UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Efeitos de uma sessão de treinamento concorrente nos níveis de metilação e expressão de genes fatores regulatórios miogênicos

Guilherme Defante Telles

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Efeitos de uma sessão de treinamento concorrente nos níveis de metilação e expressão de genes fatores regulatórios miogênicos

Guilherme Defante Telles

São Paulo
2019

GUILHERME DEFANTE TELLES

Efeitos de uma sessão de treinamento concorrente nos níveis de metilação e expressão de genes fatores regulatórios miogênicos

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

Área de Concentração:
Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Ugrinowitsch

São Paulo

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: TELLES, Guilherme Defante.

Título: Efeitos de uma sessão de treinamento concorrente nos níveis de metilação e expressão de genes fatores regulatórios miogênicos.

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

Área de Concentração:
Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Ugrinowitsch

Data:__/__/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____**Julgamento:**_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____**Julgamento:**_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____**Julgamento:**_____

Dedico esse Trabalho primeiramente a Deus,
a Nossa Senhora, aos meus Pais
e a todos aqueles que, de alguma forma,
participaram de todo o meu processo
de formação até aqui.

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer outro agradecimento, preciso começar com todo e o maior agradecimento a Deus, Aquele que, através de Jesus Cristo e do Espírito Santo me conduziram até aqui, desde o momento da minha escolha por esse mestrado, como em cada segundo deste trabalho e da minha vida. Todas as pessoas aqui citadas foram colocadas por Deus em minha vida. Tudo isso é obra Dele, e para Ele, pois este trabalho e toda minha vida deve ser "pra que Ele cresça, e que Eu diminua. (João 3:30)". E de maneira também muito especial meu muito obrigado à minha mãezinha, Nossa Senhora, quem intercedeu por tudo que fiz e passou a frente de todos os meus planos em todo esse Caminho.

Obviamente será impossível falar especificamente de todos aqueles que eu gostaria de falar então, desde já, peço desculpas por resumir algo tão grande e importante pra mim.

Esse é um texto sobre amor, no seu sentido mais amplo, é claro. Por isso, não faltaram "eu amo você"s. E serão MUITOS "vocês"...

Esse trabalho é só uma pequena parte de um processo de 26 anos. E, nesse processo, eu agradeço de maneira infinita aos meus pais, que são os pilares da minha vida e que me formaram como a pessoa e profissional que sou. Seu Mandrake e Dona Carmen, muito obrigado por tudo que foram e são pra mim e por mim. Vocês são os maiores exemplos de pessoas que tenho e é em vocês e por vocês que me inspiro e luto todos os dias. Eu amo vocês, mais do que qualquer pessoa, de todo o coração, pra sempre. Isso, com certeza, não seria possível sem vocês. Obrigado por toda a luta, sacrifício, amor e carinho que sempre me deram. Meu muito obrigado também a toda minha família, tanto aqueles que ainda estão por aqui, como também aqueles que já se foram, mas que em algum momento fizeram parte deste processo. A todos, meu muito obrigado.

Meu muito obrigado a Olívia. Por todo o amor, refletido em todo o carinho, cuidado, paciência, suporte e apoio em todos os momentos desde o início desse caminho. Obrigado por caminhar ao meu lado, me fazer tão bem, por sempre me inspirar sendo a pessoa que você é, seguindo seu caminho com tanta coragem e, acima de tudo, fé. Obrigado por ser uma luz, enviada por Deus e que aponta sempre pra Deus na minha vida. Eu te amo muito!

Um obrigado também sem tamanhos para os meus amigos. Sou infinitamente agraciado por ter tantos bons amigos e posso dizer, com toda a certeza, que tenho os melhores do mundo. De maneira especial ao Thomaz, por ser um irmão que Deus colocou na minha vida, e que tenho

certeza que será para a vida toda. Obrigado por estar ao meu lado sempre, e por me fazer crescer sempre. Eu amo você Bill; Ao Guilherme Batista, parte desse "tripé", quem me ensinou e sempre ensina muito, sempre esteve ao meu lado, e continua a aumentar a minha autoestima em cada derrota no videogame. Obrigado por todo o apoio, carinho e presença. Eu amo você Bá; Aos irmãos que Deus me permitiu conhecer através da Igreja Católica: Ivan, Bia, Carlinhos, Karla, Chico, Rick, Eri, Júlio, Léo... Eu amo muito vocês! Obrigado ao Neto, por ser esse amigo, irmão, e por ter me dado a oportunidade de ser ainda mais, um compadre, nessa escolha com a querida Gabi! Eu amo vocês! Em especial obrigado ao Ivan, não só pela amizade de irmão, mas também pela ajuda com seus dons mágicos de edição de vídeo, em dois momentos muito especiais durante essa jornada, sendo decisivo pra conquistas extremamente importantes pra mim, no âmbito da divulgação científica. Te amo mano! São realmente muitos os nomes, vocês são incríveis. Obrigado, todos, por sempre me sustentarem, orarem por mim, e me levarem pra Deus. Eu amo vocês;

Aos amigos da EEFE-USP que tornaram todo esse processo bem mais legal, leve, engraçado e tão feliz. Em especial ao Cassaro, por ser esse cara com um coração sem igual, e que faz todo momento, do trabalho aos cafés procrastinadores (e quantos cafés...) se tornarem momentos sensacionais. Você é incrível, uma inspiração pra mim, tenha certeza disso! Eu amo você cara! Em especial também ao Ricardo e ao Manoel, por toda a presença, ajuda, risada e, principalmente, por abrirem as portas do cafofo pra eu poder ter um teto pra estar nos momentos paulistanos! Vocês são incríveis! Amo vocês! A todos os outros amigos: Jumes, Carlinha, Fabiano, Vick, Juarez, Igor, Joãozinho, Acácio, Telma, Lucas, Giba, Raquel... e tantos outros... vocês são demais!! Meu muito obrigado!!! Amo vocês! Aos amigos da FEF-UNICAMP, de maneira especial, ao João, por ter sido também um irmão pra mim durante todos esses anos. Obrigado por cada conversa, filosofia completamente inútil, risada e pelo apoio em tudo que fiz até aqui. Eu amo você; Ao Jack, por cada conselho, por cada conversa, pelas massagens "na amizade", por cada "Na realidade", pela bandana já não mais na cabeça, mas ainda no coração, e por sempre me fazer pensar diferente. Eu amo você; Ao Léo, por todo o apoio, oração, e por se fazer presente no meio desses velhos ex fefianos frustramente felizes. Você é sensancional, te amo! Meu muito obrigado aos participantes desse projeto que, com certeza, foram muito mais que isso. Tudo só aconteceu porque vocês são amigos de verdade! Por fim, misturado no grupo de amigos da da EEFE, da FEF...da vida, agradeço de forma muito especial ao Miguel. Obrigado por cada conversa, por compartilhar de ideais, por me fazer crescer a cada dia, a cada fala, profissional e, principalmente,

pessoalmente. Por cada vez que me perguntou: “O que queres pra tua vida”, por ter suportado 6 meses num cubículo em São Paulo... Pela paciência, pela humildade sem limites, por abrir portas pra mim, mais uma vez, agora pra que eu conhecesse a USP e por, mais uma vez, ter me ajudado no caminho rumo a terra dos cangurus. Eu te admiro muito, nunca se esqueça disso! Eu amo você! Obrigado também a Laís por, primeiramente, toda a amizade e carinho! Obrigado por toda a paciência comigo, por junto com o Miguel terem aberto as portas da casinha australiana por uma semana pra mim e por toda a presença na minha vida. Obrigado também por aguentar o Miguel, porque sei o quanto isso é digno de agradecimento. Obrigado por tudo. Eu amo você!

A todos os meus formadores, professores e aqueles quem me ensinaram algo na vida. Em especial, agradeço ao meu Professor e Orientador Carlos Ugrinowitsch, pela confiança em mim depositada, por todo apoio para que este trabalho acontecesse e por tudo que fez por mim, oferecendo grandes oportunidades pra que eu pudesse crescer profissionalmente, mas principalmente, como pessoa. Muito obrigado pela minha formação! Tenho certeza que ela foi a melhor que eu podia ter! Você é, não só pra mim, mas pra muita gente, um exemplo de profissional, de professor, de cientista e de pessoa. Muito obrigado mesmo por me permitir fazer parte desse time, por toda a preocupação, e por me ensinar tanto sobre essa carreira. Amo você professor! Meu muito obrigado a todos os formadores, por me fazerem gostar tanto da palavra “professor” a ponto de querer ser um de vocês. Espero poder carregar um pouquinho de cada um de vocês comigo a cada aula que eu der.

I am very thankful to everyone from the Australian Catholic University. John A. Hawley, thank you for accepting me again and giving to me an amazing opportunity in my academic life. Thank you very much Donny, for the opportunity, each teaching and your patience with me. I have no words to say how amazing you are, and how thankful I am to have met you! To Marcus, it will be in Portuguese: Muito obrigado por tudo, amigo! Você foi incrível em todos os momentos comigo durante os 6 meses que estive por aí. Espero vê-lo novamente em breve, e manter nossa amizade sempre! Muito obrigado! Thank you Sophie, Nat, Nolan, Billy, Sam, Bobby, John W., Bridget, Evelyn, Kathrin, Kathryn, Angela, Orly... Thank you very much for all. God bless each one of you. You are amazing and I hope to be back to Australia again very soon!

Por fim, meu muito obrigado também a todas as instituições que tornaram isso possível. À Universidade de São Paulo e a Escola de Educação Física e Esporte, por toda a estrutura acadêmico-científica. Obrigado ao CNPq, pelos primeiros meses de bolsa de estudos e meu muito

obrigado à FAPESP/CAPES, pelo apoio através do financiamento desse projeto com as bolsas de mestrado no país (processo número 2017/01297-8) e de estágio de pesquisa no exterior (processo número 2018/16513-0), por 6 meses, na Austrália. Nada disso seria possível sem essas instituições. Obrigado também a todo o mundo da comunicação cientifica que me foi apresentado durante esse tempo de mestrado. Obrigado ao British Council, organizador e idealizador do FameLab juntamente com tantas outras instituições, pelo prêmio e pela oportunidade de representar o Brasil no Reino Unido. Ao Euraxess pela oportunidade de estar na final do Science Slam Brasil. E a PRPG da USP, pelos prêmios no primeiro concurso vídeo pós-graduação.

“Pois é necessário que Ele cresça, e eu diminua.”

João 3, 30 - Bíblia

RESUMO

TELLES, G.D. **Efeitos de uma sessão de treinamento concorrente nos níveis de metilação e expressão de genes fatores regulatórios miogênicos.** 2019. 97 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo. 2019.

Problema: As respostas agudas dos níveis de metilação do DNA em genes miogênicos e relacionados à ativação das células satélites (CSs) podem ser mecanismos que expliquem o menor ganho de força e massa muscular, conhecido como efeito de interferência, após um período de treinamento concorrente (TC) comparado ao treinamento de força (TF) isolado. **Objetivo:** O presente estudo teve por objetivo determinar e comparar as mudanças induzidas por uma sessão de TC, TF e TA nos níveis de metilação e expressão gênica dos genes fatores regulatórios miogênicos, bem como o curso temporal de ocorrência dessas mudanças. **Métodos:** 9 homens destreinados participaram de um desenho experimental randomizado, contra balanceado e *cross over*, em que cada sujeito realizou uma sessão de TF, TA e TC, separados por uma semana de recuperação. A sessão de TF foi composta por 2 séries de 8-12 repetições máximas com intervalo de 60s, de cada um dos exercícios *Leg press* 45° e cadeira extensora. A sessão de TA foi composta por 4 minutos de aquecimento com intensidade de 50% da velocidade atingida no consumo máximo de oxigênio ($vVO_{2máx}$) durante o teste de $VO_{2máx}$, seguido de 12 *sprints* de 1 min à 100% da vVO2máx e intervalo de 1 minuto à 50% da vVO2máx. A sessão de TC foi composta pelo protocolo de TF seguido pelo protocolo de TA, com intervalo de 5 minutos entre eles. Foram obtidas 4 amostras de tecido muscular em cada sessão experimental, sendo uma coletada imediatamente antes do exercício (Pré), e outras 3 após o exercício (imediatamente, 4 horas e 8 horas após), totalizando 12 amostras por sujeito. **Resultados:** O gene MYOD1 apresentou menores níveis de metilação do DNA, após a sessão de TA, tanto 4H e 8H, em comparação com o momento PRÉ, como também no momento 8H em comparação ao momento 0H. Além disso, foi também encontrado um menor percentual de metilação 4H horas após a sessão de TA quando comparado a sessão de TF, no mesmo momento. Os níveis de metilação do DNA dos genes MYF5 e MYF6 diminuíram significantemente nos momentos 4H e 8H após as três condições (efeito principal de tempo), em comparação com os momentos PRÉ e 0H. A expressão de mRNA do gene MYOD1 mostrou-se aumentada 4H após as diferentes sessões de treinamento, quando comparada aos valores PRÉ exercício, e em 8H, quando comparada aos momentos PRÉ, 0H e 4H. O gene MYF5 mostrou, em todas as condições, níveis de mRNA menores no momento 4H quando comparados com o momento 0H, retornando a valores similares aos basaias com um aumento significante em 8H. A expressão de mRNA do gene MYF6 foi maior, em todas as condições, em 4H quando comparada aos momentos PRÉ e 0H. **Considerações finais:** Coletivamente, nossos resultados indicam que as mudanças agudas até 8 horas na metilaçao do DNA e na expressão de mRNA de genes MRFs pode não estar relacionadas diretamente com o efeito de interferência induzido pelo TC.

Palavras-chave: Epigenética; Efeito de interferência; Células Satélites; Treinamento Físico.

ABSTRACT

TELLES, G.D. **Effects of concurrent exercise on the methylation and gene expression levels of the myogenic regulatory factors.** 2019. 97 Pages. Dissertation (Master's in Science) – School of Physical Education and Sports, University of Sao Paulo. 2019.

DNA Methylation in myogenic genes related to satellite cells (SC) activation/proliferation/differentiation is a mechanism regarded to explain the lower muscle gains with concurrent exercise (CE) Training compared to resistance exercise (RE) Training alone, a phenomenon known as Interference Effect. Aim: To determine and compare the methylation and the mRNA expression levels of the myogenic regulatory factors (MyoD, Myf5, MYF6) and mitochondrial-related genes (PGC-1α, TFAM, PPAR-γ) after Resistance Exercise (RE), Endurance Exercise (EE) and Concurrent Exercise (CE). Methods: 9 untrained young men volunteered to participate in a randomized and counterbalanced cross over design. Each volunteer performed a bout of RE, EE and CE. The RE was consisted of 2 exercises (Leg Press 45 and Leg extension), 2x8-12 maximum repetitions with 60s rest. In the EE condition participants performed 12 x 1 min sprints at 100% of the vVO2max with 1 minute rest at 50% of vVO2max. In the CE condition participants performed the RE and EE routines in the same exercise session. Twelve muscle samples were taken: immediately before, and 3 times after each exercise session (immediately (0h), 4 hours and 8 hours). **Results:** MYOD1 presented lower levels of DNA methylation after the EE bout 4H and 8H when compared to PRE, as well as at 8H when compared to 0H. It was also found a lower methylation percentage 4H hours after EE when compared to RE at the same time point. MYF5 and MYF6 methylation levels decreased significantly at 4H and 8H after the three conditions (main effect of time) compared to PRE and 0H. MYOD1 mRNA expression was increased 4H after all training sessions, when compared to PRE exercise values, and also increased at 8H when compared to the PRE, 0H and 4H. There was also a main effect of time for MYF5 gene expression, which showed lower mRNA levels at 4H when compared to 0H, returning to baseline-like values with a significant increase in 8H. MYF6 gene mRNA expression was higher under all conditions at 4H compared to PRE and 0H. **Final considerations:** Collectively, our results indicate that the acute changes in DNA methylation and mRNA expression of MRFs genes up to 8 hours may not be directly related to the interference effect.

Key-words: Epigenetics; Interference Effect; Satellite Cells; Physical Training.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 OBJETIVOS 22

2.1 Obejtivo Geral 22

2.2 Objetivos Específicos 22

3 REVISÃO DA LITERATURA 23

3.1 Treinamento Concorrente - Adaptações 23

3.2 Efeito de interferência do Treinamento Concorrente 25

3.2.1 Interferência molecular 33

3.2.1.1 Papel das células satélites nas adaptações ao treinamento concorrente 37

3.2.1.2 Fatores regulatório miogênicos - Controle das células satélites e efeitos do treinamento concorrente 40

3.3 Alterações epigenéticas no exercício físico 43

3.3.1 Métodos de análise da metilação do DNA 45

3.3.2 Efeitos do treinamento concorrente na metilação do DNA 50

4. MÉTODOS 54

4.1 Participantes 54

4.2 Desenho Experimental 54

4.2.1 Sessão Experimental 55

4.3 Protocolos das sessões de treinamento 56

4.3.1 Sessão de Treinamento de Força 56

4.3.2 Sessão de Treinamento Aeróbio 56

4.3.3 Sessão de Treinamento Concorrente 56

4.4 Biópsia Muscular 57

4.5 Análises moleculares 57

4.5.1 Extração do RNA para RT-qPCR e de DNA para realização das análises de metilação do DNA 57
4.5.2 Análises de Metilação do DNA 58
4.5.2.1 Conversão por bisulfito e Pirosequenciamento 58
4.5.3 Análises de expressão gênica 59
4.5.3.1 Transcrição Reversa 59
4.5.3.2 PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) 59
4.6 Teste de Potência Aeróbia 59
4.7 Análise Estatística 60
5 RESULTADOS 61
5.1 Metilação do DNA 61
5.2 Expressão gênica 64
6 DISCUSSÃO 66
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 71
8 REFERÊNCIAS 72

1. INTRODUÇÃO

O treinamento físico é um estímulo estressor fisiológico capaz de induzir uma séries de adaptações diretamente relacionadas à melhoria da saúde, qualidade de vida e diminuição de riscos de morbimortalidade em diferentes populações (BLAIR *et al.*, 1996; MAEDA *et al.*, 2001; MYERS *et al.*, 2002; ACSM, 2011; WILLIS *et al.*, 2012; DENHAM *et al.*, 2014). Neste sentido, o *American College of Sports Medicine* (ACSM) recomenda a prática do protocolo de treinamento concorrente (TC), o qual é definido pela realização do treinamento do força (TF) juntamente ao treinamento aeróbio (TA) em um mesmo período (e.g. sessão, dia, semana) (BELL *et al.*, 2000; PUTMAN *et al.*, 2004; ACSM, 2011; DONGES *et al.*, 2012). O TC é muito recomendado devido à sua capacidade de induzir, simultaneamente, as adaptações comumente induzidas de forma isolada pelos TF e TA (HICKSON, 1980; LEVERITT *et al.*, 1999; MCCARTHY *et al.*, 2002; DONGES *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012; WILSON *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2014).

O TF produz adaptações neuromusculares, como o aumento da ativação do *pool* de unidades motoras e da hipertrofia muscular, aumentando a capacidade do músculo produzir força (CAMPOS *et al.*, 2002; MITCHELL *et al.*, 2013; BELLAMY *et al.*, 2014; NADER *et al.*, 2014). Por outro lado, o TA produz adaptações distintas ao TF (GRGIC *et al.*, 2019), como o aumento da densidade mitocondrial e angiogênese, resultando no aumento da capacidade cardiorrespiratória (e.g. potência aeróbia) (MAEDA *et al.*, 2001; COFFEY & HAWLEY, 2007; SLOTH *et al.*, 2013; KONOPKA *et al.*, 2014). Contudo, quando o TC é realizado, existem evidências que indicam que os ganhos de força e massa muscular são prejudicados em comparação ao TF isolado (i.e. realizado sem a adição do TA) (PUTMAN *et al.*, 2004; KARAVIRTA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2014; FYFE, BARTLETT*, et al.*, 2016; FYFE *et al.*, 2018), fenômeno denominado de efeito de interferência (DOCHERTY & SPORER, 2000). Ainda que esse efeito seja considerado um fenômeno de causa multifatorial (e.g. duração e volume dos protocolos de TF e TA), muitos estudos têm investigado possíveis mecanismos explicativos para sua ocorrência (DOCHERTY & SPORER, 2000; DONGES *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012; APRO *et al.*, 2013; FYFE *et al.*, 2014; PUGH *et al.*, 2015; ENGELKE *et al.*, 2016; FYFE, BISHOP*, et al.*, 2016; TERZIS *et al.*, 2016).

As adaptações decorrentes do TF e do TA são controladas por alterações moleculares após cada sessão de treino (e.g. transcrição de genes reguladores e síntese de proteínas) (PERRY *et al.*,

2010; EGAN & ZIERATH, 2013; HAWLEY *et al.*, 2014). Neste sentido, a hipertrofia muscular decorrente do TF (PERRY & RUDNICK, 2000; COFFEY & HAWLEY, 2007) é modulada por uma cascata de fosforilações proteicas, principalmente orquestradas pelo alvo da rapamicina em mamíferos complexo 1 (mTORC1) que culmina no aumento da síntese proteica miofibrilar após cada sessão de TF. Assim, baseado em algumas evidências demonstradas em modelo animal (ATHERTON *et al.*, 2005; THOMSON *et al.*, 2008), o efeito de interferência com o TC foi, primeiramente, majoritariamente atribuído à inibição do mTORC1, pela ativação da adenosina monofosfato-ativado proteína quinase (AMPK), induzida pelas sessões de TA adicionadas ao TF (ATHERTON *et al.*, 2005; BAAR, 2006; COFFEY & HAWLEY, 2007; HAWLEY, 2009; FYFE *et al.*, 2014). Contudo, essa hipótese não é devidamente sustentada nos estudos em modelo animal (MCGEE *et al.*, 2008), como também não é sustentada por nenhum estudo realizado em humanos até o momento (COFFEY, JEMIOLO*, et al.*, 2009; COFFEY, PILEGAARD*, et al.*, 2009; DONGES *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012; FYFE *et al.*, 2018). Contrariamente a hipótese, esses estudos não mostraram aumentos nos níveis de fosforilação da $AMPK^{thr172}$, nem de maneira aguda (i.e. após uma sessão de TC) (COFFEY, JEMIOLO*, et al.*, 2009; COFFEY, PILEGAARD*, et al.*, 2009; DONGES *et al.*, 2012), nem cronicamente (i.e. após um período de TC) (SOUZA *et al.*, 2012; FYFE *et al.*, 2018), mesmo quando um efeito de interferência foi observado na hipertrofia das fibras musculares do tipo I (FYFE *et al.*, 2018), indicando que outros mecanismos moleculares podem estar envolvidos na indução do efeito de interferência muscular.

Neste sentido, investigando outros mecanismos possivelmente envolvidos na produção do efeito de interferência ao TC, o estudo de DONGES *et al.* (2012) verificou que uma sessão de TF foi capaz de aumentar a transcrição do gene de diferenciação miogênica (MYOD) e da miogenina (MYOG), enquanto que a sessão de TC não alterou a expressão desses genes. O MYOD e a MYOG estão inseridos no conjunto de genes conhecidos como fatores regulatórios miogênicos (MRFs), juntamente com o fator miogênico 5 (MYF5) e o fator miogênico 6 (MYF6, ou também encontrado na literatura como MRF4) (WEINTRAUB, 1993; PSILANDER *et al.*, 2003; ROBERTS *et al.*, 2011; CALDOW *et al.*, 2015). Esses fatores desempenham um papel fundamental no processo de miogênese, controlando a proliferação e diferenciação celular do tecido muscular, tanto durante o desenvolvimento embrionário, bem como no período pós natal, durante o crescimento e regeneração do músculo esquelético adulto (PERRY & RUDNICK, 2000; WAGERS & CONBOY, 2005; ZANOU & GAILLY, 2013; ZAMMIT, 2017). Além disso, AGUIAR *et al.* (2013)

demonstraram, em animais, que existe uma correlação significante e positiva entre o aumento da expressão de mRNA dos genes MyoD (r = 0,85; p = 0,0001) e MyoG (r = 0,87; p = 0,0001) e da área de secção transversa (AST) muscular (i.e. hipertrofia muscular) induzida pelo TF. Em humanos, diversos autores também já demonstraram o aumento da expressão dos MRFs após uma sessão de TF, tanto em indivíduos destreinados (PSILANDER *et al.*, 2003; BICKEL *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005; ROBERTS *et al.*, 2011), como também após um período de TF (CALDOW *et al.*, 2015). Entretanto, corroborando com os resultados de DONGES *et al.* (2012), os estudos agudos de COFFEY, JEMIOLO*, et al.* (2009) e COFFEY, PILEGAARD*, et al.* (2009) também não observaram aumentos significantes na expressão de MYOD após uma sessão de TC. Uma vez que as adaptações musculares ao treinamento são o resultado de modulações moleculares agudas após cada sessão de exercício, coletivamente, os resultados mencionados indicam que a modulação aguda da expressão dos genes miogênicos que participam do processo de miogênese pode estar relacionada com o efeito de interferência induzido pelo TC.

Os MRFs desempenham papel importante na hipertrofia do músculo esquelético adulto por participarem do processo de ativação, proliferação e diferenciação das células satélites (CSs) musculares (MACKEY *et al.*, 2011; KONOPKA *et al.*, 2014). As CSs são células tronco do tecido muscular esquelético, mononucleadas, localizadas entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular à qual está associada (MAURO, 1961; MORESI *et al.*, 2015). Elas permanecem em um estado quiescente, são ativadas e se proliferam em resposta a diferentes estímulos intrínsecos e extrínsecos, como fatores de crescimento, estresse mecânico ou dano muscular induzido pelo exercício (CRAMERI *et al.*, 2004; MCKAY *et al.*, 2009; GRUBB *et al.*, 2014). O processo de ativação das CSs é controlado pela regulação dos MRFs e do gene paired box 7 (PAX7) (LE GRAND & RUDNICKI, 2007; MORESI *et al.*, 2015). As CSs ativadas expressam, primeiramente, o gene MYF5, o qual participa principalmente do processo de divisão e proliferação celular. A divisão celular das CSs acontece de maneira assimétrica, produzindo tanto células que não se diferenciam, mantendo a auto-renovação do *pool* de CSs, bem como produzindo mioblastos, os quais seguem o caminho miogênico (ZANOU & GAILLY, 2013). Os mioblastos em proliferação expressam então o gene MYOD, o qual induz a saída do ciclo celular, permitindo a posterior expressão de MYOG, iniciando então a diferenciação e a fusão às fibras musculares já existentes. No músculo esquelético adulto, o MYF6 então aparece expresso mais tardiamente, após as etapas de fusão e maturação, culminando na consequente doação de seus núcleos às fibras musculares

existentes, aumentando assim a capacidade de transcrição dessas células e, consequentemente, de sintetizar proteínas (HAWKE & GARRY, 2001; PALACIOS *et al.*, 2010; DUMONT *et al.*, 2015; CONCEICAO *et al.*, 2018). Como o acúmulo de proteína intracelular é o principal mecanismo a aumentar o volume da célula muscular (i.e. hipertrofia), é sugerido que a atividade das CSs é de fundamental importância para que esse processo ocorra em humanos (HAWKE & GARRY, 2001; PALACIOS *et al.*, 2010; DUMONT *et al.*, 2015; CONCEICAO *et al.*, 2018).

