

Treinamento de força/sobrecarga mecânica e sinalização do complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos na hipertrofia muscular em diferentes modelos experimentais: revisão sistemática

Resistance training/mechanical overload and mammalian target of rapamycin complex 1 signaling on muscle hypertrophy in different experimental

YAMADA AK, VOLTARELLI VA, PERTILLE A, BUENO JÚNIOR CR. Treinamento de força/sobrecarga mecânica e sinalização do complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos na hipertrofia muscular em diferentes modelos experimentais: uma revisão sistemática. *R. bras. Ci. e Mov* 2017;25(1):168-182.

RESUMO: O objetivo deste artigo de revisão sistemática foi apresentar o envolvimento da sinalização de aminoácidos e mecanotransdução na ativação do alvo mamífero de rapamicina do complexo 1 (mTORC1) na musculatura esquelética de animais e a expressão e papel do mTORC1 em humanos submetidos ao treinamento de força/estímulo mecânico. Foi realizada uma busca na base de dados PubMed com as seguintes palavras-chave: *mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1, resistance exercise, strength training, mechanical overload and skeletal muscle hypertrophy, amino acid sensing transporter e mechanotransduction*. Evidências demonstram que a ativação do mTORC1 possui correlação positiva com a hipertrofia muscular induzida pelo treinamento de força/estímulo mecânico. O mTORC1 integra diversos sinais oriundos de aminoácidos (sinalização de transportadores e sensores) e estímulo mecânico/treinamento de força (mecanotransdução). Ademais, o emprego de modelos de camundongos mutantes, abordagens genéticas, farmacológicas, cultura de células, modelos experimentais de treinamento de força para animais, assim como estudos com humanos, vêm possibilitando a elucidação destes mecanismos moleculares.

Palavras-chave: Biologia molecular; Músculo esquelético; Hipertrofia; Treinamento de resistência.

ABSTRACT: The aim of this systematic review was to provide comprehensive review about mechanotransduction and amino acid signaling in the activation of the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) in animal skeletal muscle and the expression and role of mTORC1 in humans in response to resistance training/mechanical stimulus. PubMed data base was used with the following key-words: *mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1, resistance exercise, strength training, mechanical overload and skeletal muscle hypertrophy, amino acid sensing transporter and mechanotransduction*. Evidence demonstrates that the activation of the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is correlated positively with skeletal muscle hypertrophy induced by resistance training/mechanical stimulus. mTORC1 integrates a myriad of signals coming from amino acids (transporter and sensing mechanisms) and mechanical stimulus/resistance training (mechanotransduction). Moreover, the utilization of mutant mice models, genetic, cell culture and pharmacological tools, experimental resistance exercise rodent models, as well as human studies have been elucidating these molecular mechanisms.

Key Words: Molecular biology; Skeletal muscle; Hypertrophy; Resistance training.

André Katayama Yamada¹
Vanessa A. Voltarelli²
Adriana Pertille¹
Carlos R. Bueno Júnior²

¹Universidade Metodista
de Piracicaba

²Universidade de São
Paulo

Introdução

O músculo esquelético exibe extrema plasticidade perante um programa de treinamento de força (TF) progressivo, resultando em hipertrofia muscular¹. O consumo de proteínas/aminoácidos próximo às sessões do TF aumenta a síntese proteica e favorece a hipertrofia em longo prazo². Com os avanços da biologia molecular, é possível estudar este processo por meio de mecanismos moleculares^{3,4}.

Apesar de os estudos básicos com animais terem contribuído com a grande parte da descoberta dos mecanismos moleculares, os estudos com seres humanos ainda são fundamentais. No entanto, os estudos com humanos possuem limitações devido à grande variabilidade de resposta fisiológica entre indivíduos, à pequena quantidade de amostra muscular que é possível ser obtida por meio da biópsia e à dificuldade em recrutar indivíduos e treiná-los por longos períodos (análise de efeitos crônicos)⁵. Como alternativa, pesquisas com animais (principalmente camundongos e ratos) são utilizadas a fim de mimetizar os efeitos observados em humanos. As vantagens do uso de animais em comparação a humanos incluem: possibilidade de controlar fatores ambientais e nutricionais, possibilidade de utilizar marcadores radioativos e fármacos, possibilidade de analisar diretamente propriedades funcionais de fibras isoladas tanto *in situ* como *in vitro*, possibilidade de dissecar músculos inteiros para análises bioquímicas, histológicas e fisiológicas, além de ser possível empregar métodos de manipulação genética (transfecção por eletroporação e uso de animais *knock-out*) para avaliar os efeitos de genes no crescimento muscular⁵. Em meados da década de 70 foi desenvolvido um modelo de sobrecarga compensatória que consiste na remoção dos músculos gastrocnêmio e sóleo com o objetivo de sobrecarregar o plantar (músculo sinergista)⁶. Este método é atualmente muito utilizado nos estudos, pois induz hipertrofia em curto espaço de tempo e de uma extrema magnitude, sendo útil para elucidar diversos mecanismos. Outro modelo utilizado é a estimulação elétrica, no qual o nervo isquiático é estimulado eletricamente, resultando em ativação máxima de todos os músculos dos membros inferiores⁷. Este último modelo é considerado mais fisiológico em comparação à ablação dos sinergistas, promovendo também hipertrofia, mas em menor magnitude.

Nas últimas duas décadas, o alvo mamífero de rapamicina (mTOR) tem sido bastante investigado na hipertrofia induzida por TF/sobrecarga mecânica^{8,9,10}. O alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma proteína quinase encontrada em dois complexos multi-protéticos, complexo 1 da rapamicina (mTORC1), na qual a sinalização é parcialmente inibida pela rapamicina, e o complexo 2, que é amplamente resistente à rapamicina¹¹. O mTORC1 é um regulador central do crescimento celular, em parte, por controlar a tradução de RNAm (mensageiro de RNA), e consequentemente a síntese de proteínas. Tem a função de regular tanto a eficiência traducional (a taxa de tradução de RNAm) assim como a capacidade traducional (ex: o número de ribossomos)¹². Especificamente no músculo esquelético, tem sido demonstrado que a sinalização do mTORC1 é ativada em uma ampla variedade de estímulos mecânicos (treinamento de força, estimulação elétrica, ablação dos sinergistas), sendo estes efeitos observados em células de cultura e em músculos intactos em modelos *ex vivo* e *in vivo*, e inclusive em humanos^{7,9,13-16}. Nestes casos existem mecanismos de conversão de sinais mecânicos em evento bioquímico, modulando o fenótipo tecidual, um fenômeno denominado de mecanotransdução^{14,17}. Estudos apontam que o mTORC1 é potencialmente regulado por aminoácidos. A depleção de aminoácidos, por exemplo, reduz a sinalização do mTORC1 e a disponibilidade suficiente de aminoácidos sinaliza o mTORC1. Desta forma, existe um eficiente sistema de maquinaria de sensores e transportadores de aminoácidos¹⁸.

