano growth factor expression and activates myoblast transformation in C2C12 cells. **Kobe J Med Sci**, v. 54, n. 1, p. E46-54, 2008.

JESPERSEN, J. G. *et al.* . Myostatin expression during human muscle hypertrophy and subsequent atrophy: increased myostatin with detraining. **Scand J Med Sci Sports**, v. 21, n. 2, p. 215-23, 2011.

JOANISSE, S. *et al.* . Satellite cell activity, without expansion, after nonhypertrophic stimuli. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 309, n. 9, p. R1101-11, 2015.

KADI, F. *et al.* . Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. **Muscle Nerve**, v. 29, n. 1, p. 120-7, 2004a.

KADI, F. *et al.* . The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. **J Physiol**, v. 558, n. Pt 3, p. 1005-12, 2004b.

KRAEMER, W. J. *et al.* . Hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise protocols. **J Appl Physiol**, v. 69, n. 4, p. 1442-50, 1990.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. **Sports Med**, v. 35, n. 4, p. 339-61, 2005.

LABRIE, C.; BELANGER, A.; LABRIE, F. Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate. **Endocrinology**, v. 123, n. 3, p. 1412-7, 1988.

LABRIE, F. Intracrinology. **Mol Cell Endocrinol**, v. 78, n. 3, p. C113-8, 1991.

LABRIE, F. *et al.* . Antifertility effects of LHRH agonists in the male rat and inhibition of testicular steroidogenesis in man. **Int J Fertil**, v. 25, n. 3, p. 157-70, 1980.

LANGLEY, B. *et al.* . Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. **J Biol Chem**, v. 277, n. 51, p. 49831-40, 2002.

LINNAMO, V. *et al.* . Acute hormonal responses to submaximal and maximal heavy resistance and explosive exercises in men and women. **J Strength Cond Res**, v. 19, n. 3, p. 566-71, 2005.

LIXANDRAO, M. E. *et al.* . Time Course of Resistance Training-Induced Muscle Hypertrophy in the Elderly. **J Strength Cond Res**, v. 30, n. 1, p. 159-63, 2016.

MANGINE, G. T. *et al.* . Exercise-Induced Hormone Elevations Are Related to Muscle Growth. **J Strength Cond Res**, v. 31, n. 1, p. 45-53, 2017.

MATSAKAS, A. *et al.* . Molecular, cellular and physiological investigation of myostatin propeptide-mediated muscle growth in adult mice. **Neuromuscul Disord**, v. 19, n. 7, p. 489-99, 2009.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J Biophys Biochem Cytol**, v. 9, p. 493-5, 1961.

MCHUGH, M. P. Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. **Scand J Med Sci Sports**, v. 13, n. 2, p. 88-97, 2003.

MCKAY, B. R. *et al.* . Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle lengthening contractions in humans. **J Physiol**, 2008.

MITCHELL, C. J. *et al.* . Muscular and systemic correlates of resistance training-induced muscle hypertrophy. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78636, 2013.

MOBLEY, C. B. *et al.* . Biomarkers associated with low, moderate, and high vastus lateralis muscle hypertrophy following 12 weeks of resistance training. **PLoS One**, v. 13, n. 4, p. e0195203, 2018.

MORTON, R. W. *et al.* . A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training-induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. **Br J Sports Med**, v. 52, n. 6, p. 376-384, 2018a.

MORTON, R. W. *et al.* . Neither load nor systemic hormones determine resistance training-mediated hypertrophy or strength gains in resistance-trained young men. **J Appl Physiol (1985)**, v. 121, n. 1, p. 129-38, 2016.

MORTON, R. W. *et al.* . Muscle Androgen Receptor Content but Not Systemic Hormones Is Associated With Resistance Training-Induced Skeletal Muscle Hypertrophy in Healthy, Young Men. **Front Physiol**, v. 9, p. 1373, 2018b.

MUIR, A. R.; KANJI, A. H.; ALLBROOK, D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. **J Anat**, v. 99, n. Pt 3, p. 435-44, 1965.

NEDERVEEN, J. P. *et al.* . Altered muscle satellite cell activation following 16 wk of resistance training in young men. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 312, n. 1, p. R85-R92, 2017.