De fato, alguns estudos têm mostrado que a hipertrofia das fibras após um período de TF ocorre conjuntamente com um aumento tanto no número de CSs (agudo, após uma sessão de TF) quanto de mionúcleos nas fibras do tipo I e do tipo II (MACKEY *et al.*, 2011; BELLAMY *et al.*, 2014; CONCEICAO *et al.*, 2018). Contudo, BABCOCK *et al.* (2012) demostraram que, após uma sessão aguda de TC, o número de CSs por fibra muscular foi reduzido em 6%, em comparação aos valores obtidos antes da sessão. Assim, é possível que a ativação ou a proliferação das CSs seja menor quando uma sessão de TF é associada a uma sessão de TA (i.e. TC). Uma vez que é sugerido que as CSs desempenhem um papel importante principalmente no desenvolvimento de uma maior magnitude de hipertrofia muscular em longo prazo (MURACH *et al.*, 2018), pode-se hipotetizar que essa menor ativação aguda das CSs após cada sessão de TC seja um dos fatores explicativos da menor hipertrofia muscular induzida pelo TC, quando comparado ao TF isolado. Dado que todo o ciclo ativação, proliferação e diferenciação das CSs é a) controlado principalmente pelos MRFs, e que b) esses parecem ter suas expressões atenuadas após uma sessão de TC, é também plausível sugerir que os mecanismos que modulam a expressão desses genes após cada sessão de treinamento estejam colorariamente relacionados ao efeito de interferência. Porém, até o presente momento, nenhum estudo investigou quais são os mecanismos que podem estar envolvidos nessa inibição das CSs após uma sessão de TC.

Neste sentido, a literatura científica tem dado atenção a fatores epigenéticos que modulam o padrão de expressão de inúmeros genes no tecido muscular esquelético após cada sessão de exercício físico (MCGEE & HARGREAVES, 2011; TERRUZZI *et al.*, 2011; BARRES *et al.*, 2012; NITERT *et al.*, 2012; BRYAN *et al.*, 2013; EHLERT *et al.*, 2013; NTANASIS-STATHOPOULOS *et al.*, 2013; DENHAM *et al.*, 2014; LINDHOLM *et al.*, 2014; LING & RONN, 2014; PAREJA-GALEANO *et al.*, 2014; BOUCHARD, 2015; BROWN, 2015; KANZLEITER *et al.*, 2015; LOCHMANN *et al.*, 2015; MORESI *et al.*, 2015; VOISIN *et al.*, 2015; ZIMMER & BLOCH, 2015; BARRES & ZIERATH, 2016; DENHAM *et al.*, 2016; BAGLEY *et*

al., 2019; JACQUES *et al.*, 2019; TURNER *et al.*, 2019; WIDMANN *et al.*, 2019). A epigenética estuda as mudanças transcricionais e pós transcricionais causadas por mecanismos moleculares, independentemente de mudanças na sequência do DNA (TERRUZZI *et al.*, 2011; BARRES *et al.*, 2012; NITERT *et al.*, 2012; BRYAN *et al.*, 2013), que caracterizam as funções de cada tipo de célula (MORESI *et al.*, 2015). Dependendo de onde ocorrem, essas modificações podem permitir ou reprimir a expressão de genes específicos. Ainda que muitas sejam as mudanças epigenéticas conhecidas (KOUZARIDES, 2007), os estudos relacionados ao treinamento físico têm dado ênfase principalmente para a investigação do mecanismo de metilação do DNA (DENHAM *et al.*, 2014).

A metilação do DNA é o processo de adição de um grupamento metil à molécula do DNA que normalmente ocorre em citosinas seguidas por guaninas (CpG) (LISTER *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2011). Às regiões onde são encontradas CpGs em abundância são chamadas de Ilhas CpGs (LISTER *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2011) e, em geral, quando regiões específicas (e.g. região promotora e acentuassomo (i.e. regiões do DNA às quais proteínas específicas se ligam induzindo o aumento da expressão)) de genes ativos são metiladas, a expressão daquele gene é reprimida (BIRD, 2002; BOCK *et al.*, 2010; KANZLEITER *et al.*, 2015). Assim, mudanças nos níveis de metilação do DNA podem modular as alterações no perfil da transcrição de genes e níveis de proteínas que geram as respostas adaptativas ao treinamento físico (DENHAM *et al.*, 2014).

Especificamente quanto ao músculo esquelético, sabe-se que a metilação do DNA é um importante regulador da transcrição dos MRFs e do PAX7 (CHAO *et al.*, 2016) (LAKER & RYALL, 2016). Alguns trabalhos com modelos celulares (e.g. linhagem miogênica C2C12) suportam o papel da metilação do DNA na diferenciação miogênica, sugerindo que a demetilação do DNA em células já destinadas à linhagem miogênica pode induzir uma estrutura permissiva da cromatina, tornando os promotores de genes miogênicos acessíveis à ligação de fatores de transcrição musculares específicos (SCARPA *et al.*, 1996; HUPKES *et al.*, 2011), que promovem a expressão de genes como MYOD, MYOG e o MYF5 (SCARPA *et al.*, 1996; MONTESANO *et al.*, 2013), e a consequente diferenciação celular.

Já em humanos, estudos recentes investigaram os efeitos do TF na metilação do DNA no músculo esquelético (LAKER *et al.*, 2017; ROBINSON *et al.*, 2017; SEABORNE *et al.*, 2018; TURNER *et al.*, 2019). O elegante estudo de SEABORNE *et al.* (2018), por exemplo, demonstrou que genes específicos, dentre os quais o TRAF1, relacionado a proliferação e diferenciação de CSs musculares, sofreram demetilação significante 30 minutos após uma sessão de TF em indivíduos

previamente destreinados. Interessantemente, esses níveis reduzidos de metilação foram mantidos tanto após um período de sete semanas de TF, como também após sete semanas de destreinamento e, posteriormente, após mais sete semanas de re-treinamento. Ao final de 22 semanas, tanto a expressão de mRNA desses genes, bem como a hipertrofia muscular, mostraram-se significantemente aumentadas. Apesar dos autores não especificarem em que momento após a última sessão de treinamento de cada período (i.e. treinamento, destreinamento e re-treinamento) aconteceram as biópsias musculares, esses resultados indicam que as mudanças agudas induzidas por uma sessão de TF nos níveis de metilação do DNA, especificamente desses genes, podem ser mais estáveis (i.e. duram por mais tempo), sendo consideradas pelos autores como possíveis biomarcadores da hipertrofia muscular induzida pelo TF mais sensíveis que a própria expressão aguda desses genes.

Por outro lado, a grande maioria dos estudos que investigou os efeitos do treinamento físico aguda e cronicamente nos níveis de metilação do DNA, até o momento, utilizou apenas o TA como intervenção (ALIBEGOVIC *et al.*, 2010; BARRES *et al.*, 2012; NITERT *et al.*, 2012; BRYAN *et al.*, 2013; LINDHOLM *et al.*, 2014; BAJPEYI *et al.*, 2017). O estudo de Barres et al. BARRES *et al.* (2012) mostrou que, de maneira aguda, uma sessão de TA foi capaz de diminuir os níveis de metilação (i.e. demetilação) global do DNA, bem como de genes específicos no músculo esquelético de humanos, e que essa diminuição acontece concomitantemente à expressão dos genes demetilados. Ou seja, genes relacionados à biogênese mitocondrial e ao metabolismo aeróbio (i.e. PGC-1α, PPAR-δ, TFAM, CS e PDK4) sofreram demetilação significante acompanhada de aumento da expressão também significante de mRNA, principalmente quando a sessão de TA é realizada em alta intensidade (i.e. 80% do $VO_{2máx}$), indicando que a expressão de genes induzida por uma sessão aguda de TA parece ser dependente da demetilação de regiões específicas dos genes expressos. Porém, os resultados do estudo mostraram que não houve demetilação significante do gene miogênico MYOD1, e que sua expressão não foi aumentada após a sessão de TA em alta intensidade. Diante desses achados, é possível sugerir que a adição da sessão de TA as sessões de TF, no protocolo de TC, pode atenuar a demetilação dos genes MRFs, bem como suas consequentes transcrições, prejudicando o processo de ativação, proliferação e diferenciação das CSs e, consequentemente, contribuindo para a atenuação da magnitude da hipertrofia muscular após um período de TC. Contudo, até o presente momento, apenas o trabalho de ROBINSON *et al.* (2017) investigou os efeitos do TC, bem como dos protocolos de TA e TF isolados, na metilação do DNA

no músculo esquelético humano. Ainda que esse estudo não tenha demonstrado diferenças significantes na metilação após os três protocolos de treinamento, é importante salientar que o tecido muscular foi coletado apenas antes do período de treinamento e 72 horas após a última sessão de exercícios, tempo o qual pode ser tardio para analisar as mudanças mais transientes na metilação do DNA importantes para a adaptação ao treinamento físico (LAKER *et al.*, 2017; ROBINSON *et al.*, 2017). Porém, nenhum estudo demonstrou qual a dinâmica do curso temporal da metilação do DNA, juntamente com a expressão gênica, após uma sessão de diferentes protocolos de treinamento físico, incluindo o TC. Além disso, o protocolo de TC prescrito por ROBINSON *et al.* (2017) foi composto por componentes de TF e TA diferentes dos protocolos realizados isoladamente, não permitindo a comparação direta dos resultados entre os grupos. Diante disso, o presente estudo teve por objetivo determinar e comparar as mudanças induzidas por uma sessão aguda de TF, TA e TC nos níveis de metilação do DNA região-específica e expressão gênica de genes fatores regulatórios miogênicos (MYOD1, MYF5 e MYF6) bem como o curso temporal dessas mudanças. A hipótese do presente trabalho é que a adição da sessão de TA ao TF atenuará a demetilação dos genes miogênicos que modulam a ativação, proliferação e diferenciação das CSs, em comparação com o TF isolado, interferindo consequentemente no padrão da expressão desses genes, o que pode ser um dos mecanismos que participam da indução do efeito de interferência após um período de TC.

2. OBJETIVOS

2.1. Obejtivo Geral

Determinar e comparar as mudanças induzidas por uma sessão de TF, TA e TC nos níveis de metilação do DNA e expressão gênica de genes fatores regulatórios miogênicos, bem como o curso temporal de ocorrência dessas mudanças.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar e comparar os níveis de metilação médio de regiões específicas dos genes fatores regulatórios miogênicos MYOD1, MYF5 e MYF6 após uma sessão de treinamento de força, de treinamento aeróbio e de treinamento concorrente.
- Determinar e comparar os níveis de expressão dos genes fatores regulatórios miogênicos MYOD1, MYF5, MYF6 após uma sessão de treinamento de força, de treinamento aeróbio e de treinamento concorrente.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Com a finalidade de melhor entender a problemática do efeito de interferência do treinamento concorrente, seus possíveis mecanismos, como também o possível papel da metilação do DNA na indução desse fenômeno, a presente revisão de literatura tem por objetivo, primeiramente, apresentar as adaptações aos treinamentos de força e aeróbio, bem como os efeitos adaptativos da combinação desses dois métodos no protocolo de treinamento concorrente. Posteriormente, será discutido o efeito de interferência e as principais teorias que tentam explicar esse fenômeno até o presente momento. Por fim, será apresentada a temática da epigenética, seus principais tópicos de estudo, destacando a metilação do DNA, mecanismo central proposto no presente trabalho como possível novo nível de abordagem para explicar o efeito de interferência do treinamento concorrente.

3.1. Treinamento Concorrente - Adaptações

O treinamento físico é um estímulo capaz de induzir alterações sistêmicas importantes para a saúde em geral (ACSM, 2011), relacionadas com menores riscos de doenças, com a diminuição da morbimortalidade, além da melhora do desempenho de atletas (BLAIR *et al.*, 1996; ACSM, 1998; BELARDINELLI *et al.*, 1999; ACSM, 2002; MYERS *et al.*, 2002; ACSM, 2003; IESTRA *et al.*, 2005; ACSM, 2009; GARBER *et al.*, 2011; MOORE *et al.*, 2012). Neste sentido, as principais recomendações internacionais para prescrição do treinamento para diferentes populações sugerem a realização do treinamento concorrente (TC) devido à sua capacidade de produzir adaptações neuromusculares (e.g. maiores níveis de força e massa muscular) e cardiorrespiratório (e.g. aumento da potência aeróbia) conjuntamente (ACSM, 2011). O TC é caracterizado pela realização, em um mesmo período de tempo, de dois protocolos de treinamento amplamente investigados e conhecidos por produzirem diferentes efeitos: o treinamento de força (TF) e o treinamento aeróbio (TA) (PUTMAN *et al.*, 2004; DONGES *et al.*, 2012).

O Treinamento de Força (TF) é capaz de induzir um conjunto de adaptações neurais (e.g. aumento do *pool*, da frequência de disparo e da sincronização de unidades motoras; diminuição do déficit de ativação central) e morfológicas (e.g. aumento da área de secção transversa (AST) muscular, do ângulo de penação das fibras musculares e do comprimento do

fascículo, rigidez músculo-tendínea) que aumentam a capacidade de trabalho (i.e. capacidade de produzir força) do músculo esquelético (KAWAKAMI *et al.*, 1993; PHILLIPS *et al.*, 1997; CAMPOS *et al.*, 2002; ZAMPARO *et al.*, 2002; BOJSEN-MOLLER *et al.*, 2005; BODINE, 2006; GABRIEL *et al.*, 2006; FOLLAND & WILLIAMS, 2007; VERDIJK *et al.*, 2009; MITCHELL *et al.*, 2012; MITCHELL *et al.*, 2013; DAMAS *et al.*, 2016; ROBERTS, 2016; SUCHOMEL *et al.*, 2018). De fato, diferentes protocolos de TF, principalmente quando realizados em alta intensidade, até a falha concêntrica nos exercícios (CAMPOS *et al.*, 2002; MITCHELL *et al.*, 2012; SCHOENFELD, PETERSON*, et al.*, 2015), têm se mostrado eficazes no aumento da AST e da força muscular, mesmo com modulações em variáveis como o volume (CAMPOS *et al.*, 2002; MITCHELL *et al.*, 2012; SCHOENFELD *et al.*, 2017) e a frequência (SCHOENFELD, RATAMESS*, et al.*, 2015; DANKEL *et al.*, 2017) de treinamento. Entretanto, apesar desses efeitos bem consolidados, o TF tem pouco ou nenhum efeito sobre a potência aeróbia (CAMPOS *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2014). Por outro lado, o TA é um método efetivo para induzir adaptações no sistema cardiorrespiratório (SUOMINEN *et al.*, 1977; DANIELS *et al.*, 1978; MAEDA *et al.*, 2001; BARNETT *et al.*, 2004) a partir de um somatório de mudanças centrais e periféricas (DOCHERTY & SPORER, 2000) que culminam no aumento da potência e da capacidade aeróbia. Muitos estudos mostram que o TA induz a aumentos de variáveis como o $VO_{2máx}$, economia de exercício, limiar de lactato e cinética de consumo de oxigênio (JONES & CARTER, 2000; BURGOMASTER *et al.*, 2008; GIBALA *et al.*, 2012), principalmente quando realizado em alta intensidade, de maneira intervalada (HELGERUD *et al.*, 2007; BURGOMASTER *et al.*, 2008; GIBALA & HAWLEY, 2017). Porém, contrariamente ao TF, o TA produz pouco ou nenhum efeito na força e hipertrofia muscular (KRAEMER *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2014; FYFE *et al.*, 2018; GRGIC *et al.*, 2019).

Apesar dos efeitos produzidos pelo TF e o TA serem considerados opostos (FYFE *et al.*, 2014; COFFEY & HAWLEY, 2016), a literatura científica tem constantemente demonstrado que o TC é uma estratégia efetiva para produzir ambas as adaptações provenientes dos protocolos isolados (LEVERITT *et al.*, 1999; BELL *et al.*, 2000; BALABINIS *et al.*, 2003; HAKKINEN *et al.*, 2003; GLOWACKI *et al.*, 2004; CADORE, IZQUIERDO, PINTO*, et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012; WILSON *et al.*, 2012; LIBARDI *et al.*, 2015; FYFE, BARTLETT*, et al.*, 2016). O estudo de BELL *et al.* (2000), por exemplo, demonstrou aumentos significantes no $VO_{2máx}$ absoluto (homens: 6,3%; mulheres: 7,3%), na força muscular no teste de uma repetição máxima (1-RM)

para os exercícios *Leg press* (homens: 37%; mulheres: 83,8%) e extensão de joelho (homens: 21,5%; mulheres: 41%), bem como na AST das fibras do tipo I e II em jovens submetidos a um protocolo de TC, seis vezes por semana, durante 12 semanas. No mesmo sentido, mas com um período de intervenção maior, HAKKINEN *et al.* (2003) demonstraram que 21 semanas de TC aumentaram significantemente tanto o $VO_{2máx}$ (18,5%), como também a carga do teste de 1-RM (22%), a força isométrica máxima (21%) e a AST do quadríceps femoral de todos os tipos fibras analisados (I: 13,4%, IIa: 22,9% e IIx: 31,4%). Além desses trabalhos com intervenções mais longas, SOUZA *et al.* (2012) demonstraram que a realização de apenas 8 semanas de um protocolo de TC foi também capaz de produzir tanto aumentos do $VO_{2máx}$ (5%), quando comparado com o controle, como também da força muscular no teste de 1-RM no exercício *Leg press* (6,2%) e da AST do quadríceps (7,8%), do momento pré para o momento após oito semanas. Porém, ainda que esses e outros estudos (WOOD *et al.*, 2001; MCCARTHY *et al.*, 2002; BALABINIS *et al.*, 2003; GLOWACKI *et al.*, 2004; CADORE *et al.*, 2010; LIBARDI *et al.*, 2011; FYFE, BARTLETT*, et al.*, 2016) demonstrem a efetividade do TC na produção de ambas as adaptações específicas ao TF e ao TA, existem evidências de que a magnitude dos ganhos neuromusculares induzidos pelo TC é diferente daquela produzida pelo TF realizado de forma isolada (i.e. sem adição do TA) (HICKSON, 1980; DOCHERTY & SPORER, 2000; WILSON *et al.*, 2012; FYFE *et al.*, 2014; TERZIS *et al.*, 2016).

3.2. Efeito de interferência do Treinamento Concorrente

O primeiro trabalho a investigar as diferenças nas adaptações entre o TC e o TF realizado isoladamente foi o de HICKSON (1980). Nesse clássico, os participantes foram divididos em três grupos (Treinamento aeróbio (TA), Treinamento de força (TF) e Treinamento concorrente (TC)), de forma que o TF foi realizado cinco vezes por semana, o TA seis vezes por semana e o TC realizou ambos os protocolos. Ao final das 10 semanas de intervenção, os autores observaram que, apesar do TC induzir aumentos tanto no VO_{2max} (23% na bicicleta e 17% na esteira), como também na força muscular no teste de 1-RM no agachamento (25%), o aumento da força muscular foi significantemente maior para o grupo que realizou o TF isoladamente (44%), sendo essa a primeira evidência do efeito de interferência decorrente do TC. A partir dos achados de HICKSON (1980), um grande número de estudos investigou o efeito de interferência, a partir de diferentes

desenhos experimentais (BELL *et al.*, 2000; MCCARTHY *et al.*, 2002; BALABINIS *et al.*, 2003; HAKKINEN *et al.*, 2003; GLOWACKI *et al.*, 2004; CADORE *et al.*, 2010; BABCOCK *et al.*, 2012; CADORE, IZQUIERDO, PINTO*, et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2014; FYFE, BARTLETT*, et al.*, 2016; FYFE *et al.*, 2018).

Dentre os diferentes estudos posteriores, muitos obtiveram achados que convergem com os resultados de HICKSON (1980) (DUDLEY & DJAMIL, 1985; KRAEMER *et al.*, 1995; BELL *et al.*, 2000; PUTMAN *et al.*, 2004; CHTARA *et al.*, 2008; KARAVIRTA *et al.*, 2011; WILSON *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2014; FYFE *et al.*, 2018). No estudo de BELL *et al.* (2000), citado anteriormente, o aumento da força muscular no teste de 1-RM para o exercício extensão do joelho foi significantemente menor para o grupo TC quando comparado ao grupo que realizou o TF isoladamente (homens: 21,5% para o TC vs 32% para o TF; mulheres: 41% para o TC vs 58% para o TF). Além disso, SOUZA *et al.* (2014) demonstraram prejuízos também na adaptação das fibras musculares. Nesse trabalho, oito semanas de TF produziram aumentos significantes nas áreas das fibras tipo I (17.9%) e tipo IIa (17.08%), enquanto o mesmo período de TC não foi capaz de aumentar significantemente a área de nenhum dos tipos de fibra analisados. Entretanto, ainda que exista um considerável número de evidências que mostrem ganhos neuromusculares atenuados após o TC em comparação ao TF, outros autores falharam em demonstrar o efeito de interferência (SALE *et al.*, 1990; BELL *et al.*, 1991; MCCARTHY *et al.*, 1995; LUNDBERG *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012; LUNDBERG *et al.*, 2014; KAZIOR *et al.*, 2016). No trabalho de SOUZA *et al.* (2012), citado anteriormente, o TC e o TF produziram aumentos similares na carga de 1-RM no exercício *leg press* (TC: 17,6%; TF: 18,5%), como também na AST do quadríceps das pernas direta e esquerda dos participantes (TC: 7,8% e 7,5%; TF: 6.2% e 5,5%, respectivamente). No mesmo sentido, recentemente KAZIOR *et al.* (2016) demonstraram que um curto período de TC (sete semanas), além de produzir aumento significante e similar na força muscular no teste de 1-RM comparado ao TF (29,5% vs 30%), aumentou de maneira significante a área das fibras tipo I (25%), IIA (26%) e IIX (15%), enquanto o TF produziu aumentos significantes apenas na área das fibras IIA (7%) e IIX (10%). Conjuntamente, esses resultados evidenciam que não há um consenso na literatura com relação ao efeito de interferência. Devido a isso, uma série de estudos passou a discutir quais variáveis poderiam estar relacionadas à ocorrência do fenômeno da interferência do TC (LEVERITT *et al.*, 1999; DOCHERTY & SPORER, 2000; HAWLEY, 2009; FYFE *et al.*, 2014; FYFE & LOENNEKE, 2018).

As discrepâncias nos resultados obtidos entre os estudos que investigaram o TC comparando seus efeitos aos do TF podem ser consequência de uma série de questões metodológicas intra e inter estudos. Uma vez que as adaptações aos diferentes protocolos de TA e TF estão intimamente atreladas às variáveis ligadas direta ou indiretamente ao treinamento físico, é plausível sugerir que a ocorrência do efeito de interferência esteja também atrelada a essas variáveis (FYFE *et al.*, 2014; COFFEY & HAWLEY, 2016; FYFE & LOENNEKE, 2018). Neste sentido, FYFE & LOENNEKE (2018) destacou a importância de considerar também as variáveis relacionadas indiretamente aos protocolos de treinamento, como o estado de treinamento dos indivíduos (FERNANDEZ-GONZALO *et al.*, 2013) e o curso temporal da ocorrência das adaptações de força e hipertrofia (HICKSON, 1980; HAKKINEN *et al.*, 2003) ao analisar o fenômeno do efeito de interferência nos diferentes estudos. Já em relação às variáveis do treinamento, variações dos protocolos de TA (i.e. volume (RONNESTAD *et al.*, 2011; JONES *et al.*, 2013), intensidade (SILVA *et al.*, 2012; FYFE *et al.*, 2018; WAY *et al.*, 2019), modalidade (SOUZA *et al.*, 2012; KAZIOR *et al.*, 2016)), e de TF (HICKSON, 1980; HUNTER *et al.*, 1987; KRAEMER *et al.*, 1995; BELL *et al.*, 2000; RONNESTAD *et al.*, 2011) além de mudanças na ordem (CHTARA *et al.*, 2008; CADORE, IZQUIERDO, ALBERTON*, et al.*, 2012; CADORE, IZQUIERDO, PINTO*, et al.*, 2012) e no tempo de pausa entre o TF e o TA (SALE *et al.*, 1990), como também na duração das intervenções (BELL *et al.*, 2000; MIKKOLA *et al.*, 2012; KAZIOR *et al.*, 2016) são diferenças muito evidentes entre os estudos que investigaram o efeito de interferência. Em uma meta-análise, WILSON *et al.* (2012), demonstraram que, de fato, a modalidade do treinamento aeróbio se mostra um fator importante para a ocorrência da interferência, sendo que o TA com corrida produziu interferência na força e na hipertrofia, mas não a produziu com a bicicleta. Os autores discutem que a maior semelhança biomecânica do TA em bicicleta com a maioria das medidas de força realizadas nos estudos revisados pela meta-análise, bem como o maior componente concêntrico relacionado à realização do TA em bicicleta, são duas possíveis razões para explicar esse achado. Além disso, a partir dos estudos analisados, os autores encontraram também uma correlação inversa da hipertrofia muscular tanto com o volume, quanto com a frequência do componente TA. Assim, essas variações nos desenhos experimentais, juntamente com a escolha das variáveis dependentes e os diferentes métodos utilizados para analisá-las, limitam a comparação entre os resultados de diferentes estudos (DOCHERTY & SPORER, 2000; FYFE *et al.*, 2014).

Neste sentido, com o objetivo de propor um modelo para investigar o fenômeno da interferência, DOCHERTY & SPORER (2000) reuniram um conjunto de achados da literatura científica até aquele momento e propuseram a existência de um modelo de "Zona de Interferência". Esse modelo está baseado na manipulação, basicamente, do volume e da intensidade do TA e do TF. Segundo os autores, a interferência seria maximizada a partir da realização de protocolos de TF de alta intensidade, em uma zona de 8-12 repetições máximas (RM), juntamente com o TA, também em alta intensidade (95-100% $VO_{2máx}$) e, consequentemente, baixo volume. Esse modelo se baseia na teoria de que, a partir dos estudos revisados pelos autores, ambos esses protocolos de TF e TA induzem estímulos em nível mais periférico no músculo esquelético a partir de mecanismos diferentes e divergentes. Nessa situação, o músculo teria demandas adaptativas fisiológicas opostas e, por consequência, reduziria a adaptação de um dos sistemas. De fato, uma parte dos estudos que demonstrou algum tipo de efeito de interferência nas adaptações neuromusculares ao TC utilizaram exatamente sessões de TF de alta intensidade juntamente com sessões de TA também de alta intensidade (e.g. *High Intensity Interval Training (HIIT)*) para compor o protocolo de TC (DUDLEY & DJAMIL, 1985; SOUZA *et al.*, 2014; FYFE, BISHOP*, et al.*, 2016; TSITKANOU *et al.*, 2017; FYFE *et al.*, 2018). Por outro lado, outros estudos mostraram a ocorrência do fenômeno de interferência também após um protocolo de TC composto por sessões de TA contínuo, em baixa intensidade (HAKKINEN *et al.*, 2003; KARAVIRTA *et al.*, 2011). Alguns trabalhos que também demonstraram algum tipo de interferência utilizaram ainda ambos os protocolos de TA (i.e. alta intensidade intervalado e moderada intensidade contínuo) para compor o modelo de TC (KRAEMER *et al.*, 1995; BELL *et al.*, 2000; PUTMAN *et al.*, 2004). Com o objetivo de elucidar exatamente o potencial papel da intensidade do TA na produção do efeito de interferência, os estudos de FYFE, BARTLETT*, et al.* (2016) e FYFE *et al.* (2018), demonstraram que tanto o TC incorporando o TA de alta intensidade, como também o TC incorporando o TA de moderada intensidade (com trabalho equalizado entre ambos os protocolos), induzem uma atenuação similar nos ganhos de força muscular (medida pelo teste de 1-RM) e de potência dos membros inferiores (i.e. salto com contramovimento), comparados com o TF. Porém, os resultados também mostram que a adição do TA de alta intensidade pode comprometer mais os ganhos de massa magra do que a adição de TA de moderada intensidade. Assim, considerando essas variáveis, uma série de estudos utilizou de diferentes desenhos experimentais a fim de descrever os mecanismos associados à mitigação das adaptações neuromusculares ao TC

(LEVERITT *et al.*, 1999; DOCHERTY & SPORER, 2000; SPORER & WENGER, 2003; DE SOUZA *et al.*, 2007; CADORE, IZQUIERDO, DOS SANTOS*, et al.*, 2012; CADORE, IZQUIERDO, PINTO*, et al.*, 2012). As possíveis explicações para o efeito de interferência são classicamente divididas em três hipóteses: A hipótese do overtraining, a hipótese aguda, e a hipótese crônica (LEVERITT *et al.*, 1999).

