

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Influência da modulação do dano muscular e da inflamação sobre o efeito da carga repetida e as vias de sinalização de hipertrofia do músculo esquelético

RENATO BARROSO

SÃO PAULO  
2013

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

Barroso, Renato

Influência da modulação do dano muscular e da inflamação sobre o efeito da carga repetida e as vias de sinalização de hipertrofia do músculo esquelético / Renato Barroso. – São Paulo : [s.n.], 2013.

86 p.

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

Orientador: Prof. Dr. Valmor A.A. Tricoli

1. Treinamento de força 2. Hipertrofia 3. Músculo Esquelético 4. Proteínas I. Título.

RENATO BARROSO

Influência da modulação do dano muscular e da inflamação sobre o efeito da carga repetida e as vias de sinalização de hipertrofia do músculo esquelético

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

Área de concentração: Biodinâmica do Movimento Humano

Orientador: Prof. Dr. Valmor A. A. Tricoli

SÃO PAULO  
2013

**BARROSO, R. Influência da modulação do dano muscular e da inflamação sobre o efeito da carga repetida e as vias de sinalização de hipertrofia do músculo esquelético.** Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

Aos Laboratórios Filgueiras pela realização das análises clínicas.

A todos aqueles que de certa forma contribuíram para o projeto, e não vou citar nomes para não correr o risco de esquecer alguém.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Vias de sinalização da hipertrofia. Adaptado de Bolster, Jefferson e Kimball (BOLSTER; JEFFERSON; KIMBALL, 2004). .....29
- Figura 2 – Desenho experimental do estudo.....33
- Figura 3 – Ilustração da vista anterior dos equipamentos utilizados para a fototerapia (os pontos escuros representam os LEDs) .....40
- Figura 4 – Pontos de aplicação da fototerapia nos músculos vasto lateral, vasto medial e reto femoral.....41
- Figura 5 – Painel A - Torque isométrico máximo absoluto (N.m, média ± desvio padrão) produzido nos diferentes momentos após a realização das duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. Painel B – Torque isométrico máximo relativo (% , média ± desvio padrão) ao momento pré nos diferentes momentos após a realização das duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. \*p<0,05 em relação ao pré para ambos os grupos #p<0,05 efeito principal da sessão de TF.....44
- Figura 6 – Log da concentração sérica de CK (u.a., média ± erro padrão) para os grupos fototerapia e placebo nos diferentes momentos. \*p<0,05 comparado com pré para ambos os grupos, #p<0,05 comparado com pré para o grupo placebo, \$p<0,05 fototerapia x placebo @ p<0,05 comparado com o mesmo momento da primeira sessão para o grupo placebo .....44
- Figura 7 – Percepção subjetiva de dor (DOR, cm, média ± desvio padrão) nos diferentes momentos após as duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. \*p<0,05 em relação do momento pré para ambos os grupos #p<0,05 em relação ao momento pré para o grupo placebo \$p<0,05 em relação ao mesmo momento após a primeira sessão de TF no grupo fototerapia @ p<0,05 em relação ao mesmo momento após a primeira sessão de TF no grupo placebo .....45
- Figura 8 – Painel A = Circunferência da coxa (cm, média ± desvio padrão) nos diferentes momentos após as duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. Painel B – Alteração da circunferência da coxa (mm, média ± desvio padrão) nos diferentes momentos após as duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. \*p<0,05 em relação do momento pré #p<0,05 efeito principal de grupo após a primeira sessão de TF.....46
- Figura 9 – Painel A - Amplitude de movimento da articulação do joelho (ADM, °, média ± desvio padrão) nos diferentes momentos para os grupos fototerapia e placebo. Painel B – Alteração na amplitude de movimento da articulação do joelho (Delta ADM, °, média ± desvio padrão) nos diferentes momentos para os grupos fototerapia e placebo. \*p<0,05 comparado com o momento pré para ambos os grupos # p<0,05 comparado com o momento pré no grupo placebo \$ p<0,05 efeito principal da sessão de TF para os valores de Delta ADM.....47
- Figura 10 – Focos de infiltração de células inflamatórias (focos de infiltração/mm<sup>2</sup>, média ± erro padrão) normalizados pela área analisada nos momentos pré e 2h para

os grupos fototerapia e placebo após as duas sessões de treinamento. \* $p < 0,05$  efeito principal de tempo em cada sessão de TF.....48

Figura 11 - Conteúdo de mTOR total (u.a. média  $\pm$  erro padrão) antes (pré) e após (2h) a realização de cada uma das duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. \* $p < 0,05$  efeito principal entre a primeira e a segunda sessão de TF .....48

Figura 12 – Conteúdo de p70<sup>S6K1</sup> fosforilada (p-p70<sup>S6K1</sup>, u.a., média  $\pm$  erro padrão) antes (pré) e após (2h) as duas sessões de treinamento nos grupos fototerapia (n=5) e placebo (n=4). .....49

Figura 13 - Conteúdo de 4E-BP1 total (u.a., média  $\pm$  erro padrão) antes (pré) e após (2h) a realização das duas sessões de treinamento nos grupos fototerapia e placebo.....50

Figura 14 - Conteúdo de proteína ribossomal S6 total (rpS6, u.a. média  $\pm$  erro padrão) antes (pré) e após (2h) a realização das duas sessões de treinamento nos grupos fototerapia e placebo.....50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de força dinâmica máxima (1RM, kg, média $\pm$ desvio padrão) e das cargas de treinamento para os grupos experimentais nos dois exercícios avaliados. ....	43
---	----



## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 .....	79
Anexo 2 .....	83

## RESUMO

BARROSO, R. **Influência da modulação do dano muscular e da inflamação sobre o efeito da carga repetida e as vias de sinalização de hipertrofia do músculo esquelético.** 2013, 89f, Tese (Doutorado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O objetivo desse estudo foi verificar o efeito da modulação do dano muscular e da resposta inflamatória, com o uso de fototerapia, no efeito da carga repetida e na ativação da via PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6K</sup> após a realização de cada uma das duas sessões de treinamento de força para membros inferiores. Vinte participantes foram divididos em dois grupos experimentais. Um dos grupos recebeu a fototerapia antes da realização da primeira sessão experimental e o outro grupo recebeu um tratamento placebo. A fototerapia consistiu na irradiação sobre o vasto lateral, o vasto medial e o reto femoral durante 90s, oferecendo uma dose de energia total de 180 J. As sessões de treinamento foram compostas de duas séries a 85% de 1-RM e duas séries a 120% de 1-RM com intervalo de dois minutos entre elas, nos exercícios *leg-press* e extensão de joelhos. Os marcadores indiretos de dano muscular (dor, amplitude de movimento, torque isométrico máximo, circunferência da coxa e creatina quinase) foram avaliados antes, 2h, 24h, 48h e 96h após o término de cada sessão de treinamento. Uma semana antes e duas horas após o término de cada sessão de treinamento, foram coletadas amostras de tecido muscular através da biópsia percutânea para análise da infiltração de células inflamatórias e das proteínas de interesse. Os resultados dessas variáveis demonstraram que a primeira sessão de treinamento induziu a ocorrência do dano muscular e da inflamação, mas a fototerapia não promoveu nenhum dos efeitos esperados sobre o dano e a inflamação. A expressão total das proteínas de interesse não foi afetada pela realização da sessão de treinamento e nem pela fototerapia. Antes do início da segunda sessão de treinamento, a quantidade de mTOR total estava mais elevada do que antes da primeira sessão. A repetição da sessão de treinamento resultou em alterações dos marcadores de dano muscular, mas a recuperação foi mais rápida do comparada com a primeira sessão, o que vai ao encontro do efeito da carga repetida (ECR). A inflamação foi semelhante entre as duas sessões. Da mesma forma que na primeira sessão, o treinamento não afetou a expressão total das proteínas de interesse. A maior quantidade de mTOR total pode significar uma adaptação protetora (ECR), aumentando a atividade mitocondrial e reduzindo o estresse oxidativo diminuindo assim a ocorrência do dano secundário.

Palavras-chave: hipertrofia, adaptações protetoras, proteína, fototerapia

## ABSTRACT

BARROSO, R. **Influence of muscle damage and inflammation modulation on the repeated bout effect and skeletal muscle hypertrophy pathway.** 2013, 89f, Tese (Doutorado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The aim of this study was to investigate the effect of muscle damage and inflammatory response modulation through phototherapy, on the repeated bout effect and PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6K1</sup> pathway activation after each of two lower-limbs resistance exercise bouts. Twenty participants were divided into two experimental groups. One of the groups was treated with phototherapy and the other one received a placebo. Phototherapy consisted of irradiating vastus lateralis, vastus medialis and the recto femoris muscles for 90s, applying a total energy dose of 180 J. Two sets at 85% of 1-RM and two sets at 120% of 1-RM were performed in the leg-press and leg extension exercises with a two-minute interval. Indirect markers of muscle damage (muscle soreness, range of motion, maximal isometric torque, thigh girth and creatine kinase, CK) were assessed before, 2h, 24h, 48, and 96h post exercise. One week before and 2h after each exercise bout, percutaneous muscle biopsies were performed to obtain muscle samples to measure inflammatory cells infiltration and some proteins of interest. The results demonstrated that the first exercise bout induced muscle damage and inflammation, but phototherapy did not have any of the expected effects on muscle damage and inflammation responses. Total protein content was not affected by the resistance exercise bout neither by the phototherapy. Before the second bout, total mTOR was elevated compared to the first bout. Repeating a resistance exercise bout affected indirect markers of muscle damage, but recovery was faster compared to the first bout, which is in accordance to the repeated bout effect theory. Also, inflammation was similar after the two bouts. Similar to the first bout, the second exercise bout did not affect total protein content. The higher total mTOR content might represent a protective response which is part of the RBE, by increasing mitochondrial activity, reducing oxidative stress and consequently secondary damage.

Keywords: hypertrophy, protective adaptation, protein, phototherapy

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVO</b> .....	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
3.1. EFEITO DA CARGA REPETIDA .....	19
3.2. DANO MUSCULAR E INFLAMAÇÃO.....	22
3.3. FOTOTERAPIA .....	25
3.4. VIA DA PI3K/AKT/MTOR/P70 <sup>s6k1</sup> .....	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
4.1. AMOSTRA .....	32
4.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.3. TESTE DE FORÇA DINÂMICA MÁXIMA (1RM) .....	33
4.4. MEDIÇÃO DOS MARCADORES INDIRETOS DE DANO MUSCULAR .....	33
<b>4.4.1. Torque isométrico máximo</b> .....	33
<b>4.4.2. Concentração sérica de creatina quinase (CK)</b> .....	34
<b>4.4.3. Amplitude de Movimento</b> .....	34
<b>4.4.4. Circunferência da coxa</b> .....	35
<b>4.4.5. Percepção subjetiva de dor</b> .....	35
4.5. BIÓPSIA MUSCULAR .....	36
4.6. QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS mTOR TOTAL, p-p70 <sup>s6k1</sup> , 4E-BP1 total, rpS6 TOTAL.....	37
<b>4.6.1 Extração das proteínas totais dos músculos esqueléticos</b> .....	37
<b>4.6.2 Análise proteica por ensaio imunoenzimático (ELISA)</b> .....	37
<b>4.6.3 Análise protéica por immunoblotting</b> .....	38
4.7 MENSURAÇÃO DA INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.....	39

4.8. PROTOCOLO DE TREINAMENTO DE FORÇA .....	39
4.9. TRATAMENTO EXPERIMENTAL .....	40
4.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	41
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
5.1. MARCADORES INDIRETOS DE DANO MUSCULAR. ....	43
<b>5.1.1. Torque isométrico máximo</b> .....	<b>43</b>
<b>5.1.2. Creatina quinase (CK)</b> .....	<b>44</b>
<b>5.1.3. Percepção subjetiva de dor (DOR)</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1.4. Circunferência da coxa (CIR)</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1.5. Amplitude de movimento (ADM)</b> .....	<b>46</b>
5.2. MARCADORES DE INFLAMAÇÃO MUSCULAR.....	47
<b>5.2.1 Avaliação da infiltração de células inflamatórias</b> .....	<b>47</b>
5.3. COMPONENTES DA SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/MTOR.....	48
<b>5.3.1. mTOR total</b> .....	<b>48</b>
<b>5.3.2. p-p70<sup>s6k1</sup></b> .....	<b>49</b>
<b>5.3.3. 4E-BP1 total</b> .....	<b>49</b>
<b>5.3.4. Proteína Ribossomal S6 total (rpS6)</b> .....	<b>50</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
6.1 EFEITOS DA FOTOTERAPIA SOBRE O DANO MUSCULAR, A INFLAMAÇÃO E A SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA HIPERTROFIA APÓS UMA SESSÃO DE TREINO.....	51
6.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS SESSÕES DE TREINAMENTO DE FORÇA – EFEITO DA CARGA REPETIDA .....	56
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é um tecido altamente plástico, capaz de produzir adaptações específicas a diferentes tipos de estímulos, desde alterações na atividade neuromuscular até a disponibilidade de substratos. Alguns exemplos podem ser notados quando os indivíduos são submetidos a situações como o treinamento de resistência aeróbia, a imobilização dos segmentos corporais ou o treinamento de força, (HORTOBÁGYI; DEMPSEY; FRASER; ZHENG; HAMILTON; LAMBERT; DOHM, 2000; CAMPOS; LUECKE; WENDELN; TOMA; HAGERMAN; MURRAY; RAGG; RATAMESS; KRAEMER; STARON, 2002; PUTMAN; XU; GILLIES; MACLEAN; BELL, 2004).

Quando o músculo é submetido a um estímulo como o apresentado pelo treinamento de força (TF), as principais adaptações são o aumento da força muscular e da área da secção transversa do músculo esquelético (hipertrofia). Essas adaptações podem contribuir para a melhora da qualidade de vida e do desempenho físico-esportivo e também para a reabilitação e prevenção de quedas e lesões (CWIKEL; FRIED; GALISNKY; RING, 1995; DESCHENES; KRAEMER, 2002; BENEKE; HUTLER, 2005)

Considerando a importância do aumento da massa muscular para as situações citadas anteriormente, o entendimento dos principais estímulos responsáveis por desencadear o processo de hipertrofia é fundamental para aperfeiçoar a prescrição de programas de TF. Atualmente, a hipertrofia muscular é uma das adaptações do TF de maior interesse na comunidade científica e vários estudos têm investigado os mecanismos responsáveis pelo aumento da massa muscular, bem como o melhor modelo de treinamento para maximizar tal efeito (BRANDENBURG; DOCHERTY, 2002; AHTIAINEN; PAKARINEN; ALEN; KRAEMER; HAKKINEN, 2003; ADAMS; CHENG; HADDAD; BALDWIN, 2004; ELIASSON; ELFEGOUN; NILSSON; KOHNKE; EKBLUM; BLOMSTRAND, 2006; HULMI; TANNERSTEDT; SELANNE; KAINULAINEN; KOVANEN; MERO, 2009).

Acredita-se que o processo de hipertrofia muscular seja dependente de diferentes estímulos, como o estresse metabólico, o mecânico e o humoral. O estímulo metabólico se refere aos desequilíbrios na homeostase local enquanto que o estímulo mecânico diz respeito ao grau de tensão desenvolvido, ao volume de

treino realizado e ao dano estrutural decorrente das contrações musculares. O estímulo humoral está relacionado às substâncias liberadas na circulação sanguínea bem como no tecido muscular (hormônios, citocinas e fatores de crescimento) que criam um ambiente endógeno favorável ao aumento da síntese protéica.

É interessante notar que o dano muscular induzido pelas contrações musculares durante o TF pode constituir um importante elo entre os estímulos mecânico e humoral e desempenhar um papel importante para desencadear o processo de hipertrofia (MORGAN; PARTRIDGE, 2003). O dano muscular decorrente do exercício físico é frequentemente iniciado por um evento mecânico, é caracterizado pelo rompimento de alguns sarcômeros nas miofibrilas e resulta em sintomas que incluem a dor muscular de início tardio, a liberação de enzimas no sangue, redução da funcionalidade e da amplitude de movimento.

Após a ocorrência do dano muscular, existe uma resposta inflamatória. Na etapa inicial da inflamação, neutrófilos são atraídos para o local afetado e liberam substâncias que facilitam a fagocitose dos fragmentos da lesão. No entanto, essas substâncias liberadas também afetam partes do tecido que permaneceram intactas após o estímulo mecânico, resultando no aumento da área de lesão (TIDBALL, 2005; KOH; PIZZA, 2009). Esse aumento é conhecido como dano secundário. Pizza, Peterson, Bass e Koh (2005) reportaram que o menor acúmulo de neutrófilos está associado a uma recuperação mais rápida da força após um protocolo de exercícios para induzir dano muscular. Assim, é possível que a resposta inflamatória inicial, apesar de importante para retirar os fragmentos de tecido danificado e proporcionar a regeneração, pode ampliar o dano inicial, provocando maior degradação protéica e retardando a recuperação (ALMEKINDERS, 1999).

Adicionalmente, tem sido demonstrado que o dano muscular diminui sensivelmente nas sessões subsequentes ao estímulo inicial, em um fenômeno conhecido como “efeito da carga repetida” (ECR) (NOSAKA; CLARKSON, 1995). De forma paradoxal, a resposta inflamatória induzida pelo dano muscular parece ter também um papel importante no ECR (LAPOINTE; FREMONT; COTE, 2002; PIZZA; KOH; MCGREGOR; BROOKS, 2002), pois se essa resposta inflamatória após uma sessão de TF é inibida, o ECR pode ser minimizado ou até mesmo inibido (LAPOINTE; FREMONT; COTE, 2002). Desta forma, sessões que induzissem menor grau de dano e menor resposta inflamatória, provocariam menor efeito protetor. De fato, protocolos de TF que induzem maior grau de dano muscular promovem maior

efeito protetor (NOSAKA; NEWTON, 2002a; b). Portanto, a modulação do grau de dano muscular e da inflamação pode interferir diretamente nas adaptações protetoras.

Um método relativamente recente, mas que tem se mostrado bastante eficaz em reduzir o dano muscular, além de acelerar a resolução do processo inflamatório decorrente da lesão aos tecidos moles, é a fototerapia (LIU; ZHOU; LIU; YUAN, 2009; BARONI; LEAL JUNIOR; DE MARCHI; LOPES; SALVADOR; VAZ, 2010a). Essa terapia consiste na aplicação de luz sobre o local afetado com a utilização de diodos emissores de laser (terapia de laser de baixa intensidade) ou de luz (LEDs). A fototerapia contribui tanto para elevar processos relacionados à respiração mitocondrial, como o aumento do transporte de elétrons, da atividade enzimática e da produção de ATP (LAKYOVA; TOPORCER; TOMECKOVA; SABO; RADONAK, 2010; HUANG; NAGATA; TEDFORD; MCCARTHY; HAMBLIN, 2012), quanto para aumentar a microcirculação local (IHSAN, 2005) e reduzir a liberação de espécies reativas de oxigênio (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004). Esses efeitos diminuem a inflamação e o estresse oxidativo reduzindo o dano secundário (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004) e podem ser suficientes para inibir alterações nos marcadores de dano e de inflamação musculares e reduzir o tempo necessário para recuperação (CAMARGO; SIQUEIRA; PRETI; NAKAMURA; DE LIMA; DIAS; TOGINHO FILHO ; RAMOS 2012).

É possível, então, que essa diminuição da magnitude do dano muscular e do processo inflamatório atenuem as adaptações protetoras (ECR), permitindo que uma sessão subsequente de TF induza novamente um alto grau de dano muscular. Assumindo que o dano muscular constitui um potente estímulo para a hipertrofia (SCHOENFELD, 2012), essa seria uma estratégia interessante de maximizar os efeitos hipertróficos do treinamento, uma vez que ele poderá contribuir mais frequentemente para o desencadeamento das respostas agudas ao TF.

Recentemente, o estudo das vias de sinalização intracelular do processo de hipertrofia muscular tem atraído grande interesse. A via PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6K1</sup> tem sido amplamente reconhecida como uma das principais controladoras do crescimento celular (NADER, 2005). O aumento da atividade dessa via parece ser necessário para a hipertrofia estimulada tanto pela tensão muscular (BODINE; STITT; GONZALEZ; KLINE; STOVER; BAUERLEIN; ZLOTCHENKO; SCRIMGEOUR; LAWRENCE; GLASS; YANCOPOULOS, 2001; NADER, 2005)



quanto por fatores de crescimento e controladores do processo inflamatório (BODINE et al., 2001; MARKWORTH; CAMERON-SMITH, 2011).

