

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA

EFEITO DO TREINAMENTO CONCORRENTE NA EXPRESSÃO GÊNICA E
PROTEÍCA ASSOCIADAS À HIPERTROFIA MUSCULAR

EDUARDO OLIVEIRA DE SOUZA

SÃO PAULO
2010

EFEITO DO TREINAMENTO CONCORRENTE NA EXPRESSÃO GÊNICA E
PROTEÍCA ASSOCIADAS À HIPERTROFIA MUSCULAR

EDUARDO OLIVEIRA DE SOUZA

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

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS UGRINOWITSCH

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Ugrinowitsch, pela amizade, pelo apoio, pela confiança na fase que mais precisei e principalmente pelos ensinamentos e sinceridade ao longo dessa relação. OBRIGADO.

Ao meu segundo orientador Prof. Dr. Valmor Tricoli, por ter me aceitado nesse grupo o qual tenho orgulho de participar, pela confiança, pelos ensinamentos e ajuda em momentos especiais. OBRIGADO.

Aos meus amigos do laboratório Mauro “Maurão”, Hamilton “Mimi”, Renato “Corneta”, Gilberto “Gibinha” e Lilian “little sister”, Anderson “Tchan” e Leonardo “Léo”, pela paciência, apoio e ajuda incondicional, TODOS em diferentes momentos contribuíram e contribuem para o que sou como pesquisador. Tenho ORGULHO de conviver com vocês!

À Prof. Dr. Patrícia Chakur Brum, por ter me aberto as portas de seu laboratório e agregado valor imensurável ao projeto, pelos novos ensinamentos e pela ajuda e apoio ao longo desse e outros projetos.

Aos novos parceiros, Aline Villa Nova Bacurau e Julio Batista Ferreira, pela dedicação, pelo humor e profissionalismo indiscutível de vocês.

À Carla Batista, pelo empenho e ajuda nas análises de histologia das fibras musculares.

Ao Edson, técnico do LADESP, pela ajuda desde o primeiro projeto de pesquisa.

À Katia Pascoto e Luiz Cainelli, pela ajuda nos testes e agendamento com os voluntários.

Ao Prof. Dr. Marcelo Saldanha, pela contribuição com os dados de expressão gênica.

Ao Dr. Manoel Neves, pela maneira ética e profissional que conduziu as biópsias musculares, nova amizade, nova parceria.

Aos voluntários que literalmente deram o sangue pela pesquisa, sem a participação e empolgação deles, nada teria acontecido. OBRIGADO MESMO.

Ao Dr. Valentim Fernandes, que tem me ajudado nos bastidores da minha vida pessoal, acho que sem o seu apoio e suas palavras sempre sábias, não sei não! OBRIGADO amigo.

Ao Rubens Bergoudian, pelo apoio, incentivo e amizade, você tem me ajudado muito nesses anos. OBRIGADO amigo.

Aos “brothers”, Luiz e Kinho, tudo isso sem as nossas risadas e cervejas, não teria graça. OBRIGADO pela amizade sincera.

Aos meus pais João e Hilda, por todo amor e presença, pelos incentivos e puxões de orelha, por me ajudarem a realizar um sonho. AMOR ETERNO.

À tia Iva, por ter me dado o privilégio de contar com duas mães, Te amo tia!

Aos meus irmãos Gisele e Alexandre, pelo amor e pela amizade, por me fazer aprender muitas coisas com vocês. ADMIRO VOCÊS DOIS!

À Maria Eduarda “Duda Maria” e Ana Clara Souza Santos “gol do Palmeiras” minha “Titinha”, pela alegria e por um tipo de amor antes desconhecido pelo tio Dudu.

À minha amada Kelly “Princesa”, como é bom contar com você, sua PACIÊNCIA, dedicação, seu AMOR, é a paz que seus olhos me trazem que me faz continuar. OBRIGADO POR TUDO!

Ao Cnpq pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

À FAPESP pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

O hábito do homem culto é aperfeiçoar-se pelo silêncio
e desenvolver a virtude pela frugalidade.
Sem desprendimento não é possível purificar a vontade.
Sem a serenidade não é possível ir longe.
O estudo exige calma, o talento exige estudo.
Sem estudo não é possível expandir o talento.
Sem calma não é possível realizar o estudo.
Se for preguiçoso, não conseguirá realizar uma pesquisa perfeita.
Se for impulsivo, não conseguirá governar sua natureza.
Os anos voam com as horas, as aspirações fogem com os anos.
No fim envelhecemos e sucumbimos.
De que adiantará lamentar a pobreza?
Sun Tzu (400 a.C)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 Treinamento concorrente e força muscular.....	4
3.2 Treinamento concorrente e hipertrofia muscular.....	7
3.3 Função da via AKt/mTOR no crescimento do músculo esquelético.....	9
3.4 Efeito agudo e crônico do exercício de força na via Akt/mTOR	11
3.5 Função da ativação da AMPK no Controle do Estado Energético Intracelular.....	14
3.6 Efeito agudo e crônico do exercício aeróbio na AMPK	16
3.7 Treinamento concorrente e possíveis mecanismos intracelulares de interferência	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS.	21
4.1 Amostra.....	21
4.2 Procedimentos e testes.....	22
4.2.1 Biópsia Muscular	22
4.2.2 Monitoração do padrão alimentar dos sujeitos.....	23
4.2.3 Análise Molecular (expressão gênica)	23
4.2.3.1 Extração do RNA	23
4.2.3.2 RT-PCR.....	24
4.2.3.3. Método de Detecção da Expressão Gênica em Tempo Real.....	24
4.3 Análise da expressão de proteínas	25
4.3.1 Western blotting	25
4.4 Medida da área de secção transversa muscular (ASTM)	27
4.5 Teste de potência aeróbia.....	28
4.6 Teste de força dinâmica máxima.	28
4.7 Protocolo de treinamento	29
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1 Força dinâmica máxima (1RM)	32
6.2 Área de Secção transversa Muscular	33
6.3 Consumo máximo de oxigênio e velocidade máxima	34
6.4 Expressão gênica.....	35

6.5 Expressão protéica	36
7. DISCUSSÃO	41
7.1 Consumo máximo de oxigênio	41
7.2 Força dinâmica máxima	43
7.3 Área de secção transversa da musculatura da coxa.....	45
7.4 Expressão gênica e protéica	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXO I CONSENTIMENTO INFORMADO	65
ANEXO II APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características iniciais dos sujeitos (Média ± DP).....	22
TABELA 2 – Sequências dos iniciadores (primers) utilizadas para a amplificação dos genes de interesse.....	25
TABELA 3 - Progressão do treinamento de força durante as oito semanas de treinamento.....	30
TABELA 4 - Progressão do treinamento aeróbio durante as oito semanas de treinamento.....	31
TABELA 5 - Força máxima (1RM-kg) no exercício leg-press antes e após oito semanas de treinamento.....	32
TABELA 6 - Área de secção transversa muscular da perna direita (PD) antes e após oito semanas de treinamento.....	33
TABELA 7 - Área de secção transversa muscular da perna direita (PE) antes e após oito semanas de treinamento.....	34
TABELA 8 - Consumo máximo de oxigênio relativo antes e após oito semanas de treinamento para os grupos controle (C).....	34
TABELA 9 - Consumo máximo de oxigênio absoluto antes e após oito semanas de treinamento.....	35
TABELA 10 - Velocidade de corrida na potência aeróbia máxima (vVO_{2max}) antes e após oito semanas de treinamento.....	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Complexo ativo e inativo da mTOR.	20
FIGURA 2 - Visualização da demarcação do perímetro do músculo quadríceps femural.	28
FIGURA 3- Dados de expressão gênica para AMPK, Akt, mTOR e p70 ^{S6K1} (u.a)	36
FIGURA 4 – Quantificação da proteína total AMPK (u.a.)	37
FIGURA 5 – Quantificação da proteína p.AMPK no resíduo treonina 172.....	37
FIGURA 6 – Quantificação da proteína total Akt.....	38
FIGURA 7 – Quantificação da proteína p.Akt no resíduo serina 473	39
FIGURA 8 – Quantificação da proteína total p70.....	40
FIGURA 9 – Quantificação da proteína p.p70 ^{S6K1} no resíduo treonina 389	40

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AICAR *5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-β-D-ribose*

AKt Proteína quinase b

AST Área de secção transversa

ATP Adenosina trifosfato

AMPK *Adenosine monophosphate-activated kinase*

AMP Adenosina monofosfato

Ca²⁺ Íon Ca²⁺

CaMKβ *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase- β*

CaMK-IV *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase- IV*

CS Citrato sintase

CT Cycle threshold

DN Dominante negativo

DNA Ácido desoxirribonucléico

dNTPs Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EEF Fatores eucarióticos de alongamento

eIF-4E Fator de iniciação eucarioto 4E

H⁺ Íon H⁺

IGF-I Fator de crescimento similar à insulina

LKB1 *Suppressor gene product*

MgCl₂ Cloreto de magnésio

MGF *Mechano growth factor*

mtDNA DNA mitocodrial

mtTFA Fator de transcrição mitocondrial A

mTOR *Mammalian target of rapamycin*

mTORC1 Mammalian target of rapamycin complex 1

NRF Fatores nucleares de transcrição respiratórios

PCR *Polymerase chain reaction*

PDK Proteína dependente de fosfoinosítídeos

P_i Fosfato inorgânico

PI3K Fosfatidilinositol 3 quinase

PGC-1 α *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α*

p70^{S6K} 70-KD S6 protein kinase

Ser Serina

RNA Ácido ribonucléico

Rheb *Ras homolog enriched in brain*

RM Repetição máxima

RT *Reverse transcriptase*

SDS Sulfato lauril de sódio

Thr Treonina

TSC2 *Tuberous sclerosis complex 2*

TSP Taxa de síntese de proteínas

VO_{2max} Consumo máximo *de oxigênio*

vVO_{2max} Velocidade de corrida correspondente ao consumo máximo de oxigênio

β -GPA *β -guanidinopropionic acid*

4E-BP1 *Eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1*

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I CONSENTIMENTO INFORMADO	65
ANEXO II APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA.....	73

RESUMO

EFEITO DO TREINAMENTO CONCORRENTE NA EXPRESSÃO GÊNICA E
PROTÉICA ASSOCIADAS À HIPERTROFIA MUSCULAR.

Autor: EDUARDO OLIVEIRA DE SOUZA
Orientador: PROF. DR. CARLOS UGRINOWITSCH

Diversos atletas e praticantes de atividades físicas incorporam em suas rotinas de treinamento, exercícios aeróbios e de força motora simultaneamente. Contudo, essa combinação conhecida como treinamento concorrente (TC) tem demonstrado uma atenuação da resposta adaptativa da força e hipertrofia muscular. O presente estudo analisou se alguns genes e proteínas envolvidos na resposta hipertrófica e na biogênese mitocondrial do músculo esquelético poderiam explicar a atenuação da resposta adaptativa com o TC. Trinta e sete sujeitos foram divididos nos grupos: controle (C), aeróbio (TA), força (TF) e concorrente (TC) e submetidos a oito semanas de treinamento. Os resultados significantes foram: aumento na força dinâmica máxima de 270,3 ($\pm 45,5$) para 320,3 ($\pm 57,0$) Kg para o TF e de 268,4 ($\pm 47,6$) para 315,7 ($\pm 63,5$) para o TC; área de secção transversa do quadríceps de 8332,4 ($\pm 817,5$) mm² para 8849,5 ($\pm 893,3$) mm² para o TF e de 8340,8 ($\pm 1000,0$) mm² para 8996,8 ($\pm 919,5$) mm² para o TC; o gene da mTOR demonstrou aumento significativo de 1,01 ($\pm 0,10$) U.A para 1,44 ($\pm 0,17$) U.A no TF e redução de 1,01 ($\pm 0,15$) para 0,536 ($\pm 0,25$) U.A da p70^{S6K1} no TC; a expressão total da proteína p70^{S6K1} demonstrou aumentou no grupo TC em relação ao C (1,1 ($\pm 0,2$) U.A vs 0,8 ($\pm 0,3$) U.A), a fosforilação da Akt no resíduo ser473 e da p70^{S6K1} no resíduo thr389 aumentou somente no TF em relação ao C (1,3 ($\pm 0,2$) U.A vs 0,9 ($\pm 0,1$) U.A e 1,3 ($\pm 0,4$) vs 0,8 ($\pm 0,3$) U.A, respectivamente). O grupo TF e TC demonstraram adaptações similares nas variáveis de força e hipertrofia muscular apesar de

algumas diferenças na resposta molecular. Esses achados indicam que na fase inicial do TC as diferenças na adaptação molecular não refletem em alterações na força e hipertrofia muscular quando comparadas ao TF.

Palavras chaves: Treinamento concorrente, crescimento muscular, vias de sinalização.

ABSTRACT

EFFECT OF CONCURRENT TRAINING ON GENE AND PROTEIN EXPRESSION
ASSOCIATED WITH SKELETAL MUSCLE HYPERTROPHY

Author: EDUARDO OLIVEIRA DE SOUZA
Advisor: PROF. DR. CARLOS UGRINOWITSCH

Many athletes and individuals involved in physical training perform strength and endurance exercises in the same training unit. However, this combination, referred as concurrent training (CT), has shown to blunt strength and skeletal muscle growth responses. This study investigated whether some genes and proteins associated with muscle growth and mitochondrial biogenesis may explain the decreased adaptive response to CT. Thirty seven participants were divided into four groups: control (C), endurance (TA), strength (TF) and concurrent (TC) and submitted to eight weeks of training. Significant results were found in the following variables from pre to post training: maximum dynamic strength - TF from 270,3 ($\pm 45,5$) to 320,3 ($\pm 57,0$) Kg and TC from 268,4 ($\pm 47,6$) to 315,7 ($\pm 63,5$); quadriceps cross sectional area (CSA) - TF from 8332,4 ($\pm 817,5$) mm² to 8849,5 ($\pm 893,3$) mm², TC from 8340,8 ($\pm 1000,0$) mm² to 8996,8 ($\pm 919,5$) mm²; mTOR gene expression increased significantly post-training only for the TF (1,01 ($\pm 0,10$) A.U to 1,44 ($\pm 0,17$) A.U) and p70^{S6K1} was significantly reduced post-training (1,01 ($\pm 0,15$) to 0,536 ($\pm 0,25$) A.U) for the TC; p70^{S6K1} total protein content was significantly greater after TC when compared with C (1,1 ($\pm 0,2$) U.A vs 0,8 ($\pm 0,3$)) and phosphorylation of both Akt at ser473 and p70^{S6K1} at thr389 increased only after TF compared with C (1,3 ($\pm 0,2$) U.A vs 0,9 ($\pm 0,1$) U.A and 1,3 ($\pm 0,4$) vs 0,8 ($\pm 0,3$) U.A, respectively). TF and TC groups had similar improvements in muscle strength and hypertrophy, besides some differences in the molecular responses. These differences at the molecular level in early phases of the TC do not blunt muscle strength and hypertrophy adaptations compared with the TF.

Key words: Concurrent training, muscle growing, signaling pathways

1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é um tecido que apresenta grande plasticidade, possuindo a capacidade de se adaptar a alterações na atividade neuromuscular e na disponibilidade tanto de substratos quanto de hormônios (HOOD, IRRCHER, LJUBICIC e JOSEPH, 2006). Esta capacidade de adaptação muscular é dependente da demanda funcional específica (ATHERTON, BABRAJ, SMITH, SINGH, RENNIE e WACKERHAGE, 2005). Alguns exemplos destas adaptações podem ser notados quando indivíduos são submetidos a diferentes situações de diminuição (ex: repouso absoluto ou imobilização) ou de aumento (ex: treinamento de força e/ou aeróbio) da atividade muscular.

Especificamente em relação ao aumento da atividade muscular, a associação de diferentes estímulos de treinamento constitui uma estratégia utilizada não só por atletas que necessitam desenvolver diferentes capacidades motoras, mas também por praticantes de atividades físicas que buscam melhoras na estética e na saúde. O exemplo mais usual de tal associação é o treinamento concorrente (TC).

O TC consiste na realização de exercícios que desenvolvam a força muscular e a resistência aeróbia, dentro da mesma unidade de treino. Porém, este modelo de treinamento tem demonstrado uma redução na resposta adaptativa crônica, caracterizada pela diminuição nos ganhos de força e na hipertrofia muscular (KRAEMER, PATTON, GORDON, HARMAN, DESCHENES, REYNOLDS, NEWTON, TRIPLETT e DZIADOS, 1995; PUTMAN, XU, GILLIES, MACLEAN e BELL, 2004) e conhecida na literatura como fenômeno de interferência (DOCHERTY e SPORER, 2000).

Com relação aos ganhos de força muscular, a interferência tem sido atribuída tanto a fatores agudos, relacionados à ordem dos estímulos de treinamento dentro em uma sessão, como a fatores crônicos, relacionados ao *overtraining* e à qualidade do estímulo de treino (CRAIG, LUCAS, POHLMAN e STELLING, 1991) (LEVERITT, ABERNETHY, BARRY e LOGAN, 1999) (DE SOUZA, TRICOLI, FRANCHINI, PAULO, REGAZZINI e UGRINOWITSCH, 2007). Contudo, os modelos de interferência propostos ainda não conseguiram apontar o(s) mecanismo(s) responsável (eis) por esse fenômeno. Diversos fatores contribuem para essa lacuna

sobre os mecanismos responsáveis pelo efeito de interferência, como o uso de diferentes protocolos de treinamento, nível de experiência dos participantes, ausência de controle nutricional, e as técnicas de pesquisa utilizadas para esclarecer o problema.

Com a crescente utilização das técnicas de biologia molecular para com o intuito de investigar as adaptações ao exercício físico, alguns pesquisadores têm sugerido mecanismos específicos de sinalização intracelular que teriam potencial para explicar o fenômeno da interferência no TC (NADER, 2006; COFFEY e HAWLEY, 2007; HAWLEY, 2009).

Embora o TC atue de maneira similar ao TF e ao TA no fenótipo das fibras musculares, ele promove uma atenuação na hipertrofia muscular das fibras tipo I (KRAEMER *et al.*, 1995; BELL, SYROTUIK, MARTIN, BURNHAM e QUINNEY, 2000) (PUTMAN *et al.*, 2004), que parece estar associada à fatores intrínsecos à fibra muscular. De acordo com esses autores, o componente aeróbio do TC ativaria proteínas intramusculares que causariam a inibição da síntese protéica, responsável pelo processo de hipertrofia muscular, prejudicando o acúmulo de proteínas na célula muscular e consequente aumento do volume celular (COFFEY e HAWLEY, 2007) (NADER, 2006).

De fato, o exercício aeróbio pode produzir um *turnover* de ATP, até 80 vezes maior do que o treinamento de força (WILKINSON, PHILLIPS, ATHERTON, PATEL, YARASHESKI, TARNOPOLSKY e RENNIE, 2008) ocasionando assim, um acúmulo de metabólitos, que somado à ausência de liberação de fatores de crescimento, ativam proteínas associadas a processos catalíticos e à biogênese mitocondrial. Uma delas é a *Adenosine monophosphate-activated kinase* (AMPK). Essa proteína é um complexo heterotrimérico, cuja função é monitorar o estado energético da fibra muscular através de alterações na razão AMP:ATP (WINDER, TAYLOR e THOMSON, 2006). Uma vez ativada, a AMPK inibe os processos anabólicos que demandam um elevado consumo de ATP, como a síntese protéica (BOLSTER, CROZIER, KIMBALL e JEFFERSON, 2002).

Por outro lado, o exercício de força resulta na ativação das proteínas quinase b, também conhecidas como (Akt). Essas proteínas são serinas treoninas quinases envolvidas na modulação da síntese de proteínas e, conseqüentemente, da

hipertrofia muscular. Uma vez ativada, a AKt é responsável por fosforilar uma série de proteínas-alvo que podem induzir à síntese protéica, aumentando a transcrição gênica e a proliferação celular (GLASS, 2003). Uma dessas proteínas é a mammalian target of rapamycin (mTOR), que está envolvida na regulação do crescimento celular. Por exemplo, sob a ação da rapamicina, um bloqueador da atividade da mTOR, há diminuição da síntese protéica e da hipertrofia muscular induzida pelo treinamento de força (BODINE, STITT, GONZALEZ, KLINE, STOVER, BAUERLEIN, ZLOTCHENKO, SCRIMGEOUR, LAWRENCE, GLASS e YANCOPOULOS, 2001).