A hipótese do overtraining (i.e. exposição e acumulação excessivas às sobrecargas de treinamento, com tempos de recuperação inadequados, que resultam em pioras crônicas da capacidade de desempenho dos indivíduos. (LEVERITT *et al.*, 1999; ARMSTRONG & VANHEEST, 2002; HALSON & JEUKENDRUP, 2004; KREHER & SCHWARTZ, 2012; MEEUSEN *et al.*, 2013)) propõe que o possível fator causador do efeito de interferência seria o excesso de volume de treinamento imposto pelos protocolos de TC. Porém, DOCHERTY & SPORER (2000) discutem que essa hipótese (i.e. overtraining) pode indicar uma simplificação excessiva de um fenômeno complexo, além de ser pouco sustentada por dados empíricos. Diferentemente do conceito de overtraining, os estudos que mostraram algum tipo de interferência não mostraram pioras crônicas de desempenho nas variáveis neuromusculares. Na realidade, esses estudos mostraram que ambos os protocolos de TF e TC induzem às adaptações neuromusculares mencionadas, porém com uma diferença na magnitude dessas adaptações (sendo maior quando o TF é realizado isoladamente, em comparação ao TC). Os dois clássicos estudos de HICKSON (1980) e de DUDLEY & DJAMIL (1985), por exemplo, observaram uma menor magnitude no aumento da força muscular para o grupo TC, em comparação ao TF. Porém, em ambos os estudos não houve piora de rendimento dos grupos TC, mesmo que DUDLEY & DJAMIL (1985) tenham utilizado um volume de treinamento consideravelmente menor em relação ao estudo pioneiro. Ainda que utilizando de avaliações da força muscular diferentes (HICKSON (1980) mediram a força pelo teste de 1-RM, enquanto DUDLEY & DJAMIL (1985) mensuraram o pico de torque de extensão de joelho em sete diferentes velocidades angulares), esses resultados, juntamente com as outras evidências do efeito de interferência presentes na literatura, indicam que a hipótese do overtraining pode não ser a melhor explicação para o fenômeno da interferência.

A hipótese aguda, por sua vez, sugere que a capacidade de desenvolver força durante o componente TF nos protocolos de TC é prejudicada pela fadiga residual produzida pela realização do TA (LEVERITT *et al.*, 1999; DE SOUZA *et al.*, 2007). Proposta inicialmente por CRAIG *et al.* (1991), a hipótese aguda não sugere que a adição do TA ao TF no TC produza menores ganhos na

força muscular diretamente, mas sim uma pior qualidade na execução do componente TF, causado pela fadiga residual produzida pela(s) sessão(ões) anterior(es) de TA, diminuindo o nível de tensão muscular nos exercícios resistidos, fato que pode prejudicar as adaptações provenientes do TF. Testando a presente hipótese, SPORER & WENGER (2003) demonstraram prejuízos agudos na resistência de força (i.e. máximo de repetições realizadas em um exercício em uma determinada carga) em até 8 horas após uma sessão de TA em bicicleta, independentemente do tipo de exercício aeróbio realizado (i.e. contínuo - 36 minutos à 70% da potência máxima no $VO_{2máx}$ ou intervalado - 6 séries de 3 minutos à 85-100% da potência máxima no $VO_{2máx}$, separadas por 3 minutos de recuperação à 40% da mesma potência). Por outro lado, LEVERITT *et al.* (2000) demonstraram que uma sessão de TA realizada em bicicleta (50 minutos, 70-110% da potência crítica) não promoveu prejuízos agudos no pico de torque em nenhuma das velocidades mensuradas no teste isocinético. Esses resultados controversos parecem estar também relacionados com os protocolos de TA e testes de TF empregados nos diferentes estudos. DE SOUZA *et al.* (2007), por exemplo, demonstraram que, enquanto um protocolo TA intervalado e de alta intensidade produziu interferência na resistência de força no exercício *leg press*, bem como apresentou uma tendência a diminuir a força máxima no teste de 1-RM no mesmo exercício, um protocolo de TA contínuo não produziu efeito agudo de interferência nas variáveis analisadas. Outros estudos demonstram também que a maior proximidade entre as sessões de TA e TF parece aumentar a tendência da ocorrência de prejuízos no desempenho da força muscular (BENTLEY *et al.*, 2000; LEVERITT *et al.*, 2000). Além dos estudos agudos, alguns trabalhos testaram a hipótese aguda em desenhos experimentais longitudinais (CHTARA *et al.*, 2008; CADORE, IZQUIERDO, DOS SANTOS*, et al.*, 2012; CADORE, IZQUIERDO, PINTO*, et al.*, 2012; MURLASITS *et al.*, 2017). O estudo de CHTARA *et al.* (2008), por exemplo, demonstrou que 12 semanas de TC produziram menores ganhos de força e potência muscular em jovens, independentemente da ordem da realização do TA e do TF, quando comparados ao TF isolado. Nesse estudo, o TC foi realizado duas vezes por semana, e composto por um protocolo de TF realizado em formato de circuito (dividido em quatro períodos de três semanas, sendo os dois primeiros focados em resistência de força, e os dois últimos no desenvolvimento de força explosiva e potência), juntamente com um protocolo de TA, em que cada sessão incluiu cinco *sprints* realizados na máxima velocidade aeróbia (medida pelo teste *Vam-eval track*), com intervalos de recuperação entre *sprints* à 60% dessa máxima velocidade. Diferentemente dos achados de CHTARA *et al.* (2008), a recente meta-análise de MURLASITS *et*

al. (2017) demonstrou que os ganhos na força máxima são significantemente maiores quando o TF precede o TA do que a ordem contrária, nos protocolos de TC. Assim, fica evidente a importância de considerar as diferentes variáveis do treinamento ao analisar também a hipótese aguda de concorrência.

A hipótese crônica sugere que o músculo esquelético é colocado em uma situação de conflito quando o TC é realizado e, consequentemente, não consegue se adaptar metabolica e/ou morfologicamente de maneira ótima a cada um dos componentes do TC, devido às exigências adaptativas opostas (LEVERITT *et al.*, 1999). Esta hipótese explicativa propõe alguns possíveis mecanismos que estariam envolvidos na produção do efeito de interferência. Um dos mecanismos inseridos na hipótese crônica sugere que exista uma diferença no recrutamento de unidades motoras entre o TF realizado isoladamente e o TC. A realização do TF isolado é uma atividade conhecida por recrutar um percentual muito elevado do *pool* de unidades motoras de um determinado músculo ou grupo muscular, principalmente quando as séries de TF são realizadas até a falha concêntrica, aumentando assim, cronicamente, a sincronia entre as unidades motoras e, consequentemente, a força muscular. Por outro lado, o TA tende a recrutar preferencialmente unidades motoras lentas. Assim, a adição de sessões de TA ao TF, poderia produzir uma mudança no padrão de recrutamento de unidades motoras em cada sessão, fazendo com que, cronicamente, as adaptações neurais comumente atribuídas ao TF, principalmente o aumento da força muscular pelo aumento da sincronia de recrutamento entre as unidades motoras, fossem prejudicadas (LEVERITT *et al.*, 1999). Porém, é pouco provável que esse mecanismo contribua significativamente para o efeito de interferência, uma vez que a literatura indica que as adaptações neurais induzidas pelo TF no músculo esquelético acontecem principalmente no início (i.e. uma à cinco semanas) de um período de treinamento (MORITANI & DEVRIES, 1979; ABE *et al.*, 2000; GABRIEL *et al.*, 2006; FOLLAND & WILLIAMS, 2007), ao passo que a interferência na força muscular é observada principalmente após períodos mais longos (i.e. >10 semanas) de TC (HICKSON, 1980; HAKKINEN *et al.*, 2003; RONNESTAD *et al.*, 2011). Além da mudança no padrão de recrutamento de unidades motoras, a hipótese crônica sugere também que a alteração da produção hormonal induzida pelo componente TA poderia ser um mecanismo relacionado ao efeito de interferência (LEVERITT *et al.*, 1999). Basicamente, a adição do TA criaria um ambiente muscular mais catabólico, a partir da produção de hormônios catabólicos (e.g. cortisol), prejudicando o efeito dos hormônios anabólicos (e.g. testosterona) produzidos pelo TF. Porém, além dos resultados

pouco conclusivos de alguns estudos que testaram os efeitos de protocolos de TC na resposta hormonal de diferentes indivíduos (KRAEMER *et al.*, 1995; BELL *et al.*, 2000; CADORE, IZQUIERDO, DOS SANTOS*, et al.*, 2012), já é bem estabelecido na literatura científica que a resposta hormonal ao TF não é um fator determinante para a ocorrência da hipertrofia muscular (WEST *et al.*, 2009; WEST *et al.*, 2010; WEST *et al.*, 2012; MORTON *et al.*, 2016), o que torna também pouco provável que esse seja o principal fator envolvido na produção do efeito de interferência.

Por fim, a hipótese crônica também sugere que a adição do TA ao TF produziria prejuízos diretamente no aumento da AST das fibras musculares, e assim, consequentemente, no aumento da força muscular induzida pelo TF. De fato, muitos estudos que investigaram o efeito de interferência na hipertrofia muscular mostram interferência na magnitude da hipertrofia das fibras musculares, conjuntamente com menores ganhos na força muscular (KRAEMER *et al.*, 1995; BELL *et al.*, 2000; PUTMAN *et al.*, 2004; KARAVIRTA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2014; FYFE *et al.*, 2018). Além dos resultados de SOUZA *et al.* (2014), já citados anteriormente, MCCARTHY *et al.* (2002) demonstraram que um protocolo de TF realizado isoladamente produziu aumentos significantes da área das fibras musculares tipo I (19%) e II (24%), enquanto o protocolo de TC, apesar de aumentar de maneira similar a área das fibras tipo II (28%), não produziu aumentos significantes na área das fibras tipo I (13%). Nesse estudo, o TC foi realizado três vezes por semana, durante 10 semanas, sendo que o componente TA foi realizado por 50 minutos contínuos, em bicicleta, à 70% da frequência cardíaca de reserva e o TF em uma zona de 6-RM. Ambos os protocolos foram realizados na mesma sessão, com ordem alterada a cada sessão de treinamento, e com pausa de 10-20 minutos entre cada protocolo. No mesmo sentido, recentemente FYFE *et al.* (2018) também demonstraram que dois protocolos diferentes de TC, realizados três vezes por semana, durante oito semanas, prejudicaram a hipertrofia das fibras do tipo I, quando comparado ao TF isolado. Nesse estudo, a AST das fibras do tipo I diminuiu ($p>0,05$) tanto para o grupo em que o TC foi composto por um protocolo de TA em alta intensidade (TA-AI) (-22,8%), como também para o grupo em que o TA foi realizado em moderada intensidade (TA-MI) (-5,1%), enquanto o TF isolado produziu aumento significante na área dessa fibras (21,9%). Interessantemente, as mudanças na AST das fibras do tipo I induzidas pelo TF foram significantemente maiores quando comparadas ao grupo TA-AI, mas não em comparação ao grupo TA-MI. Além disso, como citado anteriormente, esses resultados foram acompanhados de uma menor magnitude nos ganhos de força no teste de 1-RM,

demonstrados em um estudo anterior (FYFE, BARTLETT*, et al.*, 2016) que avaliou os mesmos participantes. Ambos os protocolos de TA que compunham o TC foram realizados em bicicleta, 10 minutos antes do componente TF, sendo que o TA-AI era composto por um protocolo intervalado, com estímulos de dois minutos à 120-150% do limiar de lactato dos participantes (LL), enquanto o TA-MI tinha duração de 15-33 minutos, e intensidade de 80-100% do LL. Conjuntamente, esses estudos indicam que a hipótese crônica se torna plausível, fornecendo mecanismos possivelmente importantes para o entendimento do efeito de interferência do TC.

Em resumo, as evidências apresentadas mostram que o TC é um protocolo que pode provocar em uma resposta adaptativa diferente do TF realizado isoladamente. Ainda que uma série de hipóteses crônicas e agudas sejam propostas para explicar o fenômeno da interferência, ainda existem evidências limitadas para ambas as hipóteses, sendo necessária a realização de mais pesquisas para identificar outros mecanismos adicionais envolvidos nesse fenômeno. Sendo assim, muitos estudos passaram a investigar quais mecanismos moleculares poderiam ser responsáveis pela inibição observada no desenvolvimento das adaptações neuromusculares após o TC.

3.2.1. Interferência molecular

O músculo esquelético é um tecido de alta plasticidade, adaptável quando submetido a diferentes estímulos, como o treinamento físico (COFFEY & HAWLEY, 2007; HAWLEY *et al.*, 2014). Para que essas adaptações ocorram, uma série de alterações em nível molecular nesse tecido é necessária. Neste sentido, muitos estudos sugerem que as adaptações musculares decorrentes de um período de treinamento são o resultado do somatório de uma série modulações na expressão gênica e proteica após cada sessão de treinamento (PERRY & RUDNICK, 2000; PILEGAARD *et al.*, 2003; COFFEY & HAWLEY, 2007; COFFEY, JEMIOLO*, et al.*, 2009; COFFEY, PILEGAARD*, et al.*, 2009; HAWLEY, 2009; KUMAR *et al.*, 2009; LIRA *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2012; STEPTO *et al.*, 2012). Assim, uma vez que o efeito de interferência está relacionado com o processo adaptativo do músculo esquelético, é plausível sugerir que esses processos moleculares estão envolvidos nesse fenômeno.

Em geral, a lógica dos processos adaptativos moleculares ao treinamento físico é a mesma, independentemente do tipo de treinamento. Ou seja, os diferentes estímulos decorrentes de uma sessão de treinamento (e.g. contração muscular, estresse metabólico, gasto energético)

ativam cascatas de proteínas nas fibras musculares que, por sua vez, estimulam o núcleo da célula muscular a aumentar a transcrição de genes que poderão ser traduzidos em novas proteínas, responsáveis por alterar a funcionalidade das células de maneira específica à demanda a qual elas foram submetidas (BAAR & ESSER, 1999; BAAR *et al.*, 2002; GOTO *et al.*, 2005; COFFEY & HAWLEY, 2007; SPIERING *et al.*, 2008; EGAN *et al.*, 2010; APRO *et al.*, 2013; GUNDERMANN *et al.*, 2014; APRÓ *et al.*, 2015). A principal diferença está no fato de que diferentes protocolos de treinamento estimulam as células musculares de maneira também distintas (COFFEY & HAWLEY, 2007; COFFEY & HAWLEY, 2016). Assim, o TF induz a hipertrofia das fibras musculares principalmente através de uma série de cascatas de fosforilações proteicas (i.e. ativações ou inibições de proteínas pela adição de fosfatos), reguladas principalmente pela via sinalizada pela serina/treonina quinase-Akt (também conhecida como proteína quinase B - PKB) e pelo alvo da rapamicina em mamíferos complexo 1 (mTORC1), que culmina no aumento da transcrição de genes pelos mionúcleos (i.e. núcleos das fibras musculares) e da síntese proteica miofibrilar pelos ribossomos (PERRY & RUDNICK, 2000; PHILLIPS, 2000; NADER & ESSER, 2001; NADER, 2006; COFFEY & HAWLEY, 2007; PHILLIPS, 2009; PHILLIPS *et al.*, 2012). De fato, alguns experimentos já demonstraram que uma única sessão de TF aumenta a atividade da Akt e da mTOR (NADER & ESSER, 2001), e que, após a realização de oito semanas TF, a fosforilação dessas duas proteínas aumenta significativamente, acompanhadas pelo aumento na AST do quadríceps (LEGER *et al.*, 2006). Por outro lado, o aumento da capacidade respiratória induzida pelo TA, no músculo esquelético, é o resultado da atividade e da interação de outras proteínas que estimulam o processo de angiogênese (i.e. desenvolvimento de novos vasos sanguíneos) e de biogênese mitocondrial, e por fim a síntese proteica mitocondrial pelos mionúcleos (SCARPULLA, 2002; PILEGAARD *et al.*, 2003; KELLY & SCARPULLA, 2004; COFFEY & HAWLEY, 2007; ARANY, 2008; BENTON *et al.*, 2008; EGAN *et al.*, 2010; PERRY *et al.*, 2010; RUAS *et al.*, 2012). Basicamente, o TA aumenta em maior magnitude o gasto energético celular, induzindo a uma maior quebra das moléculas de ATP até a forma de AMP, aumentando significativamente a razão AMP:ATP celular, o que estimula a fosforilação da Proteína Quinase Ativada por Adenosina Mono Fosfato, conhecida como AMPK (COFFEY & HAWLEY, 2007; HAWLEY *et al.*, 2014). A AMPK é uma proteína que funciona como um sensor energético celular, sendo diretamente ativada por AMP através da fosforilação no sítio de ligação em treonina 172 (ASCHENBACH *et al.*, 2004; HARDIE & SAKAMOTO, 2006). Uma vez

ativada, a AMPK fosforila uma série de outras proteínas, como o co-ativador do receptor ativado por proliferador de peroxissomo gamma (PPAR-γ) 1 α, conhecido como PGC-1α (SCARPULLA, 2002; KELLY & SCARPULLA, 2004; RUAS *et al.*, 2012) aumentando a expressão de genes e a síntese de proteínas envolvidos na biogênese mitocondrial, mudanças no tipo de fibra, oxidação de ácidos graxos, angiogênese e resistência do músculo esquelético à atrofia (COFFEY & HAWLEY, 2007; ARANY, 2008; BENTON *et al.*, 2008; HAWLEY *et al.*, 2014). Assim, uma vez que as adaptações ao TF e ao TA têm sido atribuídas principalmente à atividade das vias controladas pela Akt/mTORC1 e AMPK/PGC1-α, respectivamente, uma série de estudos passaram a propor que a interferência local no músculo esquelético se daria por uma interação molecular negativa ao crescimento muscular envolvendo essas vias.

O primeiro trabalho a demonstrar uma possível interação negativa entre essas vias foi o de BOLSTER *et al.* (2002). Nesse trabalho, os autores demonstraram que animais que tiveram a atividade da isoforma α2 da proteína AMPK estimulada (51%) pela injeção de AICAR (substância análoga à AMP que é capaz de estimular a atividade da AMPK) apresentaram também uma diminuição de 45% da taxa de síntese proteica, em relação ao controle, bem como redução das formas fosforiladas das proteínas PKB^{ser473}, $mTOR^{ser2448}$, e de outras proteínas envolvidas na tradução proteica. No mesmo sentido, o clássico trabalho de ATHERTON *et al.* (2005) utilizou um modelo de eletroestimulação em músculos de animais mimetizou um protocolo de TA a partir de estímulos elétricos de baixa frequência (10 Hz) e longa duração (3 horas), e um protocolo de TF a partir de estímulos intermitentes de alta frequência (100 Hz). Esse estudo demonstrou que, de fato, a estimulação que simulou o TF ativou a via da PKB(Akt)-mTOR, bem como a taxa de síntese proteica miofibrilar, como esperado. Porém, a estimulação que simulou o TA, além da ativação esperada da via AMPK-PGC1-α, provocou também uma diminuição da fosforilação da tuberina, conhecida como TSC2, proteína que inibe a atividade da mTOR. Diferentemente da maioria das proteínas, sabe-se que, quando fosforilada, a TSC2 é inativada. Assim, a diminuição da sua forma fosforilada no estudo sugere que o estímulo que simulou o TA aumentou a atividade inibitória dessa proteína na mTOR, não permitindo, consequentemente, o aumento da taxa de síntese proteica miofibrilar. A partir desses achados, muitos outros trabalhos (COFFEY *et al.*, 2006; MCGEE *et al.*, 2008; THOMSON *et al.*, 2008; COFFEY, JEMIOLO*, et al.*, 2009; COFFEY, PILEGAARD*, et al.*, 2009; LANTIER *et al.*, 2010; DONGES *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012; APRO *et al.*, 2013; VISSING *et al.*, 2013; EGAWA *et al.*, 2014; APRÓ *et al.*, 2015) investigaram a quantidade

e a atividade dessas proteínas em resposta ao TC, tendo como hipótese que a ocorrência do efeito de interferência estaria atrelada a interação molecular entre AMPK-TSC2-mTOR, provocada pela adição do componente TA ao TF.

Ainda que os achados de outros estudos (THOMSON *et al.*, 2008; LANTIER *et al.*, 2010; EGAWA *et al.*, 2014), também utilizando modelos celulares ou animais, corroborem com a hipótese da interferência mediada pela interação AMPK-TSC2-mTOR, esses achados não foram reproduzidos em modelos com humanos (COFFEY *et al.*, 2006; MCGEE *et al.*, 2008; COFFEY, JEMIOLO*, et al.*, 2009; COFFEY, PILEGAARD*, et al.*, 2009; DONGES *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012; APRO *et al.*, 2013; VISSING *et al.*, 2013; APRÓ *et al.*, 2015). No estudo agudo de COFFEY, PILEGAARD*, et al.* (2009), por exemplo, duas sessões de TC, nas quais a ordem dos componentes TF e TA foi invertida de uma sessão para outra, a partir de um desenho experimental *crossover*, não provocaram mudanças significantes na fosforilação da AMPK, 15 minutos e 3 horas após o exercício, em relação ao repouso. No mesmo sentido e a partir de um desenho experimental longitudinal com grupos paralelos, SOUZA *et al.* (2012) demonstraram que oito semanas de TC não alteraram a quantidade total e fosforilada de AMPK, e não reduziu a ativação da Akt.~~,~~ Por outro lado, alguns trabalhos que investigaram os protocolos de TF e TA isoladamente demonstraram uma elevação similar na ativação da AMPK (COFFEY *et al.*, 2006; DREYER *et al.*, 2006; WILKINSON *et al.*, 2008; COFFEY, JEMIOLO*, et al.*, 2009; VISSING *et al.*, 2013), bem como um aumento similar na atividade da mTORC1 após ambas sessões de treino (MASCHER *et al.*, 2007; BENZIANE *et al.*, 2008; MASCHER *et al.*, 2011). Conjuntamente, os achados na literatura indicam que a hipótese proposta por ATHERTON *et al.* (2005) pode não ser adequada para explicação do efeito de interferência, principalmente devido à alta complexidade das respostas moleculares induzidas pelo exercício (FYFE *et al.*, 2014). Frente a esse cenário, outros mecanismos moleculares têm sido propostos como possíveis causadores do efeito de interferência (BAAR, 2014; FYFE *et al.*, 2014; COFFEY & HAWLEY, 2016). Dentre esses mecanismos, a atividade das células satélites (CSs) musculares tem sido um dos principais focos em estudos que investigaram os efeitos do TF e TA realizados isoladamente (CHARIFI *et al.*, 2003; CRAMERI *et al.*, 2004; VERNEY *et al.*, 2008; FUJIMAKI *et al.*, 2016; ABREU *et al.*, 2017; DAMAS, LIBARDI, UGRINOWITSCH*, et al.*, 2018), e no TC (BABCOCK *et al.*, 2012; PUGH *et al.*, 2018).

3.2.1.1. Papel das células satélites nas adaptações ao treinamento concorrente

As células satélites (CSs) musculares são consideradas as principais células tronco no músculo esquelético (CECCARELLI *et al.*, 2017). Primeiramente identificadas no século 18 e posteriormente identificadas e descritas, simultaneamente, por KATZ (1961) e MAURO (1961), as CSs são mononucleadas e devem sua nomenclatura ao seu posicionamento na região periférica das fibras musculares, entre a membrana e a lâmina basal, estritamente associadas com o sarcolema (i.e. camada de tecido conjuntivo que envolve a fibra muscular) (MAURO, 1961; MORESI *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2016; BAZGIR *et al.*, 2017; CECCARELLI *et al.*, 2017; MURACH *et al.*, 2018). Essas células são classicamente conhecidas por seu papel fundamental no reparo, regeneração, manutenção e crescimento do músculo esquelético (MAURO, 1961; HAWKE & GARRY, 2001; FUJIMAKI *et al.*, 2016; MURACH *et al.*, 2018). Diferentemente de outras células tronco, as CSs permanecem em um estado quiescente e são ativadas quando submetidas a estímulos provenientes do sistema circulatório ou de seu próprio microambiente (e.g. fatores de crescimento, estresse mecânico, dano muscular), entrando em um estado proliferativo. Uma vez em proliferação, as CSs podem retornar a seu estado quiescente, em um processo de auto-renovação, ou se diferenciar e se fundir às fibras musculares já existentes, doando seus respectivos núcleos e, consequentemente, aumentando a capacidade transcricional dessas fibras (CRAMERI *et al.*, 2004; MCKAY *et al.*, 2009; FRY, LEE*, et al.*, 2014; GRUBB *et al.*, 2014; CECCARELLI *et al.*, 2017). Devido a isso, muitos estudos têm investigado as respostas das CSs a diferentes protocolos de exercício, bem como sua relação com as adaptações induzidas pelo treinamento físico (CHARIFI *et al.*, 2003; KADI *et al.*, 2004; OLSEN *et al.*, 2006; VERDIJK *et al.*, 2007; PETRELLA *et al.*, 2008; VERNEY *et al.*, 2008; VERDIJK *et al.*, 2009; MACKEY *et al.*, 2011; BABCOCK *et al.*, 2012; BELLAMY *et al.*, 2014; FRY, LEE*, et al.*, 2014; ABREU *et al.*, 2017; LIM *et al.*, 2017; NEDERVEEN *et al.*, 2017; DAMAS, LIBARDI, UGRINOWITSCH*, et al.*, 2018; NEDERVEEN *et al.*, 2018).

A adaptação de hipertrofia muscular induzida pelo TF é comumente considerada como resultado de um *turnover* proteico positivo, em que os aumentos transitórios, mas cumulativos na taxa de síntese proteica miofibrilar das fibras musculares superam a taxa de degradação (PHILLIPS, 2009; PHILLIPS *et al.*, 2012; DAMAS *et al.*, 2015; DAMAS *et al.*, 2016; DAMAS, LIBARDI & UGRINOWITSCH, 2018). Assim, dado o potencial papel das CSs no aumento da

capacidade transcricional da fibra muscular e, consequentemente, na síntese proteica miofibrilar, a literatura científica tem voltado sua atenção para as respostas dessas células, principalmente ao TF (PETRELLA *et al.*, 2008; MACKEY *et al.*, 2011; GRUBB *et al.*, 2014; LIM *et al.*, 2017; NEDERVEEN *et al.*, 2017; DAMAS, LIBARDI, UGRINOWITSCH*, et al.*, 2018; NEDERVEEN *et al.*, 2018). De fato, muitos estudos demonstraram que a sessão de TF estimula o aumento da quantidade de CSs no músculo esquelético (MACKEY *et al.*, 2007; MACKEY *et al.*, 2011; BELLAMY *et al.*, 2014; NEDERVEEN *et al.*, 2017; DAMAS, LIBARDI, UGRINOWITSCH*, et al.*, 2018). No estudo de BELLAMY *et al.* (2014), por exemplo, o número de CSs aumentou tanto 72 horas após uma única sessão de TF em alta intensidade, como também após um período de 16 semanas de treinamento. O aumento agudo observado se deu apenas para a quantidade de CSs associadas às fibras do tipo II (29.9%), enquanto o aumento após as 16 semanas de treinamento foi observado tanto para as fibras do tipo I (13.1%), como também para as fibras do tipo II (15%). Além disso, o estudo demonstrou mudanças significantes no volume do quadríceps (7,9%), bem como na AST das fibras musculares (21%) após o período de treinamento. Interessantemente, a mudança relativa no número de CSs associadas às fibras do tipo I de 24 para 72 horas após a sessão aguda de TF, como também no número de CSs associadas às fibras do tipo II após as 16 semanas de treinamento, se correlacionam significantemente ($r^2 = 0,566$, $p = 0,012$ e $r^2 = 0,493$, $p = 0,027$, respectivamente) com as mudanças observadas na massa magra do quadríceps, analisada por ressonância magnética, indicando que mudanças agudas no *pool* de CSs estão relacionadas com a hipertrofia muscular após um período de TF. Dessa maneira, uma vez que esses achados sugerem que o aumento do número da CSs está relacionado com a hipertrofia muscular induzida pelo TF, é plausível sugerir que o efeito de interferência causado pelo TC pode estar relacionado com prejuízos no ciclo das CSs induzido pelas sessões de exercício durante um período de treinamento.

