MARCELO LARCIPRETE LEAL

**GENES DA VIA WNT SÃO DIFERENCIALMENTE
MODULADOS POR PROTOCOLOS DE
TREINAMENTO DE FORÇA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

São Paulo

2009

RESUMO

Larciprete-leal M. Genes da via WNT são diferencialmente modulados por protocolos de treinamento de força [Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Tecidual]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

A proposta deste estudo foi avaliar o efeito de 8 semanas de treinamento de força ou potência sobre a expressão de genes pertencentes a via de sinalização canônica da WNT, tão bem como os níveis de expressão protéicos de β -catenina, em indivíduos do sexo masculino, fisicamente ativos. Vinte e cinco indivíduos ($27,4 \pm 4,6$ anos) foram distribuídos randomicamente em três grupos: treinamento de força (TF) ($n = 10$), treinamento de potência (TP) ($n = 10$), e grupo controle (C) ($n = 5$). Os grupos TF e TP realizaram treinamentos de alta e baixa intensidade respectivamente, no exercício agachamento, 3 vezes por semana, durante 8 semanas. As biópsias do músculo vasto lateral foram retiradas antes e após o período de treinamento. As análises de expressão gênica foram acessadas por PCR em tempo real e as de expressão protéica para β -catenina por Western blot. Alguns genes foram modulados positivamente no grupo TF (WNT1: 6.4 vezes – $P < 0.0001$; SFRP1: 3.3 vezes – $P < 0.0001$ e LEF1: 7.3 vezes – $P < 0.0001$) e também no grupo TP (WNT1: 24.9 vezes – $P < 0.0001$; SFRP1: 2.7 vezes – $P < 0.0001$; LEF1: 34.1 vezes – $P < 0.0001$ e Cyclina D1: 7.7 vezes – $P < 0.001$). Além disto, a expressão de genes chave da via de sinalização da WNT foi substancialmente mais responsiva ao treinamento de potência do que ao treinamento de força máxima (WNT1 – $P < 0.0001$; LEF1 – $P < 0.0001$ e Cyclina D1 – $P < 0.001$). O conteúdo protéico total de β -catenina aumentou somente no grupo TP ($p < 0,05$). Nossos dados indicam que tanto o treinamento de força máxima quanto o treinamento de potência modulam a expressão de genes da via de sinalização da WNT, assim como os níveis de expressão protéica de β -catenina. No entanto, o treinamento de potência desencadeia maiores respostas sobre elementos chave desta via de sinalização.

Palavras-chave: Treinamento de força, Treinamento de potência, Expressão gênica, Músculo esquelético

ABSTRACT

Larciprete-leal M. WNT pathway related genes are differentially modulated by resistance training regimens [Master Thesis]. Sao Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo; 2009.

The purpose of the present study was to evaluate the effects of 8 weeks of strength and power training on the expression of genes related to the canonical WNT pathway and β -catenin protein levels in physically active men. Twenty five subjects (27.4 ± 4.6 yrs) were randomly assigned to three groups: strength training (ST) ($n = 10$), power training (PT) ($n = 10$), and control (C) ($n = 5$). The ST and the PT groups performed high and low intensity squats, respectively, 3 times per week, for 8 weeks. Muscle biopsies from the *vastus lateralis* muscle were collected before and after the training period. Gene expression and β -catenin protein expression levels were assessed by real time PCR and Western blot. Furthermore, certain genes were up-regulated in the ST group (WNT1: 6.4 fold – $P < 0.0001$; SFRP1: 3.3 fold – $P < 0.0001$ and LEF1: 7.3 fold – $P < 0.0001$) and also in the PT group (WNT1: 24.9 fold – $P < 0.0001$; SFRP1: 2.7 fold – $P < 0.0001$; LEF1: 34.1 fold – $P < 0.0001$ and Cyclin D1: 7.7 fold – $P < 0.001$). In addition, the expression of key WNT pathway genes was substantially more responsive to PT than to ST (WNT1 – $P < 0.0001$; LEF1 – $P < 0.0001$ and Cyclin D1 – $P < 0.001$). Finally, the total protein content of β -catenin increased only in the PT group ($P < 0.05$). Our data indicate that both ST and PT modulate WNT signaling pathway gene expression and β -catenin protein levels. However, PT triggers greater responses on key elements of this pathway.