De maneira similar, a atividade da mTOR e a síntese de proteínas, também parecem ser reduzidas quando a expressão da AMPK é elevada. O aumento da AMPK induzido tanto por agonista farmacológico (AICAR) quanto por eletroestimulação simulando treinamento aeróbio, reduziu a taxa de síntese protéica, em associação com a diminuição da fosforilação da Akt^{Ser 473} e da mTOR^{Ser2448} (BOLSTER *et al.*, 2002) (ATHERTON *et al.*, 2005). Essas evidências sugerem que durante o TC, o exercício aeróbio, ou a somatória dos dois estímulos (aeróbio e força) poderia ativar a AMPK em maior magnitude que as vias de síntese protéica, inibindo parcialmente a resposta hipertrófica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar se alterações em alguns genes e proteínas, responsáveis pela modulação da hipertrofia muscular e biogênese mitocondrial, podem explicar o fenômeno de interferência observado no treinamento concorrente.

2.2. Objetivos específicos

- a- Verificar se o aumento na expressão gênica e protéica de AMPK observado durante o TA afeta negativamente a hipertrofia muscular no TC.

b- Verificar se o TC afeta a expressão de genes e proteínas relacionados à hipertrofia muscular quando comparado ao TF isolado.

c- Verificar se diferenças no padrão de expressão gênica e protéica podem estar associadas às adaptações funcionais e morfológicas diferenciadas entre os modelos de treinamento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A sequência de tópicos na presente revisão de literatura tem como objetivo primeiramente caracterizar o TC e suas implicações na produção de força e hipertrofia muscular. Na sequência, as respostas moleculares agudas e crônicas aos treinamentos isolados de aeróbio e força TA e TF serão apresentadas, assim como um modelo de interferência que se iniciaria em nível molecular, em resposta ao TC.

3.1. Treinamento concorrente e força muscular

Baseado no princípio da especificidade, o TF provoca adaptações morfo-funcionais específicas e diferenciadas quando comparadas àquelas provenientes do TA (STARON, KARAPONDO, KRAEMER, FRY, GORDON, FALKEL, HAGERMAN e HIKIDA, 1994) (LEVERITT *et al.*, 1999). Em geral, as adaptações resultantes após um programa de TF incluem aumento na massa muscular e na capacidade de produção de força (HICKSON, 1980; HAKKINEN, ALEN, KRAEMER, GOROSTIAGA, IZQUIERDO, RUSKO, MIKKOLA, HAKKINEN, VALKEINEN, KAARAKAINEN, ROMU, EROLA, AHTIAINEN e PAAVOLAINEN, 2003). Por outro lado, o TA diminui o conteúdo miofibrilar para otimizar a cinética do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) (HOLLOSZY e COYLE, 1984; BASSETT e HOWLEY, 2000; TANISHO e HIRAKAWA, 2009).

Dessa maneira, devido à incongruência entre as adaptações produzidas pelos dois modelos de treinamento isoladamente, o desenvolvimento máximo dessas duas capacidades nem sempre é possível quando elas são treinadas simultaneamente. Sugerindo assim, que a produção de força medida pelo teste de uma repetição

máxima (1RM) ou o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) poderão ser afetados após um programa de TC.

Poucos estudos verificaram interferência no VO_{2max} após o TC (NELSON, ARNALL, LOY, SILVESTER e CONLEE, 1990). Por outro lado, a maioria dos estudos que investigou o TC observou uma diminuição nos ganhos de força, quando comparados com o treino de força isoladamente (HICKSON, 1980; CRAIG *et al.*, 1991). Essa diminuição da resposta adaptativa é definida como “efeito de interferência” (DOCHERTY e SPORER, 2000).

HICKSON (1980) foi o primeiro a verificar esse efeito no desempenho da força muscular em indivíduos destreinados. Nesse estudo, os grupos treinaram por 10 semanas. Até a sétima semana os grupos TF e TC tiveram os mesmos ganhos em força, porém, após a oitava semana, o grupo TC atingiu um platô no desenvolvimento de força, terminando o estudo com um ganho de 25%, enquanto o TF demonstrou um ganho de 44%.

Essa atenuação verificada nos ganhos de força muscular tem sido atribuída tanto a fatores agudos, relacionados à ordem da sessão, quanto a fatores crônicos relacionados à divergência dos estímulos e a fatores relacionados à sobreposição das cargas de treinamento (i.e. *overtraining*), que podem diminuir a qualidade do estímulo de treinamento, levando ao efeito de interferência (LEVERITT *et al.*, 1999) (DOCHERTY e SPORER, 2000).

Quando os componentes do TC, força e resistência aeróbia são treinados no mesmo dia, a capacidade que é treinada primeiro pode causar uma fadiga residual, o que, em tese, atrapalharia o desempenho da capacidade subsequente. Dessa forma, a hipótese do efeito agudo sugere que a diminuição no desempenho do exercício de força realizado subsequentemente ao exercício aeróbio, poderia causar o efeito de interferência. De fato, o exercício aeróbio intermitente em intensidade elevada, produz diminuições na força máxima isométrica, ativação muscular e resistência de força (BENTLEY, SMITH, DAVIE e ZHOU, 2000; SPORER e WENGER, 2003). Por outro lado, o exercício contínuo não diminui a força máxima e a resistência de força (DE SOUZA *et al.*, 2007).

Diante dessa hipótese, a sequência de realização do TF e TA, dentro de uma sessão de TC, poderia afetar o desempenho de uma capacidade ou de outra, mas

poucos estudos verificaram o efeito da ordem da sessão, sem resultados conclusivos. De fato, essa queda aguda no desempenho de força tem sido verificada em diversos estudos (ABERNETHY, 1993) (SPORER e WENGER, 2003) (DE SOUZA *et al.*, 2007), porém, não está claro se essa redução é um fator determinante na diminuição do desenvolvimento de força atípico observado nos protocolos de TC.

A hipótese crônica é baseada na exposição de estímulos divergentes de treinamento. Há muito tempo evidencia-se que o TF pode causar decréscimo na densidade capilar (SCHANTZ, 1983) e na densidade mitocondrial (MACDOUGALL, SALE, MOROZ, ELDER, SUTTON e HOWALD, 1979). Essas adaptações poderiam prejudicar o desempenho aeróbio e/ou consumo máximo de oxigênio. Por outro lado, SALE *et al.*(1990) (SALE, JACOBS, MACDOUGALL e GARNER, 1990) demonstraram que o TA promove uma atenuação na hipertrofia muscular, sendo essa, uma resposta adaptativa capaz de diminuir o desempenho de força motora. Sendo assim, a hipótese crônica sustenta-se na divergente resposta dos modelos de TA e TF realizados de maneira isolada, uma vez que, algumas dessas adaptações podem ser consideradas antagônicas.

DOCHERTHY E SPORER (2000) também levantaram a hipótese de que, dependendo da intensidade do TA, as adaptações decorrentes poderiam ser mais centrais ou periféricas. Isto é, em intensidade entre 60-80% do VO_{2MAX} , as adaptações são predominantes no componente central (adaptação cardiovascular), por outro lado, as adaptações periféricas predominariam quando o músculo entrasse em um estado de hipóxia, ou seja, quando a intensidade de treinamento é maior que 90% do VO_{2MAX} .

De acordo com os mesmos autores, o TF também demonstraria essa especificidade. Quando o TF é realizado entre 1-5RM haveria melhoras do componente central, nesse caso, na capacidade de ativação neuromuscular, e quando realizado entre 8-12RM produziria adaptações predominantemente periféricas (aumento na área de secção transversa do músculo).

Com isso, os autores sugeriram haver uma possível zona para o efeito de interferência, que ocorreria quando a intensidade dos dois modelos de treinamento disputasse o mesmo sítio de adaptação (i.e. central ou periférico). Todavia, o modelo proposto não se mostra totalmente efetivo, haja vista, que programas de TC fora

dessa zona de interferência também demonstraram o efeito de interferência. Por exemplo, no estudo de HICKSON (1980), o TF foi realizado com séries de 5RM e TA próximo ao VO_{2max} . Nesse caso, o componente central dos dois estímulos não disputariam o mesmo sítio de adaptação e, mesmo assim, foi observado atenuação nos ganhos de força do grupo TC.

Por último, a hipótese associada ao *overtraining* tenta explicar a queda no desempenho de força pelo excesso de treinamento. Invariavelmente, o grupo que realiza o TC, é submetido ao dobro do número de sessões, caracterizado pela soma do número de sessões de TA e TF. Alguns autores tem atribuído o efeito de interferência a esse alto volume de treinamento (MCCARTHY, AGRE, GRAF, POZNIAK e VAILAS, 1995).

Contudo, o *overtraining* é uma condição complexa caracterizada por um grupo de sintomas e anormalidades que sempre incluem queda na performance (FOSTER, 1998). Sendo assim, existem dois motivos que dificultam a aceitação dessa hipótese. Primeiro, protocolos com baixo volume e intensidade, demonstraram atenuação na hipertrofia e força muscular (DUDLEY e DJAMIL, 1985; MCCARTHY, POZNIAK e AGRE, 2002). Segundo, se essa condição promove queda na performance, seria esperada uma queda em ambas as capacidades e, invariavelmente, a queda de performance ocorre apenas no componente força de quem realiza o TC.

Desta maneira, olhando apenas para a adaptação final (força máxima) fica difícil o entendimento do efeito de interferência. A comparação entre os estudos, que utilizam diferentes protocolos, períodos, frequências e níveis diferenciados de treinamento dos voluntários nem sempre é viável para a identificação de um mecanismo responsável pela interferência. Desta maneira, se faz necessário a integração dos diferentes níveis hierárquicos do processo adaptativo, haja vista, que o TC também produz uma resposta peculiar na hipertrofia muscular.

3.2. Treinamento concorrente e hipertrofia muscular

As respostas adaptativas ao treinamento aeróbio e de força realizados de maneira isolada, indicam uma incompatibilidade característica ao TC, já que miofibrilas e mitocôndrias parecem competir pelo espaço intracelular, pois perfazem,

juntamente com o retículo sarcoplasmático, a maior parte do volume da célula muscular (ROME e LINDSTEDT, 1998).

Essa competição acontece quando os dois tipos de treinamento ativam as mesmas unidades motoras. Por exemplo, o TF parece recrutar todo o *pool* de unidades motoras presente nos músculos esqueléticos, pois ativa as unidades motoras lentas, rápidas com alta resistência à fadiga e rápidas com baixa resistência à fadiga (ENOKA e STUART, 1992). Por outro lado, o TA ativa preferencialmente as unidades motoras lentas, pois as unidades motoras rápidas parecem ser ativadas apenas em intensidades mais próximas a do VO_{2max} (SALE, 1988). Dessa forma, as unidades motoras lentas, compostas preferencialmente por fibras tipo I, são solicitadas tanto no TF quanto no TA (KRAEMER *et al.*, 1995).

KRAEMER *et al.* (1995) foram os primeiros a demonstrar atenuação da resposta hipertrófica na fibras tipo I após o TC. Os sujeitos foram submetidos a um protocolo experimental de quatro sessões semanais durante 12 semanas. O TA consistiu em corridas contínuas de 40 minutos (segunda e quinta-feira) e tiros de 200 a 800 metros variando a relação exercício/descanso de 1:4 para 1:0,5 (terça e sexta-feira). Já o TF foi composto de 2-3 séries de 10-15 RM (segunda e quinta-feira) e 3-5 séries de 5-6 RM (terça e sexta-feira). O TC combinou as sessões de TA e TF, quatro vezes por semana, com intervalo de 4/6 horas entre as sessões. O grupo que realizou o TA demonstrou uma diminuição significativa na área de secção transversa das fibras tipo I e II. O grupo TF aumentou a área das fibras I e IIA e o grupo TC demonstrou aumento apenas nas fibras tipo IIA, a área de secção transversa das fibras tipo I não demonstrou alteração significativa (pré 5.008 ± 874 e pós $4.756 \pm 692 \mu m^2$).

PUTMAN *et al.* (2004) observaram resultados semelhantes após 12 semanas de treinamento. Nesse protocolo o TA consistiu em três sessões semanais, sendo duas de caráter contínuo, com duração de 30 a 42 minutos no limiar ventilatório, e uma sessão de caráter intermitente a 90% do VO_{2MAX} (i.e 3min exercício/ 3min recuperação passiva). O TF consistiu em 2-6 séries de 4-10 repetições a 70-85% de 1RM, em três sessões semanais. O grupo TC realizou o mesmo protocolo do TA e do TF, em dias alternados, seis vezes por semana. O grupo TA não demonstrou nenhum aumento na área de secção transversa das fibras. O grupo TF demonstrou

um aumento na área das fibras tipo I e IIa de 17% e 13%, respectivamente. Similarmente aos achados de KRAEMER et al.(1995), somente as fibras tipo IIa (18%) apresentaram aumento na área de secção transversa após o TC (PUTMAN *et al.*, 2004).

Outro dado importante é que, em estudos com menor volume e intensidade, a resposta hipertrófica nas fibras tipo I após o TC, também é inibida (MCCARTHY *et al.*, 2002). MACCARTHY et al. (2002) defendem que pode haver compatibilidade entre os dois componentes, desde que haja uma redução no volume total e na intensidade de treinamento. Entretanto, após 10 semanas de TC com sessões que não ultrapassavam uma hora, com 10 a 20 minutos de intervalo entre os componentes, a área de secção transversa das fibras tipo I não demonstrou alteração significativa.

Sendo assim, parece que a introdução de TA, durante um período de TF, modula negativamente a resposta hipertrófica do *pool* de fibras musculares, quando comparado ao TF isolado. Como a resposta hipertrófica está diretamente ligada ao aumento da síntese protéica no tecido muscular, algum mecanismo parece agir negativamente nas fibras tipo I durante o TC. Assim, serão caracterizadas a seguir, algumas das respostas moleculares agudas e crônicas do TF e TA, assim como as vias de sinalização intracelular específicas para a síntese protéica e sua interação com o componente aeróbio do TC.

3.3 Função da via AKt/mTOR no crescimento do músculo esquelético.

O tecido muscular possui plasticidade elevada sendo capaz de sofrer adaptações diferenciadas em resposta ao treinamento específico. A somatória das alterações produzidas pelo exercício físico, em cada uma das sessões de treinamento, gera um remodelamento muscular que promove essa adaptação (HOOD *et al.*, 2006). Esse processo envolve eventos celulares específicos que iniciam-se no meio extracelular e ativam vias de sinalização intracelular específicas ao estímulo oferecido (ATHERTON *et al.*, 2005). O exercício físico pode estimular vias que regulam o equilíbrio energético celular, a biogênese mitocondrial, a transcrição gênica e a síntese de proteínas, entre outras. (BODINE *et al.*, 2001)

(NORRBOM, SUNDBERG, AMELN, KRAUS, JANSSON e GUSTAFSSON, 2004) (NADER, 2005) (COFFEY e HAWLEY, 2007).

A modulação da síntese protéica e da hipertrofia muscular é fortemente regulada por fatores de crescimento expressos na célula muscular (BAMMAN, SHIPP, JIANG, GOWER, HUNTER, GOODMAN, MCLAFFERTY e URBAN, 2001), um deles é o fator de crescimento similar à insulina do tipo 1 (IGF-1). É importante salientar que o gene do IGF-1 pode sofrer *splicing* alternativos em diferentes regiões e produzir diferentes RNAm que resultarão em isoformas de IGF (IGF-1Ea, IGF-1Eb, IGF1-Ec). Aumento nas isoformas de IGF-1 é visualizado após 5 semanas de TF (HAMEED, LANGE, ANDERSEN, SCHJERLING, KJAER, HARRIDGE e GOLDSPINK, 2004), contudo, duas isoformas exercem papel determinante no processo adaptativo do TF, a isoforma IGF-1Ea e a isoforma IGF-1Ec também conhecida como MGF (mechano growth factor) (BAMMAN, PETRELLA, KIM, MAYHEW e CROSS, 2007) (HAMEED, TOFT, PEDERSEN, HARRIDGE e GOLDSPINK, 2008). Estímulos tróficos importantes para a musculatura esquelética têm demonstrado aumentar os níveis de IGF-1 (PHILIPPOU, HALAPAS, MARIDAKI e KOUTSILIERIS, 2007), promovendo a ativação da cascata de sinalização, pelo recrutamento da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), da proteína dependente de fosfoinosítídeos (PDK) e da proteína quinase B, também conhecida como AKt.

Quando ativada, essa cascata de sinalização exerce um papel determinante na regulação da síntese protéica e, conseqüentemente, no tamanho do músculo (KUBICA, BOLSTER, FARRELL, KIMBALL e JEFFERSON, 2005). A ativação da PI3K pelo IGF-1 desloca a AKt para membrana celular, causando a alteração conformacional da molécula e permitindo que a PDK-1 fosforile o resíduo Ser⁴⁷³. Uma vez fosforilada, a AKt pode agir em uma variedade de substratos que influenciam a sobrevivência celular e a síntese de proteínas. Um dos alvos da AKt é a mTOR, que tem importante função na regulação da hipertrofia muscular. Esse controle exercido pela mTOR, parece depender de sua capacidade em estimular a tradução, processo envolvido na síntese protéica, onde organelas como o ribossomo são essenciais para ligação ao RNAm e a formação da cadeia polipeptídica.

Quando ativada, a mTOR estimula o processo de tradução pela modulação da atividade de duas proteínas ribossomais: 1) ela fosforila a proteína 4E-BP1 e

previne a interação desta com o fator de iniciação eucarioto 4E (eIF-4E). Os fatores de iniciação são responsáveis pela ligação do ribossomo na extremidade 5' *cap* do RNAm, ligação que promoverá o início da tradução dos códons. Essa região é reconhecida pelo eIF-4E e a interação da 4E-BP1 com essa extremidade, inibe o processo de tradução, (HARA, YONEZAWA, KOZLOWSKI, SUGIMOTO, ANDRABI, WENG, KASUGA, NISHIMOTO e AVRUCH, 1997); 2) a mTOR fosforila a proteína p70^{S6K}, a qual atua na fosforilação do polipeptídeo ribossomal S6 na subunidade ribossomal 40S, próximo aos fatores de iniciação e do RNAm (KOOPMAN, ZORENC, GRANSIER, CAMERON-SMITH e VAN LOON, 2006). A eficácia de todo esse aparato de tradução, possibilita o acoplamento correto dos ribossomos no RNAm, possibilitando a sequência de eventos chave para a síntese de proteínas.

3.4 Efeito agudo e crônico do exercício de força na via Akt/mTOR

O treinamento de força é conhecido por provocar aumentos na massa muscular e, por consequência, na capacidade de geração de força do músculo esquelético. O aumento da massa muscular ocorre em decorrência do incremento no número e no diâmetro das miofibrilas resultando no aumento da área de secção transversa (AST). Essa resposta é consequência do acúmulo de proteínas contráteis nas fibras musculares, quando a taxa de síntese protéica é maior do que a de degradação (BODINE, 2006).

A maior taxa de síntese de proteínas na fase de recuperação após sessões de treinamento de força, tem sido associada ao aumento na ativação da via de sinalização envolvendo AKt, mTOR e p70^{S6K} (BOLSTER, KUBICA, CROZIER, WILLIAMSON, FARRELL, KIMBALL e JEFFERSON, 2003; CUTHBERTSON, BABRAJ, SMITH, WILKES, FEDELE, ESSER e RENNIE, 2006).

PARKINGTON et al. (2003) realizaram um estudo simulando o treinamento de força através de eletroestimulação com os objetivos de verificar a resposta nas proteínas associadas ao trofismo muscular e se o padrão de ativação da via Akt/mTOR era dependente do tipo de fibra muscular. Em ratos a composição dos músculos é: Plantar (PLA), 7% tipo I, 52% tipo IIa, 41% tipo IIb, Tibial anterior (TA), 3% tipo I, 61% tipo IIa, 36% tipo IIB e Sóleo (SOL), 83% tipo I, 17% tipo IIa e 0% tipo

IIb. Comparado ao grupo controle, a fosforilação da mTOR aumentou significativamente no músculo PLA e não foi alterada no TA. Após 6 horas, a fosforilação continuou aumentada no PLA e foi verificado aumento no TA. No músculo SOL, não foi verificado nenhuma alteração da mTOR. Com uso de anticorpos para cadeia pesada de miosina, foi verificado que a fosforilação da mTOR foi específica ao tipo de fibra, sendo expressa predominantemente na isoforma IIa, enquanto o aumento nas fibras tipo I não foi significativo. A p70^{S6K} aumentou de maneira discreta no PLA e não houve alteração no TA imediatamente após o estímulo. Contudo, após 6 horas foi verificado um aumento significativo na fosforilação da p70^{S6K} nos músculos PLA e TA. Esses dados sugerem que existe uma resposta integrada entre mTOR e p70^{S6K} e que essa atividade ocorre predominantemente nas fibras que demonstram maior área de secção transversa (PARKINGTON, SIEBERT, LEBRASSEUR e FIELDING, 2003).