Corradetti e Guan (2006) destacaram que um dos mecanismos pelo qual essa via exerce tal regulação é através da fosforilação de uma proteína chave da tradução, a p70<sup>s6k1</sup>. O TF induz a fosforilação da p70<sup>s6k1</sup> (KOOPMAN; ZORENC; GRANSIER; CAMERON-SMITH; VAN LOON, 2006; TERZIS; GEORGIADIS; STRATAKOS; VOGIATZIS; KAVOURAS; MANTA; MASCHER; BLOMSTRAND, 2008), e tal fosforilação tem relação com o aumento de massa muscular resultante deste tipo de treinamento (BAAR; ESSER, 1999; TERZIS et al., 2008). De forma ainda mais interessante, contrações excêntricas, reconhecidas por promoverem maior grau de dano (CLARKSON; SAYERS, 1999), parecem ser mais capazes de estimular a via mTOR/p70<sup>s6k1</sup> (ELIASSON et al., 2006; BURRY; HAWKINS; SPANGENBURG, 2007), permitindo sugerir a possível importância do dano muscular no processo de ativação da via.

Deve ser lembrado que a magnitude do dano muscular tende a diminuir com a continuidade do TF, devido às adaptações protetoras. Considerando a possível influência do dano e da inflamação (TRAPPE; FLUCKEY; WHITE; LAMBERT; EVANS, 2001; TRAPPE; WHITE; LAMBERT; CESAR; HELLERSTEIN; EVANS, 2002; NOVAK; BILLICH; SMITH; SUKHIJA; MCLOUGHLIN; HORNBERGER; KOH, 2009) no desencadeamento dos processos associados à síntese protéica, é razoável assumir que estratégias para manter a ocorrência do dano mais elevada ao longo do tempo sejam importantes para a maximização da hipertrofia do músculo esquelético. Assim, a utilização da fototerapia pode resultar na aceleração da resolução do processo inflamatório, reduzindo a magnitude do efeito protetor da carga e permitindo a manutenção do dano em níveis mais elevados, resultando então em um estímulo mais potente para o processo de hipertrofia muscular.

## 2. OBJETIVO

Verificar o efeito do dano muscular e da resposta inflamatória no efeito da carga repetida e na ativação da via PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6k1</sup> após a realização de duas sessões de treinamento de força para membros inferiores.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as alterações nos marcadores indiretos de dano muscular em dois grupos, placebo e fototerapia, após duas sessões de treinamento de força.
- Comparar as alterações na inflamação em dois grupos, placebo e fototerapia, após duas sessões de treinamento de força.
- Comparar as alterações na via de sinalização da hipertrofia em dois grupos, placebo e fototerapia, após duas sessões de treinamento de força.
- Comparar o efeito da carga repetida em dois grupos, placebo e fototerapia, após duas sessões de treinamento de força.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

A hipertrofia muscular é uma das adaptações ao TF que atrai maior interesse na comunidade científica atualmente. Vários estudos têm tentado elucidar os mecanismos responsáveis pelo aumento da massa muscular, bem como desenvolver melhores estratégias de treinamento para otimizar essa adaptação (TAKARADA; TAKAZAWA; SATO; TAKEBAYASHI; TANAKA; ISHII, 2000; HORNBERGER; ESSER, 2004; ELIASSON et al., 2006; HORNBERGER; CHIEN, 2006; SPANGENBURG; MCBRIDE, 2006; TERZIS et al., 2008).

Diferentes métodos de TF foram criados por treinadores e praticantes ao longo dos anos com o objetivo de maximizar a hipertrofia muscular (FLECK; KRAEMER, 2003). Esses métodos de TF foram desenvolvidos baseados nos estímulos conhecidos por desencadear o processo de hipertrofia do músculo esquelético: o metabólico, o mecânico e o humoral. O estímulo metabólico se refere aos desequilíbrios na homeostase corporal induzidos pelo custo energético da atividade motora realizada. O estímulo mecânico diz respeito ao grau de tensão desenvolvido e o dano estrutural decorrentes das contrações musculares utilizadas. Já o estímulo humoral está relacionado às substâncias liberadas na circulação sanguínea bem como no tecido muscular (hormônios, citocinas e fatores de crescimento) que criam um ambiente endógeno favorável ao aumento da síntese protéica.

Assim, diferentes métodos de treinamento tentam enfatizar esses estímulos. Em teoria, em alguns métodos desenvolvidos como, por exemplo, o método da *pré-exaustão*, o estímulo metabólico seria enfatizado, enquanto que no método do *treinamento negativo* o estímulo mecânico seria maximizado (FLECK; KRAEMER, 2003), e no método com oclusão vascular o estímulo humoral sobressai (TAKARADA; NAKAMURA; ARUGA; ONDA; MIYAZAKI; ISHII, 2000).

Até o momento não é conhecido qual dos estímulos é o mais importante para o aumento da massa muscular. Porém, a importância do estímulo metabólico pode ser parcialmente questionada. Estudos têm reportado maior hipertrofia originada com ações excêntricas do que com concêntricas (HIGBIE; CURETON; WARREN; PRIOR, 1996; HORTOBÁGYI; HILL; HOUMARD; FRASER; LAMBERT; ISRAEL, 1996) e que as ações excêntricas geram menor gasto energético do que as

ações concêntricas (LINDSTEDT; LASTAYO; REICH, 2001) e, portanto oferecem um estímulo metabólico menor. Por outro lado, como durante as ações excêntricas a tensão desenvolvida por cada fibra ativa e o dano muscular são maiores, o estímulo mecânico parece representar um estímulo mais potente para a hipertrofia.

Em uma recente revisão, Schoenfeld (2012) apresenta evidências, como a ativação das vias de sinalização para hipertrofia e de células satélites e a liberação de IGF-1, que sugerem a associação existente entre dano e hipertrofia. Dessa maneira, o dano muscular pode representar um elo entre os diferentes estímulos (mecânico, metabólico e humoral). Assim, o aumento do grau de dano (estímulo mecânico) muscular também resultaria em maior estímulo humoral.

As ações excêntricas possuem características que as tornam únicas comparadas com as concêntricas (ENOKA, 1996). É possível que os modelos de treinamento que utilizam somente ações excêntricas proporcionem melhor entendimento do papel do dano no processo hipertrófico por induzirem maior dano muscular do que os modelos de treinamento que utilizam ações concêntricas (KOMULAINEN; KALLIOKOSKIM; KOSKINEN; DROST; KULPERS; HESSELINK, 2000; ELIASSON et al., 2006). Porém, esses modelos utilizam um número muito elevado de repetições (até 300 ações), aumentando demasiadamente a ocorrência de dano. Adicionalmente, a realização de treinamento apenas com ações excêntricas não representa um modelo que possa ser realizado com pesos livres no cotidiano dos praticantes de TF. Como a magnitude do dano muscular induzido por esses modelos é mais elevada do que a provocada pelos protocolos de treinamentos tradicionais (NOSAKA; NEWTON, 2002b), os efeitos estudados com ações exclusivamente excêntricas podem não representar os efeitos observados com modelos de treinamento de aplicação mais prática. Além disso, Schoenfeld (2012) sugere que é possível que exista uma magnitude de dano ótima para ativar adequadamente as vias de sinalização de hipertrofia.

Infelizmente, as ações excêntricas possuem características neurais e mecânicas singulares que podem interferir na interpretação dos dados resultantes desses estudos (ENOKA, 1996). Além do elevado grau de dano resultante da realização das ações excêntricas, o alongamento das fibras musculares, a maior tensão desenvolvida pelas fibras e a ativação de canais ativado pelo alongamento (*stretch-activated channels*) podem representar importantes estímulos para as vias de sinalização de hipertrofia (GOLDSPINK, 1999; MARTINEAU; GARDINER, 2001;

SPANGENBURG; MCBRIDE, 2006; BUTTERFIELD; BEST, 2009). Assim, muitos dos efeitos que são associados ao dano muscular podem, na verdade, ser resultados do alongamento ativo (GOLDSPINK, 1999), do grau de tensão (MARTINEAU; GARDINER, 2001) e/ou da ativação dos canais ativados pelo alongamento (SPANGENBURG; MCBRIDE, 2006; BUTTERFIELD; BEST, 2009).

Outro fator que contribui para dar suporte à relação dano-hipertrofia é o fato de que o dano muscular dá origem a uma resposta inflamatória, que também pode estimular as vias de sinalização da hipertrofia (WEINHEIMER; JEMIOLO; CARROLL; HARBER; HAUS; BURD; LEMOINE; TRAPPE; TRAPPE, 2007; NOVAK et al., 2009), a ativação de células satélites (JARVINEN; JARVINEN; KAARIAINEN; AARIMAA; VAITTINEN; KALIMO; JARVINEN, 2007) e a síntese protéica (BURD; DICKINSON; LEMOINE; CARROLL; SULLIVAN; HAUS; JEMIOLO; TRAPPE; HUGHES; SANDERS; TRAPPE, 2010). Apesar de tentadora, essas evidências pressupõem a necessidade da ocorrência de dano ao longo de todo o período de treinamento. Entretanto, a continuidade do TF promove um efeito protetor nos músculos exercitados, o qual diminui consideravelmente a ocorrência do dano em sessões de treinamento subsequentes (NOSAKA; CLARKSON, 1995; BARROSO; ROSCHEL; UGRINOWITSCH; ARAUJO; NOSAKA; TRICOLI, 2010). Esse fenômeno é conhecido como *repeated bout effect* (NOSAKA; CLARKSON, 1995). A existência desse efeito protetor pode representar um fator limitante no papel do dano muscular como potente estímulo para a hipertrofia.

Se a relação dano-hipertrofia é real, então estratégias de treinamento deveriam ser desenvolvidas na tentativa de evitar o aparecimento do ECR e assim manter o dano elevado mesmo após as sessões subsequentes de TF. Para tanto, é fundamental o entendimento dos mecanismos responsáveis pelo ECR.

### 3.1. EFEITO DA CARGA REPETIDA

Está bem estabelecido que a execução de sessões de treinamento físico com exercícios aos quais os indivíduos não estejam acostumados (especialmente aqueles em que são realizadas ações excêntricas) provoca a ocorrência de dano à musculatura esquelética (NOSAKA; CLARKSON, 1995; BROWN; CHILD; DAY; DONNELLY, 1997b; a; CLARKSON, 1997; TALBOT; MORGAN, 1998; BYRNE; ESTON; EDWARDS, 2001). Durante uma ação excêntrica, o torque produzido pelo músculo é menor do que o torque gerado por uma carga externa, fazendo com que o

músculo seja alongado mesmo produzindo tensão. Com esse aumento do comprimento, e consequente redução da sobreposição dos miofilamentos, os sarcômeros trabalham na parte descendente (2,25 - 3,6  $\mu\text{m}$ ) da curva força-comprimento. Existem alguns sarcômeros que são mais fracos do que outros e uma vez nessa parte da curva, eles são incapazes de suportar a tensão sendo submetidos às maiores taxas de alongamento e eventualmente se rompendo (MORGAN, 1990). Este evento é parcialmente responsável pela queda no desempenho de força observado após a ocorrência do dano muscular.

O dano muscular é comumente diagnosticado pelas alterações nos marcadores indiretos como a concentração sanguínea de enzimas intramusculares, o desempenho de força muscular, a amplitude de movimento e a formação de edema.

A manipulação do volume e da intensidade das ações musculares durante a sessão inicial é capaz de interferir na magnitude desse efeito protetor. O maior número de repetições realizado (NOSAKA; SAKAMOTO; NEWTON; SACCO, 2001b) ou a maior intensidade das contrações musculares (FLANN; LASTAYO; MCCLAIN; HAZEL; LINDSTEDT, 2011) promove maior proteção. Sabendo que o volume e a intensidade mais elevados também interferem na magnitude do dano inicial (NOSAKA; NEWTON, 2002b; CHAPMAN; NEWTON; SACCO; NOSAKA, 2006) é possível sugerir, então, que a extensão do dano inicial afete o efeito da carga repetida (ECR). Apesar de os mecanismos responsáveis pelas adaptações protetoras presentes no ECR ainda não estarem completamente elucidados, sabe-se que esse efeito protetor persiste por muitas semanas após a sessão inicial (NOSAKA; SAKAMOTO; NEWTON; SACCO, 2001a). Embora o dano muscular e o ECR tenham sido estudados em modelos de treinamento que utilizaram exclusivamente ações excêntricas, o mesmo efeito é observado em protocolos de treinamento tradicionais, em que são realizadas as ações concêntrica e excêntrica (NEWTON; MORGAN; SACCO; CHAPMAN; NOSAKA, 2008). Deve ser destacado que as ações excêntricas possuem características neurais singulares e diferentes das ações concêntricas. O número de unidades motoras (e fibras musculares) ativas é menor (KOMI; BUSKIRK, 1972), e existe a possibilidade de que o recrutamento muscular ignore o princípio do tamanho e ative seletivamente as unidades motoras compostas de fibras musculares do tipo IIb (NARDONE; ROMANO; SCHIEPPATI, 1989). O menor número de fibras ativas significa que o grau de tensão imposto

sobre cada uma delas é bastante elevado, eventualmente provocando o dano muscular. Além disso, as fibras do tipo IIb são mais susceptíveis à ocorrência das micro lesões (LIEBER; FRIDEN, 1988); assim, o recrutamento seletivo dessas fibras poderia elevar o dano provocado pelas contrações musculares excêntricas.

McHugh (2003) apresenta três possíveis mecanismos responsáveis por esse efeito protetor: o neural, o mecânico e o celular. As evidências para o mecanismo neural se baseiam no fato de que a amplitude e a frequência mediana do sinal eletromiográfico (EMG) são, respectivamente, aumentada (MCHUGH; CONNOLLY; ESTON; GARTMAN; GLEIM, 2001) e diminuída (WARREN; HERMANN; INGALLS; MASSELLI; ARMSTRONG, 2000) quando a sessão de treinamento é repetida. O aumento da amplitude da EMG refletiria um maior número de fibras ativas, o que proporcionaria melhor distribuição da força produzida entre elas; enquanto que a diminuição da frequência mediana seria consequência do recrutamento de fibras mais lentas (tipo I) e mais resistentes à tensão produzida pela sobrecarga. Contudo, o ECR é observado mesmo em condições em que as contrações não sofrem influência do controle voluntário (eletroestimuladas) (NOSAKA; NEWTON; SACCO, 2002), o que coloca dúvida sobre o mecanismo neural. Essas adaptações foram estudadas apenas com ações excêntricas e não se conhece se elas acontecem da mesma maneira em protocolos de treinamento tradicionais que utilizam tanto ações concêntricas como excêntricas.

O mecanismo mecânico está relacionado a adaptações que afetem o *stiffness* (i.e. rigidez) da unidade músculo-tendínea. A expressão de proteínas não contráteis, responsáveis pela estabilidade e rigidez do citoesqueleto, como a desmina e a titina, é aumentada após a execução de protocolos de treinamento que induzam dano na estrutura muscular (BARASH; PETERS; FRIDEN; LUTZ; LIEBER, 2002). O aumento da expressão dessas proteínas aumenta o *stiffness* muscular, culminando com maior resistência a ocorrência de dano. Por outro lado, músculos que apresentam menor quantidade de desmina e menor *stiffness* parecem ser menos susceptíveis a ocorrência de dano (SAM; SHAH; FRIDEN; MILNER; CAPETANAKI; LIEBER, 2000). Dessa forma, o significado do *stiffness* muscular para a ocorrência do dano e do ECR ainda não está completamente esclarecido.

Dentre os mecanismos citados por McHugh (2003), o mais atraente parece ser o celular. Apesar desse mecanismo estabelecer que o ECR depende de adaptações como a adição longitudinal de sarcômeros (LYNN; MORGAN, 1994) e

no acoplamento excitação contração (WARREN; INGALLS; LOWE; ARMSTRONG, 2001), a adaptação mais convincente está relacionada à inflamação originada em resposta a ocorrência do dano muscular.

A magnitude da adaptação protetora é proporcional à da resposta inflamatória (LAPOINTE; FREMONT; COTE, 2002). Por exemplo, Lapointe, Fremont e Cote (2002) submeteram os músculos dorsiflexores de ratos a duas sessões de ações excêntricas eletricamente induzidas, e observaram as alterações na força (indicador de dano) e na concentração dos macrófagos (marcador inflamatório) antes, e dois dias após cada sessão. Os ratos foram divididos em um grupo que não foi tratado com anti-inflamatório e outros dois que receberam o tratamento por dois ou sete dias. A primeira sessão provocou uma diminuição de 45% na força no grupo sem tratamento e 25% nos grupos experimentais, enquanto que a concentração de macrófagos aumentou 10 e cinco vezes, respectivamente. Após a segunda sessão, apenas o ratos tratados com anti-inflamatório apresentaram diminuição da força e aumento na concentração de macrófagos, e essa resposta foi mais acentuada no grupo que recebeu o tratamento por sete dias. Isso mostra que a adaptação protetora foi provavelmente dependente do nível de inflamação.

Além disso, sabe-se que resposta inflamatória é associada ao grau de dano induzido (PIZZA et al., 2002). Assim, quanto maior a magnitude do dano maior a resposta inflamatória e mais proteção essas adaptações confeririam à estrutura muscular. Corroborando com esses resultados, Koh e Brooks (2001) e Koh, Peterson, Pizza e Brooks (2003) observaram que mesmo exercícios (alongamento ou contrações isométricas) que não promovam grande ocorrência de dano muscular também são capazes de originar adaptações protetoras, apesar de reduzidas. Essas informações vão ao encontro dos resultados apresentados anteriormente (NOSAKA et al., 2001b), em que sessões de exercícios que causem menor magnitude dano muscular, também são responsáveis por ECR atenuado.

Assim, é importante conhecer os processos associados à inflamação decorrente do dano muscular.

### 3.2. DANO MUSCULAR E INFLAMAÇÃO

A resposta inflamatória é um mecanismo fisiológico envolvendo interações complexas entre células do sistema imunológico (circulantes e residentes) e tecido vascular (células endoteliais e do músculo liso), com objetivo de



eliminar do organismo a causa inicial da lesão e suas consequências (SMITH; KRUGER; SMITH; MYBURGH, 2008). A magnitude da inflamação depende da severidade da lesão e da vascularização do tecido lesionado. Quanto mais severa ou maior a vascularização, maior será a resposta inflamatória (SMITH et al., 2008).

O processo inflamatório agudo refere-se à resposta que começa de maneira abrupta e precoce. No caso do dano muscular, essa agressão tecidual é seguida de fenômenos vasculares como a) vasodilatação e diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo local que resulta em elevação da temperatura local e rubor e b) aumento da permeabilidade vascular. Ambos os eventos culminam com o extravasamento de proteínas intracelulares, com o recrutamento de leucócitos para o espaço intersticial e com a formação de edema. Em seguida, inicia-se a produção local de mediadores inflamatórios que promovem um aumento da permeabilidade capilar e também quimiotaxia, processo químico pelo qual células polimorfonucleares (neutrófilos e macrófagos) são atraídas para o foco da lesão (MOLDOVEANU; SHEPHARD; SHEK, 2001; JARVINEN; JARVINEN; KAARIAINEN; KALIMO; JARVINEN, 2005). Estas células fagocitam os elementos que estão na origem da inflamação e produzem mais mediadores químicos, como as citocinas (por exemplo: o fator de necrose tumoral, TNF, e a família de interleucinas, IL), a bradicinina, as prostaglandinas e os leucotrienos (AL-NAEMI; BALDWIN, 1999; WEBSTER; GALLEY, 2003). Esses eventos são responsáveis pelo reconhecimento do local da lesão através das células inflamatórias, com posterior remoção do agente causador da lesão e retirada de células e tecidos danificados, além do reparo e restabelecimento do equilíbrio no local afetado (SMITH et al., 2008).

Independentemente do estímulo agressor, as células lesionadas iniciam a cascata de eventos com a secreção das citocinas IL-1 e TNF- $\alpha$ , causando assim, a liberação de um segundo conjunto de citocinas que inclui também as IL-6 e IL-8 e as proteínas inflamatórias (MIP-1) e quimiotáticas de macrófagos. A IL-1 e a IL-8 atraem para o sítio inflamatório monócitos e neutrófilos, que secretam um terceiro conjunto de citocinas, incluindo o TNF- $\alpha$ , que exacerbam a resposta inicial (BAUMANN; GAULDIE, 1994; VOLTARELLI; LOUGHRAN JUNIOR, 1994). Essa sequência de eventos garante que todas as células do corpo possam se envolver na iniciação e propagação dessa resposta.

O exercício físico não habitual induz alterações musculares locais, o dano muscular. Após a ocorrência do dano muscular, ocorrem alterações nas populações

de células inflamatórias circulantes. Inicialmente neutrófilos são recrutados para o local afetado pelas microlesões, onde produzem enzimas proteolíticas para a limpeza e reparo do tecido lesionado. Os neutrófilos fagocitam a fibra muscular lesionada por meio de ativação do sistema enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH-oxidase) e da liberação de enzimas proteolíticas, como a mieloperoxidase, a partir dos seus grânulos intracelulares. Essa resposta não é específica, podendo acarretar lesão de células adjacentes ao local lesionado (NIEMAN; DAVIS; HENSON; GROSS; DUMKE; UTTER; VINCI; CARSON; BROWN; MCANULTY; MCANULTY; TRIPLETT, 2005; HONG; KO; CHO; KIM; MA; YU; FRIEDLINE; KURT-JONES; FINBERG; FISCHER; GRANGER; NORBURY; HAUSCHKA; PHILBRICK; LEE; ELIAS; KIM, 2009). Essa consiste em uma das explicações para a ocorrência de lesão secundária. Contudo, Knight (1976) também sugere que a lesão secundária seja causada por hipóxia, aumentando o estresse oxidativo sobre as células sobreviventes, ampliando a extensão da área lesionada.