De fato, o estudo de BABCOCK *et al.* (2012) demonstrou que, enquanto uma sessão de TF induziu o aumento do número de CSs por fibra muscular (38%) de maneira significante, a adição de um protocolo de TA 10 minutos após a sessão de TF diminuiu (-6%) o número de CSs por fibra muscular. Assim como nos estudos que investigaram o TF realizado isoladamente, as mudanças observadas por BABCOCK *et al.* (2012) aconteceram diferentemente entre os tipos de fibra: a densidade de CSs para as fibras tipo I diminuiu após a sessão de TC (-8%), enquanto aumentou após a sessão de TF (46%). Já para as fibras do tipo II, o estudo demonstrou aumento da densidade de CSs apenas após a sessão de TF. Contrariamente aos achados de BABCOCK *et al.* (2012),

recentemente o estudo de PUGH *et al.* (2018) demonstrou aumentos similares (78%) no número de CSs ($PAX7^+$) por fibras do tipo I 96 horas após ambas as sessões de TF e TC. Porém, é importante evidenciar que nenhum dos dois estudos apresentou os valores de erro da medida (e.g. erro típico, coeficiente de variação) na mensuração da quantidade de CSs, não permitindo saber se as alterações observadas são, de fato, significantes. Além disso, apesar do desenho experimental similar, com a mesma ordem entre as sessões de TF e TA (i.e. TF realizado antes do TA), bem como o tempo das coletas de tecido muscular (i.e. 96 horas), algumas diferenças entre os dois estudos limitam a comparação direta dos achados: no estudo de PUGH *et al.* (2018) foi utilizado um protocolo de TA intervalado, em alta intensidade (10 séries de 1 minuto de exercício em bicicleta, à 90% da $FC_{máx}$, separados por 30 segundos à 50W para os homens e à 30 W para as mulheres), enquanto no estudo de BABCOCK *et al.* (2012) o TA foi realizado também em bicicleta, porém de maneira contínua, em intensidade moderada (90 minutos à 60% da potência máxima atingida no teste $VO_{2máx}$). Além disso, enquanto a amostra do estudo de BABCOCK *et al.* (2012) contava com homens jovens recreacionalmente ativos, a amostra de PUGH *et al.* (2018) era composta por indivíduos sedentários e obesos, incluindo tanto homens quanto mulheres, com diferenças no nível de treinamento evidenciadas pelos valores de $VO_{2máx}$ relativo (48,5 mL/kg/min vs 25,7 mL/kg/min, respectivamente, em cada estudo) e força máxima de extensão do joelho medida pelo teste de 1-RM (73 kg vs 40,6 kg, respecivamente, em cada estudo). Uma vez que a quantidade de CSs está relacionada a parâmetros que refletem o nível de treinamento dos indivíduos, como o $VO_{2máx}$ (MACALUSO *et al.*, 2012), esses valores indicam que os indivíduos do estudo Pugh et al. (2018) poderiam estar menos susceptíveis à ocorrência de um fenômeno de interferência devido ao estado "muito menos treinado" em que se encontravam, como discutido na revisão de FYFE & LOENNEKE (2018), citada anteriormente. Porém, mesmo com essas limitações, esses resultados de PUGH *et al.* (2018) juntamente com alguns estudos que encontraram aumentos na quantidade de CSs após o TA realizado isoladamente (CHARIFI *et al.*, 2003; FRY, NOEHREN*, et al.*, 2014) poderiam também indicar que a atividade das CSs em resposta a sessão de TF não sofreria interferência da adição de um protocolo de TA. Porém, nenhum estudo mostrou se, de fato, essas células em proliferação após o TA se diferenciam e se fundem às fibras musculares existentes. Interessantemente, a recente revisão de MURACH *et al.* (2018) sugere que o aumento do número de CSs pode se dar também pelo possível papel dessas células em outros processos que não diretamente no crescimento muscular, como na regulação da matriz

extracelular (FRY *et al.*, 2017). Dado esse papel importante na regulação da matrix extracelular, segundo a revisão, as CSs podem estar relacionadas com a produção de uma maior magnitude da hipertrofia muscular em longo prazo, uma vez que parece existir um "efeito teto" no crescimento muscular induzido por um modelo de sobrecarga funcional em camundongos transgênicos com uma depleção de mais de 90% da quantidade de CSs, quando comparado ao modelo em que as CSs estão normalmente presentes (26% vs 36%, respectivamente) (FRY, LEE*, et al.*, 2014; FRY *et al.*, 2017; KAWANO *et al.*, 2017). Os autores sugerem que a proliferação das CSs em resposta a um estímulo hipertrófico participaria do remodelamento da matriz extracelular, impedindo um processo de fibrose, permitindo assim uma maior magnitude de hipertrofia das fibras musculares em longo prazo. Assim, uma vez que, em nível morfológico e funcional, a adição do TA ao TF não bloqueia totalmente os ganhos de força e hipertrofia muscular, mas parece prejudicar a magnitude dessas adaptações em longo prazo, é possível que os estímulos decorrentes do TA prejudiquem algum(ns) estágio(s) do ciclo das CSs. Assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos em cada uma das fases das CSs (ativação, proliferação, diferenciação (ou volta a quiescência/auto-renovação)) é primordial para o entendimento do possível papel dessas células na ocorrência do efeito de interferência.

3.2.1.2. Fatores regulatório miogênicos - Controle das células satélites e efeitos do treinamento concorrente

A regulação do ciclo das CSs é um processo altamente complexo, modulado por uma série de fatores que se expressam e agem coordenadamente (WEINTRAUB, 1993; PERRY & RUDNICK, 2000; BAZGIR *et al.*, 2017; CECCARELLI *et al.*, 2017). A progressão miogênica dessas células de um estado quiescente para um estado ativo, bem como para a posterior diferenciação e fusão, demanda uma mudança de perfil transcricional (CECCARELLI *et al.*, 2017). Essa progressão na linhagem miogênica é orquestrada por uma família de proteínas conhecida por Fatores Regulatórios Miogênicos (MRFs (do inglês "*Myogenic Regulatory Factors*)), composta pelo MYOD, MYF5, MYOG e MYF6. Os MRFs são proteínas de estrutura hélice-volta-hélice que contêm um domínio de ligação com o DNA, permitindo que atuem como fatores de transcrição (WEINTRAUB, 1993). Basicamente, CSs em um estado quiescente são caracterizadas pela expressão homogênea e parcial dos fatores de transcrição PAX7 e MYF5, respectivamente. Uma

vez ativadas, essas células podem retornar para o estado quiescente ou seguir para um estado proliferativo, em que a expressão do MYF5 é parcialmente sustentada, em conjunto com a expressão do MYOD. A regulação negativa do PAX7, bem como a expressão da MYOG, conjuntamente com o MYOD, irão ativar a expressão de genes musculares específicos (e.g. MEF2, desmina, troponina I, MHC) (WILLOUGHBY & NELSON, 2002; PSILANDER *et al.*, 2003), determinando o progresso das CSs para o estado de diferenciação e fusão às fibras já existentes (WEINTRAUB, 1993; PERRY & RUDNICK, 2000; BAZGIR *et al.*, 2017; CECCARELLI *et al.*, 2017). Assim, uma vez que esse progresso miogênico das CSs é um fator importante para as adaptações do músculo esquelético ao treinamento físico, muitos estudos passaram a investigar os efeitos de diferentes protocolos de treinamento na expressão dos MRFs (WILLOUGHBY & NELSON, 2002; PSILANDER *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2005; RAUE *et al.*, 2007; ABE *et al.*, 2009; CALDOW *et al.*, 2015; PUGH *et al.*, 2015; PUGH *et al.*, 2018).

Devido à capacidade do TF em produzir a hipertrofia muscular, acompanhado do aumento do número de CSs, muitos estudos investigaram a atividade dos MRFs em resposta a esse tipo de treinamento (PERRY & RUDNICK, 2000; PSILANDER *et al.*, 2003; BICKEL *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005; KOSEK *et al.*, 2006; ROBERTS *et al.*, 2011; CALDOW *et al.*, 2015). O estudo de WILLOUGHBY & NELSON (2002) foi o primeiro a demonstrar que uma sessão de TF em alta intensidade (3 séries de 8-10 repetições, realizadas à 75-80% da carga de 1-RM, nos exercícios agachamento, *leg press* e extensão do joelho) é capaz de aumentar a expressão gênica do MYOD e da MYOG tanto 30 minutos, como também 6 horas após o estímulo. Interessantemente, o estudo demonstrou que esses aumentos foram acompanhados da expressão gênica das diferentes isoformas de cadeia pesada de miosina (MHC I, MHC IIa e MHC IIx), indicando que a expressão dos dois MRFs analisados pode ter um importante papel nessa regulação positiva das MHCs. Posteriormente, investigando pela primeira vez o curso temporal das respostas transcricionais agudas dos MRFs ao TF, PSILANDER *et al.* (2003) demonstraram que o MYF6, em conjunto com o MYOD e a MYOG, têm sua expressão gênica induzida por uma sessão de TF de alta intensidade. Adicionalmente, CALDOW *et al.* (2015) mostraram que os aumentos agudos na expressão gênica de três dos MRFs (MYOD, MYOG e MYF5) observados 3 horas após uma primeira sessão de TF, são induzidos também após um período 12 semanas de TF. Complementando esses achados, YANG *et al.* (2005), investigando o curso temporal de expressão gênica dos quatro MRFs (MYF5, MYOG, MYOD e MYF6) em sete momentos (0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h) após uma sessão de TF

(3x10 repetições de extensão do joelho à 70% de 1-RM) demonstraram o aumento dos níveis de mRNA de três dos MRFs analisados (MYOG, MYOD e MYF6), sendo que a expressão significante do MYF6 aconteceu 2 horas após o exercício e permaneceu elevada até 4 horas. Somente 8 horas após a sessão ocorreu um aumento significante na expressão dos genes MYOD e MYOG, momento no qual os níveis de mRNA de MYF6 foram reduzidos. Por fim, 12 horas após o estímulo, apenas a expressão gênica de MYOG permaneceu elevada, retornando a valores próximos ao basal 24 horas após a sessão de treinamento. Esse estudo investigou também a resposta da expressão dos MRFs a uma sessão de TA (30 minutos de corrida em esteira à 75% do $VO_{2máx}$ dos indivíduos). Os autores demonstraram que a sessão de TA induziu o aumento significante apenas da expressão gênica do MYOD, o qual aconteceu 8 horas e 12 horas após o estímulo. É importante ressaltar que as biópsias nos indivíduos desse grupo foram realizadas em um músculo diferente (gastrocnêmio) em relação ao grupo que realizou a sessão de TF (vasto lateral). De qualquer maneira, esses achados de YANG *et al.* (2005), conjuntamente aos achados de outros estudos que também não encontraram a expressão de genes miogênicos após o TA (BARRES *et al.*, 2012), permitem sugerir que o TA pode ser um estímulo que atenue as respostas miogênicas no músculo esquelético, podendo interferir na magnitude da hipertrofia muscular induzida pelo TF nos protocolos de TC.

De fato, existem evidências na literatura de que o TC atenue a expressão dos genes miogênicos (COFFEY, JEMIOLO*, et al.*, 2009; COFFEY, PILEGAARD*, et al.*, 2009; DONGES *et al.*, 2012; PUGH *et al.*, 2015). Dois estudos agudos realizados em 2009 (COFFEY, JEMIOLO*, et al.*, 2009; COFFEY, PILEGAARD*, et al.*, 2009), por exemplo, demonstraram que uma sessão de TC não foi capaz de induzir o aumento significante da expressão de MYOD 3 horas após o estímulo, independentemente da ordem dos exercícios, ou da intensidade do protocolo de TA na bicicleta (30 minutos contínuos à 70% do $VO_{2máx}$ (COFFEY, PILEGAARD*, et al.*, 2009) vs 10 *sprints* máximos de 6 segundos à uma carga constante (COFFEY, JEMIOLO*, et al.*, 2009)). No mesmo sentido, DONGES *et al.* (2012) comparando as respostas moleculares agudas entre o TF, TA e o TC em homens sedentários de meia-idade (53±2 anos) mostraram que os níveis de mRNA do MYOD e da MYOG estavam significantemente elevados após 4 horas da sessão de TF, mas não após a sessão de TC ou TA. Os autores discutem que esses achados se devem provavelmente a menor "dose" do componente TF realizada no protocolo de TC, em comparação a sessão de TF realizado isolatamente (4 séries vs 8 séries, respectivamente). Assim, a partir desses achados, torna-se importante investigar a dinâmica de expressão dos MRFs, bem como dos mecanismos que

controlam a transcrição desses genes, utilizando não só os métodos já estabelecidos pela literatura científica, mas também a partir de um novo nível de abordagem, buscando o melhor entendimento dos mecanismos que contribuem para a ocorrência do efeito de interferência.

3.3. Alterações epigenéticas no exercício físico

As alterações agudas transientes que acontecem no padrão de expressão gênica das fibras musculares, induzidas pelo exercício físico, são necessárias para aumentar a taxa de síntese proteica celular e, consequentemente, produzir alterações fenotípicas no tecido muscular esquelético (e.g. hipertrofia muscular) (EGAN & ZIERATH, 2013). Muitos estudos têm descrito o papel de uma série de mecanismos (e.g. atuação de fatores e co-fatores de transcrição, cascatas de sinalização de proteínas) envolvidos na modulação dessas alterações (COFFEY & HAWLEY, 2007; SPIERING *et al.*, 2008; EGAN & ZIERATH, 2013; HAWLEY *et al.*, 2014). Outro nível de abordagem da regulação da expressão gênica que tem recebido elevada atenção da comunidade científica é a epigenética (BARRES *et al.*, 2012; BROWN, 2015; HOWLETT & MCGEE, 2016; LAKER & RYALL, 2016; LAKER *et al.*, 2017; MCGEE & WALDER, 2017; SEABORNE *et al.*, 2018). Ainda que não haja consenso na definição exata do termo (MCGEE & WALDER, 2017), em geral a epigenética (epi=sobre + genética=aquilo que está codificado na sequência do DNA) é considerada como o estudo de mudanças hereditárias nos padrões de expressão gênica que ocorrem independentemente de mudanças na sequência do DNA, sendo causadas por modificações químicas dos vários componentes da cromatina, que regulam o acesso à maquinaria de transcrição (e.g. fatores de transcrição, RNA polimerase) ao DNA (KOUZARIDES, 2007; BERGER, 2008; HENIKOFF & GREALLY, 2016; LAKER & RYALL, 2016; MCGEE & WALDER, 2017). Além disso, o atual consórcio *NIH Roadmap Epigenomics Mapping* inclui também ao conceito de epigenética as mudanças estáveis no potencial de transcrição celular que não são necessariamente herdáveis (LAKER & RYALL, 2016).

Mesmo que as mudanças epigenéticas conhecidas sejam muitas (e.g. modificações de histonas, silenciamento por micro RNAs) (KOUZARIDES, 2007; LAKER & RYALL, 2016), uma das principais modificações investigadas, inclusive quando relacionados ao treinamento físico, é a metilação do DNA (BIRD, 2002; ROBERTSON, 2005; SCARANO *et al.*, 2005; JIN *et al.*, 2011; MOORE *et al.*, 2013; DENHAM *et al.*, 2014). A metilação do DNA é uma modificação direta no

DNA, e diz respeito à transferência covalente de um grupo metil ao carbono na posição 5' do anel da citosina, formando uma 5-metilcitosina (5mC). Descoberto em 1948 por HOTCHKISS (1948), esse mecanismo tem sido amplamente estudado devido ao seu papel decisivo no controle de processos como a expressão gênica no desenvolvimento humano, imprinting genômico, a inativação do cromossomo X e a supressão de elementos transponíveis, de elementos repetitivos e de genes envolvidos na ocorrência do câncer (JIN *et al.*, 2011; VOISIN *et al.*, 2015).

A metilação do DNA é um processo orquestrado por um conjunto de enzimas catalizadoras chamadas DNA metiltransferases (Dnmts) (JIN *et al.*, 2011; LAKER & RYALL, 2016). As Dnmts podem tanto estabelecer um novo padrão de metilação (Dnmt3a e Dnmt3b), como também copiar os padrões de metilação das fitas parentais (Dnmt1) para as fitas filhas recém-sintetizadas durante o processo de replicação do DNA, transferindo um grupo metil proveniente da s-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5' de um resíduo de citosina (LAKER & RYALL, 2016). A grande maioria das metilações do DNA ocorre em resíduos de citosina localizados imediatamente antes de um nucleotídeo guanina, conhecidos como dinucleotídeos CpG (ROBERTSON, 2005; MOORE *et al.*, 2013; VOISIN *et al.*, 2015). Esses dinucleotídeos estão espalhados pelo genoma, aparecendo muitas vezes com alta densidade em locais conhecidos como "Ilhas CpG" (DEATON & BIRD, 2011). Ainda que ocorram também em outros locais pelo DNA, o maior efeito da metilação do DNA se dá quando ela acontece em regiões regulatórias dos genes (e.g. promotores, acentuassomos). Em geral, a metilação do DNA atua na repressão da expressão gênica, recrutando proteínas específicas, como também impedindo o acesso da maquinaria de transcrição gênica ao DNA e inibindo a ação de proteínas acentuadoras (LAKER & RYALL, 2016).

O entendimento desse mecanismo se desenvolveu nos últimos anos devido à grande quantidade de trabalhos científicos que o investigaram (HUPKES *et al.*, 2011; BARRES *et al.*, 2012; NITERT *et al.*, 2012; CHAO *et al.*, 2016; KING-HIMMELREICH *et al.*, 2016; BEGUE *et al.*, 2017; LAKER *et al.*, 2017; SEABORNE *et al.*, 2018). Com os avanços tecnológicos, uma série de métodos de análise da metilação do DNA foi desenvolvida e permitiu a explicação cada vez mais detalhada e fidedigna desse mecanismo epigenético (KARIMI, JOHANSSON, STACH*, et al.*, 2006; SHEN & WATERLAND, 2007; HARRIS *et al.*, 2010; LISANTI *et al.*, 2013; KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). Assim, o conhecimento desses métodos, bem como suas vantagens e desvantagens, torna-se primordial tanto para a realização de novos estudos, como também para a melhor interpretação dos achados já publicados na literatura.

3.3.1. Métodos de análise da metilação do DNA

Devido ao crescente interesse científico em perguntas que envolvem o mecanismo de metilação do DNA, o conhecimento dos diferentes ensaios, bem como suas vantagens e desvantagens, torna-se um fator primordial na escolha da estratégia de análise mais adequada para responder cada pergunta científica específica de forma imparcial e robusta (SHEN & WATERLAND, 2007; OLKHOV-MITSEL & BAPAT, 2012; KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). Tendo em vista essa importância, é necessário que os pesquisadores considerem uma série de diferentes fatores: os objetivos e as demandas de especificidade e sensibilidade do estudo, a quantidade e a qualidade das amostras de DNA, bem como a disponibilidade de recursos materiais (e.g. renda, software, equipamentos e reagentes) são primordiais para a escolha do método de análise adequado (SHEN & WATERLAND, 2007; KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). Diante desta importância e seguindo a racional do estudo de revisão de KURDYUKOV & BULLOCK (2016), este tópico da presente revisão de literatura irá abordar os principais métodos de análise da metilação do DNA utilizados nos estudos científicos até o momento, evidenciando a lógica para escolha desses métodos, a partir de suas vantagens e desvantagens relacionadas aos fatores citados anteriormente.

A escolha do método de análise da metilação do DNA mais adequado deve partir da(s) pergunta(s) de pesquisa que norteia(m) o estudo. Dessa maneira, o primeiro ponto a ser considerado são os alvos de investigação. Basicamente, os estudos podem seguir dois caminhos: a) estratégias mais exploratórias, em que os genes candidatos não são conhecidos e buscam-se novos alvos, ou b) estratégias direcionadas, com regiões genômicas já determinadas. A realização de análises em larga escala, determinando o perfil de metilação do genoma, bem como a procura por regiões diferentemente metiladas (ou *differentially methylated regions* (DMRs)), são as estratégias comumente utilizadas para contemplar perguntas mais abrangentes, sem alvos específicos prévios (e.g. exploratórias) (LISANTI *et al.*, 2013). Primeiro, para a determinação do perfil global de metilação do genoma, sem a identificação de DMRs, alguns ensaios têm sido constantemente utilizados na literatura. A cromatografia líquida de alta eficiência ultravioleta (HPLC-UV) é uma estratégia que, apesar de desenvolvida há mais de 30 anos (KUO *et al.*, 1980), é ainda considerada como um ensaio padrão ouro para a quantificação da razão entre a deoxicitidina (dC) e a citosina metilada (5mC), através da separação cromatográfica. Porém, apesar de de cobrir completamente

o genoma, o método requer relativamente grandes quantidades de DNA (3-10 µg), não conta com kits disponíveis para análise, tem baixa sensibilidade (i.e. proporção de positivos reais que são corretamente identificados como tais) e especificidade (i.e. proporção de negativos reais que são identificados corretamente como tal) mediana. Assim, uma estratégia alternativa ao HPLC é a utilização da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) (HU *et al.*, 2013; KLEPACKI *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017), a qual utiliza quantidades muito menores de DNA hidrolisado (100ŋg - 1µg), e tem uma alta sensibilidade, detectando até baixos níveis de metilação (0,05-10%), bem como pequenas diferenças na metilação global do DNA (~5%) entre amostras. Além disso, esse método é pouco afetado por amostras de DNA de baixa qualidade. Sua única limitação é o acesso e a expertise na utilização do equipamento necessário para as análises (KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). No mesmo sentido, outro método com alta especificidade, baixa variabilidade, podendo detectar até pequenas mudanças na metilação global, a partir de uma pequena quantidade de amostra de DNA (250-500 ŋg), é o ensaio de metilação luminométrico (LUMA) (KARIMI, JOHANSSON & EKSTROM, 2006; KARIMI, JOHANSSON, STACH*, et al.*, 2006), o qual utiliza a ação de duas enzimas de restrição (i.e. enzimas que clivam o DNA em regiões especificas), seguido por reações de pirosequenciamento para calcular a quantidade de DNA metilado e não metilado. Por outro lado, se uma estimativa dos níveis de metilação do DNA mais grosseira é suficiente para o estudo, ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) podem também ser realizados (DENHAM *et al.*, 2015; KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). Eles permitem uma rápida avaliação do estado de metilação do DNA através da utilização de kits comercialmente disponíveis. Porém, devido à grande variabilidade inter e intra ensaios, apenas grandes mudanças (~1.5-2 vezes) na metilação do DNA podem ser detectadas.

Além das análises de mudanças gerais no estado de metilação de amostras de DNA, outra possibilidade em análises de larga escala é a identificação de regiões diferentemente metiladas (DMRs) pelo genoma. Uma estratégia utilizada para essa identificação, bem como para análises gene-específicas (que serão discutidas com mais detalhes posteriormente), é o tratamento prévio do DNA com bissulfito (SHEN & WATERLAND, 2007; OLKHOV-MITSEL & BAPAT, 2012; BERNSTEIN *et al.*, 2015; KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). Esse tratamento induz à deaminação das citosinas, convertendo-as em uracilas. Porém, as citosinas que estão metiladas não sofrem essa conversão, permanecendo como citosinas. Assim, mesmo com a limitação das tecnologias de sequenciamento do DNA atuais em não identificar diretamente o que são citosinas

e o que são resíduos de 5mC, a conversão por bissulfito permite que as citosinas não metiladas convertidas em uracilas sejam lidas pelos sequenciadores como timinas. Dessa maneira, regiões DMRs podem ser identificadas através de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) (SHEN & WATERLAND, 2007; OLKHOV-MITSEL & BAPAT, 2012; KURDYUKOV & BULLOCK, 2016).

Considerado um método padrão ouro para análises de metilação do DNA, sendo um dos mais utilizados na literatura científica, o sequenciamento posterior à conversão por bissulfito não é uma estratégia trivial, e algumas questões importantes devem ser consideradas (LI *et al.*, 2013; KURDYUKOV & BULLOCK, 2016): dificuldade de alinhamento após o NGS (devido à conversão das citosinas não metiladas, diminuindo a complexidade do DNA para três bases); necessidade de fragmentação do DNA, dificultando a amplificação de longos fragmentos; necessidade de reações de controle de bissulfito para garantir a ocorrência da conversão completa das citosinas não metiladas; e efeito de diluição em tecidos com populações de células mistas, que variam seu estado de metilação. No mesmo sentido, o sequenciamento do genoma completo após a conversão por bissulfito (WGBS), considerado o método mais abrangente de análise de metilação do DNA, apresenta também um custo elevado e a necessidade de uma análise de dados complexa (KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). Porém, essas dificuldades podem ser reduzidas através da técnica de representação reduzida de sequenciamento após tratamento por bissulfito (RRBS) (KURDYUKOV & BULLOCK, 2016; LAKER *et al.*, 2017). Neste ensaio, apenas uma fração do genoma é sequenciada, obtida pelo enriquecimento de regiões ricas em dinucleotídeos CpG através da fragmentação do DNA por uma enzima de restrição específica que reconhece e corta o DNA em locais CCGG, metilados e não metilados.

Outra possibilidade de análises é a hibridização de frações metiladas do DNA com painéis de microarrays (KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). Essas frações do DNA são geralmente obtidas a partir de outros ensaios (e.g. imunopreciptação), e oferecem um bom custo benefício para análise da metilação de muitas regiões de interesse específicas. Muitos estudos têm utilizado ensaios de arrays com foco em regiões específicas do genoma, importantes para o efeito da metilação do DNA (e.g. promotores, acentuassomos), como o *HumanMethylation450 Bead Chip* da *Illumina*, método mais popular (utilizado em mais de 360 publicações (DENHAM *et al.*, 2015; ROBINSON *et al.*, 2017) para determinação de perfil de metilação do DNA. Situado entre as técnicas de sequenciamento completo do genoma e de determinação dos níveis de metilação gene

específicos, o *HumanMethylation450 Bead Chip* pode determinar a metilação de até 485000 CpGs localizados em 99% dos genes conhecidos. Porém, apesar de sua alta sensibilidade e especificidade, ainda é necessário considerar o alto custo relativo (300 à 360 dólares por amostra) para a realização desse método, bem como sua limitação à utilização com DNA humano (KURDYUKOV & BULLOCK, 2016).