Estudos em humanos têm descrito resultados semelhantes (DREYER, FUJITA, CADENAS, CHINKES, VOLPI e RASMUSSEN, 2006) (MASCHER, TANNERSTEDT, BRINK-ELFEGOUN, EKBLUM, GUSTAFSSON e BLOMSTRAND, 2008). Utilizando sujeitos saudáveis, que não estavam engajados em programas de treinamento, DREYER et al. (2006) demonstraram que após uma sessão de exercício de força, que consistia em 10 séries de 10 repetições a 70% de 1RM realizado na cadeira extensora, houve um aumento na taxa de síntese de proteínas tanto uma quanto duas horas após a sessão de treino. Essa resposta foi acompanhada pela maior fosforilação da AKT e mTOR uma hora após o exercício e após duas horas pela maior fosforilação da mTOR e p70^{S6K}. Esses resultados demonstram que, durante a fase inicial de recuperação, o exercício de força aumenta a fosforilação de AKT, mTOR e p70^{S6K}, melhorando o aparato de tradução e, conseqüentemente promovendo o aumento da síntese de proteínas. Porém, é preciso destacar que após a sessão de exercício, a atividade da AMPK foi maior que a situação pré-exercício. O que comprometeu a taxa de síntese protéica. Enquanto a atividade AMPK permaneceu elevada sem o aumento da AKT e da mTOR, não foi visualizado aumento na taxa de síntese de protéica, ela só demonstrou aumento significativo em relação ao pré-exercício, uma hora após o estímulo de força em

associação a maior fosforilação da Akt e mTOR e a diminuição na atividade da AMPK.

Quando analisados os efeitos crônicos do exercício de força, também são visualizados resultados parecidos (LEGER, CARTONI, PRAZ, LAMON, DERIAZ, CRETENAND, GOBELET, ROHMER, KONZELMANN, LUTHI e RUSSELL, 2006). Após 8 semanas de treinamento, a fosforilação da mTOR aumentou 44%. Não foi observado aumento na fosforilação da p70^{S6K} e da 4E-BP1, contudo esta diferença pode estar relacionada à temporalidade na aquisição das amostras de tecido muscular (a biópsia foi realizada entre 48-72 horas após a última sessão de treinamento), o que pode ter sido suficiente para não detectar alteração na expressão dessas proteínas. Essas alterações foram acompanhadas por um aumento de 10% da área de secção transversa do quadríceps.

Porém, um dos melhores suportes para a função de sinalização da via Akt/mTOR no exercício de força vem de um modelo de exercício agudo em ratos realizado por KUBICA et al.(2005). Ratos Sprague-Dawley machos foram submetidos a um protocolo de treinamento de força que consistia em 50 repetições com variação de carga entre 0,2g - 0,6/g de sobrecarga por kg de peso corporal do animal. Nesse estudo os autores investigaram a síntese de proteínas e o agrupamento polissomal de ribossomos. A alteração na distribuição de ribossomos de monossomos para polissomos está associada ao aumento na tradução de proteínas, devido ao aumento de ribossomos por fita de RNAm (BODINE, 2006). O aumento na síntese de proteínas e o agrupamento polissomal proporcionado pelo exercício de força foi completamente bloqueado com administração de rapamicina (inibidor farmacológico de mTOR), duas horas antes do exercício. A fosforilação nos dois alvos ribossomais da mTOR, p70^{S6K} e 4E-BP1, foi menor no grupo exercício + rapamicina quando comparado ao grupo exercício (KUBICA *et al.*, 2005).

Todos esses dados supracitados demonstram que a síntese protéica e o conseqüentemente aumento no tamanho do músculo visualizados após protocolos de TF é mediado por mudanças nas vias de sinalização envolvendo a fosforilação da mTOR e a sequencial ativação de seus substratos como a p70.

3.5 Função da ativação da AMPK no Controle do Estado Energético Intracelular.

A AMPK é uma serina, treonina quinase, cuja função é regular o metabolismo energético da célula. Quando há diminuição no nível energético celular (i.e., contração muscular) a AMPK inibe as vias que consomem ATP e ativa as vias envolvidas no catabolismo de carboidratos e ácidos graxos para ressintetizar ATP, regulando o estado energético da fibra muscular.

Nos tecidos de mamíferos, ela consiste em um complexo heterotrimérico que contém a subunidade catalítica α e duas subunidades regulatórias β e γ . Cada subunidade contém duas ou mais isoformas. As isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são encontradas no citosol dos músculos esqueléticos, mas somente a $\alpha 2$ está associada ao núcleo, sugerindo que ela possa exercer uma função na transcrição gênica (ASCHENBACH, SAKAMOTO e GOODYEAR, 2004). Essas subunidades contêm o domínio catalítico que transfere o fosfato de alta energia do ATP para os resíduos serina ou treonina das proteínas-alvo. A subunidade α também contém o resíduo específico treonina¹⁷². O AMP estimula a ativação da AMPK de maneira alostérica se ligando à subunidade γ , mas a fosforilação do resíduo Treonina¹⁷², nas subunidades catalíticas $\alpha 1$ e $\alpha 2$, pelas proteínas responsáveis por sua regulação é essencial para a sua ativação.

O papel de cada subunidade, ainda precisa ser mais bem elucidado, porém existem evidências sugerindo que em humanos as subunidades $\alpha 2$, $\beta 2$ e $\gamma 3$ seriam ativadas de maneira predominante no músculo esquelético (BIRK e WOJTASZEWSKI, 2006). Por outro lado, CLARK et al. (2004) (CLARK, CHEN, MURPHY, AUGHEY, MCKENNA, KEMP e HAWLEY, 2004) propuseram que a subunidade $\alpha 1$, seria ativada em resposta à exercícios mais intensos em humanos. No estudo de CLARK et al. (2004) os indivíduos eram altamente treinados e realizaram o protocolo em alta intensidade, porém essa hipótese de ativação da subunidade $\alpha 1$ durante exercícios intensos, ainda necessita ser comprovada.

As quinases capazes de ativar a AMPK foram descritas recentemente como *tumor suppressor gene product* (LKB1) e *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase- β* (CaMK β) e coletivamente são chamadas de AMPK quinases (AMPKKs). A ativação

da AMPK também é facilitada pelo aumento na concentração de AMP no interior da célula. Sob condições de alta demanda energética, a concentração de AMP aumenta com pequenas diminuições nas concentrações de ATP promovendo o aumento da razão (HARDIE). Uma vez ativada pela alteração no estado energético celular, a AMPK promove a ativação de vias associadas ao metabolismo intermediário à produção de ATP. De fato, a descoberta e a caracterização da AMPK fortaleceram a hipótese de que esta proteína estaria envolvida no controle do metabolismo energético durante situações de estresse como o exercício físico (HARDIE, 2003) (WOJTASZEWSKI, MACDONALD, NIELSEN, HELLSTEN, HARDIE, KEMP, KIENS e RICHTER, 2003) (FENG, HU, DE STANCHINA, TERESKY, JIN, LOWE e LEVINE, 2007).

Além do restabelecimento do estoque de ATP, a AMPK também é capaz de ativar fatores e coativadores de transcrição associados à biogênese mitocondrial (ASCHENBACH *et al.*, 2004). Um desses genes é o *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α* (PGC-1 α). Ele pode ser fosforilado diretamente nos resíduos Thr¹⁷⁷ e Ser⁵³⁸ (JAGER, HANDSCHIN, ST-PIERRE e SPIEGELMAN, 2007). O aumento na concentração de PGC-1 α está associado à maior expressão dos fatores nucleares de transcrição respiratórios (NRF) 1 e 2 e do fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA), os quais ativam genes nucleares e mitocondriais que codificam proteínas envolvidas na cadeia respiratória e outros eventos mitocondriais, (JORGENSEN, RICHTER e WOJTASZEWSKI, 2006), sugerindo que AMPK pode estar envolvida no processo adaptativo do exercício aeróbio.

Em um importante estudo (ZONG, REN, YOUNG, PYPAERT, MU, BIRNBAUM e SHULMAN, 2002), um análogo de creatina - *β -guanidinopropionic acid* (β -GPA), foi injetado por 8 semanas em camundongos selvagens que expressavam função normal da AMPK e em camundongos transgênicos que expressavam o dominante negativo para AMPK (DN). O tratamento diário de β -GPA mimetizava o estado crônico de depleção de creatina e de ATP no músculo esquelético, estado similar ao encontrado em situações de exercício físico. Em resposta a este tratamento, os camundongos selvagens demonstraram um significativo aumento no DNA mitocondrial e na densidade mitocondrial. Esta resposta foi associada ao aumento nos níveis de Ca^{2+} /*calmodulin-dependent protein*

kinase -IV (CaMK-IV) e de PGC-1 α . Porém, nos camundongos AMPK (DN), a CaMK-IV, o PGC-1 α , o DNA e a densidade mitocondrial não foram afetados pelo tratamento de β -GPA. Uma observação importante, é a aparente função da AMPK em aumentar a concentração da CaMK-IV e do PGC-1 α , pois faz dela um componente essencial para biogênese mitocondrial durante situações crônicas de estresse energético.

Todas essas características da AMPK reforçam o papel de sua ativação no exercício aeróbio, contudo é importante destacar, que uma vez que ela é ativada por aumento na razão AMP:ATP, ela também é ativada durante o exercício de força (DREYER *et al.*, 2006).

Dessa maneira, tanto pela sua função na manutenção do nível energético celular ou devido à sobreposição de estímulos (Aeróbio + força). A AMPK pode estar envolvida na inibição da resposta hipertrófica observada no TC.

3.6 Efeito agudo e crônico do exercício aeróbio na AMPK

Como citado acima, ambos os exercícios, aeróbio e força, são capazes de promover alteração na razão AMP:ATP. Porém, diferentemente do exercício de força, o exercício aeróbio promove essa alteração , sem o aumento da expressão de fatores de crescimento intracelular como o MGF produzido no exercício de força (ATHERTON *et al.*, 2005).

O treinamento aeróbio aumenta a capacidade oxidativa do músculo esquelético, por promover a biogênese mitocondrial (HOLLOSZY e COYLE, 1984). Esse tipo de treinamento é associado ao aumento crônico de metabólitos e diminuição das reservas energéticas celulares. Porém, as vias de sinalização ligando esse “stress” à biogênese mitocondrial são pouco compreendidas.

Como 95% dos genes necessários para a biogênese mitocondrial se encontram no núcleo, um aspecto importante desse processo é o transporte desses precursores até a organela. A ativação aguda dessas quinases e coativadores da transcrição promovida pelo exercício aeróbio representa uma regulação crítica da biogênese mitocondrial, o que tem sido sugerido como uma importante condição para o processo de adaptação, após um período de TA (NORRBOM *et al.*, 2004).

Agudamente, durante o exercício, a alteração de mensageiros citosólicos (Ca^{2+} , AMP livre, P_i , creatina, H^+ , intermediários lipídicos) está associada à ativação de várias vias de sinalização e a um rápido aumento na captação e mobilização intracelular de glicose e ácidos graxos (WOJTASZEWSKI *et al.*, 2003).

Estudos *in vivo* têm demonstrado que a AMPK é ativada em músculo esquelético de roedores durante a corrida em esteira rolante e em humanos durante exercício em ciclo ergômetro de maneira dependente do tempo e intensidade do estímulo (WOJTASZEWSKI *et al.*, 2003) (FROSIG, JORGENSEN, HARDIE, RICHTER e WOJTASZEWSKI, 2004). A maioria dos estudos em humanos demonstra uma maior atividade da subunidade $\alpha 2$ comparado à $\alpha 1$ (JORGENSEN *et al.*, 2006).

Após cinco e 30 minutos de exercício realizado em ciclo ergômetro a $62,8 \pm 1,3\%$ $\text{VO}_{2\text{pico}}$ por humanos, a atividade da AMPK $\alpha 1$ não demonstrou alteração, contudo a atividade da APMK $\alpha 2$ aumentou duas vezes após cinco minutos e 3 vezes após 30 minutos de exercício. Outro dado importante é que a concentração de ATP não demonstrou diferença após 5 minutos em relação ao controle, porém, a razão AMP:ATP demonstrou diferença significativa quando comparada com o valor de repouso (STEPHENS, CHEN, CANNY, MICHELL, KEMP e MCCONELL, 2002). Essa evidência sugere que a AMPK pode ser ativada em humanos mesmo em exercícios de intensidade moderada.

O efeito crônico do exercício aeróbio na atividade e concentração da AMPK, também é um tópico interessante de discussão. FROSIG *et al.* (2004) demonstraram que três semanas de treinamento aeróbio realizado em ciclo ergômetro promoveu um aumento (37%) na atividade da citrato sintase (CS). A expressão total da AMPK das subunidades $\alpha 1$, $\beta 2$ e $\gamma 1$ aumentou em 41 ± 12 , 34 ± 9 e $26 \pm 9\%$, respectivamente, quando comparado ao pré-treino. A atividade da α AMPK (Thr^{172}) aumentou $74 \pm 10\%$ no músculo treinado. Vale ressaltar que nesse estudo, um critério de inclusão adotado para os voluntários foi o $\text{VO}_{2\text{max}} < 52 \text{ ml O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (FROSIG *et al.*, 2004).

Apesar do aumento agudo na atividade da AMPK desempenhar um papel chave na regulação do metabolismo e do nível energético celular, essa exposição crônica tem demonstrando uma função importante no processo adaptativo do músculo esquelético após o TA.

3.7 Treinamento concorrente e possíveis mecanismos intracelulares de interferência

Desde o clássico estudo de HICKSON, 1980 (HICKSON, 1980), a incompatibilidade das adaptações entre TA e TF realizados de maneira concomitante, tem sido objeto de estudo e discussão.

Parece óbvio pensar que alguma incompatibilidade existiria nesse modelo de treino, haja vista que a adaptação produzida por ambos de maneira isoladas são distintas. O TF não promove biogênese mitocondrial e aumenta a área de secção transversa das miofibrilas, o que dificulta a difusão de oxigênio, por outro lado, o TA na maioria das vezes, não promove aumento na área das miofibrilas e aumenta a densidade mitocondrial.

Desta maneira, parece que a possível interferência descrita nas adaptações associadas às variáveis de força, após o TF, não seria somente um simples problema de incompatibilidade. Ela envolveria a interação de eventos moleculares agudos e crônicos, quando exercícios de força e aeróbios são realizados repetidamente dentro da mesma unidade de treino.

É importante salientar que a maioria dos estudos sobre TC tem medido apenas o ponto final da adaptação (força máxima, consumo de oxigênio, hipertrofia muscular, etc.) e até o momento, é desconhecida a interação desses eventos moleculares e as adaptações induzidas pelo TC. A resposta crônica, assim como os mecanismos para a ocorrência da interferência após um protocolo de TC, pelo uso de técnicas da biologia molecular, ainda carece elucidação e é incipiente.

Alguns autores têm proposto dois mecanismos que regulariam essa interferência (NADER, 2006; COFFEY e HAWLEY, 2007); 1) o aumento no transiente de cálcio que limitaria um processo-chave da síntese protéica. 2) a alteração no estado energético da célula propiciado pelo treinamento das duas capacidades motoras seria um dos fatores desencadeantes da interferência.

Um dos possíveis mecanismos envolveria a fase de alongamento da proteína em formação no ribossomo modulada pelos fatores eucarióticos de alongamento (EEF) que representa um passo limitante da síntese protéica. Um componente chave nessa fase é o EEF2, que modula o deslocamento do ribossomo na fita de RNAm até

o códon de parada. O EEF2 é fosforilado e inativado pela EEF2 quinase (EEF2K). Essa quinase é regulada pela via da calmodulina e pela AMPK, que são quinases ativadas durante o exercício aeróbio. Isso sugere que a inibição do EEF2 pelo exercício aeróbio prejudicaria o processo de alongamento na tradução resultando numa menor síntese de proteínas.

O outro mecanismo, está associado à ativação da AMPK durante o TC modular negativamente a atividade da mTOR, uma vez que a somatória das duas atividades, demonstra um potencial maior para a ativação dessa quinase. De fato, quando o aumento de AMPK foi induzido por meio de agonista farmacológico (5-aminoimidazole-4-carboxamide- β -D-ribose - AICAR), a taxa de síntese de proteínas sofreu decréscimo de 55%. A fosforilação da 4E-BP1, que libera o eIF4E do complexo inativo 4E-BP1/eIF4E, foi reduzida e a p70^{S6K} também teve sua fosforilação diminuída no resíduo Thr³⁸⁹. Essas alterações na 4E-BP1 e na p70^{S6K} apontam que a atividade da mTOR foi reprimida devido ao aumento na expressão da AMPK. Nesse estudo, os autores também avaliaram a fosforilação da AKt no resíduo Ser⁴⁷³ e da mTOR no resíduo Ser²⁴⁴⁸, a diminuição observada nos ratos tratados com AICAR em ambas as proteínas foi de 40% em relação ao controle (BOLSTER *et al.*, 2002).

Outro estudo também demonstrou forte evidência da divergência nas respostas moleculares produzidas pelo exercício de força e aeróbio. Neste estudo, os autores simularam os estímulos dos exercícios por meio de eletro-estimulação de baixa intensidade (LFS) simulando o exercício aeróbio, que consistia em 10Hz durante 3h e de alta intensidade (HFS) simulando exercício de força a 100Hz com 60 estímulos de 3s. Após a LFS a fosforilação da AMPK e do PGC-1 α aumentou 2,02 \pm 0,11 e 1,30 \pm 0,04 (vezes), respectivamente. Em contraste, após a HFS a fosforilação da AMPK e do PGC-1 α foi reduzida. A síntese de proteínas aumentou significativamente após a HFS, de 0,23 \pm 0,1%.h⁻¹ para 1,24 \pm 0,09%.h⁻¹. Por outro lado, após 3h de LFS, não houve diferença na taxa de síntese protéica. Adicionalmente, essas alterações após o protocolo de HFS foram acompanhadas por aumento na fosforilação da AKt, do *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2) e da mTOR nos resíduos Ser⁴⁷³, Thr¹⁴⁶² e Ser²⁴⁴⁸, respectivamente, o que não ocorreu após o protocolo de LFS (ATHERTON *et al.*, 2005).

De forma interessante, o TSC2 poderia exercer um papel chave nessa possível inibição da atividade da mTOR controlada pela AMPK. Ele pode ser fosforilado e inativado pela AKT, como observado por ATHERTON et al. (2005). Porém, o TSC2 também é fosforilado e ativado pela AMPK nos resíduos Thr¹²²⁷ e Ser¹³⁴⁵ (INOKI, ZHU e GUAN, 2003). Essa fosforilação do TSC2 levaria a inativação do complexo ativo da mTOR (FIGURA1).

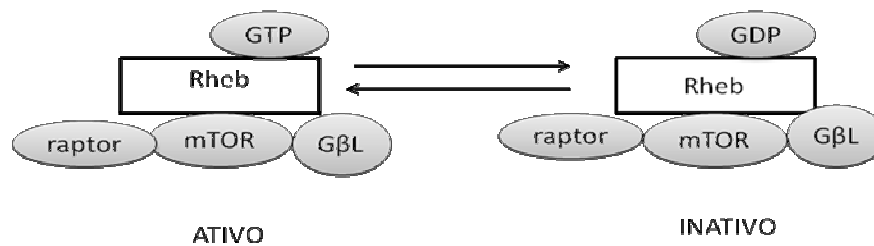


FIGURA 1 – Complexo ativo e inativo da mTOR.

Para a formação do complexo ativo da mTOR, a ligação da GTPase Rheb (ras homolog enriched in brain) é necessária. A Rheb se liga tanto na forma GDP quanto GTP. A forma GTP ativa o complexo enquanto GDP inibe a mTOR; além disso, essa atividade da Rheb GTPase é modulada pelo TSC2, e a inibição da mTOR exercida pela AMPK se daria através da fosforilação do TSC2 modulando negativamente a Rheb (MATSAKAS e PATEL, 2009).