Alguns estudos concordam que restringir a extensão da inflamação durante a fase aguda pode limitar a ocorrência de lesão secundária e ser benéfico para diminuir a dor e o edema (DOLAN; THORNTON; FISH; MENDEL, 1997; MERRICK; RANKIN; ANDRES; HINMAN, 1999; DEAL; TIPTON; ROSENCRANCE; CURL; SMITH, 2002; SCHASER; DISCH; STOVER; LAUFFER; BAIL; MITTLMEIER, 2007; SMITH et al., 2008). Esses estudos dão suporte para a utilização de estratégias antiinflamatórias nessa fase com o intuito de restringir a lesão e acelerar a recuperação. A estratégia comumente utilizada para atingir esse efeito é conhecida em inglês como *RICE*: descanso (*rest*), gelo (*ice*), compressão (*compression*) e elevação (*elevation*).

Muitos treinadores e praticantes de atividades físicas costumam fazer uso, além da crioterapia (aplicação de gelo sobre o local lesionado), de drogas antiinflamatórias para minimizar a dor e acelerar a recuperação. No entanto, a utilização de drogas antiinflamatórias pode prejudicar a regeneração muscular (BONDESEN; MILLS; KEGLEY; PAVLATH, 2004) e reduzir a síntese protéica (BURD et al., 2010).

Recentemente, novas estratégias não farmacológicas têm sido utilizadas no intuito de controlar a inflamação e acelerar a recuperação pós dano muscular induzido pelo exercício. Dentre elas, a terapia com utilização de luz, ou fototerapia,

tem se mostrado extremamente eficiente no controle da inflamação (POSTEN; WRONE; DOVER; ARNDT; SILAPUNT; ALAM, 2005; AIMBIRE; LOPES-MARTINS; CASTRO-FARIA-NETO; ALBERTINI; CHAVANTES; PACHECO; LEONARDO; IVERSEN; BJORDAL, 2006b; BJORDAL; JOHNSON; IVERSEN; AIMBIRE; LOPES-MARTINS, 2006; ALBERTINI; VILLAVERDE; AIMBIRE; SALGADO; BJORDAL; ALVES; MUNIN; COSTA, 2007).

### 3.3. FOTOTERAPIA

A fototerapia consiste na aplicação de energia luminosa sobre sistemas biológicos, a qual estimula ou inibe processos intracelulares. No caso de utilização com o objetivo de atingir o músculo esquelético, a aplicação é realizada em contato com a pele diretamente sobre o músculo de interesse (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004; LEAL JUNIOR; LOPES-MARTINS; VANIN; BARONI; GROSSELLI; DE MARCHI; IVERSEN; BJORDAL, 2009c). A utilização da luz como estratégia terapêutica tem mostrado resultados positivos sobre a modulação de processos biológicos como o aumento da síntese de ATP e atividade da citocromo c oxidase, tanto em animais quanto em humanos (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004). A maior parte dos estudos utilizou a fototerapia através da aplicação de lasers de baixa intensidade (MEDRADO; SOARES; SANTOS; REIS; ANDRADE, 2008; LEAL JUNIOR; LOPES-MARTINS; BARONI; DE MARCHI; TAUFER; MANFRO; RECH; DANNA; GROSSELLI; GENEROSI; MARCOS; RAMOS; BJORDAL, 2009a; LIU et al., 2009; BARONI et al., 2010a; LEAL JUNIOR; LOPES-MARTINS; DE ALMEIDA; RAMOS; IVERSEN; BJORDAL, 2010; BAPTISTA; MARTINS; PAVESI; BUSSADORI; FERNANDES; PINTO JUNIOR ; FERRARI, 2011). Porém, existem evidências que demonstram que os efeitos terapêuticos da fototerapia são independentes da fonte de luz (diodos emissores de luz, LED, ou de laser) e dependem da dose de energia e do comprimento de onda utilizado (ENWEMEKA, 2005; SMITH, 2005; LEAL JUNIOR; LOPES-MARTINS; ROSSI; DE MARCHI; BARONI; DE GODOI; MARCOS; RAMOS; BJORDAL, 2009b; BARONI; LEAL JUNIOR; GEREMIA; DIEFENTHAELER; VAZ, 2010b).

A dose de energia é calculada pela potência emitida por cada diodo emissor de luz multiplicada pelo tempo de aplicação (KARU, 1987). Enwemeka (2008) afirmou que apesar de a dose de energia ser um importante fator a ser controlado, há de se considerar o tempo de aplicação e a potência dos diodos. Uma

mesma dose oferecida por períodos de tempo diferentes pode fazer com que ela seja terapêutica ou prejudicial (ENWEMEKA, 2008). Se o objetivo é diminuir a ocorrência do dano muscular e acelerar a resolução da inflamação, as doses devem ser aplicadas por períodos mais longos. Assim, com o intuito de investigar os efeitos da fototerapia nos marcadores de dano muscular induzido pelo exercício (75 contrações excêntricas máximas) em humanos, Baroni et al. (2010a) realizaram a aplicação de um laser infravermelho (810 nm) com duração de 30 s em seis pontos do quadríceps, totalizando uma dose de energia de 180 J. Essa dose aplicada durante esse tempo foi suficiente para que as alterações de alguns dos marcadores de dano fossem atenuadas, sugerindo que pode ser utilizada com sucesso para essa finalidade.

O comprimento de onda é a distância em que a forma de uma onda se repete, e para a luz, esse está associado às cores, vermelho ou infravermelho (no caso específico da fototerapia) (KARU, 1987) e influencia a penetração dessa luz nos tecidos. Para que a fototerapia seja efetiva, o comprimento de onda deve permitir que a energia oferecida seja absorvida pelos tecidos (SMITH, 2005). Karu (1987) demonstrou que comprimentos de ondas do espectro vermelho e infravermelho (400-1000 nm) são absorvidos por moléculas da cadeia respiratória da mitocôndria (p. ex. citocromo c oxidase), o que resulta em aumento da produção de energia química pelo músculo (p. ex. ATP).

Esta técnica tem sido utilizada com diversas finalidades, entre elas a regeneração de lesões musculares (MESQUITA-FERRARI; MARTINS; SILVA; DA SILVA; PIOVESAN; PAVESI; BUSSADORI; FERNANDES, 2011), a atenuação da fadiga (LEAL JUNIOR et al., 2009c), a modulação da resposta inflamatória (ALBERTINI et al., 2007) e a redução do dano muscular (BARONI et al., 2010a).

Com relação ao dano muscular, a fototerapia tem se mostrado eficaz em atenuar os seus sintomas quando aplicada após (LIU et al., 2009), ou até mesmo antes da realização de exercícios com ações excêntricas (BARONI et al., 2010a). Adicionalmente, a fototerapia também promove a atenuação dos mediadores inflamatórios e a diminuição de citocinas pró-inflamatórias (AIMBIRE et al., 2006b; LIM; LEE; KIM; CHUNG; KIM; LIM; PARK; KIM; CHOI, 2007; DE ALMEIDA; LOPES-MARTINS; TOMAZONI; SILVA; DE CARVALHO; BJORDAL; LEAL JUNIOR, 2011; MESQUITA-FERRARI et al., 2011).

Os mecanismos responsáveis pela redução nas alterações dos

marcadores de dano muscular ainda não são conhecidos, mas especula-se que a elevação dos processos relacionados à atividade mitocondrial, como o aumento do transporte de elétrons, da atividade enzimática e da produção de ATP (LAKYOVA et al., 2010; HUANG et al., 2012), o aumento da microcirculação local e a redução da liberação de espécies reativas de oxigênio (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004) estejam envolvidos. Esses fatores diminuiriam o estresse oxidativo reduzindo a inflamação e o dano secundário (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004) resultando em atenuação nas alterações dos marcadores de dano e de inflamação musculares.

Como descrito anteriormente, tanto a redução do dano quanto da inflamação musculares afetam negativamente o ECR, ou seja, eles diminuem o efeito protetor à segunda carga de exercício. Por outro lado, estratégias que minimizem o dano muscular bem como a inflamação podem ter efeito positivo para a hipertrofia resultante do TF, pois o dano voltaria a ocorrer em magnitudes mais elevadas em sessões subsequentes de treinamento e eventualmente resultaria em maior ativação da sinalização intracelular das vias de hipertrofia do músculo esquelético.

Uma via de sinalização celular comumente acionada pelo exercício físico, e em particular pelo TF, é a iniciada pela fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K). Quando ativada, esta via, conhecida como PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6K</sup>, aciona em forma de cascata, entre outras, as seguintes proteínas: proteína quinase B (Akt ou PKB), proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) e proteína ribossomal 70 quinase S6 (p70<sup>S6K1</sup>).

#### 3.4. VIA DA PI3K/AKT/MTOR/P70<sup>S6K1</sup>

Uma via bastante comum de sinalização celular acionada pelo exercício físico, em particular pelo TF é a iniciada pela fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K). Estimulada pelo aumento nas concentrações de IGF e MGF (entre outros fatores) ela aciona em forma de cascata, as seguintes proteínas: proteína quinase B (Akt ou PKB), proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) e proteína ribossomal 70 quinase S6 (p70<sup>S6K1</sup>).

Quando ativada, essa cascata de sinalização exerce um papel determinante na regulação da síntese protéica e, conseqüentemente, no tamanho do músculo esquelético (KUBICA; BOLSTER; FARRELL; KIMBALL; JEFFERSON,

2005). A ativação da PI3K, uma lipídeo quinase que fosforila o grupamento hidroxil da fosfatidil-inositol 4,5 difosfato, levando à produção de fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato (PI-3,4,5-P3) na membrana sérica (CANTLEY, 2002), desloca a Akt para membrana celular, ativando-a (BOLSTER; JEFFERSON; KIMBALL, 2004).

Uma vez ativada (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 os ribossomos são essenciais para ligação ao RNAm e a formação da cadeia polipeptídica (GLASS, 2003).

Quando fosforilada, a mTOR estimula o processo de tradução pela modulação da atividade de duas proteínas ribossomais: a 4E-BP1 ou a p70<sup>S6K1</sup>. A 4E-BP1 é fosforilada pela mTOR e esse evento previne a interação desta com o fator de iniciação eucariótico 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 códonos. 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; AVRUCH, 1997). Alternativamente, a mTOR fosforila a proteína p70<sup>S6K</sup>, que atua na fosforilação do polipeptídeo ribossomal S6 na subunidade ribossomal 40S, próximo aos 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 (GLASS, 2003).

Embora a via da PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6K1</sup> pareça ser a sequência mais comum de sinalização da hipertrofia, alguns estudos observaram que a ativação da p70<sup>S6K</sup> através do exercício físico pode ocorrer independente da ativação da PI3K. Bolster, Jefferson e Kimball (2004) sugeriram que o exercício pode ativar a PI3K, a PDK1 (downstream na cascata de sinalização da PI3K) ou até mesmo a Akt/mTOR de maneiras independentes (Figura 1). Apesar das diferentes formas de ativação de componentes da via, a fosforilação da p70<sup>S6K1</sup> parece ser comum a todas elas. Adicionalmente, a ativação da mTOR foi observada em músculos submetidos a alongamento de maneira independente da Akt (ratos com gene nulo para expressão

de Akt) (HORNBERGER; ESSER, 2004) e da PI3K (droga inibidora da PI3K) (HORNBERGER; CHIEN, 2006), evidenciando a fosforilação desta proteína como destino comum a diferentes tipos de estímulos.

Esses resultados sugerem que exista uma redundância na sinalização para hipertrofia, em que estímulos distintos, através de rotas alternativas e ainda não completamente conhecidas culminam na ativação do processo de síntese protéica.

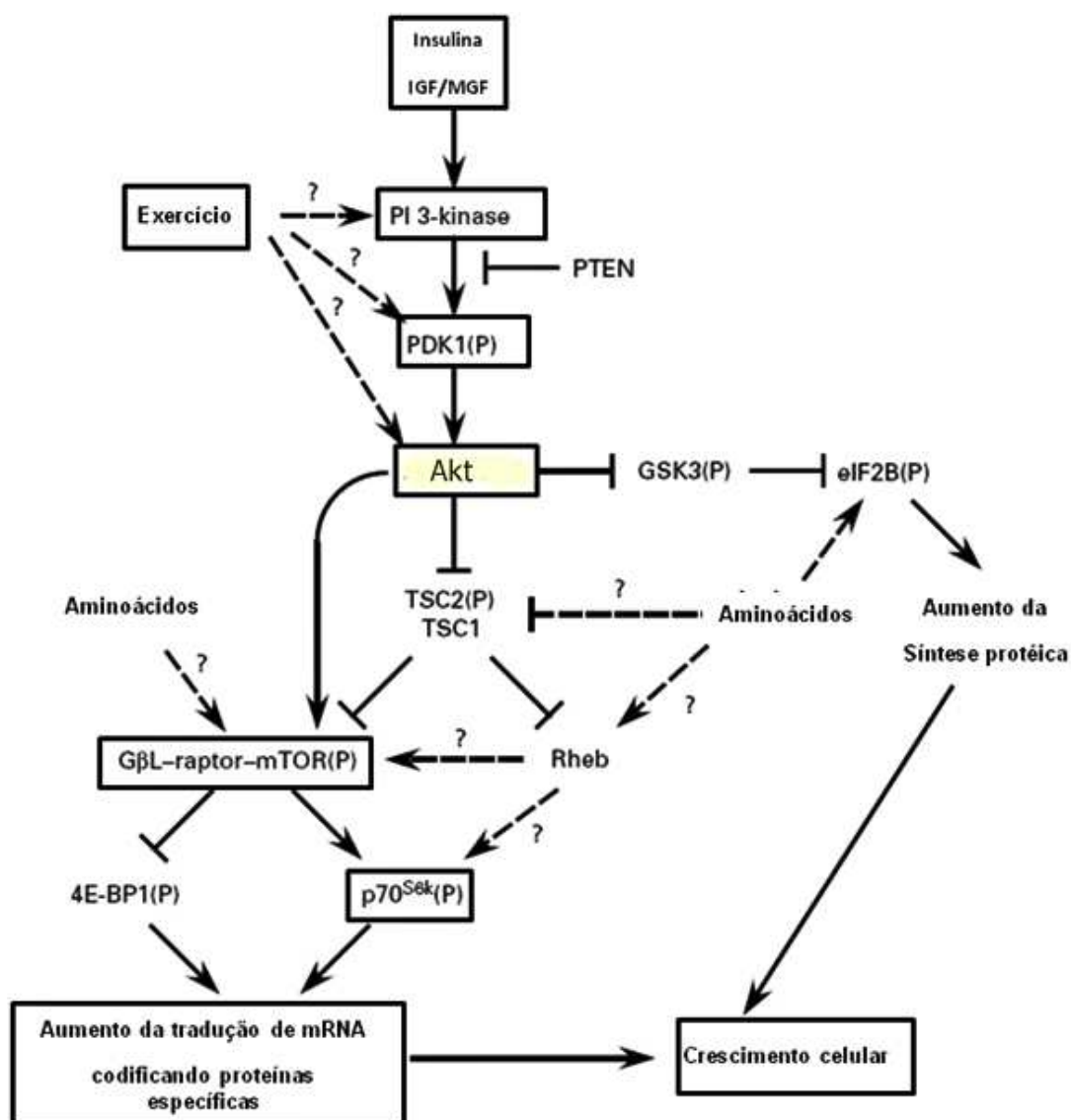


Figura 1 - Vias de sinalização da hipertrofia. Adaptado de Bolster, Jefferson e Kimball (BOLSTER; JEFFERSON; KIMBALL, 2004).

Uma relação positiva entre a ativação aguda da via de sinalização com aumentos relativos da massa muscular foi observada em modelos animais (BAAR; ESSER, 1999) e humanos (TERZIS et al., 2008), destacando a relevância do estudo

dos efeitos do exercício sobre a fosforilação de proteínas chave da via apresentada.

Vários estudos se dedicaram à investigação dos diferentes estímulos sobre a sinalização da hipertrofia, em particular pela via PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6K1</sup> (BAAR; ESSER, 1999; BODINE et al., 2001; BOLSTER; KIMBALL; JEFFERSON, 2003; BOLSTER; JEFFERSON; KIMBALL, 2004; KOOPMAN et al., 2006; TERZIS et al., 2008) Um estudo pioneiro sobre a ativação dessa via em resposta a sobrecarga mecânica (ablação dos sinergistas) foi conduzido por Bodine et al. (2001). Tal sobrecarga resultou em maior fosforilação da Akt e das proteínas *downstream* da mTOR como a 4E-BP1 e a S6K1 (BODINE et al., 2001). Bolster, Kubica, Crozier, Williamson, Farrell, Kimball e Jefferson (2003) verificaram que em ratos submetidos a um modelo que contemplava tanto ações concêntricas quanto excêntricas, a fosforilação de mTOR não se modificou, enquanto que proteínas *downstream* a ela (4E-BP1 e p70<sup>S6K1</sup>) mostraram suas fosforilações aumentadas. Koopman et al. (2006) submeteram sujeitos do sexo masculino a uma sessão aguda de treinamento de força, coletaram amostras de tecido muscular imediatamente, 30 e 120 minutos após o estímulo e observaram aumento da fosforilação da p70<sup>S6K1</sup> nesses períodos.

Porém, além da sobrecarga mecânica, a via da PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6K1</sup> é ativada em resposta ao alongamento muscular, presença de aminoácidos, hormônios e nível de inflamação (BOLSTER; JEFFERSON; KIMBALL, 2004; HORNBERGER; ESSER, 2004; SCHIAFFINO; MAMMUCARI, 2011). Até o momento, não é conhecido o efeito que o dano muscular possui nesta via de sinalização, deixando uma lacuna no conhecimento dos efeitos que um possível estímulo desencadeador da hipertrofia tenha na sinalização de forma aguda.

Alguns estudos investigaram os efeitos dos diferentes tipos de contração muscular sobre a ativação da via sinalizadora. Apesar de não terem avaliado nenhum marcador de dano muscular, esses estudos indicam que as ações excêntricas ativam de maneira mais intensa substratos como a p70<sup>S6K1</sup> (ELIASSON et al., 2006; SPANGENBURG; MCBRIDE, 2006; BURRY; HAWKINS; SPANGENBURG, 2007).

Eliasson et al. (2006) realizaram um desenho experimental interessante, com o intuito de comparar, com um modelo *cross-over* e múltiplas biópsias, o efeito de ações concêntricas máximas com ações excêntricas máximas e submáximas. Quando as ações excêntricas foram realizadas em caráter submáximo, o torque foi equalizado com o das ações concêntricas. O exercício excêntrico máximo foi o único



a induzir a fosforilação das proteínas p70<sup>s6k1</sup> e proteína ribossomal S6. Contudo, nenhuma alteração na fosforilação da Akt e da mTOR foi verificada. Nesse estudo, nenhum marcador (direto ou indireto) de dano muscular foi avaliado, o que não nos permite fazer inferências sobre o efeito do dano na sinalização. Porém, os resultados nos permitem sugerir a importância do grau de tensão desenvolvido para a ativação das proteínas sinalizadoras.

Similarmente, Burry et al. (2007) também investigaram o efeito do tipo de ação muscular sobre atividade da p70<sup>s6k1</sup>. Ratos foram submetidos a exercício agudo isométrico ou excêntrico utilizando o mesmo padrão de estimulação elétrica enquanto um equipamento motorizado determinava o tipo de ação muscular. Os autores observaram um aumento significativo na fosforilação de p70<sup>s6k1</sup> para o grupo excêntrico em comparação ao isométrico. De maneira semelhante à Eliasson et al. (2006), o tipo de ação muscular parece ter sido decisivo na resposta de fosforilação da p70<sup>s6k1</sup>. Novamente, não foram investigadas as alterações em marcadores de dano muscular.

Considerando que ações excêntricas induzem maior grau de dano muscular do que as concêntricas ou isométricas (CLARKSON, 1997; CLARKSON; SAYERS, 1999), é tentador especular que a maior ativação da via de sinalização esteja associada à maior magnitude do dano. Todavia, durante essas ações, a sobrecarga tensional aplicada sobre os músculos também é maior, possibilitando o questionamento sobre a importância do dano sobre essa sinalização. Adicionalmente, é importante considerar que durante a realização de um protocolo de treinamento de força tradicional, são realizadas tanto as ações excêntricas quanto as ações concêntricas.