Key words: Strength training; Power training; Gene expression; Skeletal muscle

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi realizado em colaboração com a equipe do Prof. Dr. Valmor Alberto Augusto Tricoli, docente da Escola de Educação Física e Esporte (EEFE) – USP, Departamento de Esporte, Grupo de Estudos e Pesquisas em Adaptações Neuromusculares ao Treinamento de Força (GEPAN). Este grupo contribuiu neste trabalho com o fornecimento das amostras musculares retiradas por biópsia, dos indivíduos submetidos aos protocolos de treinamento e dos que constituíram o grupo controle (não treinados).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Adaptações promovidas pelo treinamento de força

Com um alto grau de plasticidade, o tecido muscular esquelético possui uma acentuada capacidade de adaptação a diferentes estímulos impostos por diversas condições fisiológicas e/ou patológicas (1-3). Estes estímulos podem afetar os processos de síntese e degradação protéica, favorecendo adaptações anabólicas ou catabólicas observadas no tecido muscular (4-6). Portanto, a manutenção da massa muscular é dependente do balanço dinâmico entre os processos de síntese e degradação (7). Aumentos significativos da degradação protéica muscular são observados em condições atroficas como, imobilização e desnervação, dentre varias outras (8, 9). Com a redução drástica dos estímulos mecânicos, o corpo aciona mecanismos que vão desencadear uma perda acelerada de massa muscular. Por outro lado, atividades que aumentam a demanda sobre o músculo esquelético promovem adaptações que preparam o organismo para demandas ainda maiores, como as que acontecem em um programa de treinamento de força.

Há muitos anos já é conhecido que o treinamento progressivo contra resistência é uma importante ferramenta para ganhos de força e hipertrofia muscular. Na Grécia antiga, um grande atleta chamado Milo de Crotona, foi considerado o homem mais forte de sua época, vencendo eventos de *Wrestling* em diversas edições dos jogos olímpicos, durante vários anos consecutivos (10). Os registros relatam que Milo treinava diariamente carregando um bezerro jovem em suas costas até que o animal crescesse completamente. Portanto, à medida que o animal crescia e ganhava peso, a sobrecarga era aumentada progressivamente sobre Milo, o que consequentemente o tornava mais forte com o passar do tempo. Em uma análise atual da metodologia de treinamento usada por Milo, poderíamos considerar que ele aplicou naquela época, o que hoje é assumido como um dos mais importantes princípios do treinamento: a sobrecarga progressiva.

Atualmente, é bem estabelecido que a imposição de sobrecarga de forma progressiva é um dos fatores determinantes para ganhos de força também progressivos, e que os ganhos de força podem estar relacionados tanto a fatores neurais como a aumentos na área de secção transversa das fibras musculares esqueléticas (hipertrofia) (11-13). Em indivíduos destreinados, no período inicial de treinamento, são observados grandes aumentos na capacidade de geração de força, e estes são atribuídos a adaptações do sistema nervoso como: maior recrutamento de unidades motoras; maior frequência de disparo dos motoneurônios; dentre outras. Com o decorrer do treinamento, a contribuição deste tipo de adaptação vai diminuindo, e dando espaço para a hipertrofia, que atua de maneira expressiva para ganhos adicionais de força após algumas semanas de treinamento (Figura 1). A Figura 2 mostra imagens de ressonância magnética (IRM) da coxa de indivíduos antes (Figura 2A) e após um período de treinamento de força (Figura 2B). Podemos observar a hipertrofia após o treinamento, evidenciada pela maior área total do quadríceps (Área em destaque, 2B).

Figura 1. Figura esquemática demonstrando algumas adaptações promovidas pelo treinamento de força ao longo do tempo. Note que a hipertrofia começa a aumentar de maneira expressiva após o período inicial do treinamento. Retirada do livro Força e potência no esporte; P.V. Komi; 2ª Edição, 2006.

Figura 2. Imagem de ressonância magnética da coxa de indivíduos antes (A) e após (B) um período de treinamento de força. A área delimitada pela linha branca mostra a maior área total do quadríceps após o período de treinamento, evidenciando o processo hipertrófico. Imagens gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Valmor A. A. Tricoli – Escola de Educação Física e Esporte (EEFE) – USP.