mTORC1 como Regulador da Síntese Protéica

Em 1975, pesquisadores realizando expedições na Ilha Easter (Rapa Nui) descobriram uma espécie de bactéria de solo (*Streptomyces hygroscopicus*) que inicialmente foi caracterizada por suas potentes propriedades antifúngicas¹⁹. Posteriormente, a fascinante atividade antitumoral e imunossupressora desta pequena molécula, nomeada de

rapamicina, foi comprovada. Em sequência foi demonstrado que a rapamicina forma um complexo com a FK506 (tacrolimo/macrolídeo imunossupressor da classe da calcineurina), e este complexo se liga ao mTORC1 em uma região denominada de domínio de ligação de rapamicina FK506 (FKBP12), inibindo a função do mTORC1 (HEITMAN, 1991)²⁰. Assim, a rapamicina é um potente bloqueador seletivo do mTORC1, e é utilizada frequentemente para investigar o papel da via na regulação da síntese proteica.

Estas elegantes descobertas resultaram na caracterização do mTOR, uma proteína serina/treonina quinase, o principal mediador do crescimento e da proliferação celular via controle da síntese de proteínas²¹. O mTOR é dividido em dois complexos, denominados de complexo 1 (mTORC1) e complexo 2 (mTORC2)²². O mTORC1 é um homodímero e possui quatro componentes: a proteína associada-regulatória da mTOR (Raptor), a proteína 8 Sec13 mamífero letal (mLST8), o substrato de Akt rico em prolina, de 40 kDa (PRAS40), e a proteína de interação mTOR contendo domínio DEP (Deptor)²³ (Fig 1).

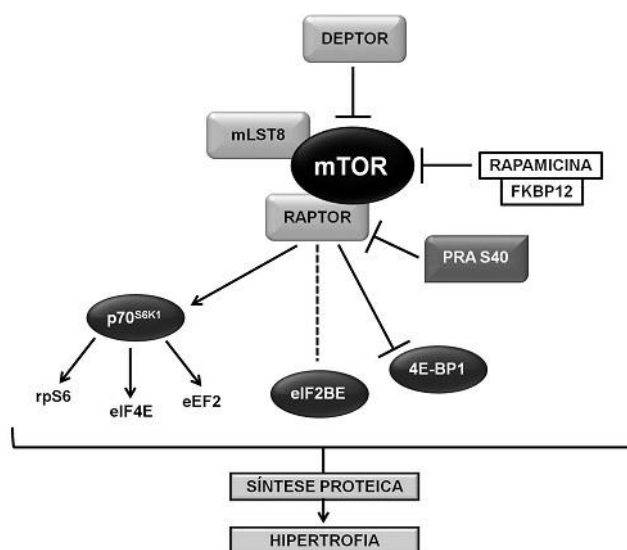


Figura 1. Componentes proteicos do mTORC1 e seus alvos relacionados à síntese proteica. O alvo mamífero de rapamicina do complexo 1 (mTORC1) é composto por Raptor (proteína regulatória associada ao mTORC1), mLST8 (proteína 8 Sec13 mamífero letal), Deptor (proteína de interação mTOR contendo domínio DEP) e PRAS40 (substrato de Akt rico em prolina, de 40 kDa). O mTORC1 pode ser inibido pela Rapamicina (FKBP12), por PRAS40 e Deptor. Dois dos alvos mais estudados do mTORC1 relacionados à síntese proteica são a proteína quinase ribossomal S6 quinase de 70 KDa (p70^{S6K1}) e o fator 4E de ligação de iniciação eucarioto (4E-BP1). P70^{S6K1} regula a síntese proteica, em parte, pela fosforilação direta da proteína ribossomal S6 (rpS6). Combinada, a sinalização de mTORC1 resulta no aumento da iniciação da tradução, elongação e biogênese ribossomal, que por sua vez aumenta a síntese proteica e o crescimento celular.

O mTORC1 tem dois alvos *downstream* bem estabelecidos, a proteína quinase ribossomal S6 quinase de 70 KDa (p70S6K1) e o fator 4E de ligação de iniciação eucarioto (4E-BP1), os quais atuam na tradução proteica e são fosforilados a partir da ativação do mTORC1²⁴. mTORC1 e p70S6K1 não somente exercem um papel na regulação aguda da iniciação da tradução, mas também exercem papel na regulação do número de ribossomos (biogênese ribossomal), e assim na capacidade traducional²⁴. Tem sido demonstrado que o 4E-BP1 exerce papel crucial na regulação na iniciação da tradução *cap* dependente, e consequentemente na síntese de proteínas. Fatores de crescimento e insulina induzem fosforilação do 4E-BP1 e com tratamento da rapamicina a fosforilação se torna inibida²⁴.

É clássica na literatura que as primeiras evidências dos mecanismos de hipertrofia são oriundas da via do fator de crescimento similar à insulina/fostatidil inositol-3-quinase/ PKB (IGF-1/PI3K/Akt/mTOR). A via canônica inicia-se com a ligação do IGF-1 ao seu receptor (IGF-1R), uma tirosina quinase localizada na membrana celular. Em seguida, o IRS1 (receptor de substrato de insulina 1) é fosforilado e ativado em seu resíduo tirosina²⁵. O próximo passo é a criação

de domínios de ligação para a proteína citosólica PI3K²⁶. A ativação da PI3K resulta na fosforilação da Akt em um resíduo de serina e na ativação do complexo esclerose tuberosa (TSC1 e TSC2)²⁷. A inibição destas proteínas ativa a proteína de ligação GTP da família RAS, conhecida como Homólogo de Ras enriquecido no Cérebro (Rheb)²⁸. A Rheb é uma proteína de ligação de GTP que é codificada ubiquitariamente em mamíferos, vital para a regulação do crescimento e progressão do ciclo celular e tem papel fundamental no mTORC1, uma vez que a sua localização no lisossomo é capaz de ativar a quinase²⁸.