Em humanos, alguns estudos estão começando a investigar o efeito agudo da combinação de exercícios aeróbios e de força em diferentes ordens (COFFEY, JEMIOLO, EDGE, GARNHAM, TRAPPE e HAWLEY, 2009a; COFFEY, PILEGAARD, GARNHAM, O'BRIEN e HAWLEY, 2009b). Esses estudos demonstraram informações interessantes, como a maior atividade da AMPK quando o exercício aeróbio foi realizado subsequentemente ao de força, associado à menor atividade da mTOR (COFFEY *et al.*, 2009b). Porém, eles foram realizados em cross-over design e não havia grupos isolados de exercícios aeróbios e de força, o que limita um pouco as observações.

Uma vez que evidências demonstram ativação da AMPK durante o exercício aeróbio (CLARK *et al.*, 2004; FROSIG *et al.*, 2004) e durante o exercício de força (DREYER *et al.*, 2006), existe também, uma grande possibilidade de sua ativação no

treinamento concorrente. Sendo assim, a somatória de dois protocolos poderia produzir um efeito na AMPK sobrepondo-se à ativação da mTOR e seus alvos, o que em tese, prejudicaria a hipertrofia muscular induzida pelo TF.

Porém, apesar das evidências indicarem para esse possível efeito do TC na AMPK, é importante destacar, que até o presente momento, é desconhecido o efeito crônico do TC na fosforilação da mTOR, da p70 e da AMPK.

4 MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1 Amostra

A amostra foi constituída por 37 indivíduos fisicamente ativos, com idade média de 23,7 ($\pm 5,5$), estudantes do curso de Educação Física e que não estavam realizando treinamento de força ou de resistência aeróbia, para membros inferiores, por no mínimo seis meses. Indivíduos com histórico recente de lesão na articulação do joelho ou qualquer outro problema neuromuscular e/ou cardiovascular não foram selecionados para participar do estudo.

Esses indivíduos foram divididos em três grupos submetidos a protocolos distintos de treinamento (TA, TF e TC) e a um quarto grupo designado como controle (C). A alocação dos sujeitos aos grupos experimentais foi realizada de forma balanceada e aleatória, para garantir condições iniciais similares entre os grupos. Porém, a mesma só foi realizada após o pré-teste, seguindo o procedimento descrito a seguir. A partir dos valores obtidos de área de secção transversa na porção medial da perna direita através de ressonância magnética e dos valores de uma repetição máxima no leg press (1-RM), os sujeitos foram classificados em quartis. Então, os indivíduos de cada quartil foram aleatoriamente divididos entre os grupos. Uma ANOVA one-way foi utilizada para verificar a ausência de diferenças significantes entre os grupos no pré-teste tanto para 1RM no leg press quanto para a AST ($p > 0,05$). Os dados antropométricos, a idade, o N, assim como os valores dos testes iniciais de cada grupo se encontram na TABELA 1.

TABELA 1 – Características iniciais dos sujeitos (Média ± DP).

	C	TA	TF	TC
N	7	8	11	11
Idade	22,1 (±2,4)	24,0 (±7,5)	25,9 (±6,4)	22,5 (±3,9)
Estatura (cm)	176,7 (±5,4)	175,0 (±8,1)	171,9 (±4,1)	176,0 (±8,1)
Peso Corporal (kg)	82,2 (±25,0)	71,5 (±7,7)	73,5 (±16,1)	72,9(±9,8)
1RM (kg)	261,2 (±56,1)	255,4 (±56,4)	270,3 (±45,5)	268,4 (±47,6)
AST PD (mm ²)	8347,3(±1643,0)	8390,3(±817,5)	8332,4(±893,3)	8340,8(±1000,0)
VO _{2max} (ml.kg.min ⁻¹)	46,9 (±7,1)	50,9 (±4,4)	49,0 (±5,6)	51,2 (±7,0)
vVO _{2max} (km.h ⁻¹)	16,9 (±1,8)	18,2 (±1,1)	17,1 (±2,0)	18,7 (±1,4)

(C) grupo controle,(TA) treino aeróbio, (TF) treino de força, (TC) treino concorrente (TC)

Todos foram informados dos possíveis riscos, desconfortos e benefícios do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes de iniciarem a participação. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Escola de Educação Física da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa n. 2007/26).

4.2 Procedimentos e testes

4.2.1 Biópsia Muscular

Para obtenção das amostras para determinação da expressão gênica de AMPK α 1, Akt, mTOR e S6K1 e de expressão proteica de AMPK α^{thr172} , AKT $^{\text{ser473}}$, p70 $^{\text{thr389}}$, foram realizadas biópsias na porção medial do músculo vasto lateral da perna dominante do voluntário. Antes da extração do tecido, a área foi tricotomizada e limpa com antisséptico. Uma pequena área, sobre a região selecionada, foi anestesiada com xilocaína à 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 da amostra de tecido muscular (~70 a 100 mg). Após a retirada do tecido, a incisão foi fechada e coberta por bandagens.

Este procedimento foi realizado em duas oportunidades. A primeira foi realizada num período de aproximadamente 1 semana antes do início do protocolo de treinamento. Já a segunda amostra foi obtida ~36 horas após a última sessão de treinamento, proximalmente em relação à cicatriz da primeira biópsia.

As amostras foram limpas (retirada de sangue e excesso de tecido conectivo) e divididas em alíquotas para análises posteriores e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e conservada à -80°C até o momento das análises.

4.2.2 Monitoração do padrão alimentar dos sujeitos

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

4.2.3 Análise Molecular (expressão gênica)

4.2.3.1 Extração do RNA

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

4.2.3.2 RT-PCR

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

Uma pequena alíquota (1 μ g) do RNA total foi submetida à técnica RT-PCR. Para isto, foi empregada a enzima transcriptase reversa SuperScript[®] RNase H⁻ (Gibco BRL Products) em 20 μ l de reação contendo: 4 μ l do tampão fornecido pelo fabricante, 0,8 mM dNTPs, 1 mM MgCl₂, 0,02 μ g/ μ l oligo-desoxitimidina *primer* (iniciador), 4 mM DTT. A reação foi realizada em termociclador de DNA (Perkin Elmer GeneAMP PCR System 2400, Norwalk CT).

Para a amplificação do *amplicon* de interesse foram utilizadas sequências iniciadoras (*primers*) já descritas na literatura e previamente padronizadas. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1.0% corado com brometo de etídeo. O gel foi fotografado pelo sistema de aquisição de imagem *Kodak Digital Science™ Electrophoresis Documentation and Analyses System 120*. E posteriormente, a análise densitométrica das bandas foi realizada no *Kodak Digital Science™ 1D Image Analyses Software*.

4.2.3.3. Método de Detecção da Expressão Gênica em Tempo Real

Após a obtenção do cDNA, as diferentes frações das RTs foram utilizadas na amplificação em cadeia por Polimerase (PCR) em um equipamento que monitora a amplificação em tempo real (PCR *real-time*, Applied Biosystems- GeneAmp 5700).

Neste equipamento é determinado o início da fase de amplificação exponencial (CT, *cycle threshold*) que é utilizado como dado para a análise da expressão gênica dos genes anteriormente citados.

Os iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação dos genes de interesse (AMPK- α 1, mTOR, AKt, S6K1) foram desenhados com o software Primer Express. As sequências dos indicadores para os respectivos genes se encontram na TABELA 2.

TABELA 2 – Sequências dos iniciadores (primers) utilizadas para a amplificação dos genes de interesse.

Gene	Sense	Antisense
AMPK- α 1	3'- TGCGTGTACGAAGGAAGAATCC-5'	3'- TGTGACTTCCAGGTCTTGGAGTT-5'
AKt	3'- AGGGAGAGCAAACGGGGCCA-5'	3'- GGCCTGGCCACAGCCTCTGA-5'
mTOR	3'- ACGCAAGTTGAGCTGCTCATC-5'	3'- AAGGGCACCCAGCCAATATAGC-5'
S6K1	3'- TGCTTCGGCCAGCACAGCAA-5'	3'- GGCCAGAGTTTCGGCTGTTCG-5'

4.3 Análise da expressão de proteínas

As amostras coletadas foram homogeneizadas através de homogeneizador Polytron (PT-K Brinkman Instruments) em volumes (9X seu peso) de tampão de lise contendo 20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 10mM EGTA, sacarose 0.25mM, 0,1% Triton-X 100 e coquetel anti-protease (P2714 Sigma 1:100) , pH 7.4. O processo de homogeneização foi realizado 3X durante quinze segundos com intervalos de 20 segundos entre as homogeneizações. Todo o processo foi realizado a 4 °C. O homogenato foi centrifugado a 5000 rpm por dez minutos a 4 °C. A fração sobrenadante foi transferida para tubos novos. A concentração de proteína das amostras foi analisada através do método de Bradford (Biorad-EUA). As aliquotas dos homogenatos foram armazenadas em freezer –80°C.

4.3.1 Western blotting

As amostras foram solubilizadas em tampão contendo 62.5 mM Tris-HCl, 2% p/v SDS, 10% glicerol, 50 mM DTT e 0.01% p/v azul de bromofenol, pH 6.8 e em seguida as proteínas presente nas amostras foram separadas eletroforicamente em géis de SDS-poliacrilamida (10%). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência contendo 25 mM Tris base, 0.2 M glicine e 20% metanol (pH 8.5). Após a transferência as membranas foram lavadas duas vezes com solução tampão contendo 50 mM Tris.HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl e 0,01% tween 20 (TBS-T). Em seguida, incubadas com bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos através de uma mistura contendo TBS-T e leite desnatado (5%) por 60

minutos em temperatura ambiente (20-25°C) com agitação constante. As membranas foram posteriormente incubadas com os anticorpos primários anti-Akt, anti-phospho Akt, anti-AMPK, anti-phospho AMPK α , anti-p70 e anti-phospho p70 diluídos na solução bloqueadora a 4°C por 12 horas com agitação constante. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas novamente foram lavadas várias vezes em solução de TBS-T. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários em solução bloqueadora por 2 horas em temperatura ambiente com agitação constante. Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas 3x em solução TBS-T. Por fim, a imuno-deteção foi realizada através do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). Para medir a intensidade das bandas nas auto-radiografias, as figuras escaneadas foram analisadas utilizando o programa de análise de densitometria óptica Image J, fornecido gratuitamente pela NIH (USA) via internet.

Como anticorpos primários foram utilizados os seguintes anticorpos:

- A expressão total da quinase Akt foi avaliada usando o anticorpo anti-Akt (Cell Signaling Technology). A titulação recomendada pelo fabricante para Western Blot é de 1:1000.
- A expressão total da quinase AMPK foi avaliada usando o anticorpo anti-AMPK α 2 (Cell Signaling Technology). A titulação recomendada pelo fabricante para Western Blot é de 1:1000.
- A expressão total da quinase p70^{S6K1} foi avaliada usando o anticorpo anti-mTOR (Cell Signaling Technology). A titulação recomendada pelo fabricante para Western Blot é de 1:1000.
- A fosforilação da quinase Akt no resíduo Ser-473, foi avaliada usando o anticorpo anti-AMPK fosforilado (Cell Signaling Technology). A titulação recomendada pelo fabricante para Western Blot é de 1:1000.
- A fosforilação da quinase AMPK no resíduo Thr-172, foi avaliada usando o anticorpo anti-AMPK fosforilado (Cell Signaling Technology). A titulação recomendada pelo fabricante para Western Blot é de 1:2000.

- A fosforilação da quinase p70^{S6K1}, no resíduo Thr-389 (sítio diretamente fosforilado in vitro pela mTOR, foi avaliada usando o anticorpo anti- p70^{S6K1} fosforilado (Cell Signaling Technology). A titulação recomendada pelo fabricante para Western Blot é de 1:1000.

4.4 Medida da área de secção transversa muscular (ASTM)

A área de secção transversa muscular (ASTM) da coxa de ambas as pernas foi determinada através de ressonância magnética por imagem (RMI). Os sujeitos foram instruídos a deitar no aparelho de ressonância magnética na posição supina com as pernas estendidas. Uma visualização inicial dos membros inferiores do sujeito foi efetuada para determinar a distância entre o trocanter maior do fêmur e o epicôndilo lateral da tíbia em um ângulo de 0°, que serve como referência para a medida do corte de ASTM. A espessura do corte do escaneamento para a medida da ASTM dos sujeitos foi feito com 0,8 cm realizados na porção medial de ambas as coxas. A extensão do mapeamento foi marcada a cada 50 mm com um tempo de exposição de 3 segundos para aumentar a qualidade de resolução. A imagem e a escala associada foram então impressas sobre um padrão de transparência de imagem e transferidas para um computador. O corte foi segmentado em quatro componentes (músculo esquelético, tecido adiposo subcutâneo, osso e tecido residual) e então a ASTM foi tracejada por um pesquisador treinado (FIGURA 2). A ASTM do músculo quadríceps femoral foi determinada pela subtração da área do osso e da gordura subcutânea usando planimetria computadorizada através de um software de análise de imagens (Advantage Workstation 4.3, GE Healthcare, Milwaukee, USA).

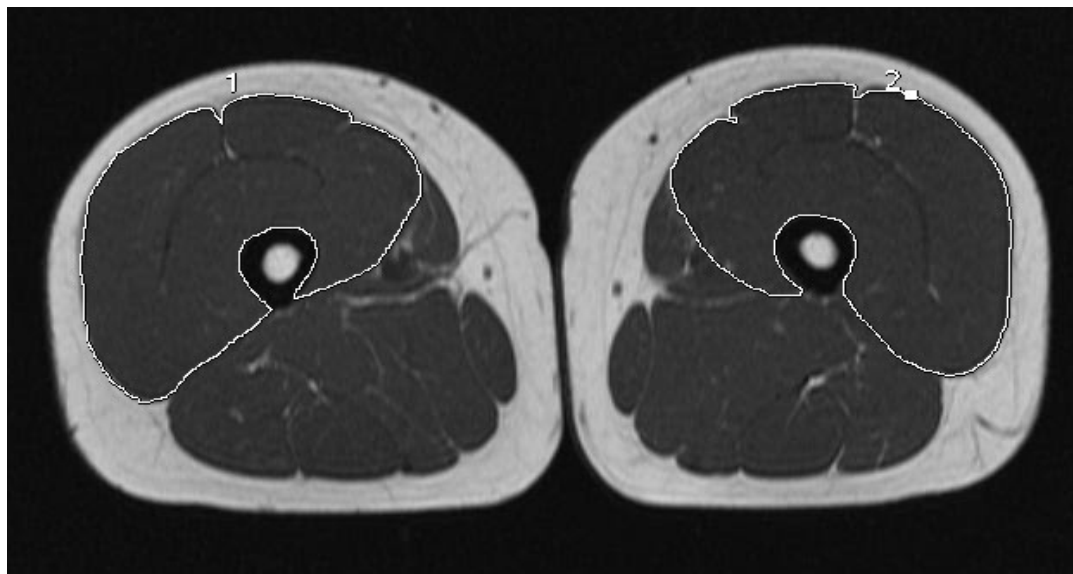


FIGURA 2 - Visualização da demarcação do perímetro do músculo quadríceps femural.

4.5 Teste de potência aeróbia

Para a avaliação da potência aeróbia foi utilizado um teste progressivo até a exaustão em uma esteira rolante (Inbrasport Super ATL, Inbrasport, Brasil). A velocidade inicial foi de seis $\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$ por três minutos, com incrementos de $1,2 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$ a cada minuto, até exaustão voluntária dos sujeitos. O consumo de oxigênio foi medido continuamente (*Quark b²*, *Cosmed*, Itália) durante todo o teste. O $\text{VO}_{2\text{max}}$ foi considerado como a média dos três maiores valores consecutivos obtidos durante o teste. A velocidade de corrida na potência aeróbia máxima ($\text{vVO}_{2\text{max}}$) foi adotada como valor referência para prescrição do treinamento.

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 NV*[□], *Electro Oy*, Finlândia).

4.6 Teste de força dinâmica máxima.

A força dinâmica máxima foi avaliada através de teste de uma repetição máxima (1RM) no exercício “leg-press 45°” (*Nakagyn*[□], São Paulo, Brasil). A

realização deste teste seguiu as orientações da “American Society of Exercise Physiologists” (ASEP), para testes de 1 RM (BROWN e WEIR, 2001). Antes do teste os sujeitos realizaram um aquecimento geral de cinco minutos de duração à $9 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$ na esteira ergométrica. Após o aquecimento geral, os sujeitos realizaram um aquecimento específico consistindo de duas séries de cinco e três repetições com cargas ao redor de 50% e 70% da carga estimada para 1RM.

Após o aquecimento específico, um intervalo de três minutos foi dado antes dos sujeitos serem submetidos ao teste. Este teste consistiu na obtenção da máxima quantidade de peso que pode ser levantada em um ciclo completo (flexão-extensão) do exercício. A carga inicial para o teste máximo foi estimada durante as sessões de familiarização, e a partir disso, o peso levantado é aumentado até que o sujeito não consiga completar uma repetição com aquela carga. O número total de tentativas para achar o valor de 1RM não foi maior que cinco. Entre as tentativas houve um intervalo de três minutos. Durante a execução do movimento os avaliadores forneciam encorajamento verbal.

4.7 Protocolo de treinamento

O protocolo do treinamento de força consistiu de três exercícios, três séries de 12RMs para membros inferiores (Leg-press 45° , cadeira extensora, mesa flexora), com intervalo entre as séries de 90 segundos e entre os exercícios de dois minutos, da primeira à segunda semana de treinamento. Da terceira a quarta semana os sujeitos realizaram quatro séries de 8-10RMs, na quinta semana cinco séries de 8RMs, na sexta semana cinco séries de 6RMs, na sétima três séries de 10RMs e na oitava e última três séries de 12RMs, a partir da quinta semana o intervalo entre séries foi aumentado para dois minutos e mantido até o final do protocolo. A carga utilizada pelos sujeitos foi ajustada progressivamente durante toda duração do estudo, esta intensidade foi escolhida por ser frequentemente usada em protocolos de treinamento que visam à hipertrofia (American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults, 2009) TABELA 3.

TABELA 3 - Progressão do treinamento de força durante as oito semanas de treinamento.

Semanas	1 e 2	3 e 4	5 e 6	7 e 8
Repetições	12 RM	8-10 RM	6-8 RM	10-12 RM
Séries	3	4	5	3
Sessões	1-4	5-8	9-12	13-16
Volume total	36	32-40	30-40	30-36
Intervalos	90 segundos	2 minutos	2 minutos	2 minutos

O protocolo de treinamento aeróbio consistiu de corrida intermitente na esteira. Durante as duas primeiras semanas de treinamento, os sujeitos realizaram 20 tiros de um minuto, com recuperação passiva de mesma duração, em uma intensidade equivalente a 80% da vVO_{2max} . Nas semanas três e quatro os sujeitos realizaram 20 tiros de um minuto, com recuperação passiva de um minuto a uma intensidade equivalente a 85% da vVO_{2max} . Nas semanas cinco e seis eles realizaram o mesmo protocolo na intensidade equivalente a 90-95% da vVO_{2max} . Já nas duas últimas semanas os indivíduos realizaram 15 tiros de um minuto, com a um minuto e meio de recuperação passiva, a uma intensidade equivalente a 100% da vVO_{2max} , TABELA 4.

TABELA 4 - Progressão do treinamento aeróbio durante as oito semanas de treinamento.

Semanas	1 e 2	3 e 4	5 e 6	7 e 8
Intensidade	80% vVO _{2max}	85 -90%vVO _{2max}	95% vVO _{2max}	95-100% vVO _{2max}
Tiros	20	20	20	15
Tempo Tiro	1 minuto	1 minuto	1 minuto	1 minuto
Sessões	1-4	5-8	9-12	13-16
Tempo	45 segundos	60 segundos	60 segundos	90 segundos

O grupo de treinamento concorrente (TC) realizou as sessões de treinamento para ambas as capacidades motoras, numa única sessão, com intervalo de 5 minutos entre elas. A ordem inicial das sessões foi alternada durante todo o protocolo para evitar possível efeito de ordem. A quantidade de peso e distância percorrida foi monitorada semanalmente entre os grupos TA, TF e TC para evitar distorções no volume de treinamento.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Técnicas de inspeção visual e o teste de Shapiro-Wilk atestaram a normalidade dos dados. Então, foi utilizado um modelo misto tendo grupo (quatro níveis) e tempo (dois níveis) como fatores fixos e os sujeitos como fator aleatório para cada variável dependente. Na ocorrência de razão F significativa, foi utilizado um ajustamento de Tukey para as múltiplas comparações. A análise da expressão de proteínas relacionadas à hipertrofia muscular foi diferenciada devido à restrições temporais. No pré-teste, as proteínas de apenas três sujeitos de cada grupo foram quantificadas. Verificada a ausência de diferenças entre elas, para todas as proteínas, comparamos apenas os valores pós treinamento entre os grupos para cada uma das proteínas. Para isso usamos ANOVAs one-way e teste de *post-hoc* de Tukey. O valor de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Ao final do treinamento foi observado um volume de treino similar entre os grupos (séries x repetições (leg-press) + séries x repetições (Cadeira extensora) para os grupos TF e TC e distância percorrida para os grupos TC e TA. Para os grupos TF e TC foram observados volumes de 174.528,6 ($\pm 24.334,8$) Kg e 168.973,4 ($\pm 30.543,7$) kg respectivamente ($p > 0,05$). As distâncias percorridas em metros para os grupos TA e TC foram de 81.922 (± 4.138) e 80.197 (± 7.757) ($p > 0,05$), respectivamente.