Apesar de adaptações como as citadas acima serem intrínsecas à imposição de sobrecarga progressiva em um programa de treinamento de força, adaptações mais específicas para a prevalência de algumas características da aptidão física como maior geração de potência, força ou hipertrofia, por exemplo, podem ser priorizadas em protocolos de treinamento desenvolvidos para estes fins (14, 15). Portanto, as adaptações que ocorrem no sistema neuromuscular além das supracitadas, são específicas ao tipo de estímulo aplicado, e podem ser determinadas por variáveis como: as ações musculares envolvidas; a velocidade de execução dos movimentos; o volume; e a intensidade de treinamento, dentre outros. A maneira mais usual para determinar a intensidade de um treinamento é o cálculo a partir da força máxima de um indivíduo. É possível fazer uma estimativa da força máxima através de testes que utilizam repetições máximas (RM). O número de repetições máximas é determinado pelo maior peso que pode ser levantado, por um determinado número de repetições em um exercício. No entanto, a força máxima pode ser avaliada de forma direta através do teste de uma repetição máxima (1RM). A carga de 1RM é a quantidade máxima de peso que pode ser levantada, somente uma vez em um exercício específico, usando uma técnica apropriada. Protocolos para uma maior manifestação de potência muscular consistem basicamente de treinamento com

intensidade de baixa a moderada (30-60%) relativa à carga de 1RM; e movimentos explosivos, com a maior velocidade de execução possível. Por definição, a potência é o produto da força pela velocidade;

$$P = F \times V.$$

Portanto, uma maior potência pode ser produzida quando mais força é gerada em uma velocidade constante ou em um mesmo intervalo de tempo; ou quando a mesma quantidade de força é produzida em maior velocidade ou em um menor intervalo de tempo. Neste sentido, a potência se torna uma qualidade física bastante desejável por atletas que competem em modalidades esportivas onde uma maior velocidade ou o menor tempo para a manifestação de certa quantidade de trabalho é uma variável determinante para o melhor desempenho esportivo. Como exemplos destas modalidades destacam-se o voleibol, basquetebol e corrida de 100 metros, dentre diversas outras.

Outro tipo de protocolo específico é o que prioriza uma maior geração de força máxima. Neste tipo de protocolo, basicamente são utilizadas, dentre outras variáveis, altas intensidades relativas (80-100% de 1RM), e grandes intervalos de recuperação entre as séries e exercícios quando comparados com protocolos para hipertrofia, por exemplo. Maiores intervalos de recuperação são usados para que não ocorra um decréscimo na produção de força decorrente do processo de fadiga cumulativa devido ao uso de curtos intervalos de recuperação, e para que algumas reservas energéticas sejam restabelecidas (14-17). Da mesma forma que o treinamento de potência favorece atletas que competem em modalidades esportivas onde o tempo e a velocidade são parâmetros que influenciam o desempenho, protocolos desenvolvidos para uma maior produção de força são amplamente utilizados por atletas de *Powerlifting*, por exemplo. Nesta modalidade a maior manifestação da força determinará o melhor desempenho dos atletas independente de tempo ou velocidade.

Existe uma alta correlação positiva entre a produção de força gerada por um músculo esquelético e a área de secção transversa das fibras musculares (18, 19). Isto significa, em geral, que fibras musculares maiores são capazes de gerar uma maior quantidade de força. Neste contexto, protocolos de treinamento de força progressivos realizados por períodos prolongados, geram hipertrofia dos músculos

exercitados em maior ou menor escala, dependendo da manipulação das variáveis do treinamento (14). Embora, em iniciantes e em indivíduos destreinados, a hipertrofia só se manifeste fenotipicamente após algumas semanas de treinamento de força, modificações celulares e moleculares relacionadas ao processo hipertrófico são observadas no tecido muscular esquelético após uma única sessão de treinamento. Alguns estudos mostram que os níveis de síntese protéica são significativamente aumentados após uma única sessão de treinamento de força (20, 21), e estes efeitos podem persistir por até 48 horas em indivíduos alimentados (22). Outros estudos apontam que sessões agudas de treinamento de força podem modular a expressão de diversos genes relacionados a processos de síntese e degradação no músculo esquelético (23-25). Atualmente acredita-se que a somação de alterações celulares e moleculares agudas promovidas por sessões individuais de treinamento, seja um fator fundamental para as adaptações hipertróficas tardias observadas com a prática de longos períodos de treinamento de força.