Além dessas análises em larga escala, que acessam a metilação global ou de várias regiões do genoma, outros métodos de análise são utilizados para quando o objetivo do estudo é investigar o estado de metilação do DNA de genes específicos de interesse, determinados previamente (WEBER *et al.*, 2005; SHEN & WATERLAND, 2007; TOST & GUT, 2007; OLKHOV-MITSEL & BAPAT, 2012; BERNSTEIN *et al.*, 2015; DELANEY *et al.*, 2015; KURDYUKOV & BULLOCK, 2016; BUSATO *et al.*, 2017). Uma das possibilidades é a utilização de métodos baseados no uso prévio de enzimas que realizam digestão de regiões específicas do DNA (KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). Nesses métodos, basicamente os locais de metilação do DNA são identificados a partir da análise do tamanho dos produtos da digestão de uma mesma amostra de DNA por pares enzimas sensíveis e não sensíveis à metilação do DNA, que atuam em regiões CCGGs. Entretanto, o uso de enzimas de restrição sensíveis à metilação do DNA não é livre de limitações, sendo restrito pela variedade de enzimas disponíveis comercialmente, bem como de suas sequências alvo (WEBER *et al.*, 2005). Nesse sentido, o método de imunoprecipitação da cromatina metilada (MeDIP) (WEBER *et al.*, 2005) enriquece eficientemente a cromatina metilada em amostras de DNA, através da utilização de um anticorpo específico para resíduos de 5mC, o qual permite a imunocaptura de fragmentos genômicos metilados. A partir desse ensaio, posteriores análises tanto em larga escala (e.g. NGS, microarrays), como também gene específicas (e.g. qPCR) podem ser realizadas para identificação e quantificação das regiões metiladas de interesse. Ainda que alguns estudos comparativos posteriores (MEISSNER *et al.*, 2005; ODA *et al.*, 2009) tenham sugerido que métodos baseados em MeDIP são inferiores à métodos baseados em enzimas de restrição, a realização do MeDIP não é restrita às enzimas de restrição disponíveis, não requer amostras de DNA de alta qualidade e ainda assim fornece maior cobertura, com menor custo. Além disso, a existência de alguns kits disponíveis comercialmente facilita a realização desse ensaio (KURDYUKOV & BULLOCK, 2016).

Além da utilização de enzimas de restrição, as regiões-alvo das amostras de DNA convertidas por bissulfito podem ser amplificadas por ensaios de PCR e, posteriormente,

sequenciadas (KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). Neste sentido, o pirosequenciamento aparece como uma das estratégias mais interessantes para a análise de metilação do DNA alvo-específica. O pirosequenciamento combina a capacidade do sequenciamento quantitativo direto, com alta reprodutibilidade, velocidade e fácil utilização, sendo considerado uma estratégia quantitativa interessante inclusive para análise de amostras heterogêneas, detectando até diferenças menores que 5% nos níveis de metilação do DNA. Além disso, o pirosequenciamento fornece não apenas os níveis médios de metilação da região analisada, mas também uma rápida e eficiente detecção dos níveis de metilação em cada sítio CpG específicos da região-alvo analisada. É uma plataforma de análise flexível e pode ser aplicada para análises de metilação do DNA tanto em regiões ricas em CpGs, como também em regiões pobres, nas quais o número de CpGs pode ser insuficiente para a ligação de primers, necessária em métodos alternativos, como PCR metilação-específico (MSP). A disponibilidade de kits para a conversão por bissulfito e para a amplificação por PCR tornam essa tecnologia acessível, com um bom custo-benefício, evitando também alguns desafios técnicos do NGS. Além de reduzir significantemente os custos, o trabalho e o tempo de análise, a utilização de ensaios otimizados da linha PyroMark da Qiagen resulta também na economia da quantidade de amostra de DNA nas análises de uma região específica amplificada por uma única PCR. Assim, os ensaios de pirosequenciamento têm demonstrado ser uma alternativa versátil na quantificação da metilação de locais específicos do DNA (TOST & GUT, 2007; DELANEY *et al.*, 2015; KURDYUKOV & BULLOCK, 2016).

A partir das informações discutidas anteriormente, fica evidente que a escolha do método de análise da metilação do DNA não é um processo simples. Além de considerar todas as vantagens e desvantagens relacionadas, a prática de bancada de cada ensaio, outras questões como o custo financeiro são também importantes nesse processo. De qualquer maneira, a escolha do método deve sempre ser norteada pela pergunta de pesquisa do estudo. Ainda que a literatura relacionada à metilação do DNA e o exercício físico não seja tão vasta, os diferentes estudos realizados até o momento utilizaram de uma considerável variedade de técnicas de análise. Assim, considerar cada uma das limitações apresentadas anteriormente na interpretação dos resultados desses estudos é primordial. Neste presente trabalho, nós optamos pela realização de ensaios de pirosequenciamento (PyroMark – Qiagen) de produtos de PCR específicos a partir de amostras de DNA convertidas por bisulfito. Além do fato de nossa pergunta de pesquisa ter como variável dependente a metilação do DNA de genes específicos, o pirosequenciamento, como discutido anteriormente, nos permitiu

investigar além dos níveis médios de metilação do DNA em nossas regiões de interesse, também os níveis de metilação de CpGs específicas nessas regiões, nos dando uma profundidade ainda maior no entendimento das mudanças induzidas pelos diferentes protocolos de exercício nesse mecanismo.

3.3.2. Efeitos do treinamento concorrente na metilação do DNA

Independentemente do modo de exercício em que está baseado, o treinamento físico, como já mostrado anteriormente na presente revisão, é um stress capaz de produzir uma série de modificações transientes na expressão de genes específicos, os quais podem induzir constantes alterações na quantidade das proteínas que codificam, levando à alterações do fenótipo do tecido muscular esquelético (COFFEY & HAWLEY, 2007; PERRY *et al.*, 2010; HAWLEY *et al.*, 2014). Sendo assim, tendo em vista o papel fundamental da metilação do DNA no controle transcricional, nos últimos anos alguns estudos investigaram as respostas dessa modificação epigenética a diferentes protocolos de treinamento, bem como sua relação com a expressão gênica induzida pelo exercício (ALIBEGOVIC *et al.*, 2010; BARRES *et al.*, 2012; NITERT *et al.*, 2012; BRYAN *et al.*, 2013; LINDHOLM *et al.*, 2014; KANZLEITER *et al.*, 2015; KING-HIMMELREICH *et al.*, 2016; BAJPEYI *et al.*, 2017; LAKER *et al.*, 2017; ROBINSON *et al.*, 2017; SEABORNE *et al.*, 2018).

Com relação ao TF, apenas 3 estudos recentes (LAKER *et al.*, 2017; SEABORNE *et al.*, 2018; BAGLEY *et al.*, 2019) investigaram os efeitos desse tipo de protocolo nos níveis de metilação do DNA no músculo esquelético de humanos. Em um trabalho investigando indivíduos sedentários submetidos a nove dias de uma dieta rica em gordura combinada ou não com o TF, LAKER *et al.* (2017) demonstraram aumentos da expressão de genes relacionados à estrutura e ao crescimento muscular, bem como a presença de 474 regiões diferentemente metiladas no grupo que realizou o TF (4 x 8-10 repetições dos exercícios *leg press* e extensão do joelho à 80% de 1-RM, juntamente com 4 séries de agachamentos com halteres), mesmo com um curto período de intervenção (apenas três sessões de exercício). Entretanto, ainda que a maioria dessas diferenças na metilação do DNA tenha acontecido em regiões promotoras, apenas 54 mostraram associação significante com a expressão gênica. Uma possível explicação para ocorrência desse fenômeno discutida pelos autores é o fato de as biópsias musculares terem sido realizadas tardiamente, 48 horas após a última das trê sessões de TF, momento no qual a atividade transcricional do músculo esquelético poderia estar reduzida. Os autores sugerem que a importância da metilação do DNA

para as adaptações do músculo esquelético ao treinamento deva ser analisada a partir de coletas musculares em momentos próximos ao término do exercício, já que algumas evidências na literatura indicam que o processo de metilação do DNA é mais transiente e dinâmico. Nesse sentido, o recente estudo de (BAGLEY *et al.*, 2019) investigou os níveis de metilação do DNA antes e em diferentes momentos (30 minutos e 4 horas) após uma sessão aguda de TF (leg press: 1x10 repetições à 50% de 1-RM seguido por 3x10 repetições à 70% 1-RM; extensão de joelho na cadeira extensora: 3x10 repetições à 70% 1-RM, com um minuto de pausa entre séries para ambos os exercícios e 3-5 minutos de pausa entre exercícios), em dois grupos de homens jovens, sendo um de sedentários e o outro grupo de indivíduos previamente treinados em TF. Utilizando a técnica MS-HRM (*methylation sensitive high-resolution melting*) os autores mostraram uma hipometilação global do DNA (medida pelos níveis de metilação de LINE-1) 4 horas após a sessão de TF e uma hipermetilação dos genes envolvidos no metabolismo GPAM (30 minutos e 4 horas após a sessão de TF) e SREBF2 (4 horas após a sessão de TF) nos indivíduos treinados, mas não nos destreinados, os quais mostraram apenas uma hipometilação do gene SREBF2 4 horas após a sessão de TF. Entretanto, não foram observadas mudanças na metilação do DNA de genes relacionados a inflamação (IL-6 e TNF-α), ou de genes associados a hipertrofia muscular (mTOR e Akt) em nenhum dos tempos analisados. Por outro lado, o estudo de SEABORNE *et al.* (2018) demonstrou que uma sessão de TF não só induz à diminuição na metilação do DNA e o aumento da expressão de genes relacionados ao crescimento muscular, mas também que essa redução é sustentada após um período de destreinamento e um período posterior de re-treinamentosendo acompanhada pelo aumento da hipertrofia muscular induzida pelo TF. Nesse estudo, os autores coletaram biópsias musculares em 5 momentos: Antes da intervenção, 30 minutos após a primeira sessão de TF, após sete semanas de TF (no começo da oitava semana), após sete semanas de destreinamento (no final da 14ª semana) e ao final do estudo, após mais sete semanas de re-treinamento (no início da 22ª semana). Interessantemente, os autores demonstraram que, de maneira aguda (30 minutos após a primeira sessão de TF), 10,284 regiões CpGs estavam hipometiladas e 7,600 hipermetiladas, comparadas com a medida basal. Além disso, o estudo mostrou que, mesmo não havendo alterações da expressão gênica no mesmo tempo de medida, 30 minutos após a primeira sessão de TF, a hipometilação dos genes BICC1, STAG1, GRIK2 e TRAF1 observada de maneira aguda foi mantida após os períodos de treinamento, de destreinamento e de re-treinamento, resultando na expressão gênica aumentada desses genes ao final de 22 semanas, juntamente com o aumento da

hipertrofia muscular. A partir desses achados, os autores sugerem que as mudanças agudas observadas nos níveis de metilação do DNA desses genes específicos podem ser mais duradoras (e não tão transientes como sugerido nos trabalhos citados anteriormente) e podem ser biomarcadores mais sensíveis que a própria expressão aguda desses genes para indicar a hipertrofia muscular induzida por um período de TF. Além disso, dentre os genes especificamente hipometilados agudamente, é sugerido que o TRAF1 está relacionado com a proliferação e diferenciação das células musculares. Conjuntamente, esses achados indicam que a metilação do DNA pode ser um processo importante na mediação da hipertrofia muscular induzida pelo TF.

No mesmo sentido, só que investigando um protocolo de TA, BARRES *et al.* (2012) testaram a hipótese de que uma sessão de TA diminuiria rapidamente a metilação do DNA em genes importantes para as adaptações aeróbias no músculo esquelético humano, e que essa alteração seria acompanhada de maior atividade transcricional desses genes. Confirmando suas hipóteses, o estudo demonstrou que uma sessão de TA realizada em alta intensidade (80% do $VO_{2máx}$) induziu à diminuição dos níveis de metilação do DNA nos promotores de genes relacionados à biogênese mitocondrial e às adaptações metabólicas (i.e. PGC-1α, PPAR-δ, TFAM, CS e PDK4), conjuntamente com o aumento da expressão desses genes. Cronicamente, no trabalho de LINDHOLM *et al.* (2014) 23 participantes jovens, destreinados, realizaram três meses de TA intenso, composto por quatro sessões de 45 minutos, por semana, de extensão do joelho unilateral. Nesse trabalho, a perna que não realizou o protocolo de treinamento foi utilizada como controle. O estudo demonstrou que o TA induziu mudanças na metilação de 4919 locais pelo genoma do momento Pré para o momento 24 horas após a última sessão de treinamento. Interessantemente, essas mudanças nos níveis de metilação foram observadas principalmente em acentuassomos e outras regiões regulatórias de genes do DNA. Além disso, corroborando com o estudo de BARRES *et al.* (2012), as análises transcricionais correspondentes mostraram que 4076 genes foram expressos e que, de fato, esses genes estão envolvidos com vias moleculares relacionadas às adaptações ao treinamento. Conjuntamente, esses achados sugerem um link funcional entre a metilação do DNA e a expressão de mRNA dos genes analisados. Porém, diferentemente dos genes relacionados ao metabolismo, no trabalho de BARRES *et al.* (2012) o gene miogênico MYOD1 não sofreu demetilação significante e não foi significantemente mais expresso após a sessão de TA em alta intensidade. Além disso, as análises de LINDHOLM *et al.* (2014) mostraram um enriquecimento significante no aumento da metilação de motivos de ligação dos MRFs e do MEF2,

indicando um possível efeito de atenuação na ação dessas proteínas pela metilação dessas regiões específicas. Esses achados convergem com a hipótese de que o TA, associado ao TF, pode atenuar a expressão dos genes miogênicos e sugerem que pode ser que isso aconteça devido à menor demetilação dos MRFs induzida por esse protocolo. Assim, é plausível sugerir que esse mecanismo pode estar relacionado à um dos fatores que levam a uma interferência no ciclo das CSs e, a longo prazo, à uma menor magnitude da hipertrofia muscular após protocolos de TC.

Ainda que seja possível sugerir tal hipótese, apenas o trabalho de ROBINSON *et al.* (2017) analisou a metilação do DNA após um período de TC. Em um desenho experimental crônico, de 12 semanas, indivíduos jovens e idosos foram randomizados em três grupos, sendo que o protocolo de treinamento do grupo TA foi realizado três dias por semana, de maneira intervalada, em bicicleta, e composto por 4 séries de 4 minutos à >90% do VO_{2pico}, intercaladas por 3 minutos de pedalada sem carga. Já o grupo TF realizou exercícios resistidos para membros superiores e inferiores (4x8-12 repetições) com a frequência de dois dias por semana. Por fim, o protocolo de TC foi composto por 30 minutos contínuos de TA em bicicleta em moderada intensidade (70% do VO_{2pico}), realizado 5 vezes por semana, conjuntamente com 4 vezes por semana de TF realizado com menos repetições que o grupo que realizou o TF isoladamente. O trabalho demonstrou pequenas e não significantes diferenças (<10%) na metilação do DNA, em comparação com aumentos substanciais na expressão gênica após o período de treinamento. Os autores sugerem, assim como LAKER *et al.* (2017), que o fato de não terem encontrado essas mudanças se deva ao tempo tardio de coleta do tecido muscular (72 horas após a ultima sessão de exercicio). Além disso, apesar do estudo não demonstrar interferência nem na força, nem na hipertrofia muscular entre os grupos TC e TF para os jovens, os componentes TA e TF realizados pelo grupo TC são diferentes dos protocolos realizados pelos grupos que treinaram isoladamente, dificultando a comparação direta dos resultados entre os grupos. Assim, a partir desses e dos outros achados discutidos na presente revisão de literatura, é possível que o TA de fato interfira na dinâmica da metilação do DNA após o TF, e que esse seja um dos mecanismos através do quais o efeito de interferência pode se estabelecer. Além disso, nenhum estudo até o momento demonstrou como se dá o curso temporal da metilação do DNA, paralelamente a expressão gênica, após uma sessão de TF, TA e TC. Dessa maneira, novas investigações com um desenho experimental adequado se justificam para entender efeitos de diferentes protocolos de treinamento na metilação do DNA, bem como o curso temporal dessa modificação epigenética após o exercício.

4. MÉTODOS

4.1. Participantes

Participaram do presente estudo nove indivíduos jovens do sexo masculino (idade: 23.9 ± 2.8 anos; massa corpórea: 70.1 ± 14.9 kg; altura: 177.2 ± 3 cm, $VO_{2máx}$ 41.4 ± 5.2 ; média ± desvio padrão), que não estavam realizando nenhum tipo de exercício físico de forma sistematizada por pelo menos 6 meses antes do início do estudo. Todos os participantes responderam ao questionário de prontidão para atividade física (PAR-Q). Como critérios de exclusão, não foram considerados aptos a participar do estudo os participantes que tivessem qualquer condição que os impedisse de realizar esforços de alta intensidade (i.e. problemas ósteo-articulares, musculares, hipertensão ou doenças crônico-degenerativas como diabetes) ou que tivessem respondido "SIM" em alguma das questões do PAR-Q. O presente protocolo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética de pesquisa em seres humanos da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (CEP: 2.794.689). Antes de iniciarem a participação, todos os indivíduos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2. Desenho Experimental

Os sujeitos habilitados a participar do presente estudo participaram de todas as condições experimentais e, portanto, realizaram de três protocolos de exercício, seguindo um desenho experimental *cross over*, contra-balanceado, a fim de controlar a elevada variância intersujeitos. As condições experimentais foram: sessão de Treinamento de Força (TF), sessão de Treinamento Aeróbio (TA) e sessão de Treinamento Concorrente (TC).

Na primeira semana do estudo, os participantes realizaram uma sessão de familiarização com o teste de consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$). Após 72 horas da familiarização, os participantes realizaram o teste e então iniciaram os procedimentos de familiarização com as sessões de treinamento (TF, TA e TC). Foram realizadas três sessões de TF, seguido pelo TA, separadas por uma semana, seguindo os mesmos protocolos de exercício que foram posteriormente realizados nas sessões experimentais, a fim de familiarizar os participantes com a dinâmica e com os aparelhos onde, posteriormente, seriam realizadas as sessões de treino. Após esse período (três semanas), foram realizadas as três sessões experimentais de treinamento (TF, TA e TC), com um

intervalo de uma semana entre elas. A ordem das sessões de treinamento foi aleatorizada e contra-balanceada, a fim de minimizar efeitos da ordem das sessões de treinamento nos resultados do estudo e balancear por possíveis efeitos de carry-over. Além disso, no dia anterior a cada sessão experimental, cada participante recebeu uma refeição padronizada, constituída de 3 g de carboidrato/kg de massa corporal, 0,5 g de proteína/kg de massa corporal, e 0,3 g de gordura/kg de massa corporal (CONCEIÇÃO *et al.*, 2016; SMILES *et al.*, 2017) . Durante duração da sessão experimental, os participantes consumiram 3 refeições também padronizadas (com 60g de carboidrato, 10g de proteína e 23.8g de gordura) as quais foram a última ingestão calórica 3 horas antes de cada coleta de tecido muscular. A Figura 1. apresenta uma visão geral do delineamento experimental.

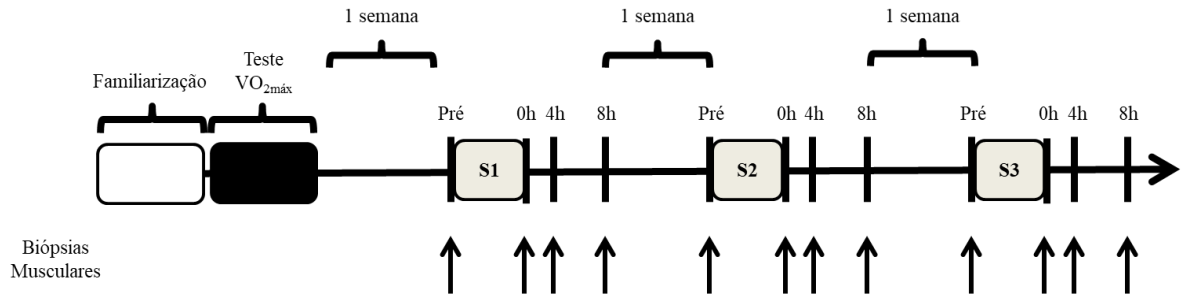


Figura 1. Visão geral do delineamento experimental. S1= primeira sessão de treinamento; S2= segunda sessão de treinamento; S3= terceira sessão de treinamento.

4.2.1. Sessão Experimental

Após chegarem ao laboratório, os participantes permaneceram em repouso na posição supina por ~15 minutos e, sob anestesia local, uma biópsia muscular do músculo vasto lateral foi obtida. Imediatamente após a biópsia muscular, os participantes realizaram a sessão de treinamento designada. Posteriormente, foram coletadas amostras de tecido muscular imediatamente, 4 horas e 8 horas após a sessão de treinamento (PSILANDER *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2005; CALDOW *et al.*, 2015). As duas sessões posteriores seguiram o mesmo protocolo de coleta. Cada sessão foi separada por uma semana de *wash out*. A Figura 2. apresenta uma visão geral da sessão experimental.

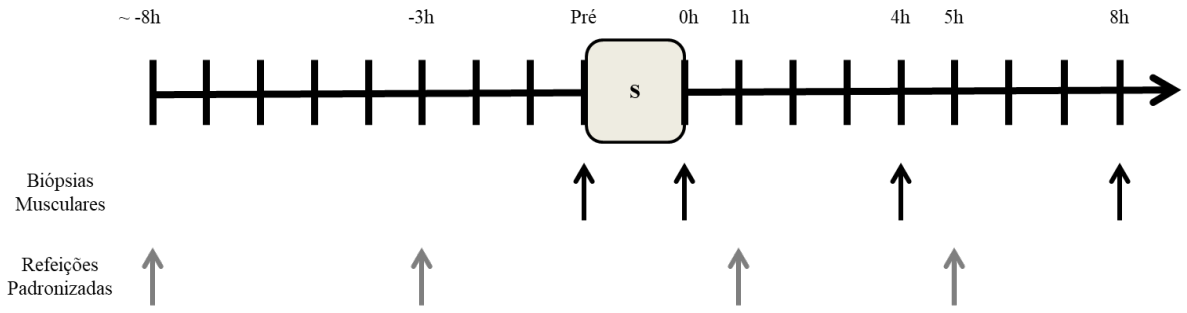


Figura 2. Visão geral da sessão experimental. S= Sessão experimental.

4.3. Protocolos das sessões de treinamento

4.3.1. Sessão de Treinamento de Força

Na sessão de TF foram realizados os exercícios *leg press* 45° e cadeira extensora. Cada exercício foi composto por duas séries de 8-12 repetições máximas. Cada série foi separada por 60s de intervalo.

4.3.2. Sessão de Treinamento Aeróbio

A sessão de TA foi realizada em esteira rolante e foi composta por 4 minutos de aquecimento com intensidade de 50% da velocidade atingida no consumo máximo de oxigênio ($_{v}VO_{2máx}$), seguido de 12 *sprints* de 1 min à 100% da $_{v}VO_{2máx}$, e intervalo de 1 minuto à 50% da $_{v}VO_{2máx}$.

4.3.3. Sessão de Treinamento Concorrente

O protocolo da sessão de TC foi composta pela realização do protocolo de TF seguido pelo protocolo de TA utilizados nas sessões isoladas, com 5 minutos de intervalo entre eles.

4.4. Biópsia Muscular

As biópsias foram realizadas na porção medial do músculo vasto lateral da perna. Antes da extração do tecido, a área foi tricotomizada e limpa com antisséptico. Uma pequena área, sobre a região selecionada, foi anestesiada com xilocaína a 2%, injetada subcutaneamente. Após a anestesia, uma pequena incisão, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, foi feita até a fáscia do músculo utilizando bisturi cirúrgico. A agulha de biópsia foi então introduzida no músculo numa profundidade aproximada de três centímetros para obtenção de aproximadamente 100 mg de amostra de tecido muscular. Todas as 4 biópsias musculares realizadas em uma mesma sessão foram feitas a partir da mesma incisão. Em cada uma das sessões experimentais subsequentes, uma nova incisão com o bisturi foi realizada aproximadamente 2 cm ao lado da incisão da sessão anterior. As amostras musculares coletadas foram limpas (livre de sangue e excesso de tecido conectivo), separadas em alíquotas para análises posteriores, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e conservadas à -80ºC até o momento das análises.

4.5. Análises moleculares

4.5.1. Extração do RNA para RT-qPCR e de DNA para realização das análises de metilação do DNA

O RNA e DNA foram extraídos de uma mesma alíquota de amostra de tecido muscular coletada no procedimento de biópsia muscular descrito anteriormente. Primeiramente, 10µL de β-mercaptoethanol (β -ME) foi adicionado a cada 1mL de Buffer RLT Plus antes da homogeneizição do tecido. Após a preparação do Buffer, ~30mg de tecido muscular foi adicionado a 600µL de Buffer RLT Plus e a homogeneização foi realizada com mini beads no instrumento MP FastPrep-24™ (MP Biomedicals). A extração do RNA e DNA total foram realizadas utilizando o kit AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen) no sistema automatizado QIAcube (QIAGEN) seguindo as instruções do protocolo do fabricante. O RNA foi eluído em água livre de RNAse em um volume final de 60µL e o DNA foi eluído no Elution Buffer, contido no próprio kit, em um volume final de eluição de 100 µL. As amostras foram armazenadas à -80°C e

posteriormente quantificadas por um espectrofotômetro (NanoDrop Technologies). As razões de absorbância 260ηm/280ηm foram utilizadas para verificar a pureza do RNA e do DNA.

Todas as amostras de RNA foram enviadas para o *Centre for Exercise and Nutrition*, no *Mary Mackillop Institute for Health Research*, na *Australian Catholic University (ACU)*, em Melbourne, Austrália para a realização das análises de expressão gênica. As amostras de DNA permaneceram no Brasil e foram encaminhadas para as análises de metilação do DNA no Núcleo de Sequenciamento ICESP/CTO no ICESP, em São Paulo.

4.5.2. Análises de Metilação do DNA

4.5.2.1. Conversão por bisulfito e Pirosequenciamento

1µg de DNA genômico (gDNA) extraído das amostras de musculo esquelético foi convertido por bissulfito usando o kit EpiTect Fast Bisulfite Conversion (Qiagen) de acordo com as especificações do fabricante. As regiões gênicas de interesse foram escolhidas a partir dos ensaios já pré-desenhados pela empresa Qiagen disponíveis para compra (Hs_MYOD1_01_PM PyroMark CpG assay; Hs_MYF5_01_PM PyroMark CpG assay; Hs_MYF6_01_PM PyroMark CpG assay). Essas regiões foram amplificadas por PCR utilizando o kit PyroMark PCR (Qiagen), também seguindo as instruções do fabricante. Todas as reações de PCR seguiram o seguinte protocolo: inicio com uma etapa de ativação de 15 minutos à 95°C, seguida por 45 ciclos de um processo de 3 etapas (denaturação (30 segundos à 95°C), anelamento (30 segundos à 56°C) e extensão (30 segundos à 72°C)), terminando com um período de extensão final de 10 minutos à 72°C. Os amplicons provenientes das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% e visualizados em um transiluminador ultravioleta. Os níveis de metilação do DNA foram mensurados utilizando os ensaios Pyromark CpG (Qiagen) e os reagentes PyroMark Q24 Gold (Qiagen), em um sistema PyroMark Q24 Autoprep (Qiagen, Brasil). O software PyroMark Q48 Autoprep versão 2.4.2 (Qiagen, Brasil) foi utilizado para gerar a ordem de dispensação de nucleotídeos, a partir da entrada da sequência a ser analisada, bem como para a análise da metilação específica de cada sítio CpG. Uma citosina em uma região não-CpG foi incluída na ordem de dispensação dos nucleotídeos para detectar uma possível conversão por bissulfito incompleta. A metilação média de todas os sítios CpG em cada região alvo foi determinada usando os valores de

metilação em cada sítio CpG individual. Além disso, foram incluídas uma amostra controle metilada e uma não metilada, adquiridas també da Qiagen (EpiTect Control DNA methylated e EpiTect Control DNA unmethylated, Qiagen), em todas as placas de análise.