6.1 Força dinâmica máxima (1RM)

A força máxima foi medida antes e após o período de treinamento (TABELA 5). Os grupos TF e TC apresentaram aumentos significantes da força dinâmica máxima em relação aos valores pré teste ($p < 0.0001$). Os valores pós-treinamento também foram significantemente maiores do que os do grupo controle no mesmo instante ($p < 0,0001$) para os mesmos grupos.

TABELA 5 - Força máxima (1RM-kg) no exercício leg-press antes e após oito semanas de treinamento.

	Leg Press 1 RM (kg)	
	Pré-Teste	Pós-Teste
C	261,2 ($\pm 56,1$)	262,8 ($\pm 60,6$)
TA	255,4 ($\pm 56,4$)	263,8 ($\pm 51,5$)
TF	270,3 ($\pm 45,5$)	320,3 ($\pm 57,0$)* !
TC	268,4 ($\pm 47,6$)	315,7 ($\pm 63,5$)*!

Média \pm DP para os grupos controle (C), treinamento aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC). *- Valor pós-teste significantemente maior que no pré-teste ($p < 0,001$). !- Valores dos grupos TF e TC significantemente maiores do que os do grupo C no pós teste ($p < 0,001$).

6.2 Área de Secção transversa Muscular

A hipertrofia muscular obtida pela área de secção transversa foi medida em dois momentos ao longo do estudo. Novamente, foram observadas diferenças significantes ($p < 0,001$) apenas para os grupos TF e TC em relação ao pré-teste e em relação ao grupo controle no pós teste ($p < 0,001$) (TABELA 6 e 7).

TABELA 6 - Área de secção transversa muscular da perna direita (PD) antes e após oito semanas de treinamento.

	ASTM PD (mm ²)	
	Pré-Teste (PD)	Pós-Teste (PD)
C	8347,3(±1643,1)	8556,3 (±1579,7)
TA	8390,3(±817,5)	8658,2 (±922,3)
TF	8332,4(±893,3)	8849,5 (893,3) ^{*!}
TC	8340,8(±1000,0)	8996,8 (±919,5) ^{*!}

Média ± DP para os grupos controle (C), treinamento aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC). *- Valor pós-teste significativamente maior que no pré-teste ($p < 0,001$). !- Valores dos grupos TF e TC significativamente maiores do que os do grupo C no pós teste ($p < 0,001$).

TABELA 7 - Área de secção transversa muscular da perna direita (PE) antes e após oito semanas de treinamento

	ASTM PE (mm ²)	
	Pré-Teste (PE)	Pós-Teste (PE)
C	8332,7(±1511,6)	8508,3 (±1467,4)
TA	8483,5(±920,9)	8756,1 (±1001,6)
TF	8215,4(±898,8)	8668,0 (952,4) ^{*†}
TC	8261,4(±1002,0)	8882,7 (±868,4) ^{*†}

Média ± DP para os grupos controle (C), treinamento aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC). *- Valor pós-teste significativamente maior que no pré-teste ($p < 0,001$). !- Valores dos grupos TF e TC significativamente maiores do que os do grupo C no pós teste ($p < 0,001$).

6.3 Consumo máximo de oxigênio e velocidade máxima

Os dados de consumo máximo de oxigênio, relativo e absoluto, e de vVO_{2max} podem ser visualizados nas TABELAS 8, 9 e 10. Não houve alterações significantes para nenhum dos grupos, nessas variáveis ($p > 0,05$). Contudo, os grupos TA e TC demonstraram uma alteração não significativa para o consumo relativo de 2,7% e 5,0% e para consumo absoluto de 6,2% e 6,5%, respectivamente.

TABELA 8 - Consumo máximo de oxigênio relativo antes e após oito semanas de treinamento para os grupos controle (C).

	VO _{2max} (ml•Kg•min ⁻¹)	
	Pré-Teste	Pós-Teste
C	46,9 (±7,1)	45,7 (±10,7)
TA	50,9 (±4,4)	52,3 (±4,4)
TF	49,0 (±5,6)	48,4 (±8,1)
TC	51,2 (±7,0)	53,8 (±8,7)

Média ± DP para os grupos controle (C), treinamento aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC).

TABELA 9 - Consumo máximo de oxigênio absoluto antes e após oito semanas de treinamento.

	VO_{2max} ($ml \cdot min^{-1}$)	
	Pré-Teste	Pós-Teste
C	3662,4 ($\pm 434,6$)	3563,9 ($\pm 634,8$)
TA	3523,2 ($\pm 328,1$)	3744,5 ($\pm 433,3$)
TF	3488,7 ($\pm 399,3$)	3492,5 ($\pm 626,6$)
TC	3629,7 ($\pm 611,2$)	3866,9 ($\pm 554,1$)

Média \pm DP para os grupos controle (C), treinamento aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC).

TABELA 10 - Velocidade de corrida na potência aeróbia máxima (vVO_{2max}) antes e após oito semanas de treinamento.

	vVO_{2max} ($Km \cdot h^{-1}$)	
	Pré-Teste	Pós-Teste
C	16,9 ($\pm 1,8$)	16,6 ($\pm 2,0$)
TA	18,2 ($\pm 1,1$)	18,9 ($\pm 0,8$)
TF	17,1 ($\pm 2,0$)	17,5 ($\pm 1,8$)
TC	18,7 ($\pm 1,4$)	18,9 ($\pm 1,3$)

Média \pm DP para os grupos controle (C), treinamento aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC).

6.4 Expressão gênica

Os dados de expressão gênica podem ser visualizados na FIGURA 3. As análises de expressão gênica demonstraram alterações significantes na expressão de mTOR e de S6K1. O grupo TF teve um aumento de 1,01 ($\pm 0,10$) U.A para 1,44 ($\pm 0,17$) U.A no gene da mTOR em relação ao pré-teste e em relação ao grupo C ($p < 0,05$). A expressão de S6k1 diminuiu de 1,01 ($\pm 0,15$) U.A para 0,536 ($\pm 0,25$) U.A ($p < 0,001$) somente no grupo TC em relação ao pré-teste e ao grupo controle no pós-teste. Não foram detectadas diferenças significantes nas expressões de AKt e AMPK.

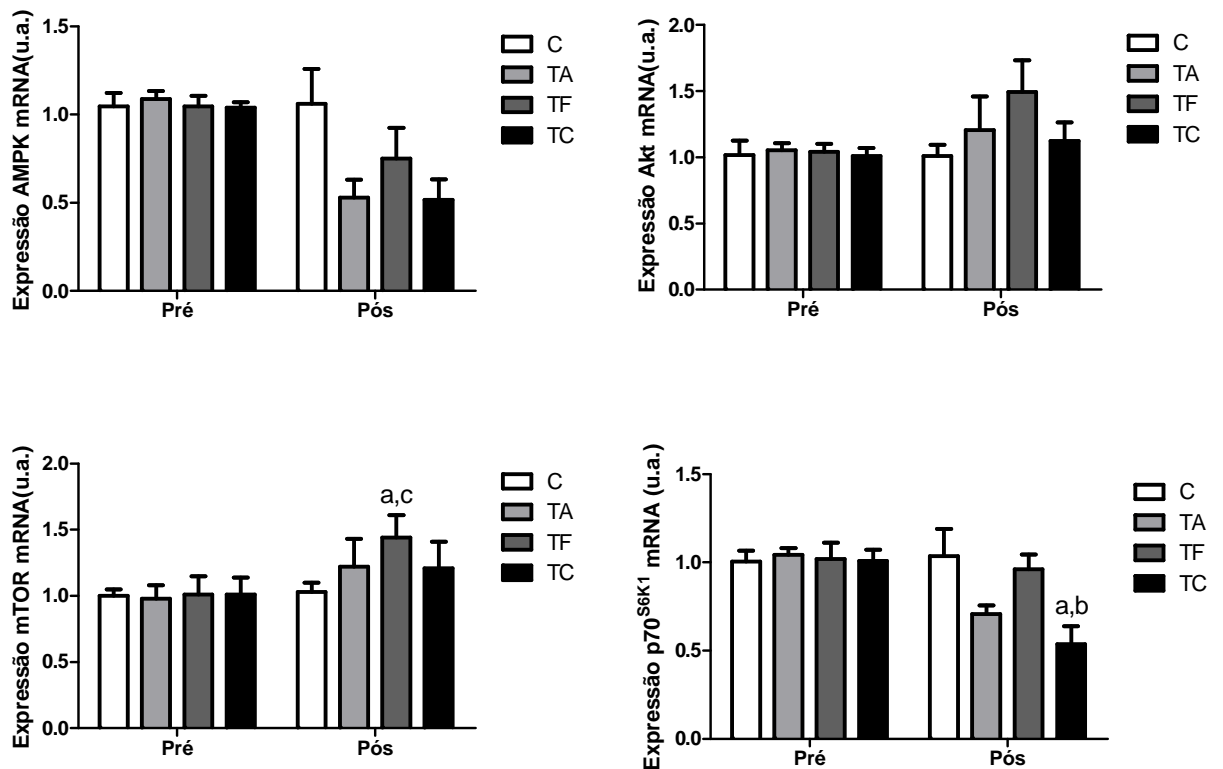


FIGURA 3- Dados de expressão gênica para AMPK, Akt, mTOR e p70^{S6K1} (u.a) antes e após oito semanas de treinamento para os grupos controle (C), treinamento aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC) (Média±DP). a – Diferença significativa em relação ao pré-teste ($p<0,001$). b - Valor do grupo TC significativamente menor do que os dos grupos C e TF no pós teste ($p<0,001$). c - Valor do grupo TF significativamente maior do que o do grupo C no pós teste ($p<0,001$).

6.5 Expressão protéica

Os dados de expressão protéica podem ser visualizados nas FIGURAS 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Não houve diferenças significantes para a expressão total e fosforilada no resíduo treonina 172 da proteína AMPK α (FIGURA 4). Contudo o TA apresentou uma forte tendência de aumento na p-AMPK em relação ao grupo C ($p=0,056$) (FIGURA 5).

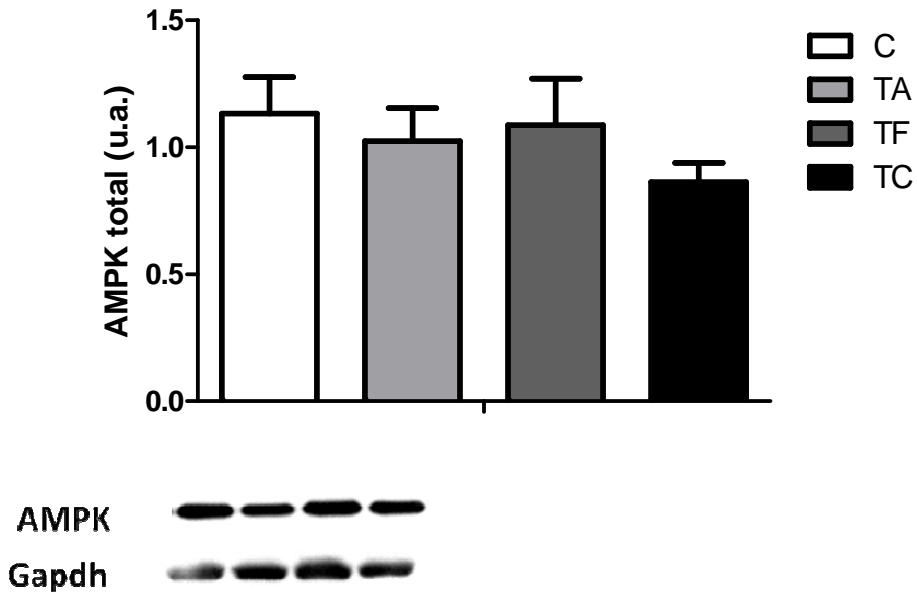


FIGURA 4 – Quantificação da proteína total AMPK (u.a.) para os grupos controle (C), treinamento de aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC) (Média±DP).

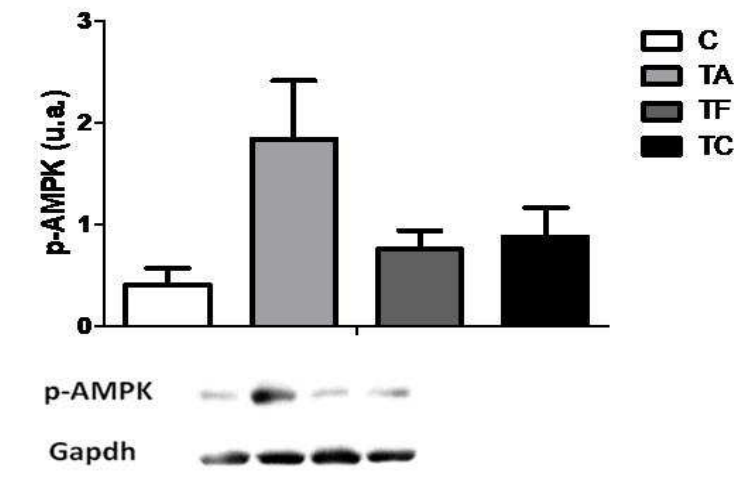


FIGURA 5 – Quantificação da proteína p-AMPK no resíduo treonina 172(AMPK fosforilada) para os grupos controle (C), treinamento de aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC) (Média±DP).

Não foram detectadas diferenças significantes para a expressão total da proteína AKt em nenhum dos grupos (FIGURA 6). A fosforilação da proteína AKt no resíduo serina 473, demonstrou alteração somente no grupo TF em relação grupo C e TA ($p < 0,05$) (FIGURA 7).

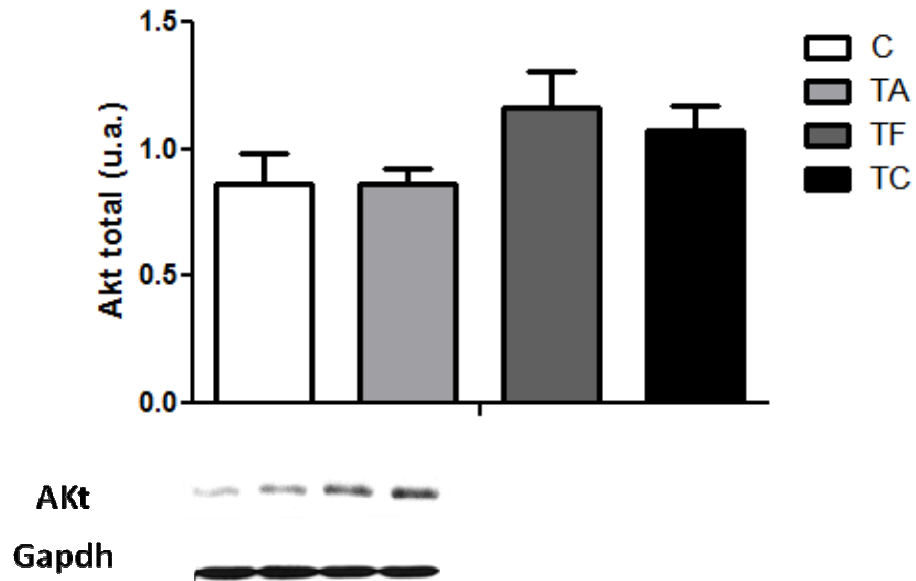


FIGURA 6 – Quantificação da proteína total AKt para os grupos controle (C), treinamento de aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC) (Média±DP).

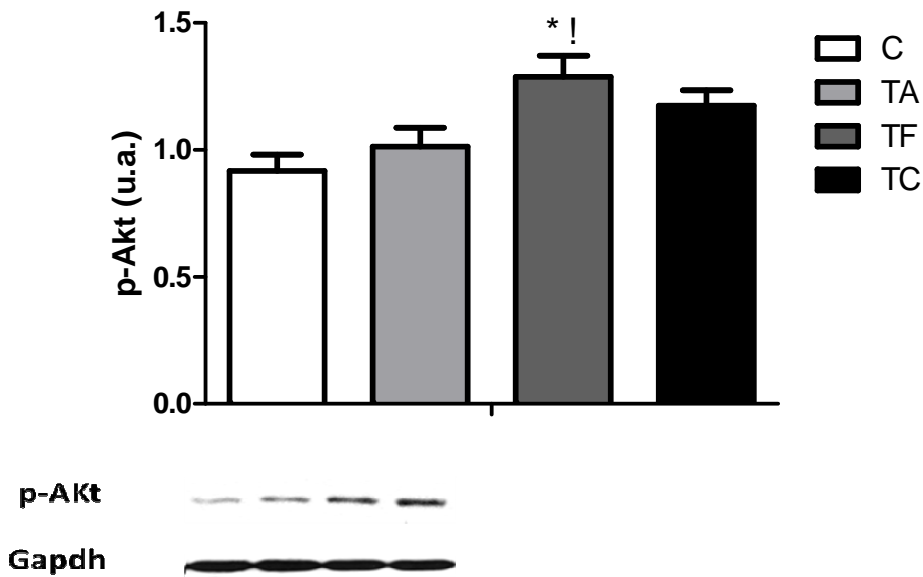


FIGURA 7 – Quantificação da proteína p.Akt no resíduo serina 473 (AKt fosforilada) para os grupos controle (C), treinamento de aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC) (Média±DP). * Valores do grupo TF significativamente maiores que o grupo C ($p<0,05$). ! Valores do grupo TF significativamente maiores que o grupo TA ($p<0,05$).

Foi observada alteração significativa na expressão total da proteína p70 somente no grupo TC em relação ao C ($p<0,05$) (FIGURA 8). A fosforilação da proteína p70 no resíduo treonina 389 demonstrou alteração significativa somente no grupo TF em relação ao controle e ao TA ($p<0,05$) (FIGURA 9).

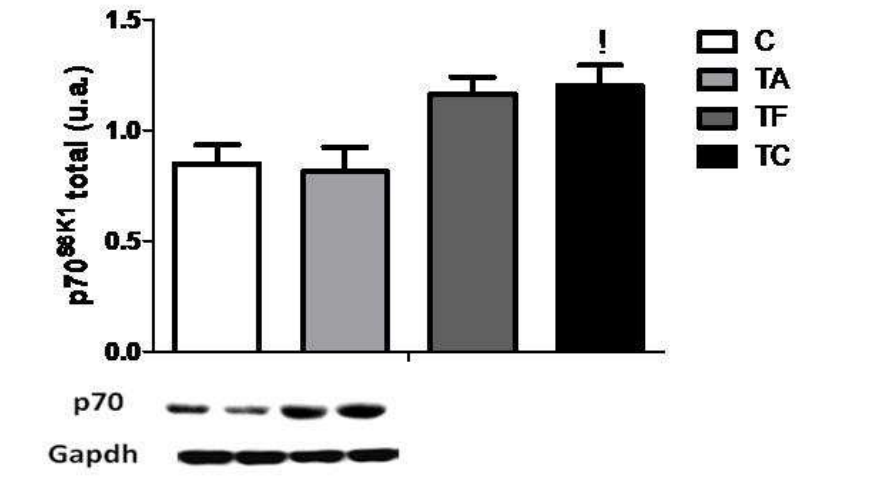


FIGURA 8 – Quantificação da proteína total p70 para os grupos controle (C), treinamento de aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC) (Média±DP). ! Valores do grupo TC significativamente maiores que o grupo TA ($p<0,05$).