Dentro deste contexto, o mTORC1 configura-se como o principal “interruptor” da síntese proteica e consequentemente do crescimento celular. No entanto, muito de seus alvos *upstream* ainda não foram elucidados. Assim, o objetivo desta revisão foi explorar estudos com sinalizadores e transportadores de aminoácidos e os efeitos da sobrecarga mecânica/treinamento de força na sinalização do mTORC1 em cultura de células, animais e humanos.

Materiais e método

A base eletrônica de dados PubMed foi pesquisada sem restrição de data, com as seguintes palavras-chave: “mTORC1”, “mammalian target of rapamycin complex 1”, “resistance exercise”, “strength training”, “mechanical overload”, “skeletal muscle hypertrophy” “amino acid sensing/transporter” e “mechanotransduction”.

Adotou-se os seguintes critérios de inclusão dos estudos: artigos originais em inglês, estudos que investigaram efeitos do treinamento de força/estímulo/sobrecarga mecânica em modelos de camundongos/ratos, cultura de células *in vitro/ex vivo* e humanos, estudos que investigaram hipertrofia muscular e/ou síntese proteica, sinalização de mTORC1 e as proteínas envolvidas nesta via. Foram excluídos artigos que continham exercício físico que não fosse musculação, artigos sobre outras proteínas que não apresentassem relação alguma com a via mTORC1 e modelos patológicos que afetassem a massa muscular.

Resultados

Dezenove artigos foram contabilizados para análise e para melhor apresentação dos resultados optou-se por classificar metodologicamente os artigos nos Quadros 1, 2 e 3. Os trabalhos foram agrupados de acordo com o modelo estudado: cultura de células (Quadro 1), animais (Quadro 2) e humanos (Quadro 3). Nos quadros 1, 2 e 3 são apresentados os resultados dos estudos com transportadores e sinalizadores de aminoácidos e efeitos do TF/sobrecarga mecânica na sinalização do mTORC1 nos diferentes modelos.

Quadro 1. Sensores e Transportadores de Aminoácidos e estímulo/sobrecarga mecânica em cultura de células.

Autor/Ano	Intervenção/Métodos	Principais desfechos	Conclusão
Hornberger <i>et al.</i> 2006 ¹⁴	Na cultura foram utilizados inibidores e agonistas para avaliar as proteínas expressas. Foi analisada mTOR, PLD1, PLD2 e atividade de PA e PLD.	↑ PA foi suficiente ↑ mTORC1. Estiramento mecânico <i>ex vivo</i> ↑ PA, PLD e mTORC1. Inibição farmacológica de PLD ↓ PA.	O estudo propõe que a ativação de mTORC1 é decorrente do aumento de PA dependente de PLD.
Byfield <i>et al.</i> 2005 ³³	Superexpressão de hVps34 na linhagem celular HEK2937T e inibição por anticorpos específicos para avaliar a fosforilação de p70 ^{S6K1} .	Superexpressão de hVps34 ↑ p70S6K1 e inibição de hVps34 ↓ atividade de p70 ^{S6K1} . Escassez de aminoácidos ↓ atividade da hVps34.	hVps34 ↑ sinais de aminoácidos para ativação da via mTORC1.
Findlay <i>et al.</i> 2007 ³⁵	Superexpressão de MAPK4K-	Superexpressão de	MAPK4K é sensível à

	3 em células HEK-293. Supressão (deleção) de MAPK4K-3 em células HEK-293.	MAPK4K $\uparrow$ p70 ^{S6K1} . Supressão de MAPK4K-3 $\downarrow$ tamanho da célula.	sinalização de aminoácidos intracelular, modulando positivamente a atividade da via mTORC1.
Kim <i>et al.</i> 2008 ³⁶	<i>Knockdown</i> da expressão do gene Rag em células S2 de <i>Drosophila Melanogaster</i> . Expressão de Rag-GTP ativo constitutivamente (superexpressão) e expressão dominante negativa de Rag (inibição).	<i>Knockdown</i> Rag $\downarrow$ mTORC1 na presença de aminoácidos. $\uparrow$ Rag $\uparrow$ mTORC1 independente de aminoácidos.	Rag GTPase é um regulador positivo de mTORC1 na sinalização de aminoácidos.
Crossland <i>et al.</i> 2013 ⁵⁰	<i>Knockdown</i> de FAK em células C2C12. As células foram tratadas com IGF-1. Foram avaliadas a síntese proteica e sinalização de FAK.	Incubação com IGF-1 $\uparrow$ hipertrofia de miotubos e proteína total. <i>Knockdown</i> de FAK $\downarrow$ síntese proteica, fosforilação de FAK e sinalização de mTORC1	FAK é necessária para hipertrofia muscular induzida por IGF-1.

(EDL): extensor longo dos dedos; (PA): ácido fosfatídico; (mTORC1): complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos; (PLD): fosfolipase D; (hVps34): fosfatidilinositol-3quinase de classe III; (p70S6K1): proteína ribossomal p70^{S6K1}; (MAPK4K-3): proteína quinase 3 ativada por mitógeno; (FAK): quinase de adesão focal; (IGF-1): fator de crescimento semelhante à insulina.

Com base no conjunto de resultados, contrações musculares intensas (TF/sobrecarga/estímulo mecânico) desencadeiam a sinalização de transportadores e sensores de aminoácidos (LAT1, Vps34, MAPK4-K3) com o objetivo de ativar o mTORC1, e tal mecanismo é acompanhado de influxo de aminoácidos (principalmente leucina) para o meio intracelular do músculo esquelético, gerando assim um ambiente anabólico para o favorecimento da hipertrofia muscular. A dissociação de TSC2 (inibição) e a translocação de mTORC1 em direção ao lisossomo é outro mecanismo de aumento de aminoácidos intracelulares e ativação de mTORC1.

Quadro 2. Sensores e Transportadores de Aminoácidos e treinamento de força/sobrecarga mecânica em modelos animais.