1.2 Treinamento de força e vias de sinalização intracelulares

Alguns genes/proteínas já foram descritos como importantes no processo de modulação da massa muscular esquelética, e dentre estes, uma parcela têm se mostrado responsivos ao treinamento de força. A proteína chamada Miostatina ou Fator-8 de crescimento e diferenciação (GDF-8) é conhecida por seu efeito repressor sobre o crescimento e desenvolvimento muscular esquelético (26, 27). A inibição/atenuação da expressão da Miostatina, ou ainda, alterações em proteínas que se relacionam com ela e atenuam seus efeitos (ex. redução da expressão do receptor ACTIIB; aumento da expressão do seu inibidor endógeno - Folistatina), são suficientes para promoverem aumentos significativos na massa muscular esquelética (28). Alguns estudos já mostraram a modulação da Miostatina e de proteínas relacionadas como as exemplificadas acima, após a aplicação de protocolos de treinamento de força (29-31). Estes estudos indicam que a via de sinalização que envolve essas proteínas pode estar relacionada com a hipertrofia observada com o treinamento de força.

Outra conhecida via de sinalização importante para o processo hipertrófico no músculo esquelético é a que envolve as proteínas PI3K/AKT/mTOR (32-34). A ativação desta via regula o processo de tradução protéica através de alvos *downstream* como a 4EBP1 e a S6K1. A fosforilação da 4EBP1 libera um fator de iniciação do processo de tradução (eIF4E) auxiliando na tradução dos RNA mensageiros (mRNA); enquanto que a ativação da S6K1 regula a biogênese de ribossomos, aumentando a disponibilidade destas estruturas para a célula. Juntos, estes eventos aumentam a capacidade de síntese da célula, o que cronicamente favorece o aumento da massa muscular. Recentemente, foi mostrado que protocolos de força e potência podem modular a expressão de genes relacionados à via AKT/mTOR (35). Outros estudos também já demonstraram os efeitos de protocolos de treinamento de força sobre a modulação desta via intracelular (36-38). Portanto, a modulação de vias hipertróficas promovida por protocolos de treinamento de força, pode explicar, pelo menos em parte, esta adaptação observada com o decorrer do treinamento.

Embora existam outros fatores envolvidos com as adaptações promovidas pelo treinamento de força como, fatores neurais e metabólicos; a identificação e caracterização de vias de sinalização intracelulares moduladas pelo treinamento de força são importantes para o melhor entendimento dos mecanismos que governam as adaptações promovidas por diferentes protocolos de treinamento. Além disto, estas vias não agem isoladamente para desencadear seus efeitos, mas em combinação umas com as outras, o que torna o entendimento das adaptações promovidas por diferentes protocolos de treino ainda mais complexo.

1.3 A influência da via WNT na regulação do trofismo muscular

Recentemente, uma via classicamente conhecida por estar envolvida em eventos de proliferação celular e com importante papel durante o período de desenvolvimento embrionário, tem apresentado envolvimento em modelos que promovem hipertrofia do músculo esquelético. Esta é a via que envolve os membros

da família WNT (*Wingless-type MMTV integration site family*). Membros da família WNT podem se ligar a diferentes tipos de receptores *Frizzled* e atuar através de diferentes vias de sinalização (39, 40). No entanto, existe um grupo de proteínas conhecidas como *secreted frizzled related proteins* (SFRPs) que possuem a capacidade de interagir com receptores *frizzled* e impedir a ligação da WNT, desta forma atuando como inibidores da via (41). Com a redução da interação ligante-receptor, a propagação do sinal é impedida de forma parcial ou total, refletindo na diminuição dos eventos em cascata.

Sobre a ligação da WNT a um complexo composto pelo receptor *Frizzled* e os coreceptores *low-density lipoprotein receptor-related protein-5 or -6* (LRP 5/6), um sinal é transduzido para a fosfoproteína citoplasmática *Dishevelled* (DVL) e a partir deste ponto, três vias independentes da WNT se tornam evidentes: uma “canônica”, uma “não canônica” e uma via “Wnt/Ca⁺⁺” (42, 43). Quando a via de sinalização canônica da WNT é ativada, a proteína citosólica β -catenina deixa de ser fosforilada por outras proteínas que fazem parte de um complexo de degradação (Axina, *Adenomatous polyposis coli* (APC), *Casein Kinase 1 α* (CK1 α) e *glycogen synthase kinase3 β* (GSK3 β)) possibilitando o seu acúmulo no citoplasma. Em maior concentração no citoplasma, a β -catenina pode ser translocada para o interior do núcleo celular, onde se liga aos fatores de transcrição *T-cell specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor-1* (TCF/LEF1) (Figura 3B). A ligação da β -catenina a estes fatores ativam a transcrição de genes alvo da via, dentre os quais podemos citar c-Myc e Ciclina D1 (44, 45). Na ausência de sinalização promovida pela WNT, a GSK3 β fosforila a β -catenina livre, que rapidamente é submetida à ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteassoma (Figura 3A) (46, 47).