Sabendo da importância que o estímulo mecânico (sobrecarga tensional e trabalho realizado) sobre a ativação das vias de sinalização de hipertrofia e para a ocorrência do dano, o protocolo de treinamento (séries, repetições e intensidade) utilizado no presente estudo será o mesmo para ambos os grupos experimentais. Dessa maneira, o estímulo mecânico será mantido igual. Uma vez que a fototerapia pode reduzir o dano e resposta inflamatória, essa técnica será utilizada na tentativa de esclarecer o papel do dano muscular na ativação das vias de sinalização de hipertrofia do músculo esquelético.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. AMOSTRA

Foram recrutados 20 sujeitos do sexo masculino (idade  $25,3 \pm 3,9$  anos, massa corporal  $76,6 \pm 10,7$  kg, estatura  $176,6 \pm 7,01$  cm), fisicamente ativos (de acordo com o questionário IPAQ-SF adaptado (MATSUDO; ARAÚJO; MATSUDO; ANDRADE; ANDRADE; OLIVEIRA; BRAGGION, 2001) (Anexo 1), sem histórico de lesão nas articulações do quadril, joelhos e tornozelos e sem problemas neuromusculares. Todos tinham experiência em TF, mas não realizaram este treinamento por um período de seis meses anterior ao estudo. Os sujeitos foram informados sobre o objetivo da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido sobre os riscos e benefícios associados à sua participação no estudo (Anexo 2).

### 4.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os sujeitos foram ranqueados e divididos de acordo com o nível de força em dois grupos, um grupo placebo que realizou o TF e recebeu um tratamento placebo e um grupo experimental que realizou o TF e recebeu a fototerapia com o objetivo de controlar/diminuir o dano muscular e acelerar a resolução do processo inflamatório decorrente do treinamento. Todos os sujeitos realizaram duas sessões de TF as quais foram separadas por 21 dias (Figura 2). Esse intervalo foi utilizado para que houvesse tempo suficiente, entre a primeira sessão de treinamento e a biópsia anterior à segunda sessão de treino, para a recuperação do dano muscular e da inflamação (PAULSEN; EGNER; DRANGE; LANGBERG; BENESTAD; FJELD; HALLÉN; RAASTAD, 2010).

Os indicadores de dano muscular e de inflamação (descritos a seguir) foram mensurados antes e 2h após as sessões de TF. Os indivíduos compareceram ao laboratório 24h, 48h e 96 horas após o término de cada sessão de treinamento para coleta de sangue e avaliação dos indicadores indiretos de dano muscular (Figura 2).

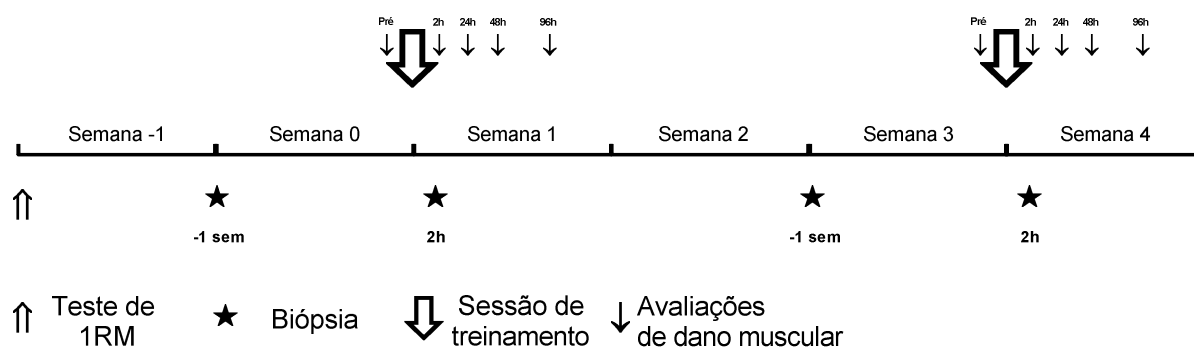


Figura 2 – Desenho experimental do estudo.

#### 4.3. TESTE DE FORÇA DINÂMICA MÁXIMA (1RM)

Uma semana antes do início dos procedimentos experimentais, foi realizado um teste de 1RM no membro não dominante para determinação da carga a ser utilizada nas sessões de treinamento. Os exercícios testados foram o *leg-press* 45° e a extensão de joelhos.

Os testes de 1RM seguiram os procedimentos propostos pela Sociedade Americana de Fisiologistas do Exercício (BROWN; WEIR, 2001). Os participantes realizaram um aquecimento geral de cinco minutos composto de corrida em esteira ergométrica a 9 km/h seguido por um aquecimento específico. O aquecimento específico foi composto de duas séries do exercício testado: uma com cinco repetições a 50% do máximo estimado e outra com três a 70% do máximo estimado, com dois minutos de intervalo entre as séries. Três minutos após o término do aquecimento, foi iniciado o teste de 1RM. A força dinâmica máxima foi determinada no máximo em cinco tentativas com três minutos de intervalo entre elas. A progressão das cargas foi feita de acordo com a percepção de um avaliador experiente. Dez minutos após o término do teste do *leg-press*, foi realizado o teste de 1RM no exercício extensão de joelhos.

#### 4.4. MEDIÇÃO DOS MARCADORES INDIRETOS DE DANO MUSCULAR

##### 4.4.1. Torque isométrico máximo

O teste de torque isométrico máximo foi realizado antes, 2h, 24h, 48h e 96h após o término do protocolo de treinamento. Foi utilizada uma célula de carga

(CLS, KRATOS, São Paulo, Brasil) acoplada ao equipamento “cadeira extensora de joelhos” (NAKAGYM, São Paulo, Brasil) o qual foi adaptado de modo a impedir qualquer movimentação do braço do equipamento para a mensuração do torque realizado isometricamente. Os dados foram coletados por um conversor A/D (USB-6218, National Instruments, Houston, EUA) a uma frequência de 500 Hz e armazenados em um computador para análise *off-line*. O pico de torque foi definido com o maior valor da curva de torque, após esta ter atingido um platô.

Os sujeitos ficaram sentados no equipamento, o eixo de rotação anatômico do joelho da perna dominante (epicôndilo lateral do fêmur) foi alinhado visualmente ao eixo de rotação do braço de alavanca do equipamento. O ponto de apoio do braço de alavanca do aparelho foi posicionado a 1 cm proximal do maléolo medial dos sujeitos e a angulação do joelho foi mantida a 60° a partir da extensão completa do joelho (assumindo 0° na horizontal), e o quadril foi mantido em um ângulo de 90°. Os sujeitos executaram força com os músculos extensores do joelho, progressivamente de modo a atingir o esforço máximo ao redor de dois segundos e mantiveram este esforço por mais dois segundos. Foram feitas duas tentativas com intervalo de três minutos entre tentativas, e o melhor resultado foi considerado para análise estatística.

A distância entre o epicôndilo femoral e o ponto de apoio do braço de alavanca foi medida e utilizada para o cálculo de torque produzido pelos indivíduos.

#### **4.4.2. Concentração sérica de creatina quinase (CK)**

Foram coletadas amostras de 5ml de sangue venoso a partir da veia antecubital dos sujeitos antes das sessões de treinamento e 2h, 24h, 48h e 96h após a realização das mesmas.

As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 1800 rpm (4000 g) para obtenção do soro. A concentração da CK foi determinada por espectrofotometria utilizando kit bioquímico padrão (CK-NAC, Labtest, Minas Gerais, BR).

#### **4.4.3. Amplitude de Movimento**

As medidas da amplitude de movimento (ADM) da articulação do joelho foram realizadas com um goniômetro manual (Carci, São Paulo, Brasil), antes do início dos protocolos de treinamento e 2h, 24h, 48h e 96h após a realização dos

mesmos. O eixo de rotação do goniômetro foi posicionado sobre epicôndilo lateral do fêmur (eixo de rotação anatômico do joelho), o braço fixo alinhado com o trocânter maior e o braço móvel com a linha lateral da fíbula, utilizando o maléolo lateral como referência. Estes pontos foram marcados com tinta semipermanente para a manutenção dos mesmos durante todo o período do estudo. O ângulo de extensão foi medido com os sujeitos em pé e com os membros inferiores relaxados. O ângulo de flexão foi avaliado com os sujeitos posicionados em decúbito ventral sobre uma maca, com 0° de abdução do quadril. Uma toalha dobrada foi colocada sob a extremidade distal da coxa para estabilizar o fêmur e reduzir a rotação, flexão e extensão de quadril. O joelho do indivíduo foi flexionado passivamente pelo pesquisador responsável, e o ângulo de flexão foi determinado quando o indivíduo reportasse dor ou desconforto (CLEARY; SITLER; KENDRICK, 2006). A amplitude de movimento foi calculada subtraindo o ângulo de flexão do ângulo de extensão, considerando como 0° a extensão completa do joelho.

#### **4.4.4. Circunferência da coxa**

A circunferência da coxa da perna dominante foi medida para avaliação do nível de edema local. Essa medida foi realizada antes do início dos protocolos de treinamento, bem como 2h, 24h, 48h e 96h após a realização dos mesmos.

Para essa medida, o indivíduo permaneceu em pé com o peso de seu corpo apoiado sobre a perna não dominante. A medida de circunferência foi realizada no ponto médio entre o trocânter maior do fêmur e o epicôndilo lateral do fêmur. Esses pontos foram marcados com tinta semipermanente para a manutenção dos mesmos locais de medida durante todo o estudo. Foi usada uma fita métrica específica para esta finalidade. As medidas foram realizadas três vezes e a mediana foi utilizada para tratamento estatístico (NOSAKA; CLARKSON, 1995).

#### **4.4.5. Percepção subjetiva de dor**

Os sujeitos foram requisitados a avaliar a dor muscular nos músculos da coxa antes do início dos protocolos de treinamento, bem como 2h, 24h, 48h e 96h após a sua realização. Foi entregue aos indivíduos uma folha com uma linha de 10 cm de comprimento, que representava uma escala subjetiva de dor. Uma das extremidades da linha se referia à condição “sem dor” enquanto a outra a “extremamente dolorido”. O indivíduo foi requisitado a marcar um ponto nessa linha

que refletisse a dor que ele sentiu durante a realização um movimento de meio agachamento sem sobrecarga. A distância em milímetros da extremidade sem dor até o ponto indicado pelo sujeito foi considerado como a medida de dor e utilizada para tratamento estatístico (NOSAKA; CLARKSON, 1995).

#### 4.5. BIÓPSIA MUSCULAR

Para obtenção das amostras musculares para determinação e quantificação das proteínas mTOR total, p70<sup>S6K</sup> fosforilada (p-p70<sup>S6K1</sup>), 4E-BP1 total e rpS6 total e para a análise da infiltração de células inflamatórias, foram realizadas biópsias da porção medial do músculo vasto lateral. Antes da extração do tecido, a área foi tricotomizada e limpa com antisséptico. Uma pequena área, sobre a região selecionada, foi anestesiada com xilocaína a 2%, injetada de forma subcutânea. Após a anestesia, uma pequena incisão, de aproximadamente 0,5 cm de largura, 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.

As amostras foram limpas (retirada de sangue e excesso de tecido conectivo) e divididas em duas alíquotas. Uma delas foi processada para a extração das proteínas totais e a outra foi separada e conservada em formalina para a análise de focos de infiltração de células inflamatórias.

Este procedimento foi realizado em quatro oportunidades. A primeira num período de aproximadamente uma semana antes do início da realização da primeira intervenção experimental. A segunda, duas horas após o término da mesma. A terceira biópsia foi realizada uma semana antes da segunda sessão de treinamento e a quarta duas horas após o término da mesma. Nos dias em que a biópsia era realizada, os voluntários foram instruídos a ingerir um café da manhã padrão sem leite, composto de um copo de suco e quatro fatias de pão de forma com manteiga. Essa recomendação de alimentação resultou em um valor energético total de aproximadamente 600 Kcal sendo 9,6 g de proteína (14,6% do valor energético total), 103,8 g de carboidrato (70,4% do valor energético total) e 16,3 g de gordura (15% do valor energético total).

#### 4.6. QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS mTOR TOTAL, p-p70<sup>S6k1</sup>, 4E-BP1 total, rpS6 TOTAL

##### 4.6.1 Extração das proteínas totais dos músculos esqueléticos

Para a extração de proteínas totais das amostras obtidas, os músculos foram homogeneizados com polytron em 1,5 ml de tampão de extração constituído de Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml. Os extratos foram centrifugados a 12000 rpm a 4°C por 40 minutos para a remoção do material insolúvel. Após centrifugação, foi realizada a normalização da concentração de proteínas para todas as amostras utilizando reagente Bradford (Bio-Rad - Richmond, CA, EUA) em espectrofotômetro  $\mu$ Quant (BioTekInstruments – Winoosk, VT, EUA). Em seguida, os sobrenadantes foram tratados com tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 4:1 (V:V), aquecidos em água fervente por 5 minutos, e de 50 a 100 $\mu$ g de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) no aparelho de mini gel. Em cada gel foi utilizado marcador de peso molecular pré-corado com valores estabelecidos como padrão (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA).

##### 4.6.2 Análise proteica por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A expressão de proteínas nas amostras musculares dos voluntários foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA – *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) conforme recomendação do fabricante (Cell Signaling, Boston, MA – EUA). Foi mensurada a expressão total das proteínas mTOR, 4E-BP1 e rpS6 (proteína ribossomal S6). As amostras foram homogeneizadas em tampão de lise na concentração de 2x (20 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl, 1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM de pirofosfato de sódio, 1 mM de  $\beta$ -glicerofosfato, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e 1  $\mu$ g/ml de leupeptina) e centrifugadas a 1800 g por 10 minutos a 4°C para remoção dos debris. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C para dosagem. A dosagem de proteína total foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). As amostras foram diluídas no tampão de lise acima descrito para ajustar a concentração protéica para 30  $\mu$ g/ml e

homogeneizadas com o reagente de diluição de amostra (100 µl de amostra + 100 µl de reagente de diluição). Do total, 100 µl de homogenato diluído foram dispensados na microplaca, a qual foi selada e incubada a 4°C por 12 horas. As amostras foram removidas da placa e a mesma foi lavada 4 vezes com 200 µl de tampão de lavagem. O anticorpo primário foi adicionado na placa (100 µl) seguido de incubação overnight a 4°C. O procedimento de lavagem foi repetido e 100 µl do anticorpo secundário foram adicionados na placa e a mesma foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após nova lavagem, 100 µl do substrato TMB foi adicionado em cada poço da placa com posterior incubação de 10 minutos a 37°C. Por fim, 100 µl da solução STOP foi adicionada em cada poço da placa e a leitura foi realizada imediatamente no comprimento de onda de 450 nm.

#### **4.6.3 Análise protéica por immunoblotting**

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através da aplicação de uma corrente de 120V por duas horas, como descrito por Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Porém, no tampão foi acrescido sódio dodecil sulfato (SDS) 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas nas membranas de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) em temperatura ambiente por 2 horas e lavadas com esta solução sem leite por 30 minutos. As membranas foram então incubadas a 4°C com anticorpos específicos em solução bloqueadora (com 3% de BSA) durante a noite e lavadas com a mesma solução sem leite ou BSA, por 30 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente, lavadas com a solução sem leite ou BSA e usada solução para detecção por quimioluminescência como descrito nas especificações do fabricante dos anticorpos. A intensidade das bandas nas auto-radiografias reveladas foi determinada através da leitura por densitometria óptica das imagens escaneadas utilizando um scanner (HP PSC 1510). O programa ScionImage (Scion Corporation – Frederick, MD, EUA) foi utilizado para converter os valores de densidade em unidades arbitrárias, quantificando a proteína de interesse.

Os reagentes e os aparelhos para eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizados foram da marca Bio-Rad (Bio-Rad,



Richmond, CA, EUA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT), DHEA, albumina, colagenase tipo V e polilisina foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e insulina regular pela Lilly (Lilly, São Paulo, SP, Brasil). A membrana de nitrocelulose, ECL e os kits para detecção por quimioluminescência foram fornecidos pela Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). D-glicose anidra e PEG (polietileno glicol + tampão borato) foram fornecidos pela Labsynth (Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Os anticorpos anti-pp70<sup>s6k1 thr389</sup> foram adquiridos junto à CellSignalling (Cell Signalling Technology, MA, EUA).

#### 4.7 MENSURAÇÃO DA INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

Após 48 horas de fixação em formalina, a amostra do tecido muscular foi submetida ao processamento histológico habitual. Cortes de 4 µm foram feitos no micrótomo e posteriormente submetidos à coloração por hematoxilina-eosina para a determinação de infiltração de células inflamatórias (PALANIYANDI; FERREIRA; BRUM; MOCHLY-ROSEN, 2011). Foi determinado o número de focos contendo células polimorfonucleares (leucócitos), normalizado pela área total analisada.

#### 4.8. PROTOCOLO DE TREINAMENTO DE FORÇA

Os músculos de interesse foram os extensores do joelho. Antes de iniciar o treinamento, os indivíduos realizaram um aquecimento geral composto de cinco minutos de corrida em esteira ergométrica a 9 km.h<sup>-1</sup>, seguido de um aquecimento específico. O aquecimento específico consistiu de duas séries de cinco repetições a 60% de 1RM com intervalo de um minuto entre séries. Foi respeitado um intervalo de dois minutos pós-aquecimento e em seguida o protocolo de treinamento foi executado. Os exercícios utilizados foram o *leg-press* 45° e a extensão de joelhos, feitos de forma unilateral com a perna dominante. Em cada exercício foram executadas duas séries com ~85% 1RM e mais duas séries com ênfase na fase excêntrica com intensidade equivalente a ~120% 1RM. Durante as últimas duas séries em que foi utilizada a sobrecarga excêntrica, os indivíduos receberam ajuda externa para executar a fase concêntrica, mas deviam resistir e controlar a flexão das articulações durante a fase excêntrica de modo que a amplitude de movimento fosse realizada em aproximadamente dois segundos. Essa cadência de movimento

foi controlada com um metrônomo. Entre cada série existiu um intervalo de dois minutos de recuperação. Nos dois exercícios foi utilizada uma amplitude de movimento de 100 graus (flexão dos joelhos à 100° - extensão completa dos joelhos a 0° na horizontal).

#### 4.9. TRATAMENTO EXPERIMENTAL

A fototerapia (LED) foi aplicada utilizando um equipamento com 50 diodos infravermelhos com comprimento de onda de 940nm. Cada diodo de aplicação possuía uma potência de emissão de 13,5 mW, com uma área de 0,07 cm<sup>2</sup> (Figura 3). Imediatamente antes do início da sessão de TF, foram irradiados três pontos, resultando em uma energia total oferecida de 180J (BARONI et al., 2010b). A densidade da energia aplicada foi de 17J.cm<sup>-2</sup>. Os diodos foram mantidos em contato com a pele a um ângulo de 90° e foi aplicada leve pressão. Os pontos de aplicação foram sobre o ventre dos músculos vasto lateral, vasto medial e reto femoral (Figura 4) e a aplicação teve duração de 90 segundos em cada ponto.

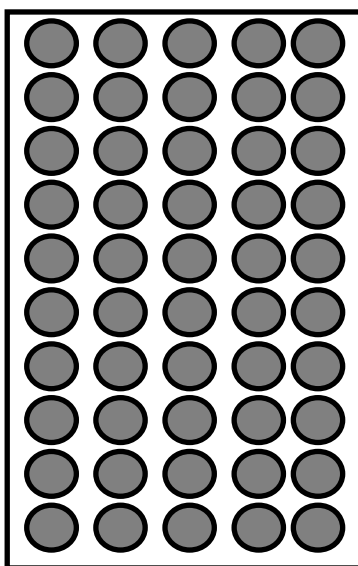


Figura 3 – Ilustração da vista anterior dos equipamentos utilizados para a fototerapia (os pontos escuros representam os LEDs)



Figura 4 – Pontos de aplicação da fototerapia nos músculos vasto lateral, vasto medial e reto femoral

Da mesma forma, os equipamentos foram posicionados sobre o músculo quadríceps dos voluntários do grupo placebo. Os equipamentos de fototerapia possuem um interruptor com duas posições, para um dos lados o equipamento é ligado e funciona para a aplicação da terapia, e para o outro lado, o equipamento não funciona mas aparenta estar ligado. Como a luz emitida está no espectro infravermelho, os voluntários não conseguiam saber se o equipamento estava realmente ligado ou não.

#### 4.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram testados para normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov e analisados visualmente para observar a presença de dados não usuais (*outliers*). Quando não apresentavam distribuição normal, eles foram transformados através da função logarítmica e testados novamente. Os dados são reportados de acordo com estatística descritiva.