Autor/Ano	Intervenção/Métodos	Principais desfechos	Conclusão
Baar e Esser, 1999 ⁷	Músculos de ratos foram submetidos a contrações excêntricas para induzir hipertrofia muscular. Foram avaliados massa muscular, fosforilação de p70 ^{S6K1} e perfil polissomal.	O modelo de TF $\uparrow$ massa muscular, p70 ^{S6K1} e <i>pool</i> polissomal. Houve correlação positiva entre o aumento da massa muscular e a fosforilação da proteína.	Via mTORC1 está associada ao aumento da massa muscular induzida por TF em ratos.
Miyazaki <i>et al.</i> , 2011 ¹⁵	Ablação dos sinergistas foi utilizada para induzir hipertrofia e foram avaliados sinalização de mTOR e Akt. Foi utilizado um inibidor de IGF-1.	Hipertrofia muscular induzida por sobrecarga $\uparrow$ mTORC1, sem alteração de Akt. Mesmo com inibição da via IGF-1, mTORC1 $\uparrow$	Na fase inicial de sobrecarga mecânica o mTORC1 é ativado independente de IGF-1.
You <i>et al.</i> , 2014 ¹⁷	Foram realizados experimentos que identificassem as enzimas que ativam o PA em resposta ao estiramento <i>ex vivo</i> . Experimentos genéticos de inibição e ativação de DAG foram realizados.	O estímulo mecânico $\uparrow$ DAG e DAG quinases. Superexpressão de DGK ζ $\uparrow$ hipertrofia muscular via sinalização de mTORC1.	DGK ζ mas não PLD exerce papel no aumento da PA induzida por estímulo mecânico e sinalização de mTORC1.
MacKenzie <i>et al.</i> 2009 ³⁴	Mensuração de mVps34 e p70 ^{S6K1} após contrações	No músculo tibial anterior: $\uparrow$ atividade de mVps34 e	Contrações musculares intensas $\uparrow$ atividade de

	musculares intensas provocadas por um modelo de TF para ratos.	p70 ^{S6K1} . ↑ concentração de leucina intracelular.	mVps34 por meio do influxo de aminoácidos essenciais (leucina), ↑ a sinalização do mTORC1.
Bodine <i>et al.</i> 2011 ³⁸	Modelos de hipertrofia e atrofia muscular foram investigados. Foi administrada rapamicina e ativação genética de mTOR também foi utilizada.	Via Akt/mTOR ↑ durante hipertrofia e ↓ em condições atroficas. Rapamicina ↓ hipertrofia e ativação genética de mTOR ↑ hipertrofia.	A hipertrofia muscular induzida por sobrecarga envolve a regulação e ativação da via mTOR.
Hornberger <i>et al.</i> 2003 ³⁹	Camundongos transgênicos com redução de selenoproteínas foram submetidos ao modelo de ablação dos sinergistas. Adicionalmente foi utilizada a rapamicina para inibição da via mTOR.	A sobrecarga compensatória foi capaz de aumentar fosforilação de Akt e p70 ^{S6K1} . O crescimento muscular foi inibido pela rapamicina.	No músculo esquelético, a deficiência de selenoproteínas amplifica a resposta adaptativa ao modelo de sobrecarga e há envolvimento da via mTORC1.
Spangenburg <i>et al.</i> 2008 ⁴¹	Foi utilizado um camundongo transgênico que expressa um receptor dominante negativo de IGF-1. Foi utilizado um modelo de sobrecarga compensatória para hipertrofia muscular. Foi mensurada Akt e p70 ^{S6K1} .	↑ Hipertrofia muscular em todos os grupos sem diferenças significativas. Mesmo com a inibição do receptor no camundongo transgênico, houve hipertrofia muscular e ativação da via Akt e p70 ^{S6K1} .	A hipertrofia mediada por estímulo mecânico não necessita do IGF-1 para ativar a via mTORC1.
O'Neil <i>et al.</i> 2009 ⁴²	Exercícios excêntricos foram empregados para avaliar curso temporal de Akt e mTORC1.	Inibição de PI3-K e PKB não preveniu ↑ de mTORC1. A ativação de mTORC1 foi acompanhada de ↑ PA e inibição de PA por PLD preveniu ↑ de mTORC1.	A ativação de mTOR por exercício excêntrico ocorre independente de Akt e ocorre via PA.
Jacobs <i>et al.</i> , 2013 ⁴³	Determinar se a ativação mecânica (exercícios excêntricos em camundongos) de mTORC1 é associada com alterações na fosforilação de TSC2 e a localização no lisossomo.	O exercício excêntrico ↑ TSC2, promovendo associação de mTOR ao lisossomo e aboliu a associação de TSC2 ao lisossomo.	No estímulo mecânico a ativação de mTORC1 está associada à translocação de TSC2, distanciando-o do lisossomo.
Klossner <i>et al.</i> 2009 ⁴⁹	FAK foi superexpresso no músculo esquelético de camundongos submetidos à ausência de carga e re-sobrecarga.	Superexpressão de FAK ↑ hipertrofia e ↑ p70 ^{S6K1} .	Foi identificado um possível novo sensor de ativação do mTORC1.

(Akt): proteína quinase B; (DAG): diacilglicerol; (DGKζ): Diacilglicerol quinase zeta; (TSC2): complexo esclerose tuberosa 2; (PI3-K): fosfatidilinositol-3-quinase; (mTORC1): complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos; (hVps34): fosfatidilinositol-3 quinase de classe III; (FAK): quinase de adesão focal; proteína ribossomal p70^{S6K1}.

Os estudos demonstram que o mTORC1 possui correlação positiva com a hipertrofia muscular induzida por TF/estímulo mecânico tanto em animais quanto em humanos. Os estudos também demonstram que o mTORC1 tem papel fundamental (é necessário) na hipertrofia compensatória induzida por modelo de sobrecarga funcional em animais

e no aumento da síntese proteica em humanos submetidos ao TF, sob tratamento da rapamicina e por abordagens genéticas. Evidências dos estudos comprovam que a ativação do mTORC1 é independente da via do IGF-1, ativado por PA por meio do DGK ζ , FAK e outros mecanossensores ainda não identificados.

Quadro 3. Sensores e Transportadores de Aminoácidos e treinamento de força/sobrecarga mecânica em humanos.