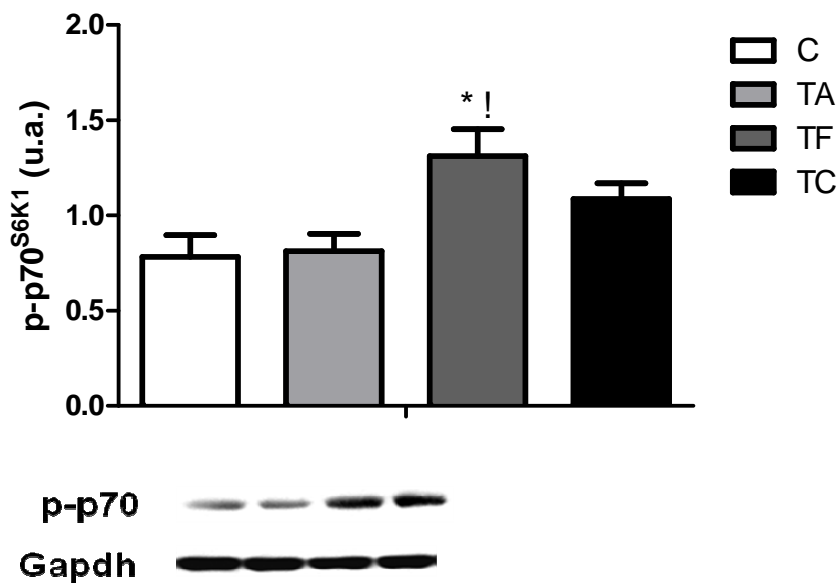


FIGURA 9 – Quantificação da proteína p-p70^{S6K1} no resíduo treonina 389 (p70 fosforilada) para os grupos controle (C), treinamento de aeróbio (TA), treinamento de força (TF) e treinamento concorrente (TC) (Média±DP). * Valores do grupo TF significativamente maiores que o grupo C ($p<0,05$). ! Valores do grupo TF significativamente maiores que o grupo TA ($p<0,05$).

7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo comparar os efeitos de um modelo de treinamento aeróbio, força e concorrente no consumo máximo de oxigênio, na força máxima e na área de secção transversa da musculatura anterior da coxa e em alguns genes e proteínas envolvidas no processo de hipertrofia muscular e biogênese mitocondrial. Além disso, verificar se possíveis alterações na expressão gênica e protéica são associadas à resposta hipertrófica e ao desempenho funcional.

Mesmo em estudos recentes, esses testes funcionais têm sido um dos principais focos de investigação nos protocolos de TC, pois a maioria dos estudos tem se preocupado apenas com o final do processo adaptativo (i.e força muscular e consumo máximo de oxigênio) (GERGLEY, 2009). Dificultando assim, o entendimento do mecanismo responsável pelo efeito de interferência. O principal achado do nosso estudo foi o ganho similar em força motora e hipertrofia muscular nos grupos TF e TC, apesar de algumas diferenças na expressão gênica e protéica.

7.1 Consumo máximo de oxigênio

O VO_{2MAX} é definido como a maior taxa na qual o oxigênio pode ser utilizado pelo corpo durante o exercício intenso. É uma das principais variáveis no campo da fisiologia do exercício e, frequentemente, usada como indicador do nível de aptidão cardiovascular de um indivíduo. Após oito semanas de treinamento, não foram detectadas diferenças significantes no consumo máximo de oxigênio (VO_{2MAX}) entre os grupos. As alterações registradas -2,5%, 2,7%, -1,2% e 5,0% no consumo relativo e -2,6%, 6,2%, 0,1% e 6,5% no consumo absoluto para os grupos C, TA, TF e TC respectivamente, não alcançaram nível de significância.

A exposição prolongada e repetida ao TA pode causar alterações estruturais e funcionais no sistema cardiovascular que promovem o aumento no VO_{2MAX} . Assim como no TF, a magnitude dessas alterações depende do modelo de treinamento aplicado e também, do nível inicial de treinamento dos indivíduos (WENGER e BELL, 1986).

McCARTHY et al. (1995) verificaram aumentos significantes no VO_{2MAX} relativo de 9%, 18% e 19% para os grupos TF, TA e TC respectivamente. Contudo, a aptidão aeróbia dessa amostra foi considerada baixa pelos próprios pesquisadores ($39 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). No presente estudo a média do VO_{2MAX} dos grupos TF, TA e TC no pré-teste foi $50,3 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Por outro lado, KRAEMER et al. (1995) verificaram aumentos significantes no VO_{2MAX} em indivíduos das forças armadas americanas após 12 semanas de treinamento. Como as análises eram feitas a cada quatro semanas, na oitava semana os grupos TF, TA e TC, da mesma forma que no presente estudo, não demonstravam diferenças significantes em relação ao pré treino (KRAEMER *et al.*, 1995). O nível inicial dos voluntários de KRAEMER et al. (1995) era $58,8 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, curiosamente na oitava semana esse valor sofreu uma redução ($56,9 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) e alcanço significância na 12ª semana ($63,4 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

Outros estudos também têm verificado aumentos na potência aeróbia máxima em populações mais treinadas com 16 semanas (BELL, SYROTUIK, SOCHA, MACLEAN e QUINNEY, 1997) e 15 semanas (TANISHO e HIRAKAWA, 2009). Além do período maior de treinamento, houve diferenças metodológicas na identificação do VO_{2MAX} , que podem ter superestimado os valores finais de consumo. No estudo de TANISHO et al. (2009) os dois grupos que foram submetidos a treinamentos contínuos ou intervalos, demonstravam um VO_{2MAX} inicial de $51,5 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Os aumentos absolutos e relativos no VO_{2MAX} são inversamente relacionados com o nível inicial de treinamento (WENGER e BELL, 1986). A maior magnitude de aumento tem sido visualizada em indivíduos com menores valores iniciais de VO_{2MAX} (McCARTHY *et al.*, 1995) (GRAVELLE e BLESSING, 2000).

Uma vez que o efeito de treinamento é dependente do status inicial de treinamento, proporcionalmente, menores ganhos serão observados à medida que o VO_{2max} aumenta. Nesse caso, possivelmente para detectar diferenças significantes os sujeitos deveriam ter sido expostos a um período maior de treinamento e/ou possuírem uma janela maior para adaptação cardiovascular caracterizado por um índice de aptidão inicial menor.

Infelizmente, não foram realizadas medidas de desempenho como tempo de corrida ou tempo de exaustão na velocidade de VO_{2MAX} (T_{lim}). Possivelmente, seria

detectada alguma diferença entre os grupos, pois os modelos de treinamento eram bem distintos e estudos demonstram que o TC promove efeito positivo nesses índices de performance (CHTARA, CHAMARI, CHAOUACHI, CHAOUACHI, KOUBAA, FEKI, MILLET e AMRI, 2005).

7.2 Força dinâmica máxima

Um dos principais achados do presente estudo é que oito semanas de treinamento promoveram ganhos similares na força dinâmica máxima (1RM) nos grupos TF e TC, mesmo com a intensidade elevada, não foi detectado efeito de interferência para a força muscular. Foram observados ganhos significantes na força muscular de 18,5% para o grupo TF e 17,6% para o grupo TC, sem alterações significantes para os grupos TA e C.

Esses dados vão de encontro com o que é proposto pelo efeito de interferência e a maioria dos estudos que investigou o TC (HICKSON, 1980) (CRAIG *et al.*, 1991; BELL *et al.*, 2000; GRAVELLE e BLESSING, 2000). Contudo, abre uma nova perspectiva para o TC, pois durante oito semanas, os voluntários foram submetidos a um protocolo intenso, sem sessões intermediárias que lhes permitiam recuperação visando o máximo de adaptação em ambas as capacidades motoras.

Um fator limitante na comparação entre os diferentes estudos é justamente a periodização empregada. Invariavelmente, os modelos de progressão em TA consistem em exercícios contínuos e intervalados e TF com exercícios passando por todas as intensidades de manifestação de força muscular (BELL *et al.*, 2000) (MCCARTHY *et al.*, 2002). No estudo de BELL *et al.* (2000) os voluntários realizavam exercícios contínuos de 30 a 42 minutos duas vezes por semana e uma sessão de exercício intervalado a 90% do VO_{2MAX} . Os exercícios de força foram realizados de quatro a seis séries e repetições variando entre quatro e dez.

Ou seja, dificilmente são empregados protocolos específicos como o realizado nesse estudo. O exercício intervalado foi empregado para conseguir mais tempo de treinamento próximo à intensidade de VO_{2MAX} e o TF visando o máximo de alteração morfológica da musculatura esquelética. Contudo, a duração de oito semanas pode ter sido o fator responsável pela não interferência na força dinâmica máxima, já que

os estudos que encontraram tal fenômeno tiveram treinamentos mais longos que os utilizados no presente estudo (KRAEMER *et al.*, 1995; BELL *et al.*, 1997).

BALABINIS *et al.* (2003) submeteram seus voluntários, indivíduos treinados, a quatro sessões semanais durante sete semanas de TA, TF e TC. Após o período de treinamento, ambos os grupos, TF e TC melhoram a força máxima na mesma magnitude (BALABINIS, PSARAKIS, MOUKAS, VASSILIOU e BEHRAKIS, 2003).

Realmente, a força muscular tem sido afetada em protocolos com maior duração, volume e frequência de treinamento (HICKSON, 1980; KRAEMER *et al.*, 1995). KRAEMER *et al.* (1995) submeteram seus voluntários à um protocolo de 12 semanas de treinamento e quatro sessões por semana, sendo os componentes aeróbio e força treinados no mesmo dia. Ao final do estudo, os ganhos de força observados (30% e 19,5% para o TF e TC respectivamente) revelaram a ocorrência da interferência. Também é importante destacar que a diferença na oitava semana só demonstrava efeito para a situação pré treino.

No nosso protocolo, apesar da intensidade elevada de ambos os componentes, optamos por um intervalo de recuperação relativamente longo (48 horas), pois em um estudo piloto foi verificado que os voluntários não conseguiam realizar as sessões de treinamento, com a intensidade proposta, três vezes por semana.

Os autores que defendem que um fator determinante no efeito de interferência pode ser o excesso de treinamento (MCCARTHY *et al.*, 1995) argumentam que os modelos de treinamento não são usuais para desenvolver a força muscular. De fato, no estudo de HICKSON (1980) o treinamento aplicado estressava o mesmo grupo muscular cinco dias por semana.

Inversamente, os estudos que não identificaram o efeito de interferência na força muscular foram de curta duração e baixa frequência (MCCARTHY *et al.*, 1995; MCCARTHY *et al.*, 2002; BALABINIS *et al.*, 2003) ou baixo volume e longa duração (HAKKINEN *et al.*, 2003).

Em indivíduos destreinados HAKKINEN *et al.* (2003) após 21 semanas de treinamento observaram aumento nos ganhos de força de 21% e 22% para os grupos TF e TC respectivamente, treinando duas vezes por semana. Em oito semanas com indivíduos fisicamente ativos, observamos ganhos significantes na

força muscular de 18,5% para o grupo TF e 17,6 para o grupo TC (HAKKINEN, KRAEMER, NEWTON e ALEN, 2001).

Ou seja, com menos da metade da duração do estudo de HAKKINEN et al. (2003) observamos ganhos similares na força muscular, contudo, os níveis iniciais de aptidão física dos voluntários eram bem diferentes entre os dois trabalhos. Os voluntários do presente estudo, apesar de possuírem um nível de aptidão melhor, não tolerariam 21 semanas de treinamento do protocolo proposto, por outro lado, os voluntários de HAKKINEN et al. (2003) não conseguiriam treinar na intensidade que nossos voluntários treinaram.

Uma importante conclusão do ponto de vista prático é que oito semanas de treinamento, onde os dois componentes (força e aeróbio) são treinados em ordem alternada e com 48 horas de intervalo entre as sessões, é capaz de promover ganhos na força máxima similares aos do TF.

Por outro lado, as mesmas oito semanas, podem ser vistas como o fator limitante do estudo, haja vista que os protocolos de TC que produziram efeito de interferência na força motora tinham uma duração maior (i.e > 10 semanas). Como no presente estudo a frequência semanal empregada foi de duas sessões, provavelmente, seria necessário um tempo maior para a visualização do efeito de interferência.

7.3 Área de secção transversa da musculatura da coxa

As medidas da AST da musculatura do quadríceps foram feitas para examinar como os modelos distintos de treinamento atuam na hipertrofia muscular. Para a PD e PE foram verificados ganhos significantes de 6,2% e 7,8% e 5,5% e 7,5% para os grupos TF e TC respectivamente, em relação ao pré-teste ($p < 0,001$). O grupo TA demonstrou pequeno aumento sem significância em relação ao pré-teste para a PD e PE 3,1% e 3,2% respectivamente.

WERNBOM et al. (2007) em um trabalho de revisão, na qual eles demonstraram a influência da frequência, intensidade, volume e modelo de TF na AST, demonstraram dados que corroboram com os nossos achados. Dentre todos os estudos analisados nessa revisão eles relataram um aumento médio na AST do

quadríceps de 8,5% (variando 1,1 - 17,3%) (WERNBOM, AUGUSTSSON e THOMEE, 2007).

Os autores também quantificaram o valor médio de aumento diário da área de secção transversa combinando ações musculares concêntricas e excêntricas, esse valor foi de 0,12% por dia (variando 0,04 – 0,55%) (WERNBOM *et al.*, 2007). Os autores chegaram nesses valores dividindo o ganho total ao final do estudo pelo número de sessões. Aplicando a mesma metodologia (6,2/16) e (7,8/16), obtemos aumentos médios diários de 0,38% e 0,48% para a perna direita dos grupos TF e TC, respectivamente, também similar aos valores reportados por WERNBOM *et al.* (2007).

Os poucos estudos de TC que analisaram a AST da musculatura da coxa, por circunferência do quadríceps (MCCARTHY *et al.*, 1995), por tomografia computadorizada (MCCARTHY *et al.*, 2002) ou do quadríceps através de ressonância magnética por imagem (HAKKINEN *et al.*, 2003), não demonstraram diferenças entre os grupos TF e TC.

MCCARTHY *et al.* (2002) após 10 semanas de treinamento realizado três vezes por semana reportaram ganhos na AST do quadríceps de 12%, 14% e 3% para os grupos TF, TC e TA, respectivamente (MCCARTHY *et al.*, 2002).

No estudo de HAKKINEN *et al.* (2003), os pesquisadores avaliaram a AST do quadríceps utilizando a mesma técnica de imagem que o presente estudo. Após 21 semanas, os resultados foram bem semelhantes aos nossos, ambos os grupos demonstraram aumentos significantes na AST da musculatura da coxa de 6% e 9% para os grupos TF e TC, respectivamente.

Há muito tempo, o potencial para o aumento da AST da musculatura esquelética após o TF é conhecido (MORITANI e DEVRIES, 1980). Desde que, os primeiros estudos começaram a identificar o efeito de interferência na força muscular (HICKSON, 1980; CRAIG *et al.*, 1991), atribui-se a interferência na força motora a alguma atenuação do crescimento muscular durante o TC.

Contudo, os nossos achados corroboram com os outros estudos, que quando analisada a AST da musculatura envolvida em ambas as tarefas, não é detectada a interferência no seu desenvolvimento. Outro dado importante, é que independente da duração do estudo, o efeito em termos percentuais é pequeno, ao redor de 8,5%

(WERNBOM *et al.*, 2007), o que em tese dificultaria detectar diferenças entre os grupos.

Desta maneira, olhando apenas para o corte medial do quadríceps, podemos concluir que o TC realizado durante oito semanas com intensidade elevada, não afeta a hipertrofia muscular.

7.4 Expressão gênica e protéica

O comportamento da expressão gênica e protéica associadas à hipertrofia muscular e a biogênese mitocondrial após três modelos distintos de treinamento (TA, TF e TC) também foi o foco dessa investigação.

O TA não demonstrou nenhuma alteração na expressão gênica e protéica associadas à hipertrofia muscular. Essa resposta corrobora com os dados de ATHERTON *et al.* (2005), que demonstraram uma especificidade das proteínas estudadas frente à protocolos de eletroestimulação que mimetizavam exercícios aeróbio ou de força. De fato, quando o protocolo de estimulação simulava o exercício aeróbio houve aumento na AMPK, enquanto para o protocolo que simulava o exercício de força foi verificada alteração na Akt/mTOR/p70^{S6K1}. Baseados em seus achados, eles propuseram que as vias de sinalização da AKt e a da AMPK representam sinalizações divergentes frente ao exercício físico. De acordo com esses autores, quando ativada, a via da AMPK induziria o músculo à adaptação aeróbia (ATHERTON *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, apesar de não haver alteração na expressão gênica da AMPK α 1, a fosforilação da APMK α no resíduo treonina 172, que detecta a fosforilação das subunidades α 1 e α 2 demonstrou uma forte tendência para o aumento (p=0,056) em relação ao controle.

Diversos estudos têm citado a AMPK, não só como uma importante quinase envolvida na regulação do metabolismo energético, mas também como essencial no processo adaptativo ao TA. A AMPK desempenha papel chave no processo de biogênese mitocondrial (HOLLOSZY, 2008; HOOD, 2009) decorrente do TA.

Dois fatores tem relacionado à AMPK ao processo adaptativo do exercício aeróbio. Primeiro, ela é responsiva ao exercício aeróbio em diferentes intensidades, tanto agudo como cronicamente, em humanos (STEPHENS *et al.*, 2002; CHEN,

STEPHENS, MURTHY, CANNY, HARGREAVES, WITTERS, KEMP e MCCONELL, 2003; FROSIG *et al.*, 2004). Segundo, ela é capaz de fosforilar o *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α* (PGC-1 α) nos resíduos Treonina 177 e Serina 538 (JAGER *et al.*, 2007). O aumento na expressão do PGC-1 α é acompanhado pelo aumento no fator nuclear de transcrição respiratório 1 (NRF-1), um importante regulador na transcrição de proteínas envolvidas no processo de biogênese mitocondrial (HOOD, 2009).

A mitocôndria é particularmente interessante, pois ela possui seu próprio DNA (mtDNA), que é diferente do DNA encontrado no núcleo. O mtDNA é pequeno e compacto e tem uma capacidade limitada de codificar proteínas, (HOOD, 2009). Devido a essa capacidade limitada de codificar proteínas a mitocôndria precisa importar boa parte do material genético envolvido na biogênese mitocondrial. A ativação do PGC-1 α pela AMPK estaria envolvida na regulação desse processo (HOLLOSZY, 2008).

Camundongos geneticamente modificados para não expressar AMPK, não demonstraram aumento no PGC-1 α e no conteúdo mitocondrial. Por outro lado, os camundongos selvagens submetidos ao tratamento com β -guanidinopropionic acid (β -GPA), que simula a depleção energética visualizada no exercício físico, demonstraram um aumento significativo no DNA mitocondrial e na densidade mitocondrial (ZONG *et al.*, 2002).

Esses dados demonstram a importância da AMPK no processo de adaptação ao TA, uma vez que, na ausência de sua expressão, não somente o DNA, mas a densidade mitocondrial também não demonstra alteração. Uma menor densidade mitocondrial produziria, em tese, um menor consumo de oxigênio.

No presente estudo, é importante destacar que, apesar de não haver diferenças significantes no VO_{2MAX} e na expressão gênica e protéica da AMPK, eles apresentaram uma tendência de aumento. É possível que o a duração do estudo e/ou o nível inicial de aptidão dos voluntários podem ter refletido na ausência de diferença estatística.

Por outro lado, o aumento na força muscular e na AST observado no grupo TF ocorreu juntamente com alterações significantes na expressão de genes e proteínas associados à hipertrofia muscular.

No músculo esquelético, a hipertrofia das fibras musculares é causada devido ao aumento na taxa de síntese protéica. Esse aumento promove o acúmulo de proteínas responsáveis pelo crescimento das fibras musculares. A via AKt/mTOR/p70 parece exercer um papel determinante no aumento da síntese protéica (MATSAKAS e PATEL, 2009).

Essa função exercida pela mTOR, parece depender da sua capacidade em estimular a tradução, processo envolvido na síntese protéica, onde organelas como o ribossomo são essenciais para ligação ao RNAm e a formação de cadeias polipeptídicas.

Em nosso estudo, a expressão do gene da mTOR demonstrou aumento significativo de 43 % após oito semanas de treinamento em relação ao pré-teste e ao grupo C somente no grupo TF, sem apresentar alterações significantes nos grupos TA e TC . A fosforilação da AKt^{ser473} e p70^{thr389} também aumentaram 45% e 62%, respectivamente, no TF em relação ao grupo C.

É importante destacar, que ainda existem poucos estudos crônicos que verificaram os efeitos do TF na via AKt/mTOR/p70^{S6K1} (TERZIS, GEORGIADIS, STRATAKOS, VOGIATZIS, KAVOURAS, MANTA, MASCHER e BLOMSTRAND, 2008) (HULMI, TANNERSTEDT, SELANNE, KAINULAINEN, KOVANEN e MERO, 2009) Da mesma forma, são escassos os estudos crônicos que analisaram o efeito do TF na expressão gênica de humanos (LAMAS, AOKI, UGRINOWITSCH, CAMPOS, REGAZZINI, MORISCOT e TRICOLI, 2009).