Para comparar os marcadores indiretos de dano após a primeira sessão de treinamento, foi utilizado modelos mistos para medidas repetidas com dois fatores: tratamento (Placebo e Fototerapia) e tempo (pré, 2h, 24h, 48h e 96h). Além disso, os valores de delta foram calculados para ADM, Torque e CIR e analisados novamente de acordo com o descrito anteriormente. Para a infiltração das células inflamatórias e as proteínas mTOR total, p-p70s6k, 4E-BP1 total e rpS6 total, foi

utilizada ANOVA para medidas repetidas com dois fatores: tratamento (Placebo e Fototerapia) e tempo (pré, 2h). Quando um valor significativo de F foi encontrado, post hoc de Tukey foi utilizado para encontrar as diferenças. O nível de significância adotado foi de  $p \leq 0,05$ .

Para comparar os efeitos da fototerapia no ECR (via marcadores indiretos de dano), foi utilizada ANOVA para medidas repetidas com três fatores: tratamento (Placebo e Fototerapia), sessão (1ª e 2ª) e tempo (pré, 2, 24h, 48h e 96h). Além disso, os valores de delta foram calculados para ADM, Torque e CIR e analisados novamente de acordo com o descrito anteriormente. Para a infiltração das células inflamatórias e as proteínas mTOR total, p-p70s6k, 4E-BP1 total e rpS6 total, foi utilizada ANOVA para medidas repetidas com 3 fatores: tratamento (Placebo e Fototerapia), sessão (1ª e 2ª) e tempo (pré, pós). Quando um valor significativo de F foi encontrado, post hoc de Tukey foi utilizado para encontrar as diferenças. O nível de significância adotado foi de  $p \leq 0,05$ .

Para a proteína p-p70<sup>s6k1</sup>, devido o reduzido tamanho da amostra e da grande variabilidade que pode ter comprometido encontrar as diferenças significantes, foi calculado também o tamanho do efeito, e esse foi classificado de acordo com a sugestão de Hopkins (2004) em trivial se o valor ficou abaixo 0,2, pequeno se ficou entre 0,2 e 0,6, moderado entre 0,6 e 1,2, grande entre 1,2 and 2,0, and muito grande acima de 2,0.

## 5. RESULTADOS

Os valores de força dinâmica máxima nos exercícios *leg-press* e extensão de joelhos não foram diferentes entre os grupos (Tabela 1). Assim, as cargas de treino foram semelhantes entre os grupos fototerapia e placebo.

Tabela 1 – Valores de força dinâmica máxima (1RM, kg, média  $\pm$  desvio padrão) e das cargas de treinamento para os grupos experimentais nos dois exercícios avaliados.

	Fototerapia			Placebo		
	1RM	85%	120%	1RM	85%	120%
<b>Leg-Press</b>	133,0 (29,7)	113,0 (25,3)	159,6 (35,6)	131,0 (34,8)	111,3 (29,6)	157,2 (41,8)
<b>Cadeira Extensora</b>	77,5 (10,9)	65,4 (9,3)	93,0 (13,1)	80,5 (13,6)	68,4 (11,6)	96,6 (16,3)

### 5.1. MARCADORES INDIRETOS DE DANO MUSCULAR.

#### 5.1.1. Torque isométrico máximo

O torque isométrico máximo era similar entre os grupos antes da realização da sessão de TF. Duas horas após a realização da primeira sessão de TF, o torque foi reduzido de maneira semelhante nos grupos fototerapia e placebo, respectivamente, em 32,3% e 30,6% (Figura 5). O torque permaneceu reduzido até 96h após o término do exercício, sem diferenças entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados.

Após a segunda sessão de TF, o torque foi reduzido em 26,3% e 35,1% nos grupos fototerapia e placebo, respectivamente. Porém, diferente da primeira sessão em que os valores permaneceram reduzidos até 96h após o término da sessão, no momento 48h o torque já não era diferente dos valores iniciais (Figura 5). Apesar de não ter havido interação, houve efeito principal da sessão de TF, indicando que as alterações foram menores e/ou a recuperação mais rápida após a segunda sessão de TF.

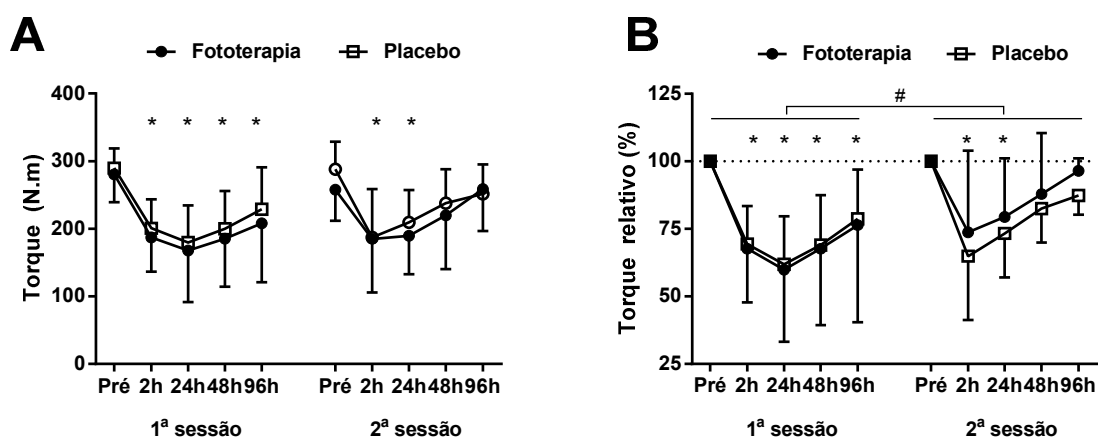


Figura 5 – Painel A - Torque isométrico máximo absoluto (N.m, média  $\pm$  desvio padrão) produzido nos diferentes momentos após a realização das duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. Painel B – Torque isométrico máximo relativo (% , média  $\pm$  desvio padrão) ao momento pré nos diferentes momentos após a realização das duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. \* $p < 0,05$  em relação ao pré para ambos os grupos # $p < 0,05$  efeito principal da sessão de TF.

### 5.1.2. Creatina quinase (CK)

Considerando que os dados de concentração sérica de creatina quinase não possuíam distribuição normal, eles foram transformados através da função logaritmo na base 10 e esses dados foram analisados. Os resultados demonstram que houve aumento na CK a partir de 2h até 48h pós-exercício para ambos os grupos. No momento 96h, os valores de CK já haviam retornado ao normal no grupo fototerapia, mas continuavam elevados no grupo placebo (Figura 6).

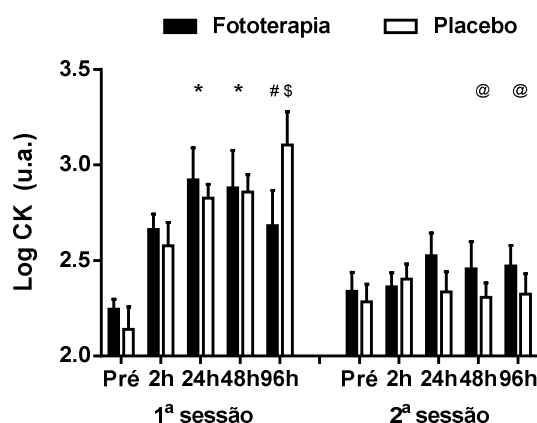


Figura 6 – Log da concentração sérica de CK (u.a., média  $\pm$  erro padrão) para os grupos fototerapia e placebo nos diferentes momentos. \* $p < 0,05$  comparado com pré para ambos os grupos, # $p < 0,05$  comparado com pré para o grupo placebo, \$ $p < 0,05$  fototerapia x placebo @  $p < 0,05$  comparado com o mesmo momento da primeira sessão para o grupo placebo

### 5.1.3. Percepção subjetiva de dor (DOR)

A percepção de dor aumentou mais rapidamente no grupo placebo, pois no momento 2h após o término da primeira sessão de TF ela já era diferente do momento pré. No grupo fototerapia, a DOR só aumentou a partir de 24h após o término da primeira sessão de TF. A DOR permaneceu elevada até 48h após a realização do exercício para ambos os grupos. No momento 96h, a percepção de dor já havia retornado próximo aos níveis iniciais (Figura 7).

Após a segunda sessão de TF, a DOR aumentou apenas no grupo placebo (24h e 48h). Nesses mesmos momentos, a DOR foi diferente dos valores da primeira sessão de TF no grupo fototerapia. Para o grupo placebo, houve interação apenas no momento 48h (Figura 7).

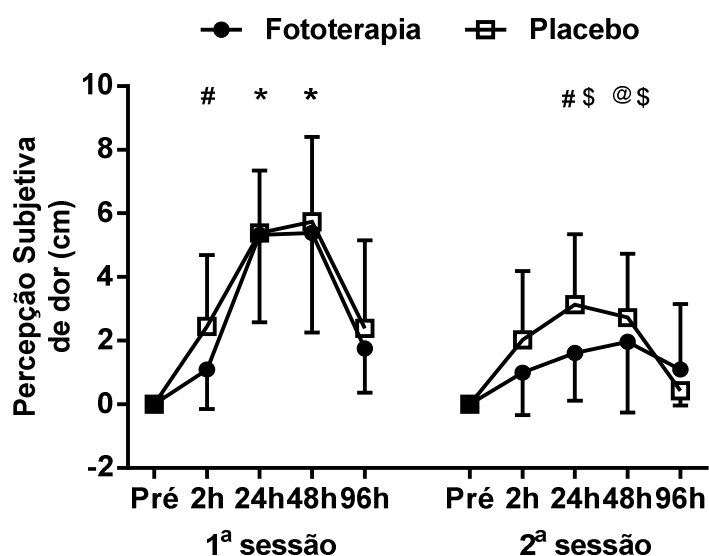


Figura 7 – Percepção subjetiva de dor (DOR, cm, média  $\pm$  desvio padrão) nos diferentes momentos após as duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. \* $p < 0,05$  em relação do momento pré para ambos os grupos # $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo placebo \$ $p < 0,05$  em relação ao mesmo momento após a primeira sessão de TF no grupo fototerapia @  $p < 0,05$  em relação ao mesmo momento após a primeira sessão de TF no grupo placebo

### 5.1.4. Circunferência da coxa (CIR)

A circunferência da coxa que foi treinada aumentou apenas no grupo placebo. Quando considerados os valores absolutos, esse aumento foi observado 2h e 24h após a realização do exercício. Interessantemente, quando considerados as alterações dos valores (delta circunferência), além de ser observado efeito simples nos momentos 2h, 24h e 48h no grupo placebo, houve efeito principal de grupo

indicando que o tratamento com a fototerapia evitou o aumento da circunferência da coxa (Figura 8).

Após a segunda sessão de TF, não houve alterações nos valores absolutos ou delta da circunferência da coxa. Nessa variável, não foram observados efeito principal da sessão ou efeitos de interação.

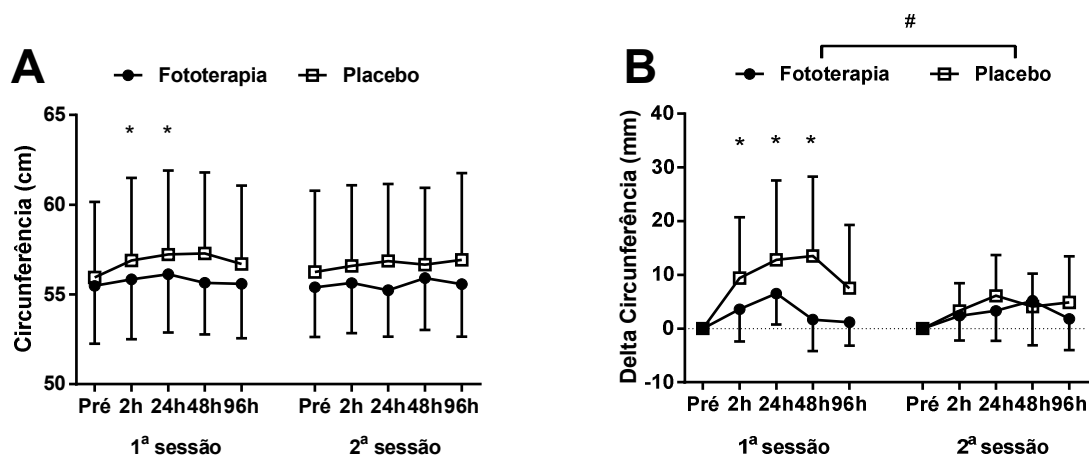


Figura 8 – Painel A = Circunferência da coxa (cm, média  $\pm$  desvio padrão) nos diferentes momentos após as duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. Painel B – Alteração da circunferência da coxa (mm, média  $\pm$  desvio padrão) nos diferentes momentos após as duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. \* $p < 0,05$  em relação do momento pré # $p < 0,05$  efeito principal de grupo após a primeira sessão de TF.

### 5.1.5. Amplitude de movimento (ADM)

A amplitude de movimento da articulação do joelho diminuiu a partir de 24h após a realização da primeira sessão de TF em ambos os grupos e permaneceram reduzidos até 48h. No momento 96h, os valores não foram diferentes dos valores iniciais (Figura 9). O mesmo padrão foi observado para os valores de alterações da ADM.

Após a segunda sessão de TF, os valores estavam reduzidos 24h após o término da sessão. No grupo placebo esses valores permaneceram reduzidos até 48h após, enquanto que no grupo fototerapia nesse mesmo momento, os valores não eram diferentes dos valores iniciais. Além disso, houve efeito principal da sessão de TF para os valores de alterações da ADM, indicando que as alterações foram menores e/ou a recuperação mais rápida.



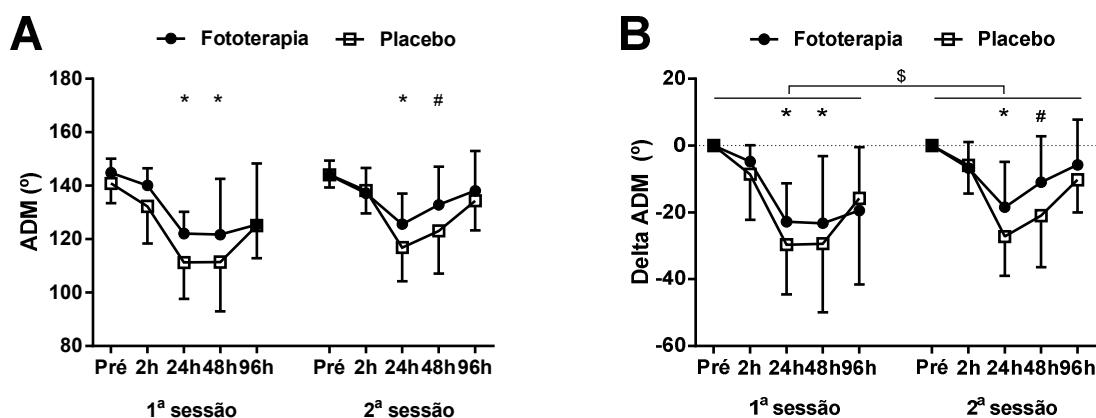


Figura 9 – Pannel A - Amplitude de movimento da articulação do joelho (ADM, °, média  $\pm$  desvio padrão) nos diferentes momentos para os grupos fototerapia e placebo. Pannel B – Alteração na amplitude de movimento da articulação do joelho (Delta ADM, °, média  $\pm$  desvio padrão) nos diferentes momentos para os grupos fototerapia e placebo. \* $p < 0,05$  comparado com o momento pré para ambos os grupos #  $p < 0,05$  comparado com o momento pré no grupo placebo \$  $p < 0,05$  efeito principal da sessão de TF para os valores de Delta ADM

## 5.2. MARCADORES DE INFLAMAÇÃO MUSCULAR

### 5.2.1 Avaliação da infiltração de células inflamatórias

Após a realização da primeira sessão de treinamento, houve aumento dos focos de infiltração de células inflamatórias, mas essa infiltração foi semelhante nos dois grupos experimentais (Figura 10). Apesar de estatisticamente não ter sido diferente, o aumento após a primeira sessão de TF no grupo placebo foi 50% maior do que no grupo fototerapia.

A infiltração de células inflamatórias após a terceira biópsia (uma semana antes da segunda sessão de treinamento) não foi diferente da infiltração observada na primeira biópsia (uma semana antes da primeira sessão de treinamento), indicando que a infiltração observada após a realização da primeira sessão de treinamento de força havia sido resolvida. Apesar de os valores do grupo placebo serem 2,5 vezes mais elevados do que o do grupo fototerapia nessa amostra, eles não eram diferentes.

Após a segunda sessão de treinamento, foi observada novamente infiltração das células inflamatórias e sem diferença entre os grupos experimentais e entre as sessões de TF (Figura 10).

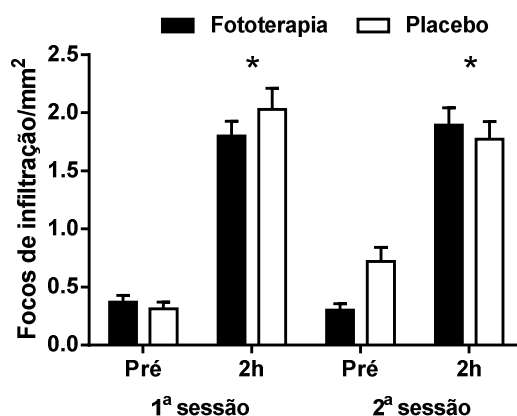


Figura 10 – Focos de infiltração de células inflamatórias (focos de infiltração/mm<sup>2</sup>, média ± erro padrão) normalizados pela área analisada nos momentos pré e 2h para os grupos fototerapia e placebo após as duas sessões de treinamento. \*p<0,05 efeito principal de tempo em cada sessão de TF.

### 5.3. COMPONENTES DA SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/MTOR

#### 5.3.1. mTOR total

O conteúdo de mTOR total não foi alterado de maneira aguda pela realização das sessões de treinamento em nenhum dos grupos experimentais. No entanto, houve efeito principal da sessão de treino, indicando que o conteúdo de mTOR total foi mais elevado na realização da segunda sessão de treinamento (Figura 11).

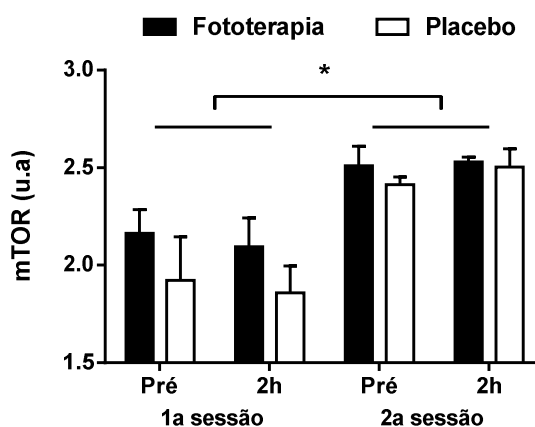


Figura 11 - Conteúdo de mTOR total (u.a. média ± erro padrão) antes (pré) e após (2h) a realização de cada uma das duas sessões de TF nos grupos fototerapia e placebo. \*p<0,05 efeito principal entre a primeira e a segunda sessão de TF

### 5.3.2. p-p70<sup>s6k1</sup>

Os dados de fosforilação da proteína p70<sup>s6k1</sup> após as duas sessões experimentais estão mostrados na Figura 12. Não houve diferenças entre os grupos experimentais em nenhum dos momentos analisados. Apesar de não ter atingido significância estatística em nenhum dos grupos, foram calculados os tamanhos do efeito (TE) para cada um dos grupos nas duas sessões de TF. O TE para o grupo fototerapia foi de 0,6 e 0,11 após a primeira e a segunda sessões de TF, respectivamente. Para o grupo placebo, o TE foi 0,48 e -0,12 após a primeira e a segunda sessões, respectivamente. O que pode sugerir menor sensibilidade da proteína ao estímulo oferecido.

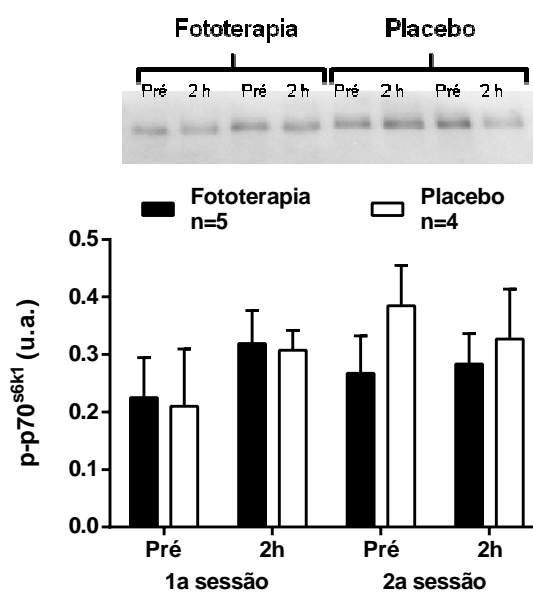


Figura 12 – Conteúdo de p70<sup>s6k1</sup> fosforilada (p-p70<sup>s6k1</sup>, u.a., média ± erro padrão) antes (pré) e após (2h) as duas sessões de treinamento nos grupos fototerapia (n=5) e placebo (n=4).