Autor/Ano	Intervenção/Métodos	Principais desfechos	Conclusão
Drummond <i>et al.</i> 2011 ¹⁰	Indivíduos idosos e jovens realizaram uma sessão de TF. RNAm dos transportadores de AA e expressão de proteínas foram analisados	Exercício ↑ RNAm de LAT1 e outros transportadores de aminoácidos. ↑ sinalização mTORC1.	TF ↑ transportadores AA e deve ser um mecanismo para ↑ sensibilidade dos AA nas células em condições anabólicas.
Moore <i>et al.</i> , 2011 ⁵¹	Indivíduos jovens realizaram TF unilateral acompanhado de ingestão de aminoácido <i>Whey</i> . Foram analisadas proteínas envolvidas na via mTORC1.	Exercício associado à ingestão de proteína ↑ síntese de proteínas de forma superior à somente ingestão isolada. Exercício associado à ingestão de proteína favorece ↑ p70 ^{S6K1} e eEF2 quando comparado a apenas ingestão isolada.	Sinalização da via mTORC1 e aumento da síntese proteica é potencializada pela combinação de TF e ingestão de proteínas.
Terzis <i>et al.</i> 2008 ⁵²	Verificar correlação de p70 ^{S6K1} (30 minutos após exercício) e hipertrofia muscular (14 semanas) no TF.	Correlação positiva de p70 ^{S6K1} com hipertrofia muscular.	O estudo demonstra que a p70 ^{S6K1} é um sinalizador no aumento da síntese proteica e possivelmente um marcador hipertrófico em resposta ao TF.
McGlory <i>et al.</i> , 2014 ⁵³	Foi desenvolvido um ensaio [γ -(32)P] ATP para p70 ^{S6K1} para avaliar a atividade quinase em músculo de humanos submetidos ao TF e ingestão alimentar. Inicialmente o ensaio foi validado em células de cultura e tecidos para <i>knock-out</i> de p70 ^{S6K1} . Foi aplicado TF em humanos combinados a ingestão de proteínas para avaliar a atividade de p70 ^{S6K1} e outras quinases.	Em resposta ao TF e ingestão de proteínas a atividade de p70 ^{S6K1} estava ↑. P70 ^{S6K1} (thr389) não foi alterado.	Os dados apontam para a utilidade em utilizar o ensaio de quinase para estudar a plasticidade muscular.

(LAT1): transportador de aminoácido tipo L humano; (mTORC1): complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos; (p70^{S6K1}): proteína ribossomal S6K1; (eEF2): fator de elongação 2 da tradução; (TF): treinamento de força.

Discussão

Regulação do mTORC1 por Sensores e Transportadores de Aminoácidos

Os aminoácidos (AA) são blocos construtores e agrupados formam uma proteína. A proteína é o principal macronutriente para aumento da síntese de proteínas musculares, necessitando ser recuperado por meio da dieta²⁹. No jejum, o balanço protéico se encontra negativo, com a degradação de proteínas excedendo a síntese³⁰. Curiosamente, o balanço proteico após o TF é recuperado parcialmente graças ao aumento da síntese de proteínas, mas não é suficiente para promover um balanço líquido positivo³¹. Assim, apenas a ingestão de nutrientes (AA) é capaz de resultar em balanço líquido positivo. Também é conhecido que o aminoácido essencial leucina é capaz de ativar a via mTORC1, sendo que a rapamicina é capaz de bloquear a habilidade da leucina em aumentar a síntese de proteínas³².

Interessantemente, sem a presença de AA, fatores de crescimento são incapazes de ativar o mTORC1 efetivamente¹⁸. Somente recentemente que o mecanismo molecular dos AA tem ganhado maior atenção na ciência.

Cultura de células e modelos animais

Recentemente foram descobertas vias sensíveis aos AA que ficam localizadas *upstream* via mTORC1. A classe 3 da fosfatidilinositol quinase (Vps34) é uma quinase lipídica que fosforila a posição 3'hidroxi do anel da fosfatidilinositol, sendo que sua função inicial era a regulação do tráfego vesicular no sistema endossomal/lisossomal³³. A Vps34 foi descoberta por Byfield *et al.*³³, que observaram inibição desta proteína na falta de AA, o que comprometia também a via do mTORC1 (Fig 2). Foi demonstrado em um estudo que uma única sessão de exercício de força foi suficiente em ativar a sinalização do mTORC1 e aumentar o conteúdo de leucina no músculo esquelético de ratos³⁴, como também capaz de aumentar a atividade do Vps34 pós-exercício³⁴.

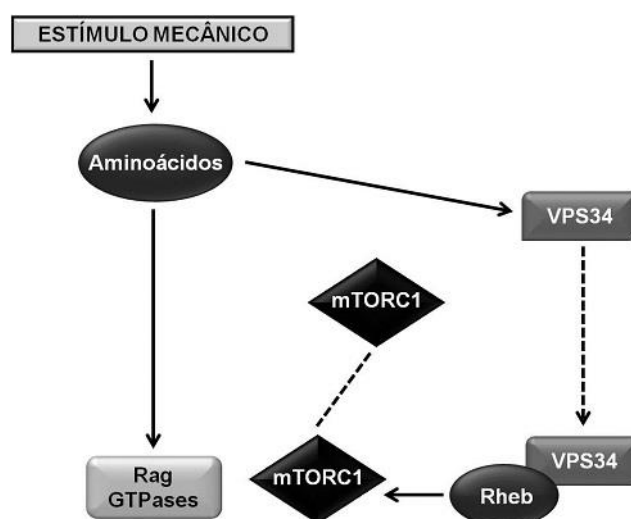


Figura 2. Regulação do mTORC1 por transportadores e sensores de aminoácidos. A associação de Homólogo de Ras enriquecido no cérebro (Rheb) com mTORC1 no lisossomo permite a ativação do mTORC1. A ativação de A classe 3 da fosfatidilinositol quinase (Vps34) resulta na ativação do mTORC1.

Outro sensor de AA é a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK4K)-3, que é ativada na presença de AA, e a superexpressão de MAPK4K-3 em células HEK-293 estimula mTORC1³⁵. A deleção de MAPK4K diminui o tamanho da célula, sugerindo uma participação no seu estado anabólico/catabólico. Na ausência de AA, mTORC1 se difunde ao longo da célula, enquanto a adição de AA resulta em transporte da mTORC1 para a membrana lisossomal por meio da interação com a família Rag das proteínas G e *regulator*, uma proteína localizada na membrana lisossomal. Uma vez no lisossomo, o mTORC1 pode se ligar à Rheb³⁶.

Humanos

Após exercício de força, é sabido que os níveis de leucina intracelular aumentam. É possível que o aumento no transportador de AA denominado Transportador de Aminoácido 1 Tipo L (LAT1) seja um dos mecanismos pelos quais a leucina é sinalizada no músculo esquelético³⁷. Apesar de não ter sido foco da revisão (suplementação de proteínas ou AA), a disponibilidade de AA exógenos e a maquinaria intracelular *per se* simultaneamente desempenham papel importante na ativação do mTORC1 no TF.