LAMAS et al. (2009) LAMAS et al. (2009) recrutaram voluntários com experiência em TF para comparar os efeitos de 8 semanas de treinamento de força e potência no gene da mTOR e de outras proteínas relacionadas à plasticidade muscular. Após o período de treinamento foi verificado aumentos significantes no gene da mTOR (efeito de tamanho de 2,8). O maior aumento da expressão do gene da mTOR no estudo de Lamas et al. (2009), comparado com o presente estudo, pode ser devido tanto ao número de sessões semanais (3 x 2 sessões semanais) ou a intensidade do treinamento, já que eles utilizaram um protocolo de força máxima enquanto nós utilizamos um protocolo de resistência de força(LAMAS *et al.*, 2009).

Boa parte da capacidade da mTOR estimular o processo de tradução está relacionada a fosforilação da p70^{S6K1}, a qual atua na fosforilação do polipeptídeo

ribossomal S6 na subunidade ribossomal 40S, próximo dos fatores de iniciação e do RNAm (KOOPMAN *et al.*, 2006). A eficácia de todo esse aparato de tradução, possibilita o acoplamento correto dos ribossomos no RNAm, possibilitando a sequência de eventos chave para a síntese de proteínas. A maior fosforilação da p70^{thr389} está associada ao aumento da hipertrofia muscular após 14 semanas de treinamento de força (TERZIS *et al.*, 2008).

HULMI *et al.* (2006) submeteram indivíduos fisicamente ativos à um protocolo de TF com suplementação de *whey protein* e TF com placebo. Os exercícios foram similares aos nossos (cadeira extensora e leg-press), com intensidade entre 40 e 85% de 1RM, em duas sessões semanais, durante 21 semanas. Ao término do estudo foi verificado um aumento no volume muscular medido por ultrassonografia e uma maior fosforilação da p70^{thr389} para ambos os grupos (i.e. suplementado e placebo) em relação ao controle (HULMI *et al.*, 2009).

Nossos dados corroboram com os achados da literatura, pois também verificamos aumento na AST da musculatura do quadríceps associado ao aumento da expressão gênica de mTOR e maior fosforilação de AKT^{ser473} e p70^{thr389}. Demonstrando a importância dessas proteínas na hipertrofia muscular em resposta ao TF.

Outro objetivo importante desse trabalho, foi caracterizar o efeito do TC na expressão gênica e protéica da AMPK, AKT, mTOR e p70^{S6K1}. Ultimamente, tem se produzido um número considerável de artigos sobre os efeitos agudos e crônicos do TF na via AKT/mTOR/p70^{S6K1} (DREYER *et al.*, 2006) (TERZIS *et al.*, 2008; HULMI *et al.*, 2009). Por outro lado, a AMPK tem sido estudada, na sua maioria, em modelos animais (BOLSTER *et al.*, 2002; ZONG *et al.*, 2002), em humanos de maneira aguda (LEE-YOUNG, KOUFOGIANNIS, CANNY e MCCONELL, 2008; GIBALA, MCGEE, GARNHAM, HOWLETT, SNOW e HARGREAVES, 2009) ou em períodos curtos de treinamento (i.e 10 dias) (BENZIANE, BURTON, SCANLAN, GALUSKA, CANNY, CHIBALIN, ZIERATH e STEPTO, 2008).

É importante destacar, que até o presente momento é pouco conhecido o efeito crônico do exercício aeróbio e da associação de exercícios de força e resistência aeróbia na expressão gênica e protéica da AMPK, AKT, mTOR e p70^{S6K1}.

Um dos principais achados foi que apesar de algumas respostas diferenciadas em relação ao TF, os ganhos em força e principalmente na hipertrofia muscular foram similares entre os grupos TF e TC. O gene da mTOR e a fosforilação de AKt^{ser473}, p70^{thr389} demonstraram aumento em relação ao controle somente no TF. Por outro lado, o TC demonstrou aumento em relação ao controle na expressão total de p70^{S6K1} e uma redução na expressão gênica de p70^{S6K1} em relação ao pré treino.

A diminuição de 46% no gene da p70^{S6K1} observada apenas no grupo TC não refletiu em menor ganho de hipertrofia muscular, haja vista a importância dessa proteína para o aumento da massa muscular (AGUILAR, ALLIOUACHENE, SOTIROPOULOS, SOBERING, ATHEA, DJOUADI, MIRAUX, THIAUDIERE, FORETZ, VIOLLET, DIOLEZ, BASTIN, BENIT, RUSTIN, CARLING, SANDRI, VENTURA-CLAPIER e PENDE, 2007) (MATSAKAS e PATEL, 2009). Curiosamente, o aumento no conteúdo total não se refletiu em aumento da fosforilação no resíduo treonina 389.

Pode ser que houve uma dissociação temporal entre o aumento da fosforilação da proteína e o aumento da síntese protéica. De fato, (DREYER *et al.*, 2006) demonstraram que o aumento de fosforilação pode estar dissociado do aumento da síntese protéica. Provavelmente, no instante em que o tecido muscular foi obtido (i.e. 36 horas após a última sessão de treinamento) a fosforilação da p70^{thr389} já havia diminuído. É provável que o TC e TF produzam diferentes dinâmicas na fosforilação das proteínas envolvidas na hipertrofia muscular já que não houve diferenças de hipertrofia entre os grupos TF e TC.

Contudo, a grande expectativa estava relacionada ao comportamento da AMPK durante o TC. Desde o estudo de ATHERTON *et al.* (2005) que demonstrou uma especificidade na resposta molecular perante estímulos divergentes que simulavam o TA e o TF, inúmeras revisões têm dado destaque para o possível comportamento das vias AMPK/PGC-1 α e AKt/mTOR/p70 após um protocolo de TC. (NADER, 2006; COFFEY e HAWLEY, 2007; HAWLEY, 2009; MATSAKAS e PATEL, 2009).

Todas as revisões citadas tem associado o efeito de interferência visualizado no TC a uma provável acentuação da ativação da APMK após o TC, quando

comparado ao TF. Uma vez que o exercício aeróbio (FROSIG *et al.*, 2004) aumenta a fosforilação da AMPK, e a maior ativação dessa quinase está relacionada à diminuição da síntese protéica (BOLSTER *et al.*, 2002), parece óbvio sugerir que a maior ativação da AMPK após o TC esteja associada ao efeito de interferência.

Os nossos dados para a AMPK no TC precisam ser vistos com cautela. Não houve efeito de interferência, entretanto, não podemos descartar a possível função dessa quinase no efeito de interferência, pois a resposta hipertrófica dos grupos TF e TC foi observada sem alteração na AMPK. Por outro lado, no TA, o qual não promove alterações na AST dos músculos esqueléticos, o aumento da AMPK foi de 350%, apesar de não ter alcançado significância estatística.

Outro dado que precisa ser destacado é o modelo e a população que tem demonstrado as alterações na AMPK. A ativação robusta da AMPK tem sido visualizada por meio de agentes farmacológicos utilizados em modelos animais (BOLSTER *et al.*, 2002) ou após sessões agudas nas quais os indivíduos não estão acostumados com o estímulo proposto (CHEN *et al.*, 2003).

COFFEY *et al.* (2006) colocaram indivíduos treinados em força (9 anos de experiência) e resistência aeróbia (8 anos de experiência) para realizarem tarefas específicas e inespecíficas. Os voluntários treinados em força e resistência aeróbia realizaram um protocolo de TF que consistia em oito séries de cinco repetições no dinamômetro isocinético a $30^{\circ}\cdot s^{-1}$ e em um protocolo de TA que consistia em 60 minutos à 70% do $VO_{2\text{pico}}$. A fosforilação da AMPK demonstrou aumento significativo somente no grupo força após o protocolo de exercício aeróbio (COFFEY, ZHONG, SHIELD, CANNY, CHIBALIN, ZIERATH e HAWLEY, 2006).

Os dados de COFFEY *et al.* (2009) indicam que indivíduos com maior índice de aptidão aeróbia possam ter uma menor resposta a atividade da AMPK. Somente os indivíduos treinados em força demonstraram alteração significativa na atividade da AMPK após o exercício aeróbio. O $VO_{2\text{pico}}$ dos indivíduos eram de $65,2 (\pm 6,4) \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e $36,9 (\pm 7,4) \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ para aeróbio e força respectivamente.

O nosso modelo também pode ter contribuído para essa atenuação na fosforilação da AMPK no TC. A maioria dos estudos que observou o efeito de interferência na força motora, o exercício aeróbio era realizado previamente ao exercício de força (HICKSON, 1980; CRAIG *et al.*, 1991; KRAEMER *et al.*, 1995). Em

nosso estudo, a ordem das sessões foi alternada, o que em tese, pensando na duração e no tempo de recuperação entre as sessões, pode ter permitido a sobreposição das via AKt/mTOR/p70^{S6K1} na fosforilação da AMPK. Haja vista, que o aumento na TSP pode durar até 48 horas após uma sessão de exercício de força (PHILLIPS, TIPTON, AARSLAND, WOLF e WOLFE, 1997) e um dos poucos estudos que mediu a fosforilação da AMPK após 24 horas de exercício aeróbio realizado à 63,1%(VO_{2pico}), não verificou diferença quando comparado a situação pré exercício (LEE-YOUNG *et al.*, 2008).

7.5 CONCLUSÕES

O nosso estudo foi o primeiro a demonstrar o efeito crônico de três modelos distintos de treinamento na expressão gênica e protéica da AMPK. O principal achado foi que os aumentos na força e hipertrofia muscular nos grupos TF e TC ocorreram sem alterações na fosforilação da AMPK, uma reguladora negativa da síntese de proteínas. Contudo, não podemos descartar ou associar a sua atividade ao efeito de interferência visualizado no TC, pois uma limitação do nosso estudo na investigação dessa quinase, foi a duração do treinamento relativamente curta, que não proporcionou o efeito de interferência.

Do ponto de vista prático, nosso estudo demonstrou que é possível obter ganhos similares na força motora e hipertrofia muscular durante oito semanas de TC em alta intensidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abernethy, P. J. Influence of acute endurance activity on isokinetic. Journal of Strength and Conditioning Research, v.7, n.3, p.141-146. 1993.

Aguilar, V., S. Alliouachene, A. Sotiropoulos, A. Sobering, Y. Athea, F. Djouadi, S. Miraux, E. Thiaudiere, M. Foretz, B. Viollet, P. Diolez, J. Bastin, P. Benit, P. Rustin, D. Carling, M. Sandri, R. Ventura-Clapier e M. Pende. S6 kinase deletion suppresses muscle growth adaptations to nutrient availability by activating AMP kinase. Cell Metabolism, v.5, n.6, Jun, p.476-87. 2007.

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

Aschenbach, W. G., K. Sakamoto e L. J. Goodyear. 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, metabolism and exercise. Sports Medicine, v.34, n.2, p.91-103. 2004.

Atherton, P. J., J. Babraj, K. Smith, J. Singh, M. J. Rennie e H. Wackerhage. 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 Journal v.19, n.7, May, p.786-8. 2005.

Balabinis, C. P., C. H. Psarakis, M. Moukas, M. P. Vassiliou e P. K. Behrakis. Early phase changes by concurrent endurance and strength training. Journal of Strength Conditioning and Research, v.17, n.2, May, p.393-401. 2003.

Bamman, M. M., J. K. Petrella, J. S. Kim, D. L. Mayhew e J. M. Cross. Cluster analysis tests the importance of myogenic gene expression during myofiber hypertrophy in humans. Journal of Applied Physiology, v.102, n.6, Jun, p.2232-9. 2007.

Bamman, M. M., J. R. Shipp, J. Jiang, B. A. Gower, G. R. Hunter, A. Goodman, C. L. Mclafferty, Jr. e R. J. Urban. Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA concentrations in humans. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, v.280, n.3, Mar, p.E383-90. 2001.

Bassett, D. R., Jr. e E. T. Howley. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.32, n.1, Jan, p.70-84. 2000.

Bell, G. J., D. Syrotuik, T. P. Martin, R. Burnham e H. A. Quinney. Effect of concurrent strength and endurance training on skeletal muscle properties and hormone concentrations in humans. European Journal of Applied Physiology, v.81, n.5, Mar, p.418-27. 2000.

Bell, G. J., D. Syrotuik, T. Socha, I. M. Maclean e A. H. Quinney. Effect of strength training and concurrent strength and endurance training on strength, testosterone, and cortisol. Journal of Strength and Conditioning Research, v.11, n.1. 1997.

Bentley, D. J., P. A. Smith, A. J. Davie e S. Zhou. Muscle activation of the knee extensors following high intensity endurance exercise in cyclists. European Journal of Applied Physiology, v.81, n.4, Mar, p.297-302. 2000.

Benziane, B., T. J. Burton, B. Scanlan, D. Galuska, B. J. Canny, A. V. Chibalin, J. R. Zierath e N. K. Stepto. Divergent cell signaling after short-term intensified endurance training in human skeletal muscle. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, v.295, n.6, Dec, p.E1427-38. 2008.

Birk, J. B. e J. F. Wojtaszewski. Predominant $\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$ AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. Journal of Physiology, v.577, n.Pt 3, Dec 15, p.1021-32. 2006.

Bodine, S. C. mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.38, n.11, Nov, p.1950-7. 2006.

Bodine, S. C., T. N. Stitt, M. Gonzalez, W. O. Kline, G. L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J. C. Lawrence, D. J. Glass e G. D. Yancopoulos. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nature, v.3, n.11, Nov, p.1014-9. 2001.

Bolster, D. R., S. J. Crozier, S. R. Kimball e L. S. Jefferson. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. The Journal of Biology and Chemistry, v.277, n.27, Jul 5, p.23977-80. 2002.

Bolster, D. R., N. Kubica, S. J. Crozier, D. L. Williamson, P. A. Farrell, S. R. Kimball e L. S. Jefferson. Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signalling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. The Journal of Physiology, v.553, n.Pt 1, Nov 15, p.213-20. 2003.

Brown, L. E. e J. P. Weir. ASEP procedures recommendation I: accurate assessment of muscular strength and power. Journal of Exercise Physiology, v.4, n.3, p.1-21. 2001.

Chen, Z. P., T. J. Stephens, S. Murthy, B. J. Canny, M. Hargreaves, L. A. Witters, B. E. Kemp e G. K. Mcconell. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. Diabetes, v.52, n.9, Sep, p.2205-12. 2003.

Chtara, M., K. Chamari, M. Chaouachi, A. Chaouachi, D. Koubaa, Y. Feki, G. P. Millet e M. Amri. Effects of intra-session concurrent endurance and strength training sequence on aerobic performance and capacity. British Journal of Sport Medicine, v.39, n.8, Aug, p.555-60. 2005.

Clark, S. A., Z. P. Chen, K. T. Murphy, R. J. Aughey, M. J. Mckenna, B. E. Kemp e J. A. Hawley. Intensified exercise training does not alter AMPK signaling in human skeletal muscle. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, v.286, n.5, May, p.E737-43. 2004.

Coffey, V. G. e J. A. Hawley. The molecular bases of training adaptation. Sports Medicine, v.37, n.9, p.737-63. 2007.

Coffey, V. G., B. Jemiolo, J. Edge, A. P. Garnham, S. W. Trappe e J. A. Hawley. Effect of consecutive repeated sprint and resistance exercise bouts on acute adaptive responses in human skeletal muscle. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative and Physiology, Aug 19. 2009a.

Coffey, V. G., H. Pilegaard, A. P. Garnham, B. J. O'brien e J. A. Hawley. Consecutive bouts of diverse contractile activity alter acute responses in human skeletal muscle. Journal of Applied Physiology, v.106, n.4, Apr, p.1187-97. 2009b.

Coffey, V. G., Z. Zhong, A. Shield, B. J. Canny, A. V. Chibalin, J. R. Zierath e J. A. Hawley. Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans. Faseb Journal, v.20, n.1, Jan, p.190-2. 2006.

Craig, B. W., J. Lucas, R. Pohlman e H. Stelling. The effects of running, weightlifting and a combination of both on growth hormone release. Journal of Applied Sports Science Research, v.5, n.4, p.198-203. 1991.

Cuthbertson, D. J., J. Babraj, K. Smith, E. Wilkes, M. J. Fedele, K. Esser e M. Rennie. Anabolic signaling and protein synthesis in human skeletal muscle after dynamic shortening or lengthening exercise. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, v.290, n.4, Apr, p.E731-8. 2006.

De Souza, E. O., V. Tricoli, E. Franchini, A. C. Paulo, M. Regazzini e C. Ugrinowitsch. Acute effect of two aerobic exercise modes on maximum strength and strength endurance. Journal of Strength and Conditioning Research, v.21, n.4, Nov, p.1286-90. 2007.

Docherty, D. e B. Sporer. A proposed model for examining the interference phenomenon between concurrent aerobic and strength training. Sports Medicine, v.30, n.6, Dec, p.385-94. 2000.

Dreyer, H. C., S. Fujita, J. G. Cadenas, D. L. Chinkes, E. Volpi e B. B. Rasmussen. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. Journal of Physiology, v.576, n.Pt 2, Oct 15, p.613-24. 2006.

Dudley, G. A. e R. Djamil. Incompatibility of endurance and strength training modes of exercise. Journal of Applied Physiology, v.59, n.5, p.1446-1451. 1985.

Enoka, R. M. e D. G. Stuart. Neurobiology of muscle fatigue. Journal of Applied Physiology, v.72, n.5, May, p.1631-48. 1992.

Feng, Z., W. Hu, E. De Stanchina, A. K. Teresky, S. Jin, S. Lowe e A. J. Levine. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. Cancer Research, v.67, n.7, Apr 1, p.3043-53. 2007.

Foster, C. Monitoring training in athletes with reference to overtraining syndrome. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.30, n.7, Jul, p.1164-8. 1998.

Frosig, C., S. B. Jorgensen, D. G. Hardie, E. A. Richter e J. F. Wojtaszewski. 5'-AMP-activated protein kinase activity and protein expression are regulated by endurance

training in human skeletal muscle. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, v.286, n.3, Mar, p.E411-7. 2004.

Gergley, J. C. Comparison of two lower-body modes of endurance training on lower-body strength development while concurrently training. Journal of Strength and Conditioning Research, v.23, n.3, May, p.979-87. 2009.

Gibala, M. J., S. L. Mcgee, A. P. Garnham, K. F. Howlett, R. J. Snow e M. Hargreaves. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1alpha in human skeletal muscle. Journal of Applied Physiology, v.106, n.3, Mar, p.929-34. 2009.

Glass, D. J. Molecular mechanisms modulating muscle mass. Trends in Molecular Medicine, v.9, n.8, Aug, p.344-50. 2003.

Gravelle, B. L. e D. L. Blessing. Physiological adaptation in women concurrently training for strength and endurance. Journal of Strength and Conditioning Research, v.14, n.1, p.5-13. 2000.

Hakkinen, K., M. Alen, W. J. Kraemer, E. Gorostiaga, M. Izquierdo, H. Rusko, J. Mikkola, A. Hakkinen, H. Valkeinen, E. Kaarakainen, S. Romu, V. Erola, J. Ahtiainen e L. Paavolainen. Neuromuscular adaptations during concurrent strength and endurance training versus strength training. European Journal of Applied Physiology, v.89, n.1, Mar, p.42-52. 2003.

Hakkinen, K., W. J. Kraemer, R. U. Newton e M. Alen. Changes in electromyographic activity, muscle fibre and force production characteristics during heavy resistance/power strength training in middle-aged and older men and women. Acta Physiol Scand, v.171, n.1, Jan, p.51-62. 2001.

Hameed, M., K. H. Lange, J. L. Andersen, P. Schjerling, M. Kjaer, S. D. Harridge e G. Goldspink. The effect of recombinant human growth hormone and resistance training on IGF-I mRNA expression in the muscles of elderly men. Journal of Physiology, v.555, n.Pt 1, Feb 15, p.231-40. 2004.

Hameed, M., A. D. Toft, B. K. Pedersen, S. D. Harridge e G. Goldspink. Effects of eccentric cycling exercise on IGF-I splice variant expression in the muscles of young and elderly people. Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, v.18, n.4, Aug, p.447-52. 2008.

Hara, K., K. Yonezawa, M. T. Kozlowski, T. Sugimoto, K. Andrabi, Q. P. Weng, M. Kasuga, I. Nishimoto e J. Avruch. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. The Journal of Biology and Chemistry, v.272, n.42, Oct 17, p.26457-63. 1997.

Hardie, D. G. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. Endocrinology, v.144, n.12, Dec, p.5179-83. 2003.