4.5.3. Análises de expressão gênica

4.5.3.1. Transcrição Reversa

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Life Technologies), em uma reação de volume final de 20 µL.

4.5.3.2. PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

A quantificação dos níveis de RNA foi realizada (em duplicata) em um termo ciclador Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad). Primers/probes TaqMan-FAM para os genes MYOD1 (no. cat. Hs00159528_m1), MYF5 (no. cat. Hs00271574_m1) e MYF6 (no. cat. Hs00231165_m1), foram utilizados em uma reação de volume final de 20 µl. As condições para a PCR foram: 2 min à 50°C para ativação da UNG, 10 min à 95°C, 40 ciclos de 95°C por 15 s e, por fim, 60°C por 60 s. GAPDH (no. cat. Hs99999905_m1) foi usado como gene *housekeeping* para normalizer os valores de Ct já que seus valores de Ct não sofreram mudança significante durante o tempo e entre as condições. Os valores relativos de mRNA foram calculados como *fold change* usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), em que $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{housekeeping})_{\text{tempo x}} - (\text{Média dos valores de } Ct_{\text{gene alvo}} - \text{Média dos valores de } Ct_{housekeeping})_{\text{PRÉ}}$. “Tempo x” diz respeito a qualquer tempo de interesse, em que as amostras foram coletadas (0h, 4h or 8h) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

4.6. Teste de Potência Aeróbia

Para a avaliação da potência aeróbia foi utilizado um teste progressivo até a exaustão em esteira rolante (Inbrasport Super ATL, Inbrasport, Brasil). A velocidade inicial foi de seis $km \cdot h^{-1}$ por 2 minutos, com incrementos de 1 $km \cdot h^{-1}$ a cada minuto, até exaustão voluntária dos sujeitos.

O consumo de oxigênio foi mensurado continuamente (Quark b^2, Cosmed, Itália) durante todo o teste. Ao final de cada estágio, o participante também relatou sua percepção subjetiva de esforço, com base na escala de Borg 6-20. A frequência cardíaca foi monitorada continuamente utilizando um frequencímetro (Polar Vantage NVâ, Electro Oy, Finlândia). Para assegurar que os participantes realizaram esforço máximo, cada participante teve que atingir pelo menos 2 dos seguintes critérios: (1) uma variação no VO2 < 2,1 mL.kg-1.min-1; (2) razão de trocas respiratórias maior que 1,10; (3) frequência cardíaca (FC) maior que 90% do máximo predito para a idade (HOWLEY *et al.*, 1995). O $VO_{2máx}$ foi considerado como o maior valor de médias de 30 segundos obtido durante todo o teste. A velocidade de corrida na potência aeróbia máxima ($vVO_{2máx}$) foi adotado como valor referência para prescrição da sessão de treinamento aeróbio e o componente aeróbio da sessão de treinamento concorrente.

4.7. Análise Estatística

Técnicas de inspeção visual e o teste de Shapiro-Wilk foram utilizadas para verificar a presença de observações extremas e a normalidade dos dados. Sendo satisfeitas essas condições, um modelo misto para medidas repetidas foi usado, tendo condição e tempo como fatores fixos e os sujeitos como fator aleatório, para cada variável dependente. Na ocorrência de razão de valores de F significantes, contrastes simples foram realizados. Valores de P foram ajustados usando uma correção de Bonferroni. Além disso, como há sugestão de que as mudanças na metilação do DNA podem ser duradouras e, por isso, afetar os níveis de metilação/demetilação das sessões posteriores, analisamos o efeito de carry-over entre as sessões experimentais. Para isso, seguimos as sugestões de Shen (s/d) e implementamos uma análise de modelos mistos incluindo mais um fator à análise previamente descrita (i.e. ordem das sessões). O efeito carry-over foi determinado pela significância do fator ordem. Em caso de valores de F significantes, um ajuste de Tukey foi implementado para realização das comparações múltiplas. O valor de significância adotado foi de $P < 0,05$ e os dados foram apresentados como média e desvio padrão. Os gráficos das figuras foram feitos usando o software GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

5. RESULTADOS

5.1. Metilação do DNA

Não foram observadas diferenças significantes no momento PRÉ entre as condições para os valores de metilação do DNA dos genes MYF5 e MYF6 (P>0,05) (Figura 3B e 3C). Não houve efeito significante de carryover na metilação para nenhum dos genes avaliados (P≥0,22) (Figura 3). O gene MYOD1 apresentou um menor (F=4,60; P=0,0204) nível de metilação na condição TC no momento PRÉ, em comparação as condições TF (P=0,06) e TA (P=0,02) (Figura 3A). Foi encontrado um efeito de interação condição*tempo (F=3,07; P=0,0137) para o gene MYOD1, o qual apresentou menores níveis de metilação 4H (P=0,0347) e 8H (P<0,0001) após a sessão de TA, em comparação com o momento PRÉ (Figura 3A). Além disso, a metilação da região do MYOD1 analisada também se mostrou significantemente diminuída no momento 8H (P=0,0019) em comparação ao momento 0H, para a condição sessão de TA (Figura 3A). O gene MYOD1 também apresentou menores (P=0,0032) níveis de metilação 4H horas após a sessão de TA quando comparado a sessão de TF, no mesmo momento (Figura 3A). Foi observado um efeito principal de tempo para o gene MYF5 (F=26; P<0,0001), em que os níveis de metilação do DNA no momento 4H e 8H estavam diminuídos quando comparados com os momentos PRÉ (P<0,0001) e 0H (P<0,0001) (Figura 3B). De maneira similar, também foi encontrado um efeito principal de tempo para o gene MYF6 (F=13.62; P<0,0001) o qual também mostrou níveis menores de metilação do DNA nos momentos 4H e 8H em comparação com os momentos PRÉ (P<0,0001) e 0H (P=0,03 e P=0,004, respectivamente) (Figura 3C).

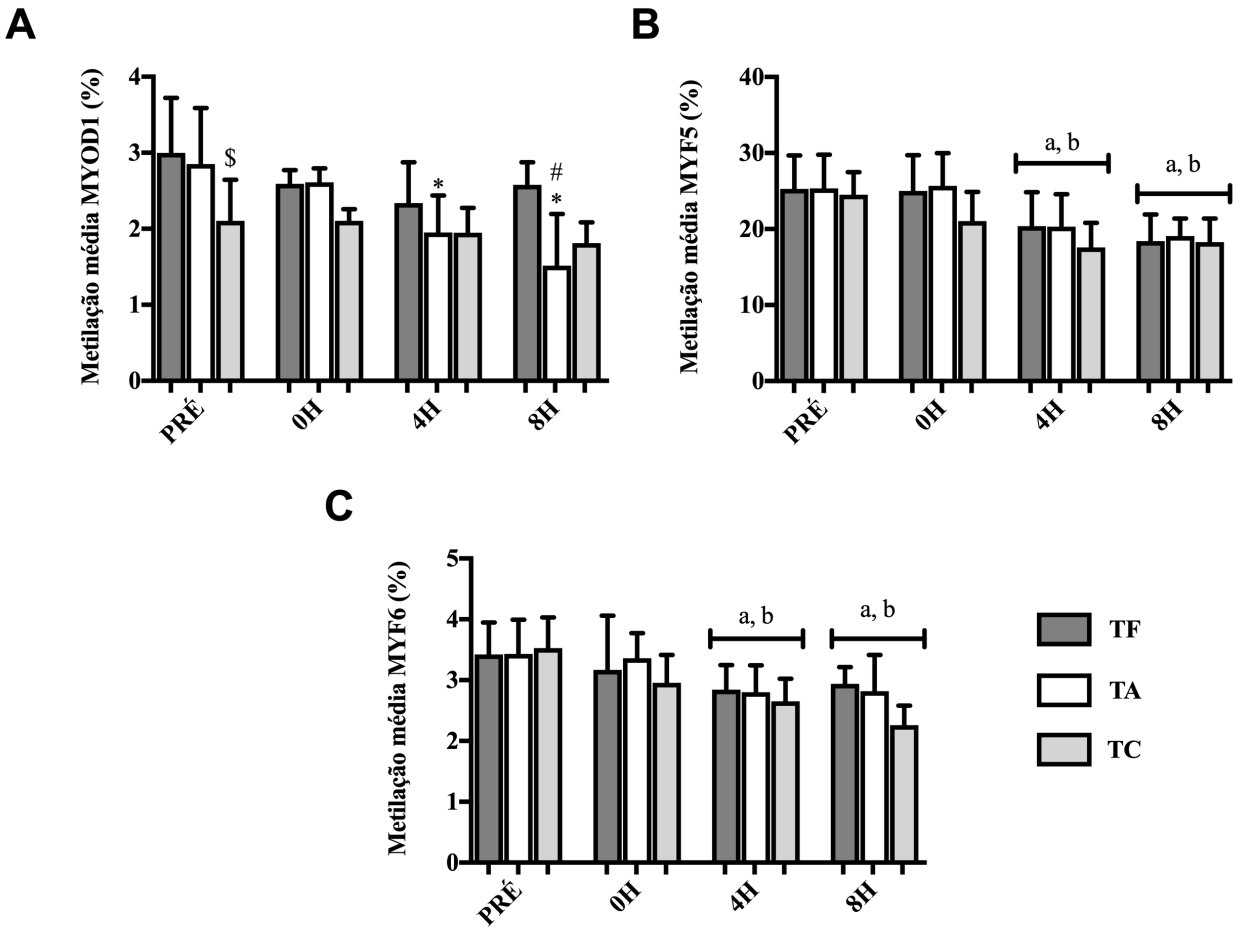
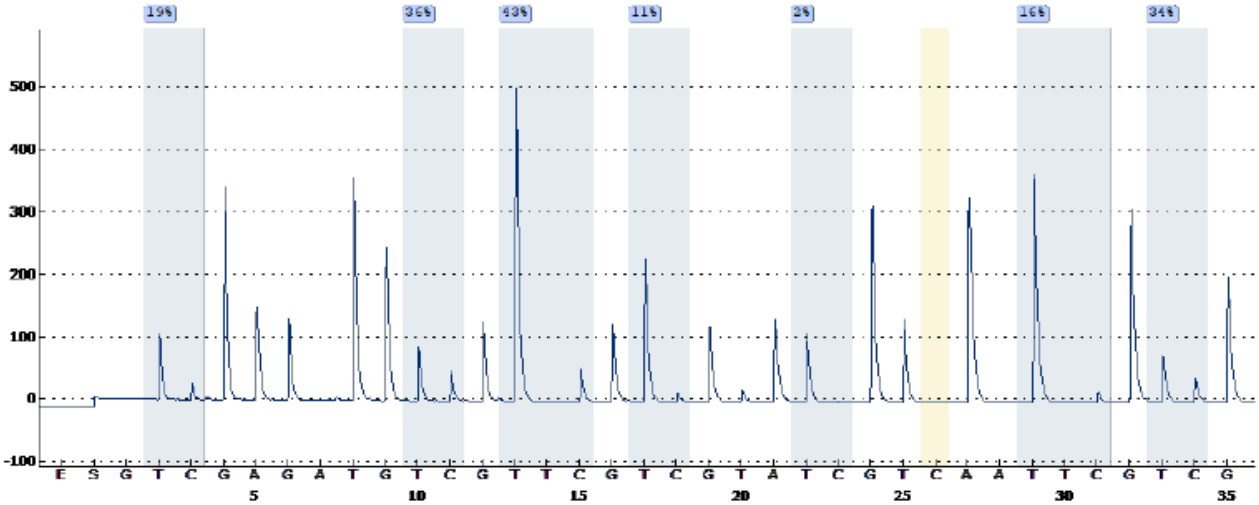


Figura 3. Média da metilação do DNA de regiões específicas dos genes (A) MYOD1, (B) MYF5 e (C) MYF6, no músculo vasto lateral, antes (PRÉ) e imediatamente (0H), 4H e 8H após o uma sessão de Treinamento de Força (TF), uma sessão de Treinamento Aeróbio (TA) e uma sessão de Treinamento Concorrente (TC). Valores expressos em percentual de metilação, conforme output original dos dados a partir do software Pyromark, e apresentados em media ± DP, n=9. $ = Significantemente diferente das condições TF e TA; * = Significantemente diferente da condição TA no momento PRÉ; # = Significantemente diferente da condição TA no momento 0H. a= Efeito principal de tempo quando comparado ao momento PRÉ (P< 0,05); b= Efeito principal de tempo quando comparado ao momento 0H (P< 0,05).

Well: A4
Assay: MYF5
Sample ID: 11
Note:
Analysis version: 2.0.8



Sequence to analyze:
YGGGAGTTTGGYGTTTTYGTYGAYGGGTAAATTTYGGGYGGA

Position	1	2	3	4	5	6	7
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	19	36	43	11	2	16	34

No warnings.

Figura 4. Imagem representativa do gráfico (pirograma) gerado como resultado pelo software PyroMark da Qiagen. A imagem mostra os resultados do sequenciamento de uma região do gene MYF5, com 7 CpGs incluídas, de uma amostra de DNA convertida por bisulfito. Os valores relativos ao percentual de cada uma das 7 CpGs específicas da região analisada aparecem acima, em azul. Basicamente, um trifosfato de desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP) é adicionado à reação. A polimerase de DNA catalisa a adição do dNTP ao iniciador, se for complementar da base na cadeia de modelo. Cada evento de incorporação é acompanhado pela liberação de pirofosfato (PPi), em uma quantidade equimolar à quantidade de nucleotídeo incorporado. A enzima ATP sulfurilase converte o pirofosfato (PPi) em ATP na presença de adenosina 5'fosfossulfato. Esse ATP estimula a conversão de luciferina em oxiluciferina, mediada por luciferase, que gera luz visível em quantidades proporcionais à quantidade de ATP. A luz produzida na reação catalisada pela luciferase é detectada pelos sensores CCD e vista como um pico na saída de dados brutos

(pirograma). A altura de cada pico (sinal luminoso) é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados.

5.2. Expressão gênica

Não foram observadas diferenças significantes no momento PRÉ entre as condições para todos os alvos analisados (P>0,05) (Figura 5). Também não foi observado efeito *carryover* para nenhum dos genes analisados (P≥0.601).Um efeito principal de tempo foi encontrado para o gene MYOD1 (F=14.19; P<0,0001) em que a expressão de mRNA em 8H foi maior quando comparada aos momentos PRÉ (P<0,0001), 0h (P<0,0001) e 4H (P=0,0083), bem como a expressão em 4H foi maior quando comparada aos valores PRÉ exercício (P=0,0052) (Figura 5A). Um efeito principal de tempo também foi encontrado para o gene MYF5 (F=7.56; P=0,0002), em que os níveis de mRNA em todas as condições foram menores no momento 4H quando comparados com o momento 0H (P=0,0008), e os níveis de mRNA em 8H mostraram-se significantemente aumentados quando comparados ao momento 4H (P=0,0026) (Figura 5B). Um efeito principal de tempo foi também observado para o MYF6 (F=8.61; P=0,0001), em que a expressão de mRNA foi maior em 4H quando comparada aos momentos PRÉ (P=0,0002) e 0H (P=0,0002) (Figure 5C).

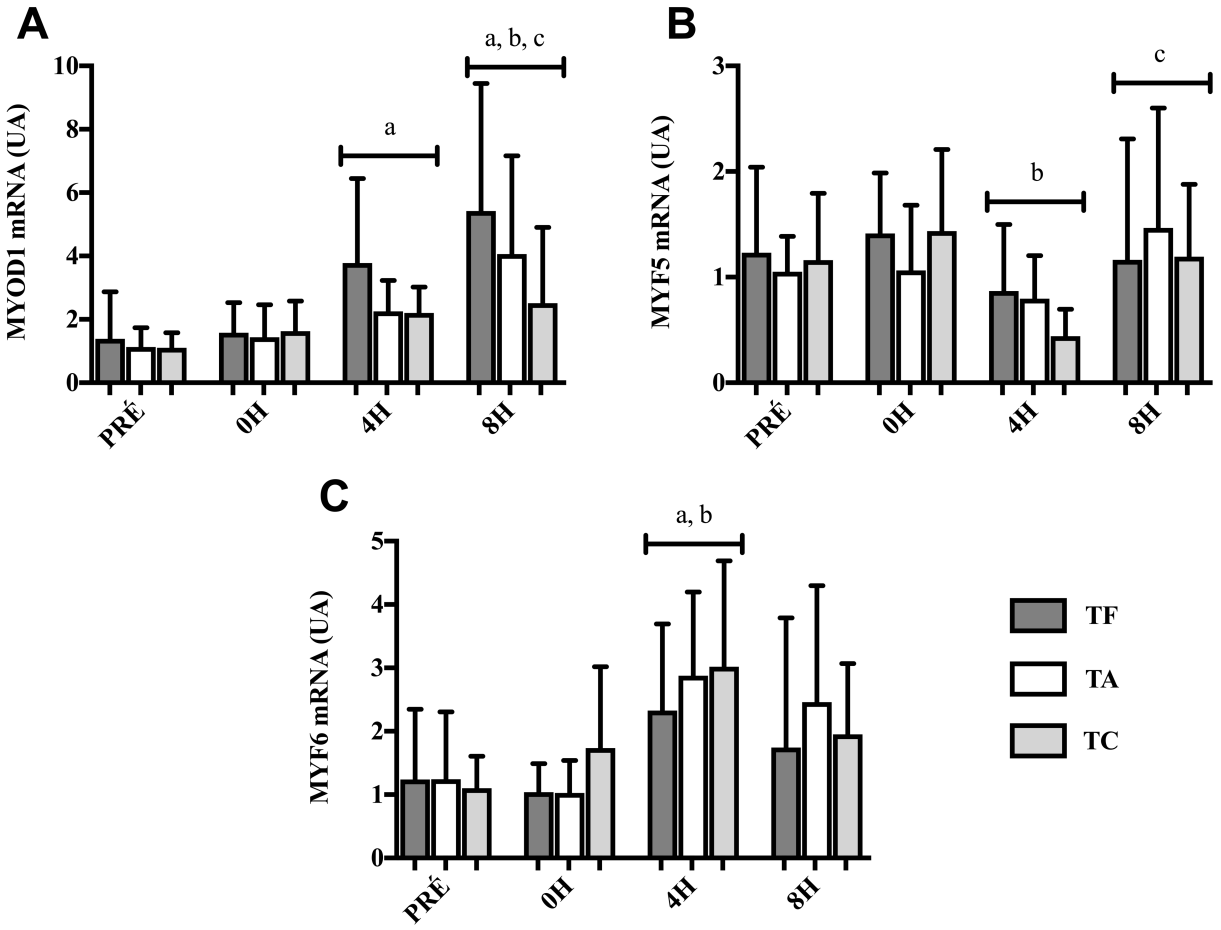


Figura 5. Expressão de mRNA dos genes (A) MYOD1, (B) MYF5 e (C) MYF6, no músculo vasto lateral, antes (PRÉ) e imediatamente (0H), 4H e 8H após o uma sessão de Treinamento de Força (TF), uma sessão de Treinamento Aeróbio (TA) e uma sessão de Treinamento Concorrente (TC). Valores expressos relativos ao GAPDH e apresentados em unidades arbitrárias (media ± DP, n=9). a= Efeito principal de tempo quando comparado ao momento PRÉ (P< 0,05); b= Efeito principal de tempo quando comparado ao momento 0H (P< 0,05); c= Efeito principal de tempo quando comparado ao momento 4H (P< 0,05).

6. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo a comparar os níveis de metilação do DNA de genes fatores regulatórios miogênicos após três diferentes sessões de treinamento físico. Além disso, foi demonstrado também pela primeira vez o curso temporal dessas mudanças agudas em três tempos distintos (0h, 4h e 8h) após os diferentes protocolos de exercício, bem como sua relação temporal com a expressão gênica nos mesmos momentos analisados. A partir de um desenho experimental *crossover* e randomizado, o presente estudo combinou análises de pirosequenciamento de DNA convertido por bisulfito com análises de RT-qPCR para verificar os níveis de metilação médio em regiões específicas de genes fatores regulatórios miogênicos conjuntamente com a análise da expressão de mRNA desses genes. Nossos principais achados mostraram que as diferentes sessões de treinamento físico (TF, TA e TC) induzem mudanças semelhantes na metilação do DNA e na expressão de transcritos dos genes MYOD1, MYF5 e MYF6, e que essas mudanças acontecem principalmente entre 4 e 8 horas após o estímulo do exercício. Contrariando nossa hipótese inicial, foi demonstrado que as mudanças nos níveis de metilação do DNA e nos níveis de mRNA dos diferentes genes não foram significantemente diferentes entre as condições TC e TF. Coletivamente, esses dados indicam que as mudanças agudas até 8 horas na metilaçao do DNA e na expressão de mRNA de genes MRFs podem não estar diretamente relacionadas com o efeito de interferência induzido pelo TC.

Os MRFs são um conjunto de fatores transcricionais que controlam a proliferação e a diferenciação das CSs musculares, as quais podem estar relacionadas à maior magnitude da hipertrofia muscular induzida por sobrecarga a longo prazo (MURACH *et al.*, 2018). O gene MYOD1, o qual participa principalmente dos processos de ativação e proliferação das CSs, mostrou ter sua expressão aumentada a partir de 4 horas após as sessões de treinamento, sendo ainda mais aumentada ainda após 8 horas. De maneira semelhante, YANG *et al.* (2005) também demonstraram aumentos significantes da expressão de MYOD 8 horas após uma sessão de TF e de TA. Porém, os autores não mostraram aumentos significantes no momento 4 horas após os exercícios, da mesma forma que no presente estudo. Já o estudo de PSILANDER *et al.* (2003) demonstrou apenas aumento significante do MYOD imediatamente após a sessão de TF e em mais nenhum outro tempo após o exercício (0h, 2h, 6h, 24h e 48h). Quanto aos níveis de metilação da região analisada do MYOD1, nossos resultados mostraram uma diminuição significante 4H e 8H

após a sessão de TA, tanto em comparação com os momentos anteriores, como também em comparação à condição TF, especificamente no momento 4H. Nossos resultados divergem dos achados de BARRES *et al.* (2012), em que os níveis de metilação do gene MYOD1 não se mostraram significantemente alterados em até 3 horas após uma sessão de TA tanto em baixa (40% do $VO_{2máx}$), como em alta (80% do $VO_{2máx}$) intensidade. Além disso, os resultados do ajuste pos hoc realizados no nosso estudo não mostraram alterações significantes da metilação do MYOD1 nas condições TF e TC. Esse resultado é inesperado, uma vez que hipotetizamos que a expressão gênica aumentada observada após todas as condições de exercício estivesse intimamente ligada às mudanças na metilação do DNA. Outro resultado inesperado foi o menor nível de metilação TC, no momento PRÉ exercício, quando comparado ao TF e ao TA. Uma possível explicação para esses resultados é que as CpGs analisadas na região específica do gene MYOD1 que nós pirosequenciamos são diferentemente sensíveis aos protocolos de exercício que nós utilizamos no nosso trabalho.

O MYF5 participa junto com o MYOD1 do processo de ativação das CSs musculares. No presente estudo encontramos uma diminuição significante dos níveis de metilação do DNA na região analisada do gene MYF5 tanto 4, como 8 horas após o exercício. Interessantemente, os níveis de transcritos de mRNA do mesmo gene diminuíram 4 horas após as três diferentes sessões de treinamento, aumentando significantemente no momento 8 horas, quando retornou a níveis semelhantes aos basais. De fato, o MYF5 não mostra um padrão tão claro de expressão gênica após o exercício físico nos diferentes estudos na literatura até o momento (YANG & GOLDSPINK, 2002; WILBORN *et al.*, 2009; ZAK *et al.*, 2017; ZAK *et al.*, 2018). No estudo de YANG *et al.* (2005) a expressão de MYF5 não foi significantemente alterada em nenhum momento após diferentes sessões de exercício (TF e TA). Já WILBORN *et al.* (2009) mostraram aumentos 30 minutos, 2 horas e 6 horas após uma sessão de TF, com diferentes intensidades. Ainda que esses resultados sejam contrários aos do presente estudo, nossos achados corroboram com o estudo de ZAK *et al.* (2018), no qual os autores também mostraram uma diminuição da expressão do MYF5 após uma sessão de TF (4x8-12 repetições dos exercícios extensão de joelho e leg press, ambos unilaterais, à ~65-75% 1-RM), tanto em uma condição de calor, como também no frio induzido (~40ºC e ~16ºC , respectivamente). De maneira similar, RAUE *et al.* (2006) também encontram uma diminuição, ainda que não significante, dos níveis de MYF5 4 horas após uma sessão de TF (3x10 repetições de extensão de joelho, à 70% de 1-RM), tanto em sujeitos jovens, como em idosos.

Ainda que esses achados sejam controversos, e que uma diminuição da expressão de MYF5 possa indicar uma possível atenuação do processo hipertrófico, uma possível explicação para essa diminuição seria o papel semelhante do gene MYF5 ao do MYOD1 no ciclo das CSs, participando principalmente do processo de ativação dessas células (ZAMMIT, 2017; ZAK *et al.*, 2018). Assim, a expressão elevada do MYOD1, observada desde o momento 4 horas após o exercício, seria suficiente para o processo de ativação das CSs acontecer, causando então a diminuição da expressão do MYF5 no mesmo momento (ZAK *et al.*, 2018). Uma outra possível explicação seria que o fato da rápida necessidade de tradução de mais proteínas do MYF5, em resposta as sessões de treinamento, para que ocorresse o desencadeamento da ativação das CSs, fez com que as moléculas de mRNA desse gene, já presentes nas CSs antes do exercício, fossem utilizadas pelos ribossomos antes mesmo da maior transcrição desse gene começar a acontecer. Assim, a demetiliação observada na região do MYF5 analisada 4 horas após os exercícios permitiu a maior expressão desse gene, produzindo então o aumento significante em seus níveis de mRNA no momento 8 horas (em comparação ao momento anterior), como observado em nossos resultados.

De maneira similar ao MYF5, os níveis de metilação do DNA da região analisada do gene MYF6, também se mostraram significantemente diminuídos 4 horas após todas as sessões de exercício, tendo essa diminuição sustentada até o momento 8 horas. Porém, contrariamente a expressão gênica do MYF5, os níveis de mRNA do gene MYF6 mostraram-se significantemente aumentados 4 horas após todas as sessões de exercício, em comparação aos momentos PRÉ e 0H. O MYF6 é um dos fatores que atua na determinação da linhagem miogênica no processo de miogênese. Os aumentos aqui observados são consistentes com os observados por YANG *et al.* (2005) e RAUE *et al.* (2006), e um pouco mais tardios que os observados por PSILANDER *et al.* (2003) (i.e. 2 horas após a sessão de TF). Nossos resultados sugerem que as três condições empregadas em nosso desenho experimental podem ter induzido, de maneira aguda, a partir de 4 horas após o exercício, o processo de diferenciação terminal de mioblastos em proliferação, gerando a fusão dessas células com as fibras musculares já existentes, permitindo assim a doação de seus núcleos, e os consequentes processos de crescimento e reparo das fibras musculares submetidas ao estresse dos protocolos de exercício. A partir dos nossos resultados, é possível que, também para o MYF6, a demetilação do DNA tenha possibilitado o aumento da expressão gênica após as sessões de treinamento.