Treinamento de força/Sobrecarga mecânica e mTORC1

Cultura de células e modelos animais

Baar e Esser⁷ em 1999 realizaram o primeiro estudo que examinou se o aumento da massa muscular em resposta ao treinamento de força estava associado ao aumento da sinalização de mTORC1. Este estudo demonstrou que o aumento da massa muscular de ratos submetidos a seis semanas de estimulação elétrica de alta intensidade foi positivamente correlacionada com o aumento na fosforilação de p70^{S6K1} 6 horas após a primeira sessão de exercício. Assim, este estudo forneceu a primeira evidência de que a sobrecarga mecânica estava associada com aumento da sinalização do mTORC1, síntese proteica e hipertrofia. Outro estudo³⁸ não apenas demonstrou que o mTORC1 estava associado à hipertrofia muscular, mas também que era necessário para a hipertrofia muscular induzida por sobrecarga. Neste elegante estudo, a administração de rapamicina inibiu a hipertrofia muscular induzida por sobrecarga, e tal resposta foi acompanhada de inibição de p70^{S6K1}. Outros estudos utilizando o modelo de ablação dos sinergistas para induzir hipertrofia compensatória têm demonstrado aumento da sinalização de mTORC1^{15,39}.

A via clássica da IGF-1/PI3K/Akt/mTOR parece ter papel paradoxal na hipertrofia por estímulos mecânicos. Recentes evidências sugerem que a hipertrofia pode ser desenvolvida por ativação do mTORC1 e independentemente da participação do IGF-1^{40,41}. Spangenburg *et al.*⁴¹ desenvolveram um modelo transgênico de camundongo que expressa um receptor de IGF-1 dominante negativo (*knock-in*) no músculo esquelético. Foi constatado que estes animais mutantes apresentavam uma perturbação na fosforilação da Akt quando estimulados por IGF-1. Além disso, não existia comprometimento da hipertrofia em resposta à ablação sinérgica, o que revela uma desnecessidade da atuação do receptor funcional de IGF-1⁴¹.

Outro estudo reportou diferenças nas etapas de fosforilação, no qual foram observadas diferenças marcantes entre a sinalização de PI3K, Akt e mTOR. Enquanto foi observado um rápido aumento da fosforilação de Akt, com duração menor que 12 minutos, para o mTORC1 a atividade se manteve por 12 horas no TF excêntrico⁴². Estes dados sugerem que o estímulo mecânico promove hipertrofia por mecanismos desconhecidos, independente de IGF-1 e com ativação do mTORC1. No entanto, os potenciais candidatos à ativação do mTORC1 são enzimas lipídicas denominadas de fosfolipase D (PLD) e ácido fosfatídico (PA)^{14,42}. Estudos prévios demonstraram que a neomicina (inibidor da PLD) previne a ativação do mTORC1¹⁴. Além disso, existe a necessidade da interação enzimática entre PLD e PA (síntese de PA pela PLD) para que o mTORC1 seja ativado, e diversos estudos têm demonstrado que o estímulo mecânico aumenta a síntese de PA^{14,42} (Fig 3). No entanto, os níveis de PLD não são suficientes em explicar a ativação do PA mesmo com a interação enzimática entre eles, pois o curso temporal das respostas entre PLD e PA é discrepante¹⁴. Mais recentemente, foi descoberto que o diacilglicerol quinase ζ (DGK ζ) é predominantemente responsável pelo aumento do PA induzido pelo estiramento e é um contribuinte importante na ativação mecânica da sinalização do mTORC1¹⁷.

Apesar de o mecanismo molecular de ativação do mTORC1 permanecer relativamente elusivo, um evento que aparentemente regula a ativação do mTORC1 mediado pela sobrecarga mecânica é o aumento da atividade de Rheb⁴³. Estudo recente demonstra que a sobrecarga resulta na translocação de TSC2 distante de Rheb. Jacobs *et al.*⁴³ foram os primeiros a demonstrar que a ativação do mTORC1 por qualquer estímulo era resultado da remoção forçada de TSC2 a Rheb. TSC2 localiza com Rheb em músculos de camundongos em repouso, porém sob estímulos de contrações excêntricas, TSC2 se torna fosforilada no resíduo RxRxxS/T e tal evento corresponde ao movimento afastando TSC2 de Rheb⁴³. No entanto, ainda não é conhecido o mecanismo que fosforila TSC2 na hipertrofia induzida pelo estímulo mecânico.

Outro candidato que tem recebido considerável atenção é a quinase de adesão focal (FAK), que é uma proteína integrina localizada dentro dos costâmeros do músculo esquelético, demonstrando sensibilidade mecânica em modelos de estímulo mecânico em organismos como roedores, células, aves e humanos⁴⁴⁻⁴⁶. Na deformação mecânica, FAK é recrutada nas adesões focais onde controla moléculas que regulam a síntese proteica celular⁴⁷. Aumentos da fosforilação e ativação da FAK podem ser observados em músculos estimulados por modelos de sobrecarga (sobrecarga crônica em

aves e sobrecarga mecânica em roedores)^{45,46}, e uma diminuição na fosforilação em condições de desuso (imobilização em humanos e suspensão de membros traseiros em roedores)^{45,48}. Adicionalmente, a superexpressão de FAK *in vivo* resulta em robusta hipertrofia, assim como na ativação da p70^{S6K1}, principal alvo *downstream* do mTORC1⁴⁹. Ainda não se sabe exatamente se a ativação de FAK é necessária para induzir ativação do mTORC1. Mas existe evidência de que FAK é necessária para aumento da síntese proteica mediada pelo IGF-1 em miotubos via sinalização de TSC2-mTORC1-p70^{S6K50}.

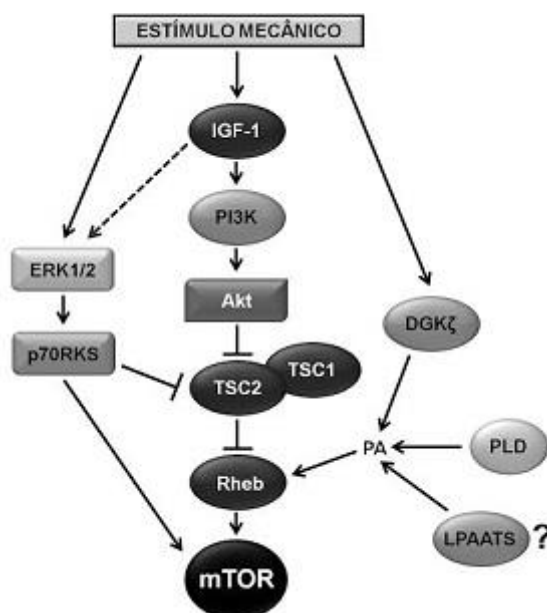


Figura 3. Regulação do mTORC1 por estímulo mecânico. Evidências recentes demonstram que a ativação do mTORC1 induzida pelo estímulo mecânico no músculo esquelético ocorre por vias independentes de fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K) e quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2). Evidências obtidas de modelos roedores sugerem que o ácido fosfatídico (PA), produzido pelo diacilglicerol quinase ζ (DGK ζ), exerce um papel significativo na ativação mecânica da sinalização do mTORC1.