Hawley, J. A. Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? Applied Physiology, Nutrition and Metabolism, v.34, n.3, Jun, p.355-61. 2009.

Hickson, R. Interference of strength development by simultaneously training for strength and endurance. European Journal of Applied Physiology, v.45, n.2-3, p.255-263. 1980.

Holloszy, J. O. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. Journal of Physiology and Pharmacology, v.59 Suppl 7, Dec, p.5-18. 2008.

Holloszy, J. O. e E. F. Coyle. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. Journal of Applied Physiology, v.56, n.4, Apr, p.831-8. 1984.

Hood, D. A. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. Applied Physiology, Nutrition and Metabolism, v.34, n.3, Jun, p.465-72. 2009.

Hood, D. A., I. Irrcher, V. Ljubcic e A. M. Joseph. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. The Journal of Experimental Biology v.209, n.Pt 12, Jun, p.2265-75. 2006.

Hulmi, J. J., J. Tannerstedt, H. Selanne, H. Kainulainen, V. Kovanen e A. A. Mero. Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. Journal of Applied Physiology, v.106, n.5, May, p.1720-9. 2009.

Inoki, K., T. Zhu e K. L. Guan. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell, v.115, n.5, Nov 26, p.577-90. 2003.

Jager, S., C. Handschin, J. St-Pierre e B. M. Spiegelman. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha.

Proceedings of the National Academy of Science, v.104, n.29, Jul 17, p.12017-22. 2007.

Jorgensen, S. B., E. A. Richter e J. F. Wojtaszewski. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. Journal of Physiology, v.574, n.Pt 1, Jul 1, p.17-31. 2006.

Koopman, R., A. H. Zorenc, R. J. Gransier, D. Cameron-Smith e L. J. Van Loon. Increase in S6K1 phosphorylation in human skeletal muscle following resistance exercise occurs mainly in type II muscle fibers. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, v.290, n.6, Jun, p.E1245-52. 2006.

Kraemer, W. J., J. F. Patton, S. E. Gordon, E. A. Harman, M. R. Deschenes, K. Reynolds, R. U. Newton, N. T. Triplett e J. E. Dziados. Compatibility of high-intensity strength and endurance training on hormonal and skeletal muscle adaptations. Journal of Applied Physiology, v.78, n.3, Mar, p.976-89. 1995.

Kubica, N., D. R. Bolster, P. A. Farrell, S. R. Kimball e L. S. Jefferson. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2Bepsilon mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. The Journal of Biology and Chemistry, v.280, n.9, Mar 4, p.7570-80. 2005.

Lamas, L., M. S. Aoki, C. Ugrinowitsch, G. E. Campos, M. Regazzini, A. S. Moriscot e V. Tricoli. Expression of genes related to muscle plasticity after strength and power training regimens. Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, Apr 14. 2009.

Lee-Young, R. S., G. Koufogiannis, B. J. Canny e G. K. Mcconell. Acute exercise does not cause sustained elevations in AMPK signaling or expression. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.40, n.8, Aug, p.1490-4. 2008.

Leger, B., R. Cartoni, M. Praz, S. Lamon, O. Deriaz, A. Crettenand, C. Gobelet, P. Rohmer, M. Konzelmann, F. Luthi e A. P. Russell. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. Journal of Physiology, v.576, n.Pt 3, Nov 1, p.923-33. 2006.

Leveritt, M., P. J. Abernethy, B. K. Barry e P. A. Logan. Concurrent strength and endurance training. A review. Sports Medicine, v.28, n.6, Dec, p.413-27. 1999.

Macedougall, J. D., D. G. Sale, J. R. Moroz, G. C. Elder, J. R. Sutton e H. Howald. Mitochondrial volume density in human skeletal muscle following heavy resistance training. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.11, n.2, Summer, p.164-6. 1979.

Mascher, H., J. Tannerstedt, T. Brink-Elfegoun, B. Ekblom, T. Gustafsson e E. Blomstrand. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, v.294, n.1, Jan, p.E43-51. 2008.

Matsakas, A. e K. Patel. Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. Histology and Histopathology, v.24, n.2, Feb, p.209-22. 2009.

Mccarthy, J. P., J. C. Agre, B. K. Graf, M. A. Pozniak e A. C. Vailas. Compatibility of adaptive responses with combining strength and endurance training. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.27, n.3, Mar, p.429-36. 1995.

Mccarthy, J. P., M. A. Pozniak e J. C. Agre. Neuromuscular adaptations to concurrent strength and endurance training. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.34, n.3, Mar, p.511-9. 2002.

Moritani, T. e H. A. Devries. Potential for gross muscle hypertrophy in older men. Journal of Gerontology, v.35, n.5, Sep, p.672-82. 1980.

Nader, G. A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, v.37, n.10, Oct, p.1985-96. 2005.

Nader, G. A. Concurrent strength and endurance training: from molecules to man. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.38, n.11, Nov, p.1965-70. 2006.

Nelson, A., D. A. Arnall, S. F. Loy, L. J. Silvester e R. K. Conlee. Consequences of combining strength and endurance training regims. Physical Therapy, v.70, n.5, p.287-294. 1990.

Norrbom, J., C. J. Sundberg, H. Ameln, W. E. Kraus, E. Jansson e T. Gustafsson. PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. Journal of Applied Physiology, v.96, n.1, Jan, p.189-94. 2004.

Parkington, J. D., A. P. Siebert, N. K. Lebrasseur e R. A. Fielding. Differential activation of mTOR signaling by contractile activity in skeletal muscle. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative and Physiology, v.285, n.5, Nov, p.R1086-90. 2003.

Philippou, A., A. Halapas, M. Maridaki e M. Koutsilieris. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, v.7, n.3, Jul-Sep, p.208-18. 2007.

Phillips, S. M., K. D. Tipton, A. Aarsland, S. E. Wolf e R. R. Wolfe. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. American Journal of Physiology, v.273, n.1 Pt 1, Jul, p.E99-107. 1997.

Putman, C. T., X. Xu, E. Gillies, I. M. Maclean e G. J. Bell. Effects of strength, endurance and combined training on myosin heavy chain content and fibre-type distribution in humans. European Journal of Applied Physiology, v.92, n.4-5, Aug, p.376-84. 2004.

Rome, L. C. e S. L. Lindstedt. The Quest for Speed: Muscles Built for High-Frequency Contractions. News in Physiological Sciences, v.13, Dec, p.261-268. 1998.

Sale, D. G. Neural adaptation to resistance training. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.20, n.5, p.135-145. 1988.

Sale, D. G., I. Jacobs, J. D. Macdougall e S. Garner. Comparison of two regimens of concurrent strength and endurance. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.22, n.3, p.348-356. 1990.

Schantz, P. Capillary supply in heavy-resistance trained non-postural human skeletal muscle. Acta Physiol Scand, v.117, n.1, Jan, p.153-155. 1983.

Sporer, B. C. e H. A. Wenger. Effects of aerobic exercise on strength performance following various periods of recovery. Journal of Strength and Conditioning Research, v.17, n.4, Nov, p.638-44. 2003.

Staron, R. S., D. L. Karapondo, W. J. Kraemer, A. C. Fry, S. E. Gordon, J. E. Falkel, F. C. Hagerman e R. S. Hikida. Skeletal muscle adaptations during early phase of

heavy-resistance training in men and women. Journal of Applied Physiology, v.76, n.3, Mar, p.1247-55. 1994.

Stephens, T. J., Z. P. Chen, B. J. Canny, B. J. Michell, B. E. Kemp e G. K. Mcconell. Progressive increase in human skeletal muscle AMPK α 2 activity and ACC phosphorylation during exercise. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, v.282, n.3, Mar, p.E688-94. 2002.

Tanisho, K. e K. Hirakawa. Training effects on endurance capacity in maximal intermittent exercise: comparison between continuous and interval training. Journal of Strength and Conditioning Research, v.23, n.8, Nov, p.2405-10. 2009.

Terzis, G., G. Georgiadis, G. Stratakos, I. Vogiatzis, S. Kavouras, P. Manta, H. Mascher e E. Blomstrand. Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. European Journal of Applied Physiology, v.102, n.2, Jan, p.145-52. 2008.

Wenger, H. A. e G. J. Bell. The interactions of intensity, frequency and duration of exercise training in altering cardiorespiratory fitness. Sports Medicine, v.3, n.5, Sep-Oct, p.346-56. 1986.

Wernbom, M., J. Augustsson e R. Thomee. The influence of frequency, intensity, volume and mode of strength training on whole muscle cross-sectional area in humans. Sports Med, v.37, n.3, p.225-64. 2007.

Wilkinson, S. B., S. M. Phillips, P. J. Atherton, R. Patel, K. E. Yarasheski, M. A. Tarnopolsky e M. J. Rennie. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. Journal of Physiology, v.586, n.Pt 15, Aug 1, p.3701-17. 2008.

Winder, W. W., E. B. Taylor e D. M. Thomson. Role of AMP-activated protein kinase in the molecular adaptation to endurance exercise. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.38, n.11, Nov, p.1945-9. 2006.

Wojtaszewski, J. F., C. Macdonald, J. N. Nielsen, Y. Hellsten, D. G. Hardie, B. E. Kemp, B. Kiens e E. A. Richter. Regulation of 5'AMP-activated protein kinase activity and substrate utilization in exercising human skeletal muscle. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, v.284, n.4, Apr, p.E813-22. 2003.

Zong, H., J. M. Ren, L. H. Young, M. Pypaert, J. Mu, M. J. Birnbaum e G. I. Shulman. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. Proceedings of the National Academy of Science, v.99, n.25, Dec 10, p.15983-7. 2002.

ANEXO I CONSENTIMENTO INFORMADO

Formulário E

ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE
DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Instruções para preenchimento no verso)

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

1. NOME DO INDIVÍDUO.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº..... APTO.....

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:

CEP:.....TELEFONE:DDD

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

“Treinamento Concorrente - identificação de mecanismos responsáveis pela competição entre as adaptações”

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Prof Dr Carlos Ugrinowitsch

3. CARGO/FUNÇÃO

Professor Doutor

4. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

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

5. DURAÇÃO DA PESQUISA

Treze (13) semanas

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

1. justificativa e os objetivos da pesquisa;

O objetivo deste estudo intitulado “Treinamento Concorrente - identificação de mecanismos responsáveis pela competição entre as adaptações” é identificar o possível mecanismo responsável pela redução da resposta adaptativa no desenvolvimento da força e hipertrofia muscular, por meio de análise molecular das quinases sinalizadoras responsáveis por essas adaptações. Os resultados obtidos no estudo poderão ser úteis no entendimento desta questão, a qual é conhecida como fenômeno de interferência e na melhor programação de treinamento de atletas cujas modalidades envolvam a combinação de treinamento de força e resistência aeróbia conhecido como Treinamento Concorrente (TC). Este estudo será conduzido pelo Bacharel em Educação Física Eduardo Oliveira de Souza, mestrando em Biodinâmica do Movimento Humano pela EEFESUSP.

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

Inicialmente você participará de 2 sessões iniciais, com intervalo de pelo menos 48 horas, que terão como objetivo familiarizar você com os procedimentos e as

avaliações iniciais. Na semana subsequente você realizará os testes iniciais. Os testes serão: teste de 1 RM no leg press 45°, teste de VO_{2max} e coleta de tecido muscular (biópsia muscular). Depois, você participará de duas sessões semanais de treinamento, onde poderá realizar treinamento de força, de resistência aeróbia, ou concorrente (treino de força e de resistência na mesma sessão) durante 8 semanas. Após, o período de treinamento, os mesmos testes serão repetidos.

Teste de consumo de oxigênio (VO_{2max})

Este é um teste de corrida na esteira. O teste terá uma velocidade inicial de $6 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$, a cada minutos a velocidade da corrida será aumentada em $1,2 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$, até a sua exaustão voluntária. A cada estágio lhe será perguntado sua percepção subjetiva de esforço e será aferida a sua frequência cardíaca.

Teste de força máxima dinâmica (1RM)

Este é um teste no aparelho de musculação leg press 45° e consiste na obtenção da máxima quantidade de peso que pode ser levantada em uma repetição (flexão-extensão de joelhos) no aparelho. Após um período de 5 min de aquecimento na esteira, será realizado o aquecimento específico que consiste em 5 repetições com carga de 50% do máximo e 3 repetições com 70% estimados na familiarização. A partir da carga inicial, o peso levantado será aumentado até que o sujeito não consiga completar uma repetição com aquela carga. O número total de tentativas para estimar o 1RM não poderá ser maior que cinco e encorajamento verbal será realizado durante as tentativas.

A seguir temos a descrição completa do procedimento de biópsia:

Neste procedimento, extrairemos uma pequena amostra (aproximadamente 100mg) da porção lateral e mais volumosa do músculo vasto lateral, localizado na parte anterior da coxa. A identificação da porção mais volumosa do músculo será feita através da visualização da área durante um contração voluntária máxima. O procedimento de biópsia muscular será realizado a partir da utilização de uma agulha

especialmente desenvolvida para extrair pequenas amostras de músculo (de tamanho aproximado de dois grãos de arroz cozidos).

Para a realização do procedimento, você deverá se manter deitado em uma maca, mantendo os joelhos estendidos e a musculatura relaxada.

Depois da identificação da área muscular, esta será tricotomizada (terá seus pelos removidos) com o uso de lâminas descartáveis individuais e limpa com gazes molhadas em anti-séptico cirúrgico por indivíduo trajando luvas esterilizadas.

Após a remoção dos pelos e limpeza da área, um primeiro campo cirúrgico será inserido sob a perna do indivíduo. O médico responsável (trajando luvas esterilizadas) fará então a anestesia do local com a utilização de xilocaína a 1%, administrando-a com seringa e agulha hipodérmicas descartáveis de forma subcutânea (sob a pele). Durante este procedimento, o indivíduo poderá, de acordo com o seu grau de sensibilidade, sentir um breve desconforto, parecido com uma sensação de calor local, devido à ação do anestésico. Após a aplicação do anestésico, a área a ser biopsiada e seus arredores serão novamente limpos com anti-séptico cirúrgico e cobertos com um segundo campo-cirúrgico, esterilizado, individual e descartável.

Uma vez anestesiado o local, será feita então a incisão para se obter a amostra de tecido muscular. Para tal, o médico responsável utilizará uma fina e pequena lâmina de bisturi (nº11), esterilizada, individual e descartável para realizar a incisão de aproximadamente 0,5 cm de extensão. A incisão cortará a pele e a fáscia (tecido que recobre o músculo) do músculo a ser biopsiado. O indivíduo não deverá sentir qualquer dor durante a realização deste procedimento, uma vez que não há terminações nervosas sensitivas a dor na fáscia muscular ou no próprio músculo e o restante da região envolvida está anestesiada.

Feita a incisão, você será instruído a relaxar a musculatura. A agulha de biópsia, esterilizada e de uso individual, é então inserida pelo médico responsável através do orifício da incisão. Seguida de uma pequena sucção, gerada na extremidade superior externa da agulha por uma seringa de 120cc, um pequeno pedaço de músculo é puxado para o interior da agulha e cortado para ser então removido juntamente com a agulha. Durante este procedimento, o qual deve durar ao redor de 15 segundos, você deverá sentir apenas uma pequena pressão pela agulha,

e não dor. Frequentemente os sujeitos reportam ausência de qualquer sensação de desconforto.

Você será sempre informado dos procedimentos que tomarão seqüência, e após a retirada da agulha, será aplicada pressão, com ataduras de gaze esterilizadas, sobre o ponto de incisão para prevenir sangramento (usualmente não se observa qualquer sangramento). A incisão será então fechada com fita adesiva esterilizada e coberta com uma pequena atadura para prevenir o seu desprendimento. Uma faixa de crepe será envolvida na coxa, sobre a região da incisão, aplicando pressão contínua, a fim de evitar formação de edema local. Você será instruído a manter a bandagem por 24 horas e a manter a incisão limpa e seca pelo mesmo período. Também será informado que você se abstenha de exercícios de musculação pelas próximas 72 horas. Estes procedimentos diminuem a possibilidade de sangramentos e dor posteriores. No local da incisão poderá ficar uma pequena cicatriz na sua pele, que dependendo de características individuais desaparecerá com o tempo.

Alguns indivíduos podem sentir dor localizada no período de aproximadamente 24 horas após o procedimento. Tal sensação não deve ser maior do que aquela devido à realização de um exercício de musculação intenso.

As complicações devido à este procedimento são raras, e se estendem a sangramento posterior e edema local, os quais devem ser tratados com aplicação breve de frio (gelo envolvido em saco e pano), compressão e elevação da perna. Tais complicações podem estender o período pelo qual o indivíduo sentirá dor, mas uma vez que a região não apresenta grandes vasos sanguíneos ou nervos, é extremamente rara a ocorrência de complicações desta natureza.

Um folheto com as seguintes informações será entregue ao sujeito ao término do procedimento:

INSTRUÇÕES DE TRATAMENTO E CUIDADOS PÓS BIÓPSIA

1. Mantenha a incisão da biópsia limpa e seca durante pelo menos 24 horas. Não a molhe no chuveiro, banheira ou similar. Não nade no mar ou piscina durante este período.

2. Retorne ao laboratório 24 horas após o procedimento para checagem da incisão.
3. Mantenha a faixa compressiva por pelo menos 24 horas. Ela ajudará a diminuir os sintomas em caso de dor, e prevenirá a formação de edema local.
4. Em caso de anormalidades ou dúvidas, entre em contato com o médico responsável (11 3091-3168 e 11 9934-8348).

Após a obtenção inicial de tecido muscular através de biópsia, haverá um período de 1 semana antes do início do treinamento. Os mesmos procedimentos de obtenção de amostras de tecido muscular e testes de desempenho serão repetidos após 4 e 8 semanas do início do treinamento (término do período de treinamento). Desta forma, o comprometimento total de tempo do sujeito com o estudo será de treze semanas.

3. Desconfortos e riscos esperados;

Os riscos envolvidos na participação deste estudo são médios. Você poderá sentir um pouco de dor muscular tardia (24-72 horas após) decorrente dos esforços realizados nas sessões de treinamento, bem como nas ocasiões das obtenções das amostras de tecido muscular (biópsias). Este desconforto será pequeno e não impedirá você de prosseguir com as suas atividades diárias. Na preparação para a obtenção da amostra de tecido muscular você poderá sentir pequena sensação de ardor devido à aplicação do anestésico local e durante a extração da amostra você poderá sentir pressão no local e/ou contração muscular involuntária. O risco de infecção decorrente da obtenção da amostra de tecido muscular é mínimo tendo em vista todos os cuidados e procedimentos experimentais que serão tomados. Além disso, não existe na literatura específica relatos de qualquer tipo de problema decorrente da biópsia. Outra possibilidade de desconforto poderá ocorrer nos testes e nas sessões experimentais realizados em esteira rolante. Poderão ocorrer sensações de desconforto como tontura, desmaios, enjôos, além da possibilidade de dor muscular tardia.

4. Benefícios que poderão ser obtidos;

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

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

Não será possível realizar qualquer procedimento alternativo em substituição ao protocolo de treinamento, obtenção de amostras e testes de desempenho.

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

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo se colocam a disposição para esclarecer, a qualquer momento, as possíveis dúvidas sobre os procedimentos, riscos e benefícios proporcionados pelo estudo. Além disso, você tem o direito de se retirar a qualquer momento do estudo sem que isso lhe proporcione qualquer prejuízo ou transtorno. As informações obtidas durante o estudo ficarão guardadas sob sigilo e privacidade absolutos. Em caso de qualquer emergência médica, os responsáveis pelo estudo lhe acompanharão ao Hospital Universitário (HU) que se localiza na Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 - Cidade Universitária- Fone: 3039-9468.

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

Em caso de necessidade você poderá entrar em contato com o Bacharel Eduardo Oliveira de Souza: 81524376/3599191.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

Nenhuma

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 2009.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

ANEXO II APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE



Of.CEP/962007/EEFE/26.11.2007

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada em 23 de novembro de 2007, **aprovou** o Protocolo de Pesquisa n. 2007/26 – “*Treinamento Concorrente - identificação de mecanismos responsáveis pela competição entre as adaptações*”, sob sua responsabilidade.

Solicitamos a observância da apresentação de relatório ao término do desenvolvimento da pesquisa, em fevereiro de 2010.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Valmor Alberto Augusto Tricoli'.

Prof. Dr. Valmor Alberto Augusto Tricoli
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo(a). Sr(a).
Prof(a). Dr(a). Carlos Ugrinowitsch
Departamento de Esporte/EEFEUSP