### 5.3.3. 4E-BP1 total

O conteúdo de 4E-BP1 total não foi alterado pela realização das duas sessões de treinamento de força em nenhum dos grupos (Figura 13).

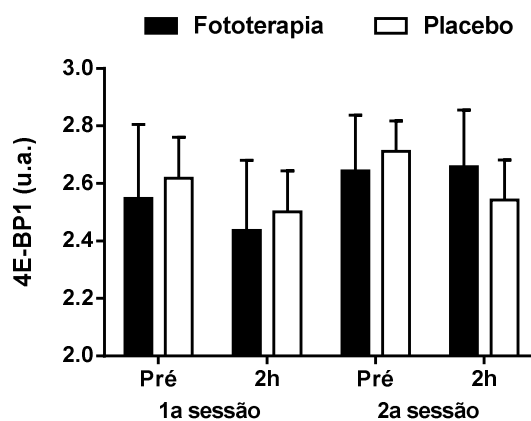


Figura 13 - Conteúdo de 4E-BP1 total (u.a., média  $\pm$  erro padrão) antes (pré) e após (2h) a realização das duas sessões de treinamento nos grupos fototerapia e placebo.

#### 5.3.4. Proteína Ribossomal S6 total (rpS6)

O conteúdo de rpS6 total não foi alterado pela realização da sessão de treinamento de força em nenhum dos grupos (Figura 14).

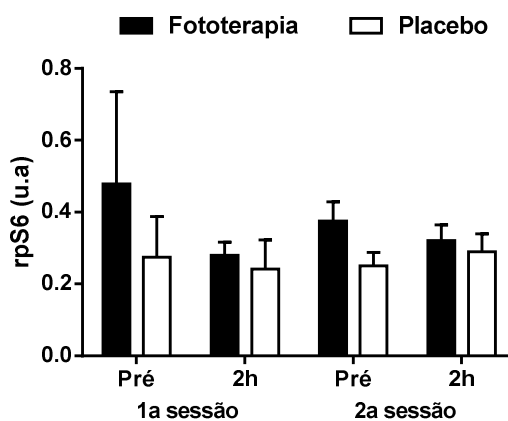


Figura 14 - Conteúdo de proteína ribossomal S6 total (rpS6, u.a. média  $\pm$  erro padrão) antes (pré) e após (2h) a realização das duas sessões de treinamento nos grupos fototerapia e placebo.

## 6. DISCUSSÃO

O objetivo principal desse estudo foi verificar o efeito do dano muscular e da resposta inflamatória no efeito da carga repetida e na ativação da via PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6K1</sup> após a realização de duas sessões de treinamento de força para membros inferiores. Para tentar avaliar esses efeitos, foi utilizada a fototerapia como estratégia para controlar a ocorrência do dano e da inflamação após a realização da primeira sessão de TF. Os resultados demonstram que essa estratégia não foi eficiente para controlar o dano (avaliado pelos marcadores indiretos) e a inflamação (avaliada pela infiltração de células inflamatórias) decorrente da primeira sessão de TF, uma vez que a alteração dessas variáveis foi similar entre os grupos. Esses mesmos resultados foram observados também após a segunda sessão de TF, sugerindo que o ECR foi semelhante entre os dois grupos. Além disso, o conteúdo das proteínas da via PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6K1</sup> não foi afetado de maneira aguda pela sessão de TF em nenhum dos grupos experimentais. Porém, o conteúdo de mTOR total foi aumentado de uma sessão para a outra.

Para facilitar o entendimento da discussão, ela será dividida em duas partes.

### 6.1 EFEITOS DA FOTOTERAPIA SOBRE O DANO MUSCULAR, A INFLAMAÇÃO E A SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA HIPERTROFIA APÓS UMA SESSÃO DE TREINO.

Após a realização da primeira sessão de TF, houve alterações significantes nos marcadores indiretos indicando a ocorrência do dano muscular. No entanto, não houve diferença entre os grupos experimentais, sugerindo que a fototerapia não afetou a ocorrência do dano muscular após apenas uma única sessão de TF. De maneira similar, houve indicativos de aumento da inflamação, avaliada através da infiltração de células inflamatórias; no entanto, novamente não houve diferença entre os grupos. As proteínas totais associadas a via de sinalização intracelular da hipertrofia do músculo esquelético também não sofreram influência significativa da fototerapia.

A alteração dos marcadores indiretos está de acordo com os resultados de outros estudos sobre dano muscular, em que há aumento da CK e da DOR, e

diminuição da força e da ADM (NOSAKA; CLARKSON, 1995; HOWATSON; GAZE; VAN SOMEREN, 2005; JAMURTAS; THEOCHARIS; TOFAS; TSIOKANOS; YFANTI; PASCHALIS; KOUTEDAKIS; NOSAKA, 2005). No presente estudo, essas alterações foram similares para os dois grupos experimentais indicando que a fototerapia não foi eficiente em atenuar o dano muscular.

Poucos estudos avaliaram o efeito da fototerapia no dano muscular em resposta a uma sessão de exercícios (BARONI et al., 2010a; LEAL JUNIOR et al., 2010; DE ALMEIDA et al., 2011), e apenas uma dessas investigações foi realizada em humanos (BARONI et al., 2010a). Baroni et al. (BARONI et al., 2010a) observaram menores alterações na concentração das enzimas sanguíneas mensuradas (LDH e CK) e no torque no grupo de sujeitos que recebeu a terapia de luz (laser de baixa intensidade). No entanto, os valores da percepção subjetiva de dor não foram diferentes entre os grupos. Apesar de ser possível argumentar que a diferença entre os resultados do presente estudo e os de Baroni et al. (2010a) é em razão da fonte de luz (laser de baixa intensidade x LED), Smith (2005) afirmou que a origem da luz não é o fator relevante, mas sim a quantidade (dose) de energia que é oferecida ao tecido. Sendo assim, como a quantidade de energia que foi oferecida no presente estudo foi igual à oferecida por Baroni et al. (2010a), as diferenças observadas entre os estudos não podem ser atribuídas ao tipo de luz aplicada.

Outro fator que pode ter provocado a ausência de efeitos positivos da fototerapia é a relação entre a dose de energia e o grau de dano muscular induzido. No estudo de Baroni et al. (2010a), foram utilizadas contrações excêntricas máximas (cinco séries de 15 repetições) realizadas em dinamômetro isocinético com amplitude de movimento de 60° (30° a 90°) no exercício de extensão de joelhos, enquanto que nesse estudo o protocolo de treinamento tentou simular uma sessão voltada para o desenvolvimento de hipertrofia muscular com quatro séries de 10 repetições a 85% e 120% de 1RM com amplitude de 100° (0° a 100°). É possível que o dano induzido tenha sido maior no presente estudo, uma vez que tanto a amplitude de movimento quanto o comprimento final do músculo, fatores que reconhecidamente afetam a ocorrência do dano (CHILD; SAXTON; DONNELLY, 1998 1060; NOSAKA; SAKAMOTO, 2001), foram maiores. Os resultados de torque máximo dos dois estudos podem ser utilizados para dar suporte a essa afirmação. No presente estudo, os valores de torque antes do início do protocolo de TF eram semelhantes entre os grupos fototerapia e placebo (280 Nm e 289 Nm,

respectivamente) e no estudo de Baroni et al. (2010a) os valores eram 292 Nm e 283 Nm para os mesmos grupos. No entanto, 24h após o término da sessão de TF, os valores no estudo de Baroni et al. (2010a) eram de 249 Nm e 205 Nm para os grupos fototerapia e placebo, enquanto que os resultados do presente estudo mostram valores de 167 Nm e 179 Nm, respectivamente. Warren et al. (1999) afirmaram que a capacidade de um músculo produzir força é o principal indicador de dano muscular. Assim, pode-se sugerir que o dano tenha sido maior com o protocolo aplicado nesse estudo.

Era esperado que a aplicação da fototerapia reduzisse as alterações dos marcadores indiretos de dano e de inflamação. Apesar de o estudo de Baroni et al. (2010a) ter reportado efeitos benéficos de uma dose de 180J para o controle do dano muscular, a mesma dose no presente estudo não promoveu o mesmo efeito. Essas diferenças podem ter sido provocadas devido as respostas à aplicação da fototerapia serem dose-dependente (AIMBIRE; ALBERTINI; PACHECO; CASTRO-FARIA-NETO; LEONARDO; IVERSEN; LOPES-MARTINS; BJORDAL, 2006a; DE ALMEIDA et al., 2011), e apesar de já ter sido utilizada com sucesso, a dose utilizada nesse estudo pode não ter sido adequada para alcançar os benefícios esperados. Conforme discutido anteriormente, é possível que o dano muscular induzido tenha sido mais exacerbado do que no estudo de Baroni et al. (2010a), e a dose de energia necessária para que algum efeito fosse observado deveria ter sido maior do que a aplicada. Assim, é possível que a dose de energia necessária para produzir benefícios em atenuar o dano muscular seja dependente também do grau de dano induzido. Dessa maneira, outras doses de energia devem ser testadas em modelos semelhantes ao utilizado nesse estudo para investigar os benefícios dessa terapia para a redução do dano e da inflamação em decorrência de modelos de treinamento que se assemelhem aos realizados por praticantes do TF.

É interessante notar que, apesar de não ter produzido efeito em nenhuma outra variável, houve um efeito principal de grupo na circunferência da coxa, indicando que as alterações foram menores no grupo que recebeu a fototerapia. As alterações da circunferência são frequentemente utilizadas como um indicador de edema induzido pela inflamação (PROSKE; MORGAN, 2001). Sendo assim, seria possível sugerir que a inflamação foi menor no grupo que recebeu a fototerapia. Contudo, a medida dos focos de infiltração de células inflamatórias, a qual representa de forma mais precisa o grau de inflamação, não foi diferente entre os

grupos experimentais, sugerindo que a fototerapia não teve efeito significativo na modulação da inflamação 2h pós-exercício. Uma possibilidade reside nos diferentes momentos em que foram realizadas as avaliações, pois nota-se que só foi observado diferença significativa na circunferência do segmento a partir de 48h após a primeira sessão de treinamento de força. Apesar de não ter efeito agudo sobre a infiltração das células inflamatórias, é possível que a fototerapia tenha afetado de alguma maneira a inflamação de maneira tardia. Um possível efeito tardio também foi observado nas alterações da CK no momento 96h. Os mecanismos responsáveis por essas diferenças não podem ser esclarecidos com os procedimentos utilizados nesse estudo.

Outros estudos investigaram o efeito da fototerapia (laser de baixa intensidade e LED) e observaram redução dos marcadores inflamatórios após um estímulo agressor (ALBERTINI et al., 2007; DE ALMEIDA et al., 2011; MESQUITA-FERRARI et al., 2011; FUKUDA; TANJI; SILVA; SATO; PLAPLER, 2012). Albertini et al. (2007) observaram efeitos benéficos (redução) na migração de células inflamatórias e no edema em grupos de ratos que receberam a irradiação de luz após injeção com veneno de cobra. Mesquita-Ferrari et al. (2011) reportaram, com o uso de modelo animal, diminuição nas respostas de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  após criolesão e tratamento com terapia de laser de baixa intensidade. De forma semelhante, Fukuda et al. (2012) observaram que a terapia com laser de baixa intensidade reduziu as repostas de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  após procedimento cirúrgico (três incisões cutâneas e uma na musculatura abdominal seguidas de sutura) em ratos, mas não teve nenhum efeito sobre as concentrações de IL-6 e de TGF- $\beta$ . No entanto, apenas um estudo utilizou modelo que incluía a realização de sessões de exercícios com os animais (DE ALMEIDA et al., 2011) e reportou redução da expressão gênica da COX-2 imediatamente após uma sessão de seis contrações eletroestimuladas em ratos Wistar.

A fototerapia também não teve efeitos sobre o conteúdo total de proteínas chaves da via de sinalização de hipertrofia, como a mTOR, a 4E-BP1 e a rpS6. A importância dessas proteínas foi inicialmente investigada utilizando modelos com animais.

A função do mTOR foi observada em modelos com animais *knockout* e em com a inibição farmacológica dessa proteína (BODINE et al., 2001). A inibição da mTOR através de agentes farmacológicos reduzia drasticamente o crescimento



celular, mas não provocava a atrofia dos músculos. É possível sugerir, então, que a redução da quantidade de mTOR pode prejudicar a hipertrofia dos músculos submetidos a sobrecarga como o treinamento de força.

A proteína ribossomal S6 é encontrada na subunidade 40S dos ribossomos. Deve ser destacado que uma redução entre 30 a 50% do conteúdo da rpS6 tem pouca influência na regulação da síntese proteica (SULIC; PANIC; BARKIC; MERCEP; UZELAC; VOLAREVIC, 2005). Esses resultados sugerem que a quantidade total da rpS6 pode não determinar de maneira importante a síntese de proteínas. Dessa maneira, ausência de diferenças no conteúdo total de rpS6 não sugere que o estímulo de treino oferecido não tenha produzido efeitos positivos na síntese proteica, pois a fosforilação dessa proteína pode ter sido afetada pela realização das sessões de treinamento. No entanto, a quantidade de rpS6 fosforilada não foi avaliada nesse estudo.

Porém, a ativação (fosforilação) de uma das proteínas *upstream* da rpS6, responsável por sua fosforilação, a p70<sup>S6k1</sup>, não foi afetada pela realização da sessão de treinamento. Esses resultados poderiam sugerir que a atividade da rpS6 não tenha sido afetada pela realização das sessões de treinamento. Evidente que não pode ser descartado o fato que o baixo número de amostras e as características da medida (grande variabilidade inter-sujeito), tenham impedido que possíveis as alterações atingissem significância estatística.

A quantidade total de outra proteína participante dessa via de sinalização, a 4E-BP1, também não foi alterada. Resultados semelhantes foram encontrados por Ogasawara, Kobayashi, Tsutaki, Lee, Abe, Fujita, Nakazato e Ishii (OGASAWARA; KOBAYASHI; TSUTAKI; LEE; ABE; FUJITA; NAKAZATO; ISHII, 2013). Esses autores investigaram a quantidade total e a fosforilação dessa proteína em ratos submetidos a uma, 12 ou 18 sessões de treinamento e observaram que a quantidade total só estava aumentada após 18 sessões. É possível, então, que caso os indivíduos repetissem as sessões de treinamento, a quantidade total dessa proteína aumentaria.

Nossos resultados indicam que apesar de ter sido utilizada uma dose que se mostrou bem sucedida anteriormente (BARONI et al., 2010a), a fototerapia não afetou a ocorrência do dano e nem a resposta inflamatória. Em adição, a realização de uma sessão de treinamento não alterou de maneira aguda a expressão de

proteínas totais participantes da via de PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6k1</sup>, nem a fosforilação da p70<sup>S6k1</sup>.

## 6.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS SESSÕES DE TREINAMENTO DE FORÇA – EFEITO DA CARGA REPETIDA

Foram realizadas as comparações entre os grupos fototerapia e placebo após a realização das duas sessões experimentais. Essas comparações não indicaram diferenças significantes entre os grupos, sugerindo que a fototerapia não afetou o efeito da carga repetida. Como não houve diferenças entre os grupos, os dados foram agrupados. As alterações que ocorrem após a segunda sessão de TF foram menores e a recuperação mais rápida do que na sessão inicial. Esses resultados são consistentes com os observados por estudos que investigaram o ECR. Os efeitos de interação observados nas variáveis DOR e CK e os efeitos principais de sessão nas variáveis torque relativo, ADM e delta ADM refletem que o ECR se manifestou após a realização da segunda sessão de TF.

Dois estudos semelhantes foram encontrados na literatura. Howatson, Goodall e van Someren (2009) investigaram a utilização da crioterapia (imersão em água a 15°C) no ECR, enquanto Paulsen et al. (2010) utilizaram drogas anti-inflamatórias com o mesmo intuito e avaliaram também marcadores inflamatórios.

No primeiro estudo (2009), os voluntários realizaram duas sessões de saltos em profundidade que consistiam de cinco séries de 20 saltos de 60 cm. Após a primeira sessão de treinamento, os voluntários do grupo crioterapia ficaram imersos durante 12 minutos em água a 15°C imediatamente, 24h, 48h, 72h e 96h após o término do treinamento, enquanto o grupo controle não recebeu nenhum tratamento. Em ambos os grupos, foram observadas alterações semelhantes nos marcadores indiretos de dano muscular. Após a segunda sessão de treinamento, nenhum dos voluntários foi submetido a crioterapia. Os resultados demonstraram que o ECR se manifestou de maneira similar nos dois grupos. Paulsen et al. (2010) realizaram um desenho experimental semelhante. No entanto, com o intuito de diminuir a inflamação, esses autores administraram doses diárias de droga anti-inflamatória por nove dias e reportaram que o anti-inflamatório teve efeito apenas na DOR, sem afetar os demais marcadores indiretos de dano e de inflamação após a primeira sessão. Os dados de Paulsen et al. (2010) são semelhantes aos desse estudo, pois após a realização da primeira sessão de treinamento e a utilização de

uma estratégia para reduzir a inflamação, não observou-se diferença significativa entre os grupos experimentais. Adicionalmente, Paulsen et al. (2010) observaram que o dano induzido pelo treinamento não foi diferente entre as sessões, sugerindo que em sua investigação não existiu o ECR, resultados contrários aos nossos e aos de Howatson, Goodall e van Someren (2009). Uma vez que a inflamação parece ser um fator chave no desencadeamento do efeito protetor (LAPOINTE; FREMONT; COTE, 2002), a ausência de efeitos da fototerapia na inflamação após a primeira sessão sugeria que o ECR seria semelhante nos dois grupos experimentais, o que de fato ocorreu.

McHugh (2003) propôs a existência de três possíveis mecanismos responsáveis pelas adaptações protetoras: neural, mecânico e celular. Esses três mecanismos explicariam a redução do dano induzido pelo estímulo mecânico. Com os métodos utilizados nesse estudo, tentamos testar a influência do mecanismo celular (inflamação) no efeito protetor. Uma vez que a estratégia utilizada para modular a inflamação não foi efetiva, não podemos apresentar conclusões sobre esse mecanismo. No entanto, com os resultados encontrados, é razoável sugerir mais um possível mecanismo responsável por essas adaptações, pois apesar de ter havido um efeito protetor conferido pela realização da primeira sessão de treinamento, as alterações nos marcadores indiretos de dano e de inflamação observadas no primeiro momento após a realização do treinamento (2h) foram semelhantes entre as sessões de TF. Esses resultados sugerem que o dano induzido pelo estímulo mecânico (sessão de treinamento) foi semelhante entre as sessões, contrariando os mecanismos propostos anteriormente (MCHUGH, 2003). Portanto, o ECR observado pode não ser um fenômeno que protege a fibra da ocorrência de dano por tornar o músculo mais resistente ao estímulo mecânico, mas sim uma adaptação que protege a fibra do dano secundário.

Independentemente do grupo experimental, a adaptação protetora pode ter como origem o aumento da atividade mitocondrial, elevando a capacidade oxidativa da célula o que eventualmente protege a fibra do estresse oxidativo e conseqüentemente do dano secundário (KNIGHT, 1976). É conhecido que a ausência da mTOR reduz a atividade mitocondrial (RISSON; MAZELIN; ROCERI; SANCHEZ; MONCOLLIN; CORNELOUP; RICHARD-BULTEAU; VIGNAUD; BAAS; DEFOUR; FREYSSENET; TANTI; LE-MARCHAND-BRUSTEL; FERRIER; CONJARD-DUPLANY; ROMANINO; BAUCHE; HANTAI; MUELLER; KOZMA;

THOMAS; RUEGG; FERRY; PENDE; BIGARD; KOULMANN; SCHAEFFER; GANGLOFF, 2009). Assim, o acréscimo da quantidade total de mTOR pode garantir um aumento da atividade mitocondrial e conseqüentemente da capacidade oxidativa, reduzindo os efeitos do estresse oxidativo gerado após a realização de uma sessão de TF. Se for assumido que essa proteína esteja sujeita a um mecanismo similar ao da supercompensação, podemos sugerir que o fator desencadeador do aumento do conteúdo de mTOR total no músculo de uma sessão para a outra tenha sido o estresse oxidativo produzido pelo dano muscular provocado pela primeira sessão de treinamento.

Alternativamente, Risson et al. (RISSON et al., 2009) reportaram também que ratos *knockout* para mTOR<sup>-/-</sup> eram mais susceptíveis à ocorrência do dano muscular do que ratos normais, sugerindo que a mTOR atue de alguma forma na ultraestrutura ou no citoesqueleto e proteja a fibra muscular do dano. Dessa maneira, a menor ocorrência do dano após a segunda sessão de treinamento parece estar associada ao aumento da mTOR em condições de repouso após a realização da primeira sessão de treinamento.