Conjuntamente, nossos resultados indicam que as três sessões de treinamento são capazes de induzir alterações similares na metilação do DNA e na expressão dos genes responsáveis pela regulação do ciclo das CSs. Além disso, todas as mudanças observadas na expressão de transcritos de mRNA dos MRFs se deram conjuntamente a uma diminuição aguda na metilação do DNA de regiões específicas desses genes, corroborando com a teoria da existência de um *link* funcional entre a demetilação do DNA e a expressão gênica induzidas pelo exercício, como sugerido pela literatura (BARRES *et al.*, 2012; LINDHOLM *et al.*, 2014; WIDMANN *et al.*, 2019). Assim, é possível que essa demetilação induzida pelo exercício agudo tenha tornado mais expostas regiões importantes da cromatina nos genes em questão, permitindo então a ligação da maquinaria de transcrição à essas regiões e, consequentemente, o aumento de suas expressões. Porém, é importante salientar que a metilação nos nossos genes alvo foi analisada apenas em uma região específica de cada gene, havendo um número variado de CpGs em cada região, dependendo do gene considerado. Como essa foi a primeira vez que este ensaio de pirosequenciamento foi utilizado para a análise desses genes miogênicos após três diferentes protocolos de exercício, nós utilizamos os primeiros conjuntos de primers disponibilizados pela Qiagen para cada gene, pré-desenhados pela própria empresa. Assim, é ainda possível que outras regiões nos mesmos genes possam apresentar uma dinâmica diferente da observada no presente trabalho.

De qualquer maneira, podemos sugerir que as sessões de TF TA e TC foram suficientes para induzir o aumento da expressão de genes miogênicos, conjuntamente com a demetilação de regiões específicas nesses genes. Interessantemente, ainda que as análises do presente trabalho tenham sido realizadas a partir do homogenato total de tecido muscular extraído nas biópsias musculares, e não em CSs isoladas, recentemente o trabalho de NEDERVEEN *et al.* (2019) demonstrou que a direção das mudanças nos níveis de mRNA dos MRFs, induzidas por um protocolo de exercício agudo excêntrico, analisadas no homogenato total de tecido muscular, refletem (ainda que em menor magnitude) a direção das mudanças observadas em CSs isoladas. Entretanto, não podemos afirmar se, de fato, as alterações observadas na expressão gênica dos MRFs se refletiram em modulações da quantidade, da ativação ou ainda da diferenciação das CSs, pois não realizamos essas medidas. Ainda assim, nossos resultados diferem dos estudos anteriores que não demonstraram diferenças significantes na expressão dos MRFs após uma sessão de TA ou TC (COFFEY, JEMIOLO*, et al.*, 2009; COFFEY, PILEGAARD*, et al.*, 2009; DONGES *et al.*, 2012; PUGH *et al.*, 2015). Ainda que, no nosso estudo, a sessão de TF tenha induzido um aumento

de maior magnitude na expressão de mRNA do gene MYOD1, no momento 8H, comparado as sessões de TA e de TC (5,42- vs 4,06- vs 2,51-fold, respectivamente), nossos resultados mostraram que, estatisticamente, esse aumento no tempo se deu independentemente das condições. A diferença entre nossos resultados e os encontrados nos estudos anteriores pode ter acontecido devido aos distintos protocolos de exercício empregados. No estudo de DONGES *et al.* (2012), o qual mostrou uma expressão de mRNA dos genes MYOD e da MYOG atenuada 4 horas após uma sessão de TC, em comparação ao TF, protocolo de TA que compôs o protocolo da sessão de TC foi realizado de maneira contínua, em bicicleta, por 20 minutos, à 55% do pico da potência aeróbia dos indivíduos. Porém, a sessão de TC foi composta por metade do volume das sessões isoladas de TF e TA, não permitindo saber se expressão gênica atenuada se deu pela adição do TA ao TF, em si, ou devido ao menor volume total de exercício, em comparação a sessão de TF isolada. Diferentemente, no nosso estudo, a sessão de TC foi composta exatamente pelos mesmos protocolos das sessões isoladas de TF e TA. Além disso, nosso protocolo da sessão de TA foi realizado em esteira rolante, a partir de um protocolo intervalado de alta intensidade, levando em consideração o modelo para o estudo do fenômeno do efeito de interferência proposto por DOCHERTY & SPORER (2000), e grande parte dos trabalhos na literatura que demonstraram algum tipo de interferência em seus resultados (DUDLEY & DJAMIL, 1985; WILSON *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2014; FYFE, BISHOP*, et al.*, 2016; TSITKANOU *et al.*, 2017; FYFE *et al.*, 2018). Além disso, ainda é possível que a adição de uma sessão de TA ao TF não interfira diretamente na expressão dos MRFs, mas sim em sua ação pós traducional, de maneira indireta, uma vez que o trabalho de LINDHOLM *et al.* (2014) mostrou um aumento da metilação de motivos de ligação de MRFs no DNA, após a realização de 3 meses de TA em alta intensidade. Assim, é possível que, ao aumentar a metilação dessas regiões, o TA interfira na ação funcional proteica dos MRFs, interferindo na ligação desses fatores ao DNA, atenuando seus efeitos como fatores de transcrição, diminuindo assim a transcrição de outros genes importantes para o crescimento muscular induzido pelo TF.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, o presente trabalho mostrou, pela primeira vez, que uma sessão aguda de TF, de TA e de TC induzem mudanças semelhantes na metilação média de regiões específicas e na expressão de mRNA dos genes MYOD1, MYF5 e MYF6. Além disso, nós mostramos também que essas mudanças acontecem principalmente entre 4 e 8 horas após o estímulo do exercício, para todos os genes analisados. Observando a dinâmica da metilação do DNA nas regiões específicas, e sua relação temporal com os resultados de expressão gênica, é possível sugerir que a demetilação dessas regiões permitiu o aumento da transcrição desses genes. Nós também observamos que as mudanças nos níveis de metilação do DNA e nos níveis de mRNA dos diferentes genes não foram significantemente diferentes entre as condições TC e TF indicando que essas mudanças agudas até 8 horas na metilaçao do DNA e na expressão de mRNA desses MRFs pode não estar relacionadas diretamente com o efeito de interferência induzido pelo TC. A partir dos nossos achados, sugerimos que futuros trabalhos investiguem ainda mais profundamente essa relação entre a metilação do DNA e a expressão gênica induzidas pelo exercício físico, a partir não só de outros protocolos de treinamento, como também utilizando de outros desenhos experimentais (e.g. crônico, agudo-crônico), introduzindo outros tempos de coleta do tecido muscular, bem como analisando outras regiões do DNA, a partir não só de modelos como o nosso, mas também de modelos mais básicos, a fim de melhor entender a importância funcional das mudanças observadas nesses mecanismos em humanos.

8. REFERÊNCIAS

ABE, S. et al. Effect of mechanical stretching on expressions of muscle specific transcription factors MyoD, Myf-5, myogenin and MRF4 in proliferated myoblasts. **Anat Histol Embryol**. v. 38, n. 4, p. 305-10, Aug 2009.

ABE, T. et al. Time course for strength and muscle thickness changes following upper and lower body resistance training in men and women. **Eur J Appl Physiol**. v. 81, n. 3, p. 174-80, Feb 2000.

ABREU, P. et al. Satellite cell activation induced by aerobic muscle adaptation in response to endurance exercise in humans and rodents. **Life Sci**. v. 170, p. 33-40, Feb 1 2017.

ACSM. American College of Sports Medicine Position Stand and American Heart Association. Recommendations for cardiovascular screening, staffing, and emergency policies at health/fitness facilities. **Med Sci Sports Exerc**. v. 30, n. 6, p. 1009-18, Jun 1998.

ACSM. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**. v. 34, n. 2, p. 364-80, Feb 2002.

ACSM. **Diretrizes do ACSM para os Testes de Esforço e sua Prescrição**. 2003.

ACSM. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**. v. 41, n. 3, p. 687-708, Mar 2009.

ACSM. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc**. v. 43, n. 7, p. 1334-59, Jul 2011.

AGUIAR, A. F. et al. Myogenin, MyoD and IGF-I regulate muscle mass but not fiber-type conversion during resistance training in rats. **Int J Sports Med**. v. 34, n. 4, p. 293-301, Apr 2013.

ALIBEGOVIC, A. C. et al. Insulin resistance induced by physical inactivity is associated with multiple transcriptional changes in skeletal muscle in young men. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 299, n. 5, p. E752-63, Nov 2010.

ALMEIDA, C. F. et al. Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. **Stem Cells Int**. v. 2016, p. 1078686, 2016.

APRÓ, W. et al. Resistance exercise-induced S6K1 kinase activity is not inhibited in human skeletal muscle despite prior activation of AMPK by high-intensity interval cycling. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 308, n. 6, p. E470-81, Mar 15 2015.

APRO, W. et al. Resistance exercise induced mTORC1 signaling is not impaired by subsequent endurance exercise in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 305, n. 1, p. E22-32, Jul 1 2013.

ARANY, Z. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. **Curr Opin Genet Dev**. v. 18, n. 5, p. 426-34, Oct 2008.

ARMSTRONG, L. E.; VANHEEST, J. L. The unknown mechanism of the overtraining syndrome: clues from depression and psychoneuroimmunology. **Sports Med**. v. 32, n. 3, p. 185-209, 2002.

ASCHENBACH, W. G.; SAKAMOTO, K.; GOODYEAR, L. J. 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, metabolism and exercise. **Sports Med**. v. 34, n. 2, p. 91-103, 2004.

ATHERTON, P. J. et al. Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. **Faseb J**. v. 19, n. 7, p. 786-8, May 2005.

BAAR, K. Training for endurance and strength: lessons from cell signaling. **Med Sci Sports Exerc**. v. 38, n. 11, p. 1939-44, Nov 2006.

BAAR, K. Using molecular biology to maximize concurrent training. **Sports Med**. v. 44 Suppl 2, p. S117-25, Nov 2014.

BAAR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **Am J Physiol**. v. 276, n. 1 Pt 1, p. C120-7, Jan 1999.

BAAR, K. et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. **Faseb J**. v. 16, n. 14, p. 1879-86, Dec 2002.

BABCOCK, L. et al. Concurrent aerobic exercise interferes with the satellite cell response to acute resistance exercise. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 302, n. 12, p. R1458-65, Jun 15 2012.

BAGLEY, J. R. et al. Epigenetic responses to acute resistance exercise in trained vs sedentary men. **The Journal of Strength & Conditioning Research**. 2019.

BAJPEYI, S. et al. Skeletal Muscle PGC1alpha -1 Nucleosome Position and -260 nt DNA Methylation Determine Exercise Response and Prevent Ectopic Lipid Accumulation in Men. **Endocrinology**. v. 158, n. 7, p. 2190-2199, Jul 1 2017.

BALABINIS, C. P. et al. Early phase changes by concurrent endurance and strength training. **J Strength Cond Res**. v. 17, n. 2, p. 393-401, May 2003.

BARNETT, C. et al. Muscle metabolism during sprint exercise in man: influence of sprint training. **J Sci Med Sport**. v. 7, n. 3, p. 314-22, Sep 2004.

BARRES, R. et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. **Cell Metab**. v. 15, n. 3, p. 405-11, Mar 07 2012.

BARRES, R.; ZIERATH, J. R. The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. **Nat Rev Endocrinol**. v. 12, n. 8, p. 441-51, Aug 2016.

BAZGIR, B. et al. Satellite Cells Contribution to Exercise Mediated Muscle Hypertrophy and Repair. **Cell J**. v. 18, n. 4, p. 473-484, Winter 2017.

BEGUE, G. et al. DNA methylation assessment from human slow- and fast-twitch skeletal muscle fibers. **J Appl Physiol (1985)**. v. 122, n. 4, p. 952-967, Apr 1 2017.

BELARDINELLI, R. et al. Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. **Circulation**. v. 99, n. 9, p. 1173-82, Mar 9 1999.

BELL, G. J. et al. Physiological adaptations to concurrent endurance training and low velocity resistance training. **Int J Sports Med**. v. 12, n. 4, p. 384-90, Aug 1991.

BELL, G. J. et al. Effect of concurrent strength and endurance training on skeletal muscle properties and hormone concentrations in humans. **Eur J Appl Physiol**. v. 81, n. 5, p. 418-27, Mar 2000.

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.

BENTLEY, D. J. et al. Muscle activation of the knee extensors following high intensity endurance exercise in cyclists. **Eur J Appl Physiol**. v. 81, n. 4, p. 297-302, Mar 2000.

BENTON, C. R.; WRIGHT, D. C.; BONEN, A. PGC-1alpha-mediated regulation of gene expression and metabolism: implications for nutrition and exercise prescriptions. **Appl Physiol Nutr Metab**. v. 33, n. 5, p. 843-62, Oct 2008.

BENZIANE, B. et al. Divergent cell signaling after short-term intensified endurance training in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 295, n. 6, p. E1427-38, Dec 2008.

BERGER, F. The strictest usage of the term epigenetic. **Semin Cell Dev Biol**. v. 19, n. 6, p. 525-6, Dec 2008.

BERNSTEIN, D. L. et al. The BisPCR(2) method for targeted bisulfite sequencing. **Epigenetics Chromatin**. v. 8, p. 27, 2015.

BICKEL, C. S. et al. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. **J Appl Physiol (1985)**. v. 98, n. 2, p. 482-8, Feb 2005.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**. v. 16, n. 1, p. 6-21, Jan 01 2002.

BLAIR, S. N. et al. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. **JAMA**. v. 276, n. 3, p. 205-10, Jul 17 1996.

BOCK, C. et al. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. **Nat Biotechnol**. v. 28, n. 10, p. 1106-14, Oct 2010.

BODINE, S. C. mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. **Med Sci Sports Exerc**. v. 38, n. 11, p. 1950-7, Nov 2006.

BOJSEN-MOLLER, J. et al. Muscle performance during maximal isometric and dynamic contractions is influenced by the stiffness of the tendinous structures. **J Appl Physiol (1985)**. v. 99, n. 3, p. 986-94, Sep 2005.

BOLSTER, D. R. et al. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. **J Biol Chem**. v. 277, n. 27, p. 23977-80, Jul 5 2002.

BOUCHARD, C. Exercise genomics--a paradigm shift is needed: a commentary. **Br J Sports Med**. v. 49, n. 23, p. 1492-6, Dec 2015.

BROWN, W. M. Exercise-associated DNA methylation change in skeletal muscle and the importance of imprinted genes: a bioinformatics meta-analysis. **Br J Sports Med**. v. 49, n. 24, p. 1567-78, Dec 2015.

BRYAN, A. D. et al. Physical activity and differential methylation of breast cancer genes assayed from saliva: a preliminary investigation. **Ann Behav Med**. v. 45, n. 1, p. 89-98, Feb 2013.

BURGOMASTER, K. A. et al. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. **J Physiol**. v. 586, n. 1, p. 151-60, Jan 1 2008.

BUSATO, F. et al. Quantitative DNA Methylation Analysis at Single-Nucleotide Resolution by Pyrosequencing(R). **Methods Mol Biol**. v. 1708, p. 427-445, 2017.

CADORE, E. L. et al. Strength prior to endurance intra-session exercise sequence optimizes neuromuscular and cardiovascular gains in elderly men. **Exp Gerontol**. v. 47, n. 2, p. 164-9, Feb 2012.

CADORE, E. L. et al. Hormonal responses to concurrent strength and endurance training with different exercise orders. **J Strength Cond Res**. v. 26, n. 12, p. 3281-8, Dec 2012.

CADORE, E. L. et al. Neuromuscular adaptations to concurrent training in the elderly: effects of intrasession exercise sequence. **Age (Dordr)**. v. 35, n. 3, p. 891-903, Jun 2012.

CADORE, E. L. et al. Physiological effects of concurrent training in elderly men. **Int J Sports Med**. v. 31, n. 10, p. 689-97, Oct 2010.

CALDOW, M. K. et al. Early myogenic responses to acute exercise before and after resistance training in young men. **Physiol Rep**. v. 3, n. 9, Sep 2015.

CAMPOS, G. E. et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. **Eur J Appl Physiol**. v. 88, n. 1-2, p. 50-60, Nov 2002.

CECCARELLI, G. et al. Muscle Stem Cell and Physical Activity: What Point is the Debate at? **Open Med (Wars)**. v. 12, p. 144-156, 2017.

CHAO, Z. et al. Characterization of the Methylation Status of Pax7 and Myogenic Regulator Factors in Cell Myogenic Differentiation. **Asian-Australas J Anim Sci**. v. 29, n. 7, p. 1037-43, Jul 2016.

CHARIFI, N. et al. Effects of endurance training on satellite cell frequency in skeletal muscle of old men. **Muscle Nerve**. v. 28, n. 1, p. 87-92, Jul 2003.

CHTARA, M. et al. Effect of concurrent endurance and circuit resistance training sequence on muscular strength and power development. **J Strength Cond Res**. v. 22, n. 4, p. 1037-45, Jul 2008.

COFFEY, V. G.; HAWLEY, J. A. The molecular bases of training adaptation. **Sports Med**. v. 37, n. 9, p. 737-63, 2007.

COFFEY, V. G.; HAWLEY, J. A. Concurrent exercise training: do opposites distract? **J Physiol**. Aug 10 2016.

COFFEY, V. G. et al. Effect of consecutive repeated sprint and resistance exercise bouts on acute adaptive responses in human skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 297, n. 5, p. R1441-51, Nov 2009.

COFFEY, V. G. et al. Consecutive bouts of diverse contractile activity alter acute responses in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**. v. 106, n. 4, p. 1187-97, Apr 2009.

COFFEY, V. G. et al. Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans. **FASEB J**. v. 20, n. 1, p. 190-2, Jan 2006.

CONCEIÇÃO, 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, Sep 2016.

CONCEICAO, M. S. et al. Muscle Fiber Hypertrophy and Myonuclei Addition: A Systematic Review and Meta-analysis. **Med Sci Sports Exerc**. Mar 5 2018.

CRAIG, B. W. et al. The Effects of Running, Weightlifting and a Combination of Both on Growth Hormone Release. **The Journal of Strength & Conditioning Research**. v. 5, n. 4, p. 198-203, 1991.

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, Jul 1 2004.

DAMAS, F.; LIBARDI, C. A.; UGRINOWITSCH, C. The development of skeletal muscle hypertrophy through resistance training: the role of muscle damage and muscle protein synthesis. **Eur J Appl Physiol**. v. 118, n. 3, p. 485-500, Mar 2018.

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, 2018.

DAMAS, F. et al. A Review of Resistance Training-Induced Changes in Skeletal Muscle Protein Synthesis and Their Contribution to Hypertrophy. **Sports Med**. Mar 6 2015.

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, Sep 15 2016.

DANIELS, J. T.; YARBROUGH, R. A.; FOSTER, C. Changes in VO2 max and running performance with training. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**. v. 39, n. 4, p. 249-54, Oct 20 1978.

DANKEL, S. J. et al. Frequency: The Overlooked Resistance Training Variable for Inducing Muscle Hypertrophy? **Sports Med**. v. 47, n. 5, p. 799-805, May 2017.

DE SOUZA, E. O. et al. Acute effect of two aerobic exercise modes on maximum strength and strength endurance. **J Strength Cond Res**. v. 21, n. 4, p. 1286-90, Nov 2007.

DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes Dev**. v. 25, n. 10, p. 1010-22, May 15 2011.

DELANEY, C.; GARG, S. K.; YUNG, R. Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. **Methods Mol Biol**. v. 1343, p. 249-64, 2015.

DENHAM, J. et al. Epigenetic changes in leukocytes after 8 weeks of resistance exercise training. **Eur J Appl Physiol**. v. 116, n. 6, p. 1245-53, Jun 2016.

DENHAM, J. et al. Exercise: putting action into our epigenome. **Sports Med**. v. 44, n. 2, p. 189-209, Feb 2014.

DENHAM, J. et al. Genome-wide sperm DNA methylation changes after 3 months of exercise training in humans. **Epigenomics**. v. 7, n. 5, p. 717-31, Aug 2015.

DOCHERTY, D.; SPORER, B. A proposed model for examining the interference phenomenon between concurrent aerobic and strength training. **Sports Med**. v. 30, n. 6, p. 385-94, Dec 2000.

DONGES, C. E. et al. Concurrent resistance and aerobic exercise stimulates both myofibrillar and mitochondrial protein synthesis in sedentary middle-aged men. **J Appl Physiol (1985)**. v. 112, n. 12, p. 1992-2001, Jun 2012.

DREYER, H. C. et al. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. **J Physiol**. v. 576, n. Pt 2, p. 613-24, Oct 15 2006.

DUDLEY, G. A.; DJAMIL, R. Incompatibility of endurance- and strength-training modes of exercise. **J Appl Physiol (1985)**. v. 59, n. 5, p. 1446-51, Nov 1985.

DUMONT, N. A.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. **Development**. v. 142, n. 9, p. 1572-1581, May 1 2015.

EGAN, B. et al. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. **J Physiol**. v. 588, n. Pt 10, p. 1779-90, May 15 2010.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metab**. v. 17, n. 2, p. 162-84, Feb 05 2013.

EGAWA, T. et al. AICAR-induced activation of AMPK negatively regulates myotube hypertrophy through the HSP72-mediated pathway in C2C12 skeletal muscle cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 306, n. 3, p. E344-54, Feb 2014.

EHLERT, T.; SIMON, P.; MOSER, D. A. Epigenetics in sports. **Sports Med**. v. 43, n. 2, p. 93-110, Feb 2013.

ENGELKE, S.; KOCH, F.; SCIASCIA, Q. Exercise and muscle protein synthesis: not all roads lead to mTORC1. **J Physiol**. v. 594, n. 12, p. 3179-80, Jun 15 2016.

FERNANDEZ-GONZALO, R.; LUNDBERG, T. R.; TESCH, P. A. Acute molecular responses in untrained and trained muscle subjected to aerobic and resistance exercise training versus resistance training alone. **Acta Physiol (Oxf)**. v. 209, n. 4, p. 283-94, Dec 2013.

FOLLAND, J. P.; WILLIAMS, A. G. The adaptations to strength training : morphological and neurological contributions to increased strength. **Sports Med**. v. 37, n. 2, p. 145-68, 2007.

FRY, C. S. et al. Myogenic Progenitor Cells Control Extracellular Matrix Production by Fibroblasts during Skeletal Muscle Hypertrophy. **Cell Stem Cell**. v. 20, n. 1, p. 56-69, Jan 5 2017.

FRY, C. S. et al. Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy. **Faseb J**. v. 28, n. 4, p. 1654-65, Apr 2014.

FRY, C. S. et al. Fibre type-specific satellite cell response to aerobic training in sedentary adults. **J Physiol**. v. 592, n. Pt 12, p. 2625-35, Jun 15 2014.

FUJIMAKI, S. et al. Functional Overload Enhances Satellite Cell Properties in Skeletal Muscle. **Stem Cells Int**. v. 2016, p. 7619418, 2016.

FYFE, J. J. et al. Endurance Training Intensity Does Not Mediate Interference to Maximal Lower-Body Strength Gain during Short-Term Concurrent Training. **Front Physiol**. v. 7, p. 487, 2016.

FYFE, J. J. et al. Enhanced skeletal muscle ribosome biogenesis, yet attenuated mTORC1 and ribosome biogenesis-related signalling, following short-term concurrent versus single-mode resistance training. **Sci Rep**. v. 8, n. 1, p. 560, Jan 12 2018.

FYFE, J. J.; BISHOP, D. J.; STEPTO, N. K. Interference between concurrent resistance and endurance exercise: molecular bases and the role of individual training variables. **Sports Med**. v. 44, n. 6, p. 743-62, Jun 2014.

FYFE, J. J. et al. Concurrent exercise incorporating high-intensity interval or continuous training modulates mTORC1 signaling and microRNA expression in human skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 310, n. 11, p. R1297-311, Jun 01 2016.

FYFE, J. J.; LOENNEKE, J. P. Interpreting Adaptation to Concurrent Compared with Single-Mode Exercise Training: Some Methodological Considerations. **Sports Med**. v. 48, n. 2, p. 289-297, Feb 2018.

GABRIEL, D. A.; KAMEN, G.; FROST, G. Neural adaptations to resistive exercise: mechanisms and recommendations for training practices. **Sports Med**. v. 36, n. 2, p. 133-49, 2006.

GARBER, C. E. et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc**. v. 43, n. 7, p. 1334-59, Jul 2011.

GIBALA, M. J.; HAWLEY, J. A. Sprinting Toward Fitness. **Cell Metab**. v. 25, n. 5, p. 988-990, May 2 2017.

GIBALA, M. J. et al. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. **J Physiol**. v. 590, n. Pt 5, p. 1077-84, Mar 1 2012.

GLOWACKI, S. P. et al. Effects of resistance, endurance, and concurrent exercise on training outcomes in men. **Med Sci Sports Exerc**. v. 36, n. 12, p. 2119-27, Dec 2004.

GOTO, K. et al. The impact of metabolic stress on hormonal responses and muscular adaptations. **Med Sci Sports Exerc**. v. 37, n. 6, p. 955-63, Jun 2005.

GRGIC, J. et al. Does Aerobic Training Promote the Same Skeletal Muscle Hypertrophy as Resistance Training? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Med**. v. 49, n. 2, p. 233-254, Feb 2019.

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, Apr 2014.

GUNDERMANN, D. M. et al. Activation of mTORC1 signaling and protein synthesis in human muscle following blood flow restriction exercise is inhibited by rapamycin. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 306, n. 10, p. E1198-204, May 15 2014.

HAKKINEN, K. et al. Neuromuscular adaptations during concurrent strength and endurance training versus strength training. **Eur J Appl Physiol**. v. 89, n. 1, p. 42-52, Mar 2003.

HALSON, S. L.; JEUKENDRUP, A. E. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. **Sports Med**. v. 34, n. 14, p. 967-81, 2004.

HARDIE, D. G.; SAKAMOTO, K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. **Physiology (Bethesda)**. v. 21, p. 48-60, Feb 2006.

HARRIS, R. A. et al. Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. **Nat Biotechnol**. v. 28, n. 10, p. 1097-105, Oct 2010.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol (1985)**. v. 91, n. 2, p. 534-51, Aug 2001.

HAWLEY, J. A. Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? **Appl Physiol Nutr Metab**. v. 34, n. 3, p. 355-61, Jun 2009.

HAWLEY, J. A. et al. Integrative biology of exercise. **Cell**. v. 159, n. 4, p. 738-49, Nov 6 2014.

HELGERUD, J. et al. Aerobic high-intensity intervals improve VO2max more than moderate training. **Med Sci Sports Exerc**. v. 39, n. 4, p. 665-71, Apr 2007.

HENIKOFF, S.; GREALLY, J. M. Epigenetics, cellular memory and gene regulation. **Curr Biol**. v. 26, n. 14, p. R644-8, Jul 25 2016.

HICKSON, R. C. Interference of strength development by simultaneously training for strength and endurance. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**. v. 45, n. 2-3, p. 255-63, 1980.

HOTCHKISS, R. D. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. **J Biol Chem**. v. 175, n. 1, p. 315-32, Aug 1948.

HOWLETT, K. F.; MCGEE, S. L. Epigenetic regulation of skeletal muscle metabolism. **Clin Sci (Lond)**. v. 130, n. 13, p. 1051-63, Jul 1 2016.

HOWLEY, E. T.; BASSETT, D. R., JR.; WELCH, H. G. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. **Med Sci Sports Exerc**. v. 27, n. 9, p. 1292-301, Sep 1995.

HU, C. W. et al. Optimization of global DNA methylation measurement by LC-MS/MS and its application in lung cancer patients. **Anal Bioanal Chem**. v. 405, n. 27, p. 8859-69, Nov 2013.

HUANG, Q. et al. Screening of exon methylation biomarkers for colorectal cancer via LC-MS/MS strategy. **J Mass Spectrom**. v. 52, n. 12, p. 860-866, Dec 2017.

HUNTER, G.; DEMMENT, R.; MILLER, D. Development of strength and maximum oxygen uptake during simultaneous training for strength and endurance. **J Sports Med Phys Fitness**. v. 27, n. 3, p. 269-75, Sep 1987.