Humanos

Os estudos com humanos demonstram apenas associação ou correlação positiva entre alterações na fosforilação de proteínas e as taxas de síntese proteica (não uma relação de causa e efeito), assim como hipertrofia muscular^{51,52,53}. É sabido que a sinalização do mTORC1 se encontra ativada no músculo de humanos destreinados e moderadamente treinados, tanto nas condições de estado alimentado como de jejum^{52,54,55,56}. O mTORC1 também se encontra ativado em indivíduos altamente treinados^{57,58}.

Em um “cenário” experimental similar ao estudo de Baar e Esser⁷, Terzis *et al.*⁵² demonstraram em humanos que o aumento da fosforilação de p70^{S6K} no resíduo T389 (30 minutos após a primeira sessão de exercício agudo de força) estava positivamente correlacionada com a hipertrofia da fibra muscular e do músculo inteiro (14 semanas de treinamento crônico de força). Os dados indicam, portanto, que o mTORC1 exerce papel importante na regulação da massa muscular em humanos, de forma similar aos dados com animais. No entanto, os estudos utilizando a rapamicina para averiguar o papel do mTORC1 na hipertrofia são escassos.

O único estudo que avaliou o efeito de rapamicina na síntese protéica foi o estudo de Drummond *et al.*¹⁰. Os pesquisadores observaram que a rapamicina foi capaz de inibir completamente o aumento na síntese protéica induzida pelo treinamento de força (1-2 horas). No entanto, a rapamicina inibiu parcialmente os marcadores de sinalização do mTORC1 durante este período de tempo. A rapamicina bloqueou o aumento da p70^{S6K1} no resíduo T389 induzido pelo treinamento de força no período de uma hora, mas não de duas horas pós exercício. Vale ressaltar que a dose utilizada

de rapamicina foi baixa. Mesmo assim, tal cenário sugere que o mTORC1 está envolvido com o aumento na síntese proteica, uma vez que a rapamicina é considerada um potente inibidor desta via.

Assim, as pesquisas futuras com humanos necessitam avaliar os efeitos crônicos da rapamicina na hipertrofia induzida pelo TF cronicamente. Além disso, o emprego de técnicas como espectrometria de massa (MS) (identificação da proteína sensível a um tratamento dentro de uma amostra) em conjunto com isótopos estáveis (técnica de mensuração de síntese proteica) e análises ômicas poderão contribuir no entendimento dos mecanismos que ativam mTORC1 no músculo humano.

Aplicações práticas

A manipulação de algumas variáveis pode influenciar na resposta anabólica. O treinamento com múltiplas séries, por exemplo, culmina em maior sinalização anabólica intramuscular, indicando que o volume pode influenciar na síntese proteica^{52,59}. E estudo recente demonstra que o TF de alto volume e de alta intensidade resulta em respostas similares na sinalização de mTORC1⁶⁰. Assim o mTORC1 pode ser considerado um mediador putativo ou necessário na hipertrofia do músculo esquelético humano, sendo que a maioria dos estudos observaram efeitos agudos?

A realização de exercícios de força (ativação mecânica) com altas intensidades (cargas elevadas) maximizam a via mTORC1, uma vez que cargas com 80% de 1RM demonstram ser mais efetivas que cargas menores (30% de 1RM) para induzir sinalização anabólica uma hora pós-exercício em sujeitos destreinados⁶¹. No entanto, a correlação da via mTORC1 com cargas elevadas de treinamento e hipertrofia precisa ser testada em um contexto crônico.

Um amplo corpo de evidência demonstra que o TF com grande volume (elevadas séries e/ou repetições) ou até a falha muscular voluntária (fadiga muscular) leva a uma elevada ativação do mTORC1^{62,59,52}. Desta forma, treinamentos que objetivam potencializar o estresse metabólico aumentam as concentrações de lactato e já foi demonstrado que o lactato serve como sinalizador do mTORC1^{63,64}. Novamente, é necessário haver mais estudos que avaliem a relação entre hipertrofia muscular e a sinalização de mTOR em resposta aos efeitos crônicos de diferentes variáveis de treinamento físico.

Contrações máximas excêntricas ativam significativamente p70^{S6K1} e rpS6, enquanto que contrações concêntricas falham em induzir alterações em Akt, mTOR, p70^{S6K1} ou rpS6⁶⁵. Além disso, a velocidade de execução do exercício excêntrico não influencia nas respostas anabólicas⁶⁶.

Imediatamente após o exercício, o consumo de proteínas de rápida absorção contendo o aminoácido essencial leucina pode favorecer o aumento da síntese de proteínas, maximizando a atividade dos transportadores e sensores do mTORC1³⁷.

É preciso variar o treinamento por meio de suas variáveis, uma vez que indivíduos altamente treinados começam a desenvolver um tipo de resistência à sinalização anabólica^{67,68}. O programa proposto serve apenas como orientação de como maximizar a atividade do mTORC1 na prática, mas é sabido que inúmeras outras vias moleculares regulam a massa muscular esquelética^{4,69}. A maioria dos estudos avaliaram efeitos agudos do TF na sinalização e síntese proteica, mas poucos são os estudos que avaliaram sinalização anabólica com TF crônico e seus efeitos na hipertrofia. Além disso, existe variabilidade de resposta hipertrófica entre indivíduos (respondedores e não respondedores), e desta forma, a individualidade biológica deve ser considerada na montagem de programas de TF^{61,70}.

Conclusões

O mTORC1 é ativado no músculo esquelético em resposta a uma sessão de TF/estímulo mecânico e está associado ao aumento da síntese proteica em diferentes modelos experimentais. Estudos também demonstram que o mTORC1 exerce papel importante na hipertrofia muscular induzida por sobrecarga mecânica em modelos animais. No

entanto, sua relação com hipertrofia muscular em humanos ainda precisa ser melhor investigada. Além disso, a ativação do mTORC1 envolve a sinalização de sensores/transportadores de aminoácidos assim como a mecanotransdução. Portanto, o mTORC1 configura-se como um importante mediador da regulação de síntese proteica e hipertrofia em resposta à diferentes modelos de TF/sobrecarga mecânica.