Apesar de o estímulo ter sido oferecido uma única vez e o tempo entre as sessões de treinamento ter sido relativamente longo, o aumento da mTOR total entre a realização da primeira e da segunda sessões de treinamento é condizente com o ECR e com sua duração, que pode chegar a até seis meses (NOSAKA et al., 2001a). Pode-se sugerir, então, que a quantidade de mTOR total permanece elevada por esse período de aproximadamente seis meses, em resposta a uma única aplicação de um estímulo estressor. No entanto essa hipótese precisa ser testada.

A fosforilação da p70<sup>S6K1</sup> não foi afetada também pela segunda sessão de exercício, o que novamente pode ter sido provocado pela reduzido número de amostras e grande variabilidade da medida. Apesar disso, o tamanho do efeito calculado após a segunda sessão de TF foi bastante reduzido, passando de pequeno (placebo) ou moderado (fototerapia) para trivial em ambos os grupos. Assim, é possível que a fosforilação dessa proteína sofra uma dessensibilização após a realização de sessões repetidas de TF (OGASAWARA et al., 2013). Conhecendo-se que o grau de dano muscular tende a diminuir com a realização de sessões repetidas de TF (CHEN; CHEN; LIN; WU; NOSAKA, 2009; BARROSO et al., 2010) e

associando-se aos resultados reportados por Ogasawara et al. (2013) pode-se sugerir que o dano muscular afete a fosforilação dessa proteína.

Dessa maneira, como o dano induzido pela primeira sessão de treinamento foi semelhante entre as sessões, era esperado que o ECR se manifestasse de maneira similar nos dois grupos experimentais, promovendo o mesmo grau de dano e de proteção nos dois grupos experimentais após a realização da segunda sessão de treinamento de força. Adicionalmente, a resposta na inflamação bem como nas proteínas avaliadas também deveriam ser similares, como realmente aconteceu.

## **7. CONCLUSÃO**

A fototerapia não foi eficiente em reduzir a ocorrência do dano muscular, nem em modular a inflamação de maneira aguda. Uma provável razão é a dose insuficiente de irradiação de luz oferecida aos músculos exercitados, indicando que a dose necessária pode ser dependente do grau de dano muscular induzido.

O aumento da quantidade de mTOR total pode representar um novo candidato a mecanismo responsável pelos efeitos protetores advindos da realização de uma sessão de treinamento que induz dano muscular.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. R.; CHENG, D. C.; HADDAD, F.; BALDWIN, K. M. Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration. *J Appl Physiol*, v. 96, n. 5, p. 1613-8, 2004.

AHTIAINEN, J. P.; PAKARINEN, A.; ALEN, M.; KRAEMER, W. J.; HAKKINEN, K. Muscle hypertrophy, hormonal adaptations and strength development during strength training in strength-trained and untrained men. *Eur J Appl Physiol*, v. 89, n. 6, p. 555-63, 2003.

AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R.; PACHECO, M. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; LEONARDO, P. S.; IVERSEN, V. V.; LOPES-MARTINS, R. A.; BJORDAL, J. M. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg*, v. 24, n. 1, p. 33-7, 2006a.

AIMBIRE, F.; LOPES-MARTINS, R. A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; ALBERTINI, R.; CHAVANTES, M. C.; PACHECO, M. T.; LEONARDO, P. S.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Low-level laser therapy can reduce lipopolysaccharide-induced contractile force dysfunction and TNF-alpha levels in rat diaphragm muscle. *Lasers Med Sci*, v. 21, n. 4, p. 238-44, 2006b.

AL-NAEMI, H.; BALDWIN, A. L. Nitric oxide: role in venular permeability recovery after histamine challenge. *Am J Physiol*, v. 277, n. 5 Pt 2, p. H2010-6, 1999.

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A. B.; AIMBIRE, F.; SALGADO, M. A.; BJORDAL, J. M.; ALVES, L. P.; MUNIN, E.; COSTA, M. S. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B*, v. 89, n. 1, p. 50-5, 2007.

ALMEKINDERS, L. C. Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sport. An update of recent studies. *Sports Med*, v. 28, n. 6, p. 383-8, 1999.

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

BAPTISTA, J.; MARTINS, M. D.; PAVESI, V. C.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P.; PINTO JUNIOR, S. D.; FERRARI, R. A. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photomed Laser Surg*, v. 29, n. 1, p. 11-7, 2011.

BARASH, I. A.; PETERS, D.; FRIDEN, J.; LUTZ, G. J.; LIEBER, R. L. Desmin cytoskeletal modifications after a bout of eccentric exercise in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 283, n. 4, p. R958-63, 2002.

BARONI, B. M.; LEAL JUNIOR, E. C.; DE MARCHI, T.; LOPES, A. L.; SALVADOR, M.; VAZ, M. A. Low level laser therapy before eccentric exercise reduces muscle damage markers in humans. *Eur J Appl Physiol*, v. 110, n. 4, p. 789-96, 2010a.

BARONI, B. M.; LEAL JUNIOR, E. C.; GEREMIA, J. M.; DIEFENTHAELER, F.; VAZ, M. A. Effect of light-emitting diodes therapy (LEDT) on knee extensor muscle fatigue. *Photomed Laser Surg*, v. 28, n. 5, p. 653-8, 2010b.

BARROSO, R.; ROSCHEL, H.; UGRINOWITSCH, C.; ARAUJO, R.; NOSAKA, K.; TRICOLI, V. Effect of eccentric contraction velocity on muscle damage in repeated bouts of elbow flexor exercise. *Appl Physiol Nutr Metab*, v. 35, n. 4, p. 534-40, 2010.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunol Today*, v. 15, n. 2, p. 74-80, 1994.

BENEKE, R.; HUTLER, M. The effect of training on running economy and performance in recreational athletes. *Med Sci Sports Exerc*, v. 37, n. 10, p. 1794-9, 2005.

BJORDAL, J. M.; JOHNSON, M. I.; IVERSEN, V.; AIMBIRE, F.; LOPES-MARTINS, R. A. Low level laser therapy in acute pain: a systematic review of possible



mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomed Laser Surg*, v. 24, n. 2, p. 158-68, 2006.

BODINE, S. C.; STITT, T. N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W. O.; STOVER, G. L.; BAUERLEIN, R.; ZLOTCHENKO, E.; SCRIMGEOUR, A.; LAWRENCE, J. C.; GLASS, D. J.; YANCOPOULOS, G. D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, v. 3, n. 11, p. 1014-9, 2001.

BOLSTER, D. R.; JEFFERSON, L. S.; KIMBALL, S. R. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. *Proc Nutr Soc*, v. 63, n. 2, p. 351-6, 2004.

BOLSTER, D. R.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Translational control mechanisms modulate skeletal muscle gene expression during hypertrophy. *Exerc Sport Sci Rev*, v. 31, n. 3, p. 111-6, 2003.

BONDESEN, B. A.; MILLS, S. T.; KEGLEY, K. M.; PAVLATH, G. K. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 287, n. 2, p. C475-83, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRANDENBURG, J. P.; DOCHERTY, D. The effects of accentuated eccentric loading on strength, muscle hypertrophy, and neural adaptations in trained individuals. *J Strength Cond Res*, v. 16, n. 1, p. 25-32, 2002.

BROWN, L. E.; WEIR, J. P. ASEP procedures recommendation I: accurate assessment of muscular strength and power. *J Exerc Physiol (on line)*, v. 4, n. 3, p. 1-21, 2001.

BROWN, S. J.; CHILD, R. B.; DAY, S. H.; DONNELLY, A. E. Exercise-induced

skeletal muscle damage and adaptation following repeated bouts of eccentric muscle contractions. *J Sports Sci*, v. 15, n. 2, p. 215-22, 1997a.

\_\_\_\_\_. Indices of skeletal muscle damage and connective tissue breakdown following eccentric muscle contractions. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, v. 75, n. 4, p. 369-74, 1997b.

BURD, N. A.; DICKINSON, J. M.; LEMOINE, J. K.; CARROLL, C. C.; SULLIVAN, B. E.; HAUS, J. M.; JEMIOLO, B.; TRAPPE, S. W.; HUGHES, G. M.; SANDERS, C. E., JR.; TRAPPE, T. A. Effect of a cyclooxygenase-2 inhibitor on postexercise muscle protein synthesis in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 298, n. 2, p. E354-61, 2010.

BURRY, M.; HAWKINS, D.; SPANGENBURG, E. E. Lengthening contractions differentially affect p70s6k phosphorylation compared to isometric contractions in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, v. 100, n. 4, p. 409-15, 2007.

BUTTERFIELD, T. A.; BEST, T. M. Stretch-activated ion channel blockade attenuates adaptations to eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, v. 41, n. 2, p. 351-6, 2009.

BYRNE, C.; ESTON, R. G.; EDWARDS, R. H. Characteristics of isometric and dynamic strength loss following eccentric exercise-induced muscle damage. *Scand J Med Sci Sports*, v. 11, n. 3, p. 134-40, 2001.

CAMARGO, M. Z.; SIQUEIRA, C. P.; PRETI, M. C.; NAKAMURA, F. Y.; DE LIMA, F. M.; DIAS, I. F.; TOGINHO FILHO, O. D.; RAMOS, P. S. Effects of light emitting diode (LED) therapy and cold water immersion therapy on exercise-induced muscle damage in rats. *Lasers Med Sci*, v. 27, n. 5, p. 1051-8, 2012.

CAMPOS, G. E.; LUECKE, T. J.; WENDELN, H. K.; TOMA, K.; HAGERMAN, F. C.; MURRAY, T. F.; RAGG, K. E.; RATAMESS, N. A.; KRAEMER, W. J.; STARON, R. S. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol*, v. 88, n. 1-2, p.

50-60, 2002.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, v. 296, n. 5573, p. 1655-7, 2002.

CHAPMAN, D.; NEWTON, M.; SACCO, P.; NOSAKA, K. Greater muscle damage induced by fast versus slow velocity eccentric exercise. *Int J Sports Med*, v. 27, n. 8, p. 591-8, 2006.

CHEN, T. C.; CHEN, H. L.; LIN, M. J.; WU, C. J.; NOSAKA, K. Muscle damage responses of the elbow flexors to four maximal eccentric exercise bouts performed every 4 weeks. *Eur J Appl Physiol*, v. 106, n. 2, p. 267-75, 2009.

CHILD, R. B.; SAXTON, J. M.; DONNELLY, A. E. Comparison of eccentric knee extensor muscle actions at two muscle lengths on indices of damage and angle-specific force production in humans. *J Sports Sci*, v. 16, n. 4, p. 301-8, 1998.

CLARKSON, P. M. Eccentric exercise and muscle damage. *Int J Sports Med*, v. 18 Suppl 4, p. S314-7, 1997.

CLARKSON, P. M.; SAYERS, S. P. Etiology of exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol*, v. 24, n. 3, p. 234-48, 1999.

CLEARY, M. A.; SITLER, M. R.; KENDRICK, Z. V. Dehydration and symptoms of delayed-onset muscle soreness in normothermic men. *J Athl Train*, v. 41, n. 1, p. 36-45, 2006.

CORRADETTI, M. N.; GUAN, K. L. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene*, v. 25, n. 48, p. 6347-60, 2006.

CWIKEL, J.; FRIED, A. V.; GALISNKY, D.; RING, H. Gait and activity in the elderly: implications for community falls-prevention and treatment programmes. *Disability and Rehabilitation*, v. 17, n. 6, p. 277-80, 1995.

DE ALMEIDA, P.; LOPES-MARTINS, R. A.; TOMAZONI, S. S.; SILVA, J. A., JR.; DE CARVALHO, P. T.; BJORDAL, J. M.; LEAL JUNIOR, E. C. Low-level laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. *Photochem Photobiol*, v. 87, n. 5, p. 1159-63, 2011.

DEAL, D. N.; TIPTON, J.; ROSENCRANCE, E.; CURL, W. W.; SMITH, T. L. Ice reduces edema. A study of microvascular permeability in rats. *J Bone Joint Surg Am*, v. 84-A, n. 9, p. 1573-8, 2002.

DESCHENES, M. R.; KRAEMER, W. J. Performance and physiologic adaptations to resistance training. *Am J Phys Med Rehabil*, v. 81, n. 11 Suppl, p. S3-16, 2002.

DOLAN, M. G.; THORNTON, R. M.; FISH, D. R.; MENDEL, F. C. Effects of Cold Water Immersion on Edema Formation After Blunt Injury to the Hind Limbs of Rats. *J Athl Train*, v. 32, n. 3, p. 233-237, 1997.

ELIASSON, J.; ELFEGOUN, T.; NILSSON, J.; KOHNKE, R.; EKBLUM, B.; BLOMSTRAND, E. Maximal lengthening contractions increase p70 S6 kinase phosphorylation in human skeletal muscle in the absence of nutritional supply. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 291, n. 6, p. E1197-205, 2006.

ENOKA, R. Eccentric contractions require unique activation strategies by the nervous system. *J Appl Physiol*, v. 81, n. 6, p. 2339-2346, 1996.

ENWEMEKA, C. S. Light is light. *Photomed Laser Surg*, v. 23, n. 2, p. 159-60, 2005.

\_\_\_\_\_. Standard parameters in laser phototherapy. *Photomed Laser Surg*, v. 26, n. 5, p. 411, 2008.

FLANN, K. L.; LASTAYO, P. C.; MCCLAIN, D. A.; HAZEL, M.; LINDSTEDT, S. L. Muscle damage and muscle remodeling: no pain, no gain? *J Exp Biol*, v. 214, n. Pt 4, p. 674-9, 2011.

FLECK, S. J.; KRAEMER, W. J. Designing resistance training program. 3rd. Champaign: Human Kinetics, 2003.

FUKUDA, T. Y.; TANJI, M. M.; SILVA, S. R.; SATO, M. N.; PLAPLER, H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. *Lasers Med Sci*, 2012.

GLASS, D. J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol*, v. 5, n. 2, p. 87-90, 2003.

GOLDSPINK, G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat*, v. 194 ( Pt 3), p. 323-34, 1999.

HARA, K.; YONEZAWA, K.; KOZLOWSKI, M. T.; SUGIMOTO, T.; ANDRABI, K.; WENG, Q. P.; KASUGA, M.; NISHIMOTO, I.; AVRUCH, J. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem*, v. 272, n. 42, p. 26457-63, 1997.

HIGBIE, E. J.; CURETON, K. J.; WARREN, G. L.; PRIOR, B. M. Effects of concentric and eccentric training on muscle strength, cross-sectional area, and neural activation. *J Appl Physiol*, v. 81, n. 5, p. 2173-81, 1996.

HONG, E. G.; KO, H. J.; CHO, Y. R.; KIM, H. J.; MA, Z.; YU, T. Y.; FRIEDLINE, R. H.; KURT-JONES, E.; FINBERG, R.; FISCHER, M. A.; GRANGER, E. L.; NORBURY, C. C.; HAUSCHKA, S. D.; PHILBRICK, W. M.; LEE, C. G.; ELIAS, J. A.; KIM, J. K. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes*, v. 58, n. 11, p. 2525-35, 2009.

HOPKINS, W. G. A new view of statistics. <http://www.sportsci.org/resource/stats/>, 2004.

HORNBERGER, T. A.; CHIEN, S. Mechanical stimuli and nutrients regulate rapamycin-sensitive signaling through distinct mechanisms in skeletal muscle. *J Cell*

Biochem, v. 97, n. 6, p. 1207-16, 2006.

HORNBERGER, T. A.; ESSER, K. A. Mechanotransduction and the regulation of protein synthesis in skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*, v. 63, n. 2, p. 331-5, 2004.

HORTOBÁGYI, T.; DEMPSEY, L.; FRASER, D.; ZHENG, N.; HAMILTON, G.; LAMBERT, J.; DOHM, L. Changes in muscle strength, muscle fiber size and myofibrillar gene expressions after immobilization and retraining in humans. *J Physiol*, v. 524, n. 1, p. 293-304, 2000.

HORTOBÁGYI, T.; HILL, J. P.; HOUMARD, J. A.; FRASER, D. D.; LAMBERT, N. J.; ISRAEL, R. G. Adaptive responses to muscle lengthening and shortening in humans. *J Appl Physiol*, v. 80, n. 3, p. 765-72, 1996.

HOWATSON, G.; GAZE, D.; VAN SOMEREN, K. A. The efficacy of ice massage in the treatment of exercise-induced muscle damage. *Scand J Med Sci Sports*, v. 15, n. 6, p. 416-22, 2005.

HOWATSON, G.; GOODALL, S.; VAN SOMEREN, K. A. The influence of cold water immersions on adaptation following a single bout of damaging exercise. *Eur J Appl Physiol*, v. 105, n. 4, p. 615-21, 2009.

HUANG, Y. Y.; NAGATA, K.; TEDFORD, C. E.; MCCARTHY, T.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. *J Biophotonics*, 2012.

HULMI, J. J.; TANNERSTEDT, J.; SELANNE, H.; KAINULAINEN, H.; KOVANEN, V.; MERO, A. A. Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. *J Appl Physiol*, v. 106, n. 5, p. 1720-9, 2009.

IHSAN, F. R. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg*, v. 23, n. 3, p. 289-94, 2005.

JAMURTAS, A. Z.; THEOCHARIS, V.; TOFAS, T.; TSIOKANOS, A.; YFANTI, C.; PASCHALIS, V.; KOUTEDAKIS, Y.; NOSAKA, K. Comparison between leg and arm eccentric exercises of the same relative intensity on indices of muscle damage. *Eur J Appl Physiol*, v. 95, n. 2-3, p. 179-85, 2005.

JARVINEN, T. A.; JARVINEN, T. L.; KAARIAINEN, M.; AARIMAA, V.; VAITTINEN, S.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, v. 21, n. 2, p. 317-31, 2007.

JARVINEN, T. A.; JARVINEN, T. L.; KAARIAINEN, M.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*, v. 33, n. 5, p. 745-64, 2005.

KARU, T. I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J Quantum Electronics*, v. 23, n. 10, p. 1703-17, 1987.

KNIGHT, K. The effects of hypothermia on inflammation and swelling. *J Athl Train*, v. 11, n. 1, p. 7-10, 1976.

KOH, T. J.; BROOKS, S. V. Lengthening contractions are not required to induce protection from contraction-induced muscle injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 281, n. 1, p. R155-61, 2001.

KOH, T. J.; PETERSON, J. M.; PIZZA, F. X.; BROOKS, S. V. Passive stretches protect skeletal muscle of adult and old mice from lengthening contraction-induced injury. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 58, n. 7, p. 592-7, 2003.

KOH, T. J.; PIZZA, F. X. Do inflammatory cells influence skeletal muscle hypertrophy? *Front Biosci (Elite Ed)*, v. 1, p. 60-71, 2009.

KOMI, P. V.; BUSKIRK, E. R. Effect of eccentric and concentric muscle conditioning on tension and electrical activity of human muscle. *Ergonomics*, v. 15, n. 4, p. 417-34, 1972.

KOMULAINEN, J.; KALLIOKOSKIM, R.; KOSKINEN, S. O. A.; DROST, M. R.; KULPERS, H.; HESSELINK, M. K. C. Controlled lengthening or shortening contraction-induced damage is followed by fiber hypertrophy in rat skeletal muscle. *Int J Sports Med*, v. 21, p. 107-12, 2000.

KOOPMAN, R.; ZORENC, A. H.; GRANSIER, R. J.; CAMERON-SMITH, D.; VAN LOON, L. J. Increase in S6K1 phosphorylation in human skeletal muscle following resistance exercise occurs mainly in type II muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 290, n. 6, p. E1245-52, 2006.

KUBICA, N.; BOLSTER, D. R.; FARRELL, P. A.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2Bepsilon mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem*, v. 280, n. 9, p. 7570-80, 2005.

LAKYOVA, L.; TOPORCER, T.; TOMECKOVA, V.; SABO, J.; RADONAK, J. Low-level laser therapy for protection against skeletal muscle damage after ischemia-reperfusion injury in rat hindlimbs. *Lasers Surg Med*, v. 42, n. 9, p. 665-72, 2010.

LAPOINTE, B. M.; FREMONT, P.; COTE, C. H. Adaptation to lengthening contractions is independent of voluntary muscle recruitment but relies on inflammation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 282, n. 1, p. R323-9, 2002.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; BARONI, B. M.; DE MARCHI, T.; TAUFER, D.; MANFRO, D. S.; RECH, M.; DANNA, V.; GROSSELLI, D.; GENEROSI, R. A.; MARCOS, R. L.; RAMOS, L.; BJORDAL, J. M. Effect of 830 nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. *Lasers Med Sci*, v. 24, n. 6, p. 857-63, 2009a.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; DE ALMEIDA, P.; RAMOS, L.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. *Eur J Appl Physiol*, v. 108, n. 6, p. 1083-8, 2010.



LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; ROSSI, R. P.; DE MARCHI, T.; BARONI, B. M.; DE GODOI, V.; MARCOS, R. L.; RAMOS, L.; BJORDAL, J. M. Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. *Lasers Surg Med*, v. 41, n. 8, p. 572-7, 2009b.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; VANIN, A. A.; BARONI, B. M.; GROSSELLI, D.; DE MARCHI, T.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med Sci*, v. 24, n. 3, p. 425-31, 2009c.

LIEBER, R. L.; FRIDEN, J. Selective damage to fast glycolytic muscle fibres with eccentric contraction of the rabbit tibialis anterior. *Acta Physiol Scand*, v. 133, p. 587-8, 1988.

LIM, W.; LEE, S.; KIM, I.; CHUNG, M.; KIM, M.; LIM, H.; PARK, J.; KIM, O.; CHOI, H. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers Surg Med*, v. 39, n. 7, p. 614-21, 2007.

LINDSTEDT, S. L.; LASTAYO, P. C.; REICH, T. E. When active muscles lengthen: properties and consequences of eccentric contractions. *News Physiol Sci*, v. 16, p. 256-61, 2001.

LIU, X. G.; ZHOU, Y. J.; LIU, T. C.; YUAN, J. Q. Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. *Photomed Laser Surg*, v. 27, n. 6, p. 863-9, 2009.

LYNN, R.; MORGAN, D. L. Decline running produces more sarcomeres in rat vastus intermedius muscle fibers than does incline running. *J Appl Physiol*, v. 77, n. 3, p. 1439-44, 1994.

MARKWORTH, J. F.; CAMERON-SMITH, D. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ ; stimulates PI3K/ERK/mTOR signaling and skeletal myotube hypertrophy. *Am J Physiol Cell*

Physiol, v. 300, n. 3, p. C671-82, 2011.

MARTINEAU, L. C.; GARDINER, P. F. Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension. *J Appl Physiol*, v. 91, n. 2, p. 693-702, 2001.

MATSUDO, S.; ARAÚJO, T.; MATSUDO, V.; ANDRADE, D.; ANDRADE, E.; OLIVEIRA, L. C.; BRAGGION, G. Questionário internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. *Rev Bras Ativ Fís Saúde*, v. 6, n. 2, p. 5-18, 2001.

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

MCHUGH, M. P.; CONNOLLY, D. A. J.; ESTON, R. G.; GARTMAN, E. J.; GLEIM, G. W. Electromyographic analysis of repeated bouts of eccentric exercise. *J Sports Sci*, v. 19, p. 163-70, 2001.

MEDRADO, A. P.; SOARES, A. P.; SANTOS, E. T.; REIS, S. R.; ANDRADE, Z. A. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobiol B*, v. 92, n. 3, p. 144-52, 2008.

MERRICK, M. A.; RANKIN, J. M.; ANDRES, F. A.; HINMAN, C. L. A preliminary examination of cryotherapy and secondary injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*, v. 31, n. 11, p. 1516-21, 1999.

MESQUITA-FERRARI, R. A.; MARTINS, M. D.; SILVA, J. A., JR.; DA SILVA, T. D.; PIOVESAN, R. F.; PAVESI, V. C.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci*, v. 26, n. 3, p. 335-40, 2011.

MOLDOVEANU, A. I.; SHEPHARD, R. J.; SHEK, P. N. The cytokine response to physical activity and training. *Sports Med*, v. 31, n. 2, p. 115-44, 2001.

MORGAN, D. L. New insights into the behavior of muscle during active lengthening. *Biophys J*, v. 57, n. 2, p. 209-21, 1990.

MORGAN, J. E.; PARTRIDGE, T. A. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 35, n. 8, p. 1151-6, 2003.

NADER, G. A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 37, n. 10, p. 1985-96, 2005.

NARDONE, A.; ROMANO, C.; SCHIEPPATI, M. Selective recruitment of high-threshold human motor units during voluntary isotonic lengthening of active muscles. *J Physiol*, v. 409, p. 451-71, 1989.

NEWTON, M. J.; MORGAN, G. T.; SACCO, P.; CHAPMAN, D. W.; NOSAKA, K. Comparison of responses to strenuous eccentric exercise of the elbow flexors between resistance-trained and untrained men. *J Strength Cond Res*, v. 22, n. 2, p. 597-607, 2008.

NIEMAN, D. C.; DAVIS, J. M.; HENSON, D. A.; GROSS, S. J.; DUMKE, C. L.; UTTER, A. C.; VINCI, D. M.; CARSON, J. A.; BROWN, A.; MCANULTY, S. R.; MCANULTY, L. S.; TRIPLETT, N. T. Muscle cytokine mRNA changes after 2.5 h of cycling: influence of carbohydrate. *Med Sci Sports Exerc*, v. 37, n. 8, p. 1283-90, 2005.

NOSAKA, K.; CLARKSON, P. M. Muscle damage following repeated bouts of high force eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, v. 27, n. 9, p. 1263-9, 1995.

NOSAKA, K.; NEWTON, M. Concentric or eccentric training effect on eccentric exercise-induced muscle damage. *Med Sci Sports Exerc*, v. 34, n. 1, p. 63-9, 2002a.

\_\_\_\_\_. Difference in the magnitude of muscle damage between maximal and submaximal eccentric loading. *J Strength Cond Res*, v. 16, n. 2, p. 202-8, 2002b.

NOSAKA, K.; NEWTON, M.; SACCO, P. Responses of human elbow flexor muscles to electrically stimulated forced lengthening exercise. *Acta Physiol Scand*, v. 174, n. 2, p. 137-45, 2002.

NOSAKA, K.; SAKAMOTO, K. Effect of elbow joint angle on the magnitude of muscle damage to the elbow flexors. *Med Sci Sports Exerc*, v. 33, n. 1, p. 22-9, 2001.

NOSAKA, K.; SAKAMOTO, K.; NEWTON, M.; SACCO, P. How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? *Med Sci Sports Exerc*, v. 33, n. 9, p. 1490-5, 2001a.

\_\_\_\_\_. The repeated bout effect of reduced-load eccentric exercise on elbow flexor muscle damage. *Eur J Appl Physiol*, v. 85, p. 34-40, 2001b.

NOVAK, M. L.; BILLICH, W.; SMITH, S. M.; SUKHIJA, K. B.; MCLOUGHLIN, T. J.; HORNBERGER, T. A.; KOH, T. J. COX-2 inhibitor reduces skeletal muscle hypertrophy in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 296, n. 4, p. R1132-9, 2009.

OGASAWARA, R.; KOBAYASHI, K.; TSUTAKI, A.; LEE, K.; ABE, T.; FUJITA, S.; NAKAZATO, K.; ISHII, N. mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2013.

PALANIYANDI, S. S.; FERREIRA, J. C.; BRUM, P. C.; MOCHLY-ROSEN, D. PKC $\beta$ 1 inhibition attenuates myocardial infarction induced heart failure and is associated with a reduction of fibrosis and pro-inflammatory responses. *J Cell Mol Med*, v. 15, n. 8, p. 1769-77, 2011.

PAULSEN, G.; EGNER, I. M.; DRANGE, M.; LANGBERG, H.; BENESTAD, H. B.; FJELD, J. G.; HALLÉN, J.; RAASTAD, T. A COX-2 inhibitor reduces muscle soreness, but does not influence recovery and adaptation after eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports*, v. 20, n. 1, p. e195-207, 2010.

PIZZA, F. X.; KOH, T. J.; MCGREGOR, S. J.; BROOKS, S. V. Muscle inflammatory

cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. *J Appl Physiol*, v. 92, n. 5, p. 1873-8, 2002.

PIZZA, F. X.; PETERSON, J. M.; BAAS, J. H.; KOH, T. J. Neutrophils contribute to muscle injury and impair its resolution after lengthening contractions in mice. *J Physiol*, v. 562, n. Pt 3, p. 899-913, 2005.

POSTEN, W.; WRONE, D. A.; DOVER, J. S.; ARNDT, K. A.; SILAPUNT, S.; ALAM, M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg*, v. 31, n. 3, p. 334-40, 2005.

PROSKE, U.; MORGAN, D. L. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol*, v. 537, n. Pt 2, p. 333-45, 2001.

PUTMAN, C. T.; XU, X.; GILLIES, E.; MACLEAN, I. M.; BELL, G. J. Effects of strength, endurance and combined training on myosin heavy chain content and fibre-type distribution in humans. *Eur J Appl Physiol*, v. 92, n. 4-5, p. 376-84, 2004.

RISSON, V.; MAZELIN, L.; ROCERI, M.; SANCHEZ, H.; MONCOLLIN, V.; CORNELOUP, C.; RICHARD-BULTEAU, H.; VIGNAUD, A.; BAAS, D.; DEFOUR, A.; FREYSSENET, D.; TANTI, J. F.; LE-MARCHAND-BRUSTEL, Y.; FERRIER, B.; CONJARD-DUPLANY, A.; ROMANINO, K.; BAUCHE, S.; HANTAI, D.; MUELLER, M.; KOZMA, S. C.; THOMAS, G.; RUEGG, M. A.; FERRY, A.; PENDE, M.; BIGARD, X.; KOULMANN, N.; SCHAEFFER, L.; GANGLOFF, Y. G. Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *J Cell Biol*, v. 187, n. 6, p. 859-74, 2009.

SAM, M.; SHAH, S.; FRIDEN, J.; MILNER, D. J.; CAPETANAKI, Y.; LIEBER, R. L. Desmin knockout muscles generate lower stress and are less vulnerable to injury compared with wild-type muscles. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 279, n. 4, p. C1116-22, 2000.

SCHASER, K. D.; DISCH, A. C.; STOVER, J. F.; LAUFFER, A.; BAIL, H. J.;

MITTLMEIER, T. Prolonged superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats. *Am J Sports Med*, v. 35, n. 1, p. 93-102, 2007.

SCHIAFFINO, S.; MAMMUCARI, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle*, v. 1, n. 1, p. 4, 2011.

SCHOENFELD, B. J. Does exercise-induced muscle damage play a role in skeletal muscle hypertrophy? *J Strength Cond Res*, v. 26, n. 5, p. 1441-53, 2012.

SMITH, C.; KRUGER, M. J.; SMITH, R. M.; MYBURGH, K. H. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med*, v. 38, n. 11, p. 947-69, 2008.

SMITH, K. C. Laser (and LED) therapy is phototherapy. *Photomed Laser Surg*, v. 23, n. 1, p. 78-80, 2005.

SPANGENBURG, E. E.; MCBRIDE, T. A. Inhibition of stretch-activated channels during eccentric muscle contraction attenuates p70S6K activation. *J Appl Physiol*, v. 100, n. 1, p. 129-35, 2006.

SULIC, S.; PANIC, L.; BARKIC, M.; MERCEP, M.; UZELAC, M.; VOLAREVIC, S. Inactivation of S6 ribosomal protein gene in T lymphocytes activates a p53-dependent checkpoint response. *Genes Dev*, v. 19, n. 24, p. 3070-82, 2005.

TAKARADA, Y.; NAKAMURA, Y.; ARUGA, S.; ONDA, T.; MIYAZAKI, S.; ISHII, N. Rapid increase in plasma growth hormone after low-intensity resistance exercise with vascular occlusion. *J Appl Physiol*, v. 88, n. 1, p. 61-5, 2000.

TAKARADA, Y.; TAKAZAWA, H.; SATO, Y.; TAKEBAYASHI, S.; TANAKA, Y.; ISHII, N. Effects of resistance exercise combined with moderate vascular occlusion on muscular function in humans. *J Appl Physiol*, v. 88, n. 6, p. 2097-106, 2000.

TALBOT, J. A.; MORGAN, D. L. The effects of stretch parameters on eccentric exercise-induced damage to toad skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, v. 19, n. 3, p. 237-45, 1998.

TERZIS, G.; GEORGIADIS, G.; STRATAKOS, G.; VOGIATZIS, I.; KAVOURAS, S.; MANTA, P.; MASCHER, H.; BLOMSTRAND, E. Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. *Eur J Appl Physiol*, v. 102, n. 2, p. 145-52, 2008.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 288, p. R345-R353, 2005.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 76, n. 9, p. 4350-4, 1979.

TRAPPE, T. A.; FLUCKEY, J. D.; WHITE, F.; LAMBERT, C. P.; EVANS, W. J. Skeletal muscle PGF(2)(alpha) and PGE(2) in response to eccentric resistance exercise: influence of ibuprofen acetaminophen. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, n. 10, p. 5067-70, 2001.

TRAPPE, T. A.; WHITE, F.; LAMBERT, C. P.; CESAR, D.; HELLERSTEIN, M.; EVANS, W. J. Effect of ibuprofen and acetaminophen on postexercise muscle protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 282, n. 3, p. E551-6, 2002.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)*, v. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.

VOLTARELLI, J. C.; LOUGHRAN JUNIOR, T. P. Expansion of a subset of TCR gamma/delta human lymphocytes from various lymphoid organs cultured with recombinant IL-2. *Braz J Med Biol Res*, v. 27, n. 3, p. 709-18, 1994.

WARREN, G.; HERMANN, K. M.; INGALLS, C. P.; MASSELLI, M. R.;

ARMSTRONG, R. B. Decreased EMG median frequency during a second bout of eccentric contractions. *Med Sci Sports Exerc*, v. 32, n. 4, p. 820-9, 2000.

WARREN, G. L.; INGALLS, C. P.; LOWE, D. A.; ARMSTRONG, R. B. Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. *Exerc Sport Sci Rev*, v. 29, n. 2, p. 82-7, 2001.

WARREN, G. L.; LOWE, D. A.; ARMSTRONG, R. B. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med*, v. 27, n. 1, p. 43-59, 1999.

WEBSTER, N. R.; GALLEY, H. F. Inflammation and immunity. *Br J Anaesth*, v. 3, n. 2, p. 54-8, 2003.

WEINHEIMER, E. M.; JEMIOLO, B.; CARROLL, C. C.; HARBER, M. P.; HAUS, J. M.; BURD, N. A.; LEMOINE, J. K.; TRAPPE, S. W.; TRAPPE, T. A. Resistance exercise and cyclooxygenase (COX) expression in human skeletal muscle: implications for COX-inhibiting drugs and protein synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 292, n. 6, p. R2241-8, 2007.



## **ANEXOS**

### **Anexo 1**

Questionário Internacional de Atividade Física – forma curta

IPAQ-SF



## QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – VERSÃO CURTA -

Nome: \_\_\_\_\_  
Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Idade : \_\_\_\_ Sexo: F ( ) M ( )

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação à pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação !

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

**1a** Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias \_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

**1b** Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: \_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_

**2a.** Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar

**moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

**2b.** Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

**3a** Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

**3b** Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentado durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

**4a.** Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?  
\_\_\_\_\_ horas \_\_\_\_ minutos

**4b.** Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?  
\_\_\_\_\_ horas \_\_\_\_ minutos

### **PERGUNTA SOMENTE PARA O ESTADO DE SÃO PAULO**

5. Você já ouviu falar do Programa Agita São Paulo? ( ) Sim ( ) Não

6. Você sabe o objetivo do Programa? ( ) Sim ( ) Não

## CLASSIFICAÇÃO DO NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA IPAQ

**1. MUITO ATIVO:** aquele que cumpriu as recomendações de:

- a) VIGOROSA:  $\geq 5$  dias/sem e  $\geq 30$  minutos por sessão
- b) VIGOROSA:  $\geq 3$  dias/sem e  $\geq 20$  minutos por sessão + MODERADA e/ou CAMINHADA:  $\geq 5$  dias/sem e  $\geq 30$  minutos por sessão.

**2. ATIVO:** aquele que cumpriu as recomendações de:

- a) VIGOROSA:  $\geq 3$  dias/sem e  $\geq 20$  minutos por sessão; **ou**
- b) MODERADA ou CAMINHADA:  $\geq 5$  dias/sem e  $\geq 30$  minutos por sessão; ou
- c) Qualquer atividade somada:  $\geq 5$  dias/sem e  $\geq 150$  minutos/sem (caminhada + moderada + vigorosa).

**3. IRREGULARMENTE ATIVO:** aquele que realiza atividade física porém insuficiente para ser classificado como ativo pois não cumpre as recomendações quanto à frequência ou duração. Para realizar essa classificação soma-se a frequência e a duração dos diferentes tipos de atividades (caminhada + moderada + vigorosa). Este grupo foi dividido em dois sub-grupos de acordo com o cumprimento ou não de alguns dos critérios de recomendação:

**IRREGULARMENTE ATIVO A:** aquele que atinge pelo menos um dos critérios da recomendação quanto à frequência ou quanto à duração da atividade:

- a) Frequência: 5 dias /semana **ou**
- b) Duração: 150 min / semana

**IRREGULARMENTE ATIVO B:** aquele que não atingiu nenhum dos critérios da recomendação quanto à frequência nem quanto à duração.

**4. SEDENTÁRIO:** aquele que não realizou nenhuma atividade física por pelo menos 10 minutos contínuos durante a semana.

### Exemplos:

Indivíduos	Caminhada		Moderada		Vigorosa		Classificação
	F	D	F	D	F	D	
1	-	-	-	-	-	-	Sedentário
2	4	20	1	30	-	-	Irregularmente Ativo A
3	3	30	-	-	-	-	Irregularmente Ativo B
4	3	20	3	20	1	30	Ativo
5	5	45	-	-	-	-	Ativo
6	3	30	3	30	3	20	Muito Ativo
7	-	-	-	-	5	30	Muito Ativo

F = Frequência – D = Duração

**Anexo 2**

Consentimento livre e informado  
de participação em pesquisa científica

**ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE  
DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

---

**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

“INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO DO DANO MUSCULAR E DA INFLAMAÇÃO SOBRE O EFEITO DA CARGA REPETIDA E AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE HIPERTROFIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Prof Dr Valmor Tricoli

2. CARGO/FUNÇÃO

Professor Livre Docente

3. 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)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA

O estudo terá duração total de 12 meses mas a sua participação será em torno de 6 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 é verificar se o dano muscular causado por uma sessão de treinamento de força contribui para o processo de aumento (hipertrofia) da massa muscular nos membros inferiores. Os resultados obtidos no estudo poderão ser úteis na organização e prescrição do treinamento de força.

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

Antes do início do estudo, você responderá um questionário (anamnese) para identificar seu estado de saúde geral. Após isso, você será submetido ao procedimento de biópsia muscular com agulha através do qual um pequeno pedaço do músculo vasto lateral da coxa será retirado. Para este procedimento você receberá uma pequena anestesia na região. Uma semana após a biópsia você será submetido a medidas dos indicadores indiretos de dano muscular (sensação de dor na coxa, circunferência da coxa, amplitude de movimento do joelho e força muscular dos membros inferiores). Estes indicadores serão medidos antes, imediatamente após e 24, 48 e 96 horas após a realização das sessões de treinamento de força. Após a primeira medida, você será submetido a testes de força dinâmica máxima (1RM) nos exercícios "leg press" e extensão de joelhos. Em seguida você executará uma sessão de treinamento de força e duas horas após o treinamento será retirada outra amostra muscular de sua coxa. O estudo consistirá de 2 sessões de treinamento de força com intervalo de 14 dias entre elas e os mesmos procedimentos serão feitos nestas sessões. Serão feitas também coletas de sangue no seu braço antes, 24, 48 e 96 horas após a realização das sessões de treinamento de força. O protocolo de treinamento de força consistirá de 2 séries com 85-90% 1RM mais 2 séries com ênfase na fase excêntrica (descida do peso) com 120% 1RM.

**3.** desconfortos e riscos esperados;

Você poderá sentir uma pequena sensação de dor no local da incisão da biópsia. Esta sensação de dor será semelhante aquela que ocorre após um treinamento físico intenso. Esta sensação não impedirá você de maneira alguma a realizar as suas tarefas diárias de rotina. Além disso, será feita a limpeza no local da biópsia (pré e pós procedimento) para evitar o risco de infecção. Assim, apesar de extremamente reduzido, pode ocorrer inflamação local. Neste caso, você receberá atenção de um médico. Nos primeiros dias de treinamento, você poderá sentir dor muscular (24-72 hs após) decorrente do esforço nos exercícios, porém com o passar das primeiras sessões de treinamento as dores desaparecerão.

**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 existem procedimentos alternativos aos propostos no estudo.

### **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. Em caso de qualquer emergência médica, os responsáveis pelo estudo lhe acompanharão ao Hospital Universitário (HU) da USP que se localiza na Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 - Cidade Universitária- Fone: 3039-9468. 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.

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

Em caso de necessidade você poderá entrar em contato com o prof. Dr. Valmor Tricoli pelo telefone: 3091-2139 ou 9849-1378 e/ou o Prof. Renato Barroso pelo telefone 3091-8976 ou 9782-9004.

#### **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 2012.

\_\_\_\_\_  
assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
assinatura do pesquisador  
(carimbo ou nome legível)