HUPKES, M. et al. Epigenetics: DNA demethylation promotes skeletal myotube maturation. **FASEB J**. v. 25, n. 11, p. 3861-72, Nov 2011.

IESTRA, J. A. et al. Effect size estimates of lifestyle and dietary changes on all-cause mortality in coronary artery disease patients: a systematic review. **Circulation**. v. 112, n. 6, p. 924-34, Aug 9 2005.

JACQUES, M. et al. Epigenetic changes in healthy human skeletal muscle following exercise- a systematic review. **Epigenetics**. v. 14, n. 7, p. 633-648, Jul 2019.

JIN, B.; LI, Y.; ROBERTSON, K. D. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? **Genes Cancer**. v. 2, n. 6, p. 607-17, Jun 2011.

JONES, A. M.; CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Med**. v. 29, n. 6, p. 373-86, Jun 2000.

JONES, T. W. et al. Performance and Neuromuscular Adaptations Following Differing Ratios of Concurrent Strength and Endurance Training. **J Strength Cond Res**. Mar 21 2013.

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, Aug 1 2004.

KANZLEITER, T. et al. Exercise training alters DNA methylation patterns in genes related to muscle growth and differentiation in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 308, n. 10, p. E912-20, May 15 2015.

KARAVIRTA, L. et al. Effects of combined endurance and strength training on muscle strength, power and hypertrophy in 40-67-year-old men. **Scand J Med Sci Sports**. v. 21, n. 3, p. 402-11, Jun 2011.

KARIMI, M.; JOHANSSON, S.; EKSTROM, T. J. Using LUMA: a Luminometric-based assay for global DNA-methylation. **Epigenetics**. v. 1, n. 1, p. 45-8, Jan-Mar 2006.

KARIMI, M. et al. LUMA (LUminometric Methylation Assay)--a high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. **Exp Cell Res**. v. 312, n. 11, p. 1989-95, Jul 1 2006.

KATZ, B. The termination of the afferent nerve fibre in the muscle spindle of the frog. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**. v. 243, n. 703, p. 221-240, 1961.

KAWAKAMI, Y.; ABE, T.; FUKUNAGA, T. Muscle-fiber pennation angles are greater in hypertrophied than in normal muscles. **J Appl Physiol (1985)**. v. 74, n. 6, p. 2740-4, Jun 1993.

KAWANO, F. et al. Prenatal myonuclei play a crucial role in skeletal muscle hypertrophy in rodents. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 312, n. 3, p. C233-C243, Mar 1 2017.

KAZIOR, Z. et al. Endurance Exercise Enhances the Effect of Strength Training on Muscle Fiber Size and Protein Expression of Akt and mTOR. **PLoS One**. v. 11, n. 2, p. e0149082, 2016.

KELLY, D. P.; SCARPULLA, R. C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. **Genes Dev**. v. 18, n. 4, p. 357-68, Feb 15 2004.

KING-HIMMELREICH, T. S. et al. The impact of endurance exercise on global and AMPK gene-specific DNA methylation. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 474, n. 2, p. 284-90, May 27 2016.

KLEPACKI, J. et al. Development and validation of an LC-MS/MS assay for the quantification of the trans-methylation pathway intermediates S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in human plasma. **Clin Chim Acta**. v. 421, p. 91-7, Jun 5 2013.

KONOPKA, A. R. et al. Markers of human skeletal muscle mitochondrial biogenesis and quality control: effects of age and aerobic exercise training. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. v. 69, n. 4, p. 371-8, Apr 2014.

KOSEK, D. J. et al. Efficacy of 3 days/wk resistance training on myofiber hypertrophy and myogenic mechanisms in young vs. older adults. **J Appl Physiol (1985)**. v. 101, n. 2, p. 531-44, Aug 2006.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**. v. 128, n. 4, p. 693-705, Feb 23 2007.

KRAEMER, W. J. et al. Compatibility of high-intensity strength and endurance training on hormonal and skeletal muscle adaptations. **J Appl Physiol**. v. 78, n. 3, p. 976-89, Mar 1995.

KREHER, J. B.; SCHWARTZ, J. B. Overtraining syndrome: a practical guide. **Sports Health**. v. 4, n. 2, p. 128-38, Mar 2012.

KUMAR, V. et al. Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise. **J Appl Physiol (1985)**. v. 106, n. 6, p. 2026-39, Jun 2009.

KUMAR, V. et al. Muscle protein synthetic responses to exercise: effects of age, volume, and intensity. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. v. 67, n. 11, p. 1170-7, Nov 2012.

KUO, K. C. et al. Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. **Nucleic Acids Res**. v. 8, n. 20, p. 4763-76, Oct 24 1980.

KURDYUKOV, S.; BULLOCK, M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. **Biology (Basel)**. v. 5, n. 1, Jan 6 2016.

LAKER, R. C. et al. Transcriptomic and epigenetic responses to short-term nutrient-exercise stress in humans. **Sci Rep**. v. 7, n. 1, p. 15134, Nov 9 2017.

LAKER, R. C.; RYALL, J. G. DNA Methylation in Skeletal Muscle Stem Cell Specification, Proliferation, and Differentiation. **Stem Cells Int**. v. 2016, p. 5725927, 2016.

LANTIER, L. et al. Coordinated maintenance of muscle cell size control by AMP-activated protein kinase. **FASEB J**. v. 24, n. 9, p. 3555-61, Sep 2010.

LE GRAND, F.; RUDNICKI, M. A. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. **Curr Opin Cell Biol**. v. 19, n. 6, p. 628-33, Dec 2007.

LEGER, B. et al. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **J Physiol**. v. 576, n. Pt 3, p. 923-33, Nov 1 2006.

LEVERITT, M. et al. Concurrent strength and endurance training. A review. **Sports Med**. v. 28, n. 6, p. 413-27, Dec 1999.

LEVERITT, M.; MACLAUGHLIN, H.; ABERNETHY, P. J. Changes in leg strength 8 and 32 h after endurance exercise. **J Sports Sci**. v. 18, n. 11, p. 865-71, Nov 2000.

LI, P. et al. An integrated workflow for DNA methylation analysis. **J Genet Genomics**. v. 40, n. 5, p. 249-60, May 20 2013.

LIBARDI, C. A. et al. Effect of concurrent training with blood flow restriction in the elderly. **Int J Sports Med**. v. 36, n. 5, p. 395-9, May 2015.

LIBARDI, C. A. et al. Effects of concurrent training on interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and C-reactive protein in middle-aged men. **J Sports Sci**. v. 29, n. 14, p. 1573-81, Nov 2011.

LIM, C. H. et al. Satellite cell activation and mTOR signaling pathway response to resistance and combined exercise in elite weight lifters. **Eur J Appl Physiol**. v. 117, n. 11, p. 2355-2363, Nov 2017.

LINDHOLM, M. E. et al. An integrative analysis reveals coordinated reprogramming of the epigenome and the transcriptome in human skeletal muscle after training. **Epigenetics**. v. 9, n. 12, p. 1557-69, Dec 2014.

LING, C.; RONN, T. Epigenetic adaptation to regular exercise in humans. **Drug Discov Today**. v. 19, n. 7, p. 1015-8, Jul 2014.

LIRA, V. A. et al. PGC-1alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 299, n. 2, p. E145-61, Aug 2010.

LISANTI, S. et al. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. **PLoS One**. v. 8, n. 11, p. e79044, 2013.

LISTER, R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**. v. 462, n. 7271, p. 315-22, Nov 19 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LOCHMANN, T. L. et al. Epigenetic Modifications of the PGC-1alpha Promoter during Exercise Induced Expression in Mice. **PLoS One**. v. 10, n. 6, p. e0129647, 2015.

LUNDBERG, T. R. et al. Aerobic exercise does not compromise muscle hypertrophy response to short-term resistance training. **J Appl Physiol (1985)**. v. 114, n. 1, p. 81-9, Jan 1 2012.

LUNDBERG, T. R.; FERNANDEZ-GONZALO, R.; TESCH, P. A. Exercise-induced AMPK activation does not interfere with muscle hypertrophy in response to resistance training in men. **J Appl Physiol (1985)**. v. 116, n. 6, p. 611-20, Mar 15 2014.

MACALUSO, F. et al. Satellite cell count, VO(2max) , and p38 MAPK in inactive to moderately active young men. **Scand J Med Sci Sports**. v. 22, n. 4, p. e38-44, Aug 2012.

MACKEY, A. L. et al. Strength training increases the size of the satellite cell pool in type I and II fibres of chronically painful trapezius muscle in females. **J Physiol**. v. 589, n. Pt 22, p. 5503-15, Nov 15 2011.

MACKEY, A. L. et al. Enhanced satellite cell proliferation with resistance training in elderly men and women. **Scand J Med Sci Sports**. v. 17, n. 1, p. 34-42, Feb 2007.

MAEDA, S. et al. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. **Life Sci**. v. 69, n. 9, p. 1005-16, Jul 20 2001.

MASCHER, H. et al. Changes in signalling pathways regulating protein synthesis in human muscle in the recovery period after endurance exercise. **Acta Physiol (Oxf)**. v. 191, n. 1, p. 67-75, Sep 2007.

MASCHER, H. et al. Enhanced rates of muscle protein synthesis and elevated mTOR signalling following endurance exercise in human subjects. **Acta Physiol (Oxf)**. v. 202, n. 2, p. 175-84, Jun 2011.

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

MCCARTHY, J. P. et al. Compatibility of adaptive responses with combining strength and endurance training. **Med Sci Sports Exerc**. v. 27, n. 3, p. 429-36, Mar 1995.

MCCARTHY, J. P.; POZNIAK, M. A.; AGRE, J. C. Neuromuscular adaptations to concurrent strength and endurance training. **Med Sci Sports Exerc**. v. 34, n. 3, p. 511-9, Mar 2002.

MCGEE, S. L.; HARGREAVES, M. Histone modifications and exercise adaptations. **J Appl Physiol (1985)**. v. 110, n. 1, p. 258-63, Jan 2011.

MCGEE, S. L. et al. Normal hypertrophy accompanied by phosphoryation and activation of AMP-activated protein kinase alpha1 following overload in LKB1 knockout mice. **J Physiol**. v. 586, n. 6, p. 1731-41, Mar 15 2008.

MCGEE, S. L.; WALDER, K. R. Exercise and the Skeletal Muscle Epigenome. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v. 7, n. 9, Sep 1 2017.

MCKAY, B. R. et al. Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following muscle-lengthening contractions in humans. **PLoS One**. v. 4, n. 6, p. e6027, 2009.

MEEUSEN, R. et al. Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. **Med Sci Sports Exerc**. v. 45, n. 1, p. 186-205, Jan 2013.

MEISSNER, A. et al. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. **Nucleic Acids Res**. v. 33, n. 18, p. 5868-77, 2005.

MIKKOLA, J. et al. Neuromuscular and cardiovascular adaptations during concurrent strength and endurance training in untrained men. **Int J Sports Med**. v. 33, n. 9, p. 702-10, Sep 2012.

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

MITCHELL, C. J. et al. Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men. **J Appl Physiol**. v. 113, n. 1, p. 71-7, Jul 2012.

MONTESANO, A. et al. Modulation of cell cycle progression by 5-azacytidine is associated with early myogenesis induction in murine myoblasts. **Int J Biol Sci**. v. 9, n. 4, p. 391-402, 2013.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**. v. 38, n. 1, p. 23-38, Jan 2013.

MOORE, S. C. et al. Leisure time physical activity of moderate to vigorous intensity and mortality: a large pooled cohort analysis. **PLoS Med**. v. 9, n. 11, p. e1001335, 2012.

MORESI, V.; MARRONCELLI, N.; ADAMO, S. New insights into the epigenetic control of satellite cells. **World J Stem Cells**. v. 7, n. 6, p. 945-55, Jul 26 2015.

MORITANI, T.; DEVRIES, H. A. Neural factors versus hypertrophy in the time course of muscle strength gain. **Am J Phys Med**. v. 58, n. 3, p. 115-30, Jun 1979.

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, Jul 1 2016.

MURACH, K. A. et al. Starring or Supporting Role? Satellite Cells and Skeletal Muscle Fiber Size Regulation. **Physiology (Bethesda)**. v. 33, n. 1, p. 26-38, Jan 1 2018.

MURLASITS, Z.; KNEFFEL, Z.; THALIB, L. The physiological effects of concurrent strength and endurance training sequence: A systematic review and meta-analysis. **J Sports Sci**. p. 1-8, Aug 7 2017.

MYERS, J. et al. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. **N Engl J Med**. v. 346, n. 11, p. 793-801, Mar 14 2002.

NADER, G. A. Concurrent strength and endurance training: from molecules to man. **Med Sci Sports Exerc**. v. 38, n. 11, p. 1965-70, Nov 2006.

NADER, G. A.; ESSER, K. A. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. **J Appl Physiol (1985)**. v. 90, n. 5, p. 1936-42, May 2001.

NADER, G. A. et al. Resistance exercise training modulates acute gene expression during human skeletal muscle hypertrophy. **J Appl Physiol (1985)**. v. 116, n. 6, p. 693-702, Mar 15 2014.

NEDERVEEN, J. P. et al. Consistent expression pattern of myogenic regulatory factors in whole muscle and isolated human muscle satellite cells after eccentric contractions in humans. **J Appl Physiol (1985)**. Sep 12 2019.

NEDERVEEN, J. P. et al. The influence of capillarization on satellite cell pool expansion and activation following exercise-induced muscle damage in healthy young men. **J Physiol**. Jan 6 2018.

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, Jan 1 2017.

NITERT, M. D. et al. Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 61, n. 12, p. 3322-32, Dec 2012.

NTANASIS-STATHOPOULOS, J. et al. Epigenetic regulation on gene expression induced by physical exercise. **J Musculoskelet Neuronal Interact**. v. 13, n. 2, p. 133-46, Jun 2013.

ODA, M. et al. High-resolution genome-wide cytosine methylation profiling with simultaneous copy number analysis and optimization for limited cell numbers. **Nucleic Acids Res**. v. 37, n. 12, p. 3829-39, Jul 2009.

OLKHOV-MITSEL, E.; BAPAT, B. Strategies for discovery and validation of methylated and hydroxymethylated DNA biomarkers. **Cancer Med**. v. 1, n. 2, p. 237-60, Oct 2012.

OLSEN, S. et al. Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. **J Physiol**. v. 573, n. Pt 2, p. 525-34, Jun 1 2006.

PALACIOS, D. et al. TNF/p38alpha/polycomb signaling to Pax7 locus in satellite cells links inflammation to the epigenetic control of muscle regeneration. **Cell Stem Cell**. v. 7, n. 4, p. 455-69, Oct 08 2010.

PAREJA-GALEANO, H.; SANCHIS-GOMAR, F.; GARCIA-GIMENEZ, J. L. Physical exercise and epigenetic modulation: elucidating intricate mechanisms. **Sports Med**. v. 44, n. 4, p. 429-36, Apr 2014.

PERRY, C. G. et al. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. **J Physiol**. v. 588, n. Pt 23, p. 4795-810, Dec 1 2010.

PERRY, R. L.; RUDNICK, M. A. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. **Front Biosci**. v. 5, p. D750-67, Sep 01 2000.

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 (1985)**. v. 104, n. 6, p. 1736-42, Jun 2008.

PHILLIPS, B. E.; HILL, D. S.; ATHERTON, P. J. Regulation of muscle protein synthesis in humans. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v. 15, n. 1, p. 58-63, Jan 2012.

PHILLIPS, S. M. Short-term training: when do repeated bouts of resistance exercise become training? **Can J Appl Physiol**. v. 25, n. 3, p. 185-93, Jun 2000.

PHILLIPS, S. M. Physiologic and molecular bases of muscle hypertrophy and atrophy: impact of resistance exercise on human skeletal muscle (protein and exercise dose effects). **Appl Physiol Nutr Metab**. v. 34, n. 3, p. 403-10, Jun 2009.

PHILLIPS, S. M. et al. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. **Am J Physiol**. v. 273, n. 1 Pt 1, p. E99-107, Jul 1997.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. **J Physiol**. v. 546, n. Pt 3, p. 851-8, Feb 1 2003.

PSILANDER, N.; DAMSGAARD, R.; PILEGAARD, H. Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**. v. 95, n. 3, p. 1038-44, Sep 2003.

PUGH, J. K. et al. Acute molecular responses to concurrent resistance and high-intensity interval exercise in untrained skeletal muscle. **Physiol Rep**. v. 3, n. 4, Apr 2015.

PUGH, J. K. et al. Satellite cell response to concurrent resistance exercise and high-intensity interval training in sedentary, overweight/obese, middle-aged individuals. **Eur J Appl Physiol**. v. 118, n. 2, p. 225-238, Feb 2018.

PUTMAN, C. T. et al. Effects of strength, endurance and combined training on myosin heavy chain content and fibre-type distribution in humans. **Eur J Appl Physiol**. v. 92, n. 4-5, p. 376-84, Aug 2004.

RAUE, U. et al. Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women. **J Appl Physiol (1985)**. v. 101, n. 1, p. 53-9, Jul 2006.

RAUE, U. et al. Proteolytic gene expression differs at rest and after resistance exercise between young and old women. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. v. 62, n. 12, p. 1407-12, Dec 2007.

ROBERTS, M. D. et al. Myogenic mRNA markers in young and old human skeletal muscle prior to and following sequential exercise bouts. **Appl Physiol Nutr Metab**. v. 36, n. 1, p. 96-106, Feb 2011.

ROBERTS, T. J. Contribution of elastic tissues to the mechanics and energetics of muscle function during movement. **J Exp Biol**. v. 219, n. Pt 2, p. 266-75, Jan 2016.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet**. v. 6, n. 8, p. 597-610, Aug 2005.

ROBINSON, M. M. et al. Enhanced Protein Translation Underlies Improved Metabolic and Physical Adaptations to Different Exercise Training Modes in Young and Old Humans. **Cell Metab**. v. 25, n. 3, p. 581-592, Mar 7 2017.

RONNESTAD, B. R.; HANSEN, E. A.; RAASTAD, T. High volume of endurance training impairs adaptations to 12 weeks of strength training in well-trained endurance athletes. **Eur J Appl Physiol**. v. 112, n. 4, p. 1457-66, Apr 2011.

RUAS, J. L. et al. A PGC-1alpha isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. **Cell**. v. 151, n. 6, p. 1319-31, Dec 7 2012.

SALE, D. G. et al. Interaction between concurrent strength and endurance training. **J Appl Physiol**. v. 68, n. 1, p. 260-70, Jan 1990.

SCARANO, M. I. et al. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. **J Cell Physiol**. v. 204, n. 1, p. 21-35, Jul 2005.

SCARPA, S. et al. Simultaneous myogenin expression and overall DNA hypomethylation promote in vitro myoblast differentiation. **Cell Growth Differ**. v. 7, n. 8, p. 1051-8, Aug 1996.

SCARPULLA, R. C. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. **Biochim Biophys Acta**. v. 1576, n. 1-2, p. 1-14, Jun 7 2002.

SCHOENFELD, B. J.; OGBORN, D.; KRIEGER, J. W. The dose-response relationship between resistance training volume and muscle hypertrophy: are there really still any doubts? **J Sports Sci**. v. 35, n. 20, p. 1985-1987, Oct 2017.

SCHOENFELD, B. J. et al. Effects of Low- vs. High-Load Resistance Training on Muscle Strength and Hypertrophy in Well-Trained Men. **J Strength Cond Res**. v. 29, n. 10, p. 2954-63, Oct 2015.

SCHOENFELD, B. J. et al. Influence of Resistance Training Frequency on Muscular Adaptations in Well-Trained Men. **J Strength Cond Res**. v. 29, n. 7, p. 1821-9, Jul 2015.

SEABORNE, R. A. et al. Human Skeletal Muscle Possesses an Epigenetic Memory of Hypertrophy. **Sci Rep**. v. 8, n. 1, p. 1898, Jan 30 2018.

SHEN, L.; WATERLAND, R. A. Methods of DNA methylation analysis. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v. 10, n. 5, p. 576-81, Sep 2007.

SILVA, R. F. et al. Concurrent training with different aerobic exercises. **Int J Sports Med**. v. 33, n. 8, p. 627-34, Aug 2012.

SLOTH, M. et al. Effects of sprint interval training on VO2max and aerobic exercise performance: A systematic review and meta-analysis. **Scand J Med Sci Sports**. v. 23, n. 6, p. e341-52, Dec 2013.

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, Feb 2017.

SOUZA, E. O. et al. Effects of concurrent strength and endurance training on genes related to myostatin signaling pathway and muscle fiber responses. **J Strength Cond Res**. v. 28, n. 11, p. 3215-23, Nov 2014.

SOUZA, E. O. et al. Molecular adaptations to concurrent training. **Int J Sports Med**. v. 34, n. 3, p. 207-13, Mar 2012.

SPIERING, B. A. et al. Resistance exercise biology: manipulation of resistance exercise programme variables determines the responses of cellular and molecular signalling pathways. **Sports Med**. v. 38, n. 7, p. 527-40, 2008.

SPORER, B. C.; WENGER, H. A. Effects of aerobic exercise on strength performance following various periods of recovery. **J Strength Cond Res**. v. 17, n. 4, p. 638-44, Nov 2003.

STEPTO, N. K. et al. Short-term intensified cycle training alters acute and chronic responses of PGC1alpha and Cytochrome C oxidase IV to exercise in human skeletal muscle. **PLoS One**. v. 7, n. 12, p. e53080, 2012.

SUCHOMEL, T. J. et al. The Importance of Muscular Strength: Training Considerations. **Sports Med**. Jan 25 2018.

SUOMINEN, H. et al. Effects of 8 weeks' endurance training on skeletal muscle metabolism in 56-70-year-old sedentary men. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**. v. 37, n. 3, p. 173-80, Oct 31 1977.

TERRUZZI, I. et al. Genetic polymorphisms of the enzymes involved in DNA methylation and synthesis in elite athletes. **Physiol Genomics**. v. 43, n. 16, p. 965-73, Aug 24 2011.

TERZIS, G. et al. Early phase interference between low-intensity running and power training in moderately trained females. **Eur J Appl Physiol**. v. 116, n. 5, p. 1063-73, May 2016.

THOMSON, D. M.; FICK, C. A.; GORDON, S. E. AMPK activation attenuates S6K1, 4E-BP1, and eEF2 signaling responses to high-frequency electrically stimulated skeletal muscle contractions. **J Appl Physiol (1985)**. v. 104, n. 3, p. 625-32, Mar 2008.

TOST, J.; GUT, I. G. DNA methylation analysis by pyrosequencing. **Nat Protoc**. v. 2, n. 9, p. 2265-75, 2007.

TSITKANOU, S. et al. Effects of high-intensity interval cycling performed after resistance training on muscle strength and hypertrophy. **Scand J Med Sci Sports**. v. 27, n. 11, p. 1317-1327, Nov 2017.

TURNER, D. C.; SEABORNE, R. A.; SHARPLES, A. P. Comparative Transcriptome and Methylome Analysis in Human Skeletal Muscle Anabolism, Hypertrophy and Epigenetic Memory. **Sci Rep**. v. 9, n. 1, p. 4251, Mar 12 2019.

VERDIJK, L. B. et al. Skeletal muscle hypertrophy following resistance training is accompanied by a fiber type-specific increase in satellite cell content in elderly men. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. v. 64, n. 3, p. 332-9, Mar 2009.

VERDIJK, L. B. et al. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 292, n. 1, p. E151-7, Jan 2007.

VERNEY, J. et al. Effects of combined lower body endurance and upper body resistance training on the satellite cell pool in elderly subjects. **Muscle Nerve**. v. 38, n. 3, p. 1147-54, Sep 2008.

VISSING, K. et al. Differentiated mTOR but not AMPK signaling after strength vs endurance exercise in training-accustomed individuals. **Scand J Med Sci Sports**. v. 23, n. 3, p. 355-66, Jun 2013.

VOISIN, S. et al. Exercise training and DNA methylation in humans. **Acta Physiol (Oxf)**. v. 213, n. 1, p. 39-59, Jan 2015.

WAGERS, A. J.; CONBOY, I. M. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. **Cell**. v. 122, n. 5, p. 659-67, Sep 9 2005.

WANG, Q.; WANG, K.; YE, M. Strategies for large-scale analysis of non-histone protein methylation by LC-MS/MS. **Analyst**. v. 142, n. 19, p. 3536-3548, Sep 25 2017.

WAY, K. L. et al. The effect of high Intensity interval training versus moderate intensity continuous training on arterial stiffness and 24h blood pressure responses: A systematic review and meta-analysis. **J Sci Med Sport**. v. 22, n. 4, p. 385-391, Apr 2019.

WEBER, M. et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. **Nat Genet**. v. 37, n. 8, p. 853-62, Aug 2005.

WEINTRAUB, H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. **Cell**. v. 75, n. 7, p. 1241-4, Dec 31 1993.

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, Jan 2010.

WEST, D. W. et al. Resistance exercise order does not determine postexercise delivery of testosterone, growth hormone, and IGF-1 to skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab**. v. 38, n. 2, p. 220-6, Feb 2012.

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, Nov 1 2009.

WIDMANN, M.; NIESS, A. M.; MUNZ, B. Physical Exercise and Epigenetic Modifications in Skeletal Muscle. **Sports Med**. v. 49, n. 4, p. 509-523, Apr 2019.

WILBORN, C. D. et al. Effects of different intensities of resistance exercise on regulators of myogenesis. **J Strength Cond Res**. v. 23, n. 8, p. 2179-87, Nov 2009.

WILKINSON, S. B. 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**. v. 586, n. Pt 15, p. 3701-17, Aug 1 2008.

WILLIS, B. L. et al. Midlife fitness and the development of chronic conditions in later life. **Arch Intern Med**. v. 172, n. 17, p. 1333-40, Sep 24 2012.

WILLOUGHBY, D. S.; NELSON, M. J. Myosin heavy-chain mRNA expression after a single session of heavy-resistance exercise. **Med Sci Sports Exerc**. v. 34, n. 8, p. 1262-9, Aug 2002.

WILSON, J. M. et al. Concurrent training: a meta-analysis examining interference of aerobic and resistance exercises. **J Strength Cond Res**. v. 26, n. 8, p. 2293-307, Aug 2012.

WOOD, R. H. et al. Concurrent cardiovascular and resistance training in healthy older adults. **Med Sci Sports Exerc**. v. 33, n. 10, p. 1751-8, Oct 2001.

YANG, S. Y.; GOLDSPINK, 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, Jul 3 2002.

YANG, Y. et al. Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**. v. 98, n. 5, p. 1745-52, May 2005.

ZAK, R. B. et al. Impact of local heating and cooling on skeletal muscle transcriptional response related to myogenesis and proteolysis. **Eur J Appl Physiol**. v. 118, n. 1, p. 101-109, Jan 2018.

ZAK, R. B. et al. Impact of hot and cold exposure on human skeletal muscle gene expression. **Appl Physiol Nutr Metab**. v. 42, n. 3, p. 319-325, Mar 2017.

ZAMMIT, P. S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. **Semin Cell Dev Biol**. v. 72, p. 19-32, Dec 2017.

ZAMPARO, P.; MINETTI, A. E.; DI PRAMPERO, P. E. Interplay among the changes of muscle strength, cross-sectional area and maximal explosive power: theory and facts. **Eur J Appl Physiol**. v. 88, n. 3, p. 193-202, Dec 2002.

ZANOU, N.; GAILLY, P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. **Cell Mol Life Sci**. v. 70, n. 21, p. 4117-30, Nov 2013.

ZIMMER, P.; BLOCH, W. Physical exercise and epigenetic adaptations of the cardiovascular system. **Herz**. v. 40, n. 3, p. 353-60, May 2015.