Figura 3. Figura esquemática da via de sinalização canônica da WNT inativa (A) e na forma ativada (B). Adaptada de “Wnt signaling.”; David M. Eisenmann, 2005.

Nenhum estudo até o presente momento foi realizado envolvendo elementos da via WNT e protocolos de treinamento de força, em seres humanos. No entanto, um estudo usando modelo de treinamento em ciclo ergômetro analisou alguns elementos pertencentes a esta via de sinalização. Este estudo mostrou que de forma aguda, duas sessões de exercício realizado em ciclo ergômetro, foram capazes de diminuir o conteúdo protéico de β -catenina fosforilada (45). No entanto, cabe ressaltar que estes protocolos não são adequados para se avaliar o papel de vias hipertróficas em humanos.

Em um trabalho utilizando modelo de sobrecarga induzida por ablação sinérgica da pata posterior de camundongos foi mostrado que o conteúdo protéico de elementos chave da via de sinalização da WNT estava significativamente aumentado. Neste estudo, 7 dias de sobrecarga induzida promoveram um aumento de 67% no peso úmido do músculo plantar, enquanto que 14 dias de sobrecarga resultaram em um aumento de 139% no peso úmido deste músculo (46). Outro trabalho mostrou aumento significativo na expressão de alguns genes relacionados à via canônica da WNT, em modelo de camundongo *knockout* para o gene da Miostatina. Visto que a Miostatina é uma proteína expressa quase exclusivamente em tecido muscular esquelético e conhecida por reprimir o desenvolvimento e

crescimento muscular esquelético, este estudo sugere que elementos pertencentes à via da WNT podem estar envolvidos com o processo anabólico promovido pela inativação do gene da Miostatina (48).

Neste contexto, decidimos investigar o perfil de expressão de genes pertencentes à via de sinalização canônica da WNT em seres humanos, após o período de 8 semanas de treinamento de força máxima ou potência. Visto que protocolos de treinamento de força são conhecidos por promoverem em algum grau, hipertrofia dos músculos esqueléticos treinados, e que a via da WNT tem recentemente sido associada com o processo hipertrófico em experimentos realizados com animais de experimentação, a nossa hipótese é de que a via da WNT possa estar modulada em seres humanos quando aplicados procedimentos que reconhecidamente levam a hipertrofia muscular esquelética.

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram claramente que os protocolos de treinamento de força usados (TF e TP) foram capazes de induzir aumentos nos níveis de expressão de diversos genes pertencentes à via WNT. No entanto, o protocolo de potência foi exclusivo em alterar tanto o conteúdo protéico total de β -catenina, quanto os níveis de mRNA para o gene alvo Ciclina D1. Além disto, este protocolo ainda alterou a expressão de outros genes com maior magnitude quando comparado ao protocolo de força máxima. Neste contexto, estes resultados sugerem que, a via de sinalização da WNT foi ativada de maneira preferencial pelo protocolo de potência.

Este estudo fornece um aprofundamento sobre as bases moleculares de diferentes adaptações ao treinamento de força, promovidas por protocolos com características específicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Hoppeler H, Billeter R. [Structure and function of skeletal muscles]. *Ther Umsch*. 2003;60(7):363-70.
2. Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol*. 2001;115(5):359-72.
3. Fluck M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2003;146:159-216.
4. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001;294(5547):1704-8.
5. Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C, Kitano T, Baldwin KM, et al. Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *Faseb J*. 2001;15(7):1279-81.
6. Jagoe RT, Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001;4(3):183-90.
7. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*. 2004;14(3):395-403.
8. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):C834-43.
9. Stevenson EJ, Koncarevic A, Giresi PG, Jackman RW, Kandarian SC. Transcriptional profile of a myotube starvation model of atrophy. *J Appl Physiol*. 2005;98(4):1396-406.
10. Dreschler A. *The Weightlifting Encyclopedia*. A IS A Communications, Flushing, NY. 1998.
11. Moritani T. Neuromuscular adaptations during the acquisition of muscle strength, power and motor tasks. *J Biomech*. 1993;26 Suppl 1:95-107.
12. Moritani T, deVries HA. Neural factors versus hypertrophy in the time course of muscle strength gain. *Am J Phys Med*. 1979;58(3):115-30.
13. Moritani T, deVries HA. Potential for gross muscle hypertrophy in older men. *J Gerontol*. 1980;35(5):672-82.
14. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41(3):687-708.
15. Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2002;34(2):364-80.
16. Pincivero DM, Lephart SM, Karunakara RG. Effects of rest interval on isokinetic strength and functional performance after short-term high intensity training. *Br J Sports Med*. 1997;31(3):229-34.
17. Ratamess NA, Falvo MJ, Mangine GT, Hoffman JR, Faigenbaum AD, Kang J. The effect of rest interval length on metabolic responses to the bench press exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2007;100(1):1-17.
18. Ikai M, Fukunaga T. Calculation of muscle strength per unit cross-sectional area of human muscle by means of ultrasonic measurement. *Int Z Angew Physiol*. 1968;26(1):26-32.
19. Hakkinen K, Keskinen KL. Muscle cross-sectional area and voluntary force production characteristics in elite strength- and endurance-trained athletes and sprinters. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1989;59(3):215-20.
20. Chesley A, MacDougall JD, Tarnopolsky MA, Atkinson SA, Smith K. Changes in human muscle protein synthesis after resistance exercise. *J Appl Physiol*. 1992;73(4):1383-8.