O'REILLY, C. *et al.* . Hepatocyte growth factor (HGF) and the satellite cell response following muscle lengthening contractions in humans. **Muscle Nerve**, v. 38, n. 5, p. 1434-42, 2008.

PAULSEN, G. *et al.* . Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? **Exerc Immunol Rev**, v. 18, p. 42-97, 2012.

PETRELLA, J. K. *et al.* . Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. **J Appl Physiol**, v. 104, n. 6, p. 1736-42, 2008.

RONNESTAD, B. R.; NYGAARD, H.; RAASTAD, T. Physiological elevation of endogenous hormones results in superior strength training adaptation. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 9, p. 2249-59, 2011.

SATO, K.; IEMITSU, M. Exercise and sex steroid hormones in skeletal muscle. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 145, p. 200-5, 2015.

SATO, K. *et al.* . Resistance training restores muscle sex steroid hormone steroidogenesis in older men. **FASEB J**, v. 28, n. 4, p. 1891-7, 2014.

SCHOENFELD, B. J. Potential mechanisms for a role of metabolic stress in hypertrophic adaptations to resistance training. **Sports Med**, v. 43, n. 3, p. 179-94, 2013.

SINHA-HIKIM, I. *et al.* . Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n. 1, p. E197-205, 2003.

SMILES, W. J. *et al.* . Acute low-intensity cycling with blood-flow restriction has no effect on metabolic signaling in human skeletal muscle compared to traditional exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 117, n. 2, p. 345-358, 2017.

SMILIOS, I. *et al.* . Hormonal responses after a strength endurance resistance exercise protocol in young and elderly males. **Int J Sports Med**, v. 28, n. 5, p. 401-6, 2007.

SMILIOS, I. *et al.* . Hormonal responses after various resistance exercise protocols. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 4, p. 644-654, 2003.

SPIERING, B. A. *et al.* . Effects of elevated circulating hormones on resistance exercise-induced Akt signaling. **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 6, p. 1039-48, 2008.

SUGA, T. *et al.* . Effect of multiple set on intramuscular metabolic stress during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, n. 11, p. 3915-20, 2012.

TAKARADA, Y.; TAKAZAWA, H.; ISHII, N. Applications of vascular occlusion diminish disuse atrophy of knee extensor muscles. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 12, p. 2035-9, 2000.

TIDBALL, J. G. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 5, p. 1900-8, 2005.

TOIGO, M.; BOUTELLIER, U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. **Eur J Appl Physiol**, v. 97, n. 6, p. 643-63, 2006.

VELLOSO, C. P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 3, p. 557-68, 2008.

VINGREN, J. L. *et al.* . Effect of resistance exercise on muscle steroidogenesis. **J Appl Physiol**, v. 105, n. 6, p. 1754-60, 2008.

VINGREN, J. L. *et al.* . Effect of resistance exercise on muscle steroid receptor protein content in strength-trained men and women. **Steroids**, v. 74, n. 13-14, p. 1033-9, 2009.

VINGREN, J. L. *et al.* . Testosterone physiology in resistance exercise and training: the up-stream regulatory elements. **Sports Med**, v. 40, n. 12, p. 1037-53, 2010.

WEST, D. W. *et al.* . Elevations in ostensibly anabolic hormones with resistance exercise enhance neither training-induced muscle hypertrophy nor strength of the elbow flexors. **J Appl Physiol**, v. 108, n. 1, p. 60-7, 2010.

WEST, D. W. *et al.* . Resistance exercise-induced increases in putative anabolic hormones do not enhance muscle protein synthesis or intracellular signalling in young men. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 21, p. 5239-47, 2009.

WEST, D. W.; PHILLIPS, S. M. Associations of exercise-induced hormone profiles and gains in strength and hypertrophy in a large cohort after weight training. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, n. 7, p. 2693-702, 2012.

WILKINSON, S. B. *et al.* . Hypertrophy with unilateral resistance exercise occurs without increases in endogenous anabolic hormone concentration. **Eur J Appl Physiol**, v. 98, n. 6, p. 546-55, 2006.

YANG, S. Y.; GOLDSPIK, G. Different roles of the IGF-I Ec peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation. **FEBS Lett**, v. 522, n. 1-3, p. 156-60, 2002.

ZAMMIT, P.; BEAUCHAMP, J. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? **Differentiation**, v. 68, n. 4-5, p. 193-204, 2001.