21. MacDougall JD, Gibala MJ, Tarnopolsky MA, MacDonald JR, Interisano SA, Yarasheski KE. The time course for elevated muscle protein synthesis following heavy resistance exercise. *Can J Appl Physiol.* 1995;20(4):480-6.
22. Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans; 1997.
23. Dennis RA, Przybyla B, Gurley C, Kortebein PM, Simpson P, Sullivan DH, et al. Aging alters gene expression of growth and remodeling factors in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. *Physiol Genomics.* 2008;32(3):393-400.
24. Phillips SM, Tipton KD, Ferrando AA, Wolfe RR. Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover. *Am J Physiol.* 1999;276(1 Pt 1):E118-24.
25. Bickel CS, Slade J, Mahoney E, Haddad F, Dudley GA, Adams GR. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. *J Appl Physiol.* 2005;98(2):482-8.
26. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* 1997;387(6628):83-90.
27. McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(23):12457-61.
28. Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen JP. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(1):E157-64.
29. Willoughby DS. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(4):574-82.
30. Roth SM, Martel GF, Ferrell RE, Metter EJ, Hurley BF, Rogers MA. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228(6):706-9.
31. Hulmi JJ, Ahtiainen JP, Kaasalainen T, Pollanen E, Hakkinen K, Alen M, et al. Postexercise myostatin and activin IIb mRNA levels: effects of strength training. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(2):289-97.
32. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1014-9.
33. Pallafacchina G, Calabria E, Serrano AL, Kalhovde JM, Schiaffino S. A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(14):9213-8.
34. Park IH, Erbay E, Nuzzi P, Chen J. Skeletal myocyte hypertrophy requires mTOR kinase activity and S6K1. *Exp Cell Res.* 2005;309(1):211-9.
35. Lamas L, Aoki MS, Ugrinowitsch C, Campos GE, Regazzini M, Moriscot AS, et al. Expression of genes related to muscle plasticity after strength and power training regimens. *Scand J Med Sci Sports.* 2009.
36. Leger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Deriaz O, Crettenand A, et al. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol.* 2006;576(Pt 3):923-33.
37. Wilkinson SB, Phillips SM, Atherton PJ, Patel R, Yarasheski KE, Tarnopolsky MA, et al. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. *J Physiol.* 2008;586(Pt 15):3701-17.
38. Hulmi JJ, Tannerstedt J, Selanne H, Kainulainen H, Kovanen V, Mero AA. Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. *J Appl Physiol.* 2009;106(5):1720-9.

39. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 13):2627-34.
40. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell.* 2003;5(3):367-77.
41. Dennis S, Aikawa M, Szeto W, d'Amore PA, Papkoff J. A secreted frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates wnt-1 signaling. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 21):3815-20.
42. Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development.* 2005;132(20):4421-36.
43. Habas R. Canonical Wnt signaling: an unexpected new player. *Dev Cell.* 2006;11(2):138-9.
44. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J.* 1998;17(5):1371-84.
45. Sakamoto K, Arnolds DE, Ekberg I, Thorell A, Goodyear LJ. Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319(2):419-25.
46. Armstrong DD, Esser KA. Wnt/beta-catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289(4):C853-9.
47. Rochat A, Fernandez A, Vandromme M, Moles JP, Bouchet T, Carnac G, et al. Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy. *Mol Biol Cell.* 2004;15(10):4544-55.
48. Steelman CA, Recknor JC, Nettleton D, Reecy JM. Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy. *FASEB J.* 2006;20(3):580-2.