Perspectivas

O avanço da biologia molecular permitiu projetar cenários moleculares antes impossíveis de serem visualizados. Neste artigo foi demonstrado que sensores e transportadores de aminoácidos e o estímulo mecânico (mecanotransdução) ativam o mTORC1. No entanto, é bem provável que existam outras proteínas e vias celulares/moleculares envolvidas nestes dois mecanismos que sejam responsáveis por regular mTORC1. Estudos posteriores com análises de larga escala (*microarray* e proteômicas) deverão fornecer informações valiosas sobre como diferentes modelos de estímulos mecânicos governam os mecanismos moleculares de ativação do mTORC1, além de identificar a existência de genes/proteínas em comum regulando positivamente ou negativamente um programa celular em resposta à hipertrofia muscular em diferentes condições de exercício físico. Por fim, apesar de não discutidos no presente artigo, estudos com microRNAs, modificações pós-traducionais e biogênese ribossomal são linhas promissoras de investigação que deverão, no futuro, fornecer informações importantes sobre como o estímulo mecânico/treinamento de força regula a sinalização de aminoácidos, eventos bioquímicos intracelulares e a ativação do mTORC1.

Referências

1. Schoenfeld BJ, Peterson MD, Ogborn D, Contreras B, Sonmez GT. Effects of low- vs. High-Load resistance training on muscle strength and hypertrophy in well-trained men. *J Strength Cond Res.* 2015; 29(10): 2954-2963.
2. Cuthbertson DJ, Babraj J, Smith K, Wilkes E, Fedele MJ, Esser K, *et al.* Anabolic signaling and protein synthesis in human skeletal muscle after dynamic shortening or lengthening exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 290(4): E731-E738.
3. Thalacker-Mercer A, Stec M, Cui X, Cross J, Windham S, Bamman M. Cluster analysis reveals differential transcript profiles associated with resistance training-induced skeletal muscle hypertrophy. *Physiol Genomics.* 2013; 45(12): 499-507.
4. Ruas JL, White JP, Rao RR, Kleiner S, Brannan KT, Harrison BC, *et al.* A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell.* 2012; 151(6): 1319-31.
5. Bodine SC, Baar K. Analysis of skeletal muscle hypertrophy in models of increasing loading. *Methods Mol Biol.* 2012; 798: 213-229.
6. Goldberg AL. Mechanisms of growth and atrophy of skeletal muscle. *Muscle Biol.* 1972; 1: 89-118.
7. Baar K, Esser K. Phosphorylation of p70S6K correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol.* 1999; 276: C120-C127.
8. Hamilton DL, Philp A, MacKenzie MG, Patton A, Towler MC, Gallagher IJ, *et al.* Molecular brakes regulating mTORC1 activation in skeletal muscle following synergist ablation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014; 307(4): E365-E373.
9. Goodman CA, Frey JW, Mabrey DM, Jacobs BL, Lincoln HD, You JS, *et al.* The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. *J Physiol.* 2011; 589(22): 5485-5501.
10. Drummond MJ, Fry CS, Glynn EL, Dreyer HC, Dhanani S, Timmerman KL, *et al.* Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis. *J Physiol.* 2009; 587: 1535-1546.
11. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012; 149: 274-93.
12. Mahoney SJ, Dempsey JM, Blenis J. Cell signaling in protein synthesis ribosome biogenesis and translation initiation and elongation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2009; 90C: 53-107.
13. Brooks MS, Wilkinson DJ, Mitchell MK, Lund JN, Szewczyk NJ, Greenhaff PL, *et al.* Skeletal muscle hypertrophy adaptations predominate in the early stages of resistance exercise training: matching deuterium oxide-derived measures of muscle protein synthesis and mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling. *FASEB J.* 2015; 29(11): 4485-96.

14. Hornberger TA, Chu WK, Mak YW, Hsiung JW, Huang SA, Chien S. The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103(2): 4741-46.
15. Miyazaki M, McCarthy JJ, Fedele MJ, Esser KA. Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase /Akt signaling. *J Physiol.* 2011; 589: 1831-1846.
16. Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1 α of PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J.* 2005; 19(7): 786-88.
17. You JC, Lincoln HC, Kim CR, Frey JW, Goodman CA, Zhong XP, *et al.* The role of diacylglycerol kinase ζ and phosphatidic acid in the mechanical activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling in skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem.* 2014; 289: 1551-1563.
18. Jewell JL, Russell RC, Guan K-L. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 133-139.
19. Véhzina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot.* 1975; 28(2): 721-726.
20. Heitman J, Mowa NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 1991; 5022: 905-909.
21. Lee CH, Inoki K, Guan KL. mTOR pathway as a target of tissue hypertrophy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47: 443-467.
22. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* 2002; 16(2): 1472-1487.
23. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12(1): 21-35.
24. Goodman CA. The role of mTORC1 in regulating protein synthesis and skeletal muscle mass in response to various mechanical stimuli. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2014; 166: 43-95.
25. Böhni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andruss BF, *et al.* Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell.* 1999; 97(7): 865-875.
26. Leever SJ, Weinkove D, MacDougall LK, Hafen E, Waterfield MD. The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *EMBO J.* 1996; 15(23): 6584-6594.
27. Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J.* 2008; 412(2): 179-190.
28. Yang Q, Inoki K, Kim E, Guan K-L. TSC1/TSC2 and Rheb have different effects on TORC1 and TORC2 activity. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103(18): 6811-6816.
29. Van Loon LJ, Gibala MJ. Dietary protein to support muscle hypertrophy. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2011; 69: 79-89.
30. Lowell BB, Ruderman NB, Goodman MN. Regulation of myofibrillar protein degradation in rat skeletal muscle during brief and prolonged starvation. *Metabolism.* 1986; 35(12): 1121-1127.
31. Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol.* 1997; 273: E99-E107.
32. Crozier S, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LC. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr.* 2005; 135(3): 376-382.
33. Byfield MP, Murray JT, Backer JM. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem.* 2005; 38: 33076-33082.
34. Mackenzie MG, Hamilton DL, Murray JT, Taylor PM, Baar K. mVps34 is activated following high-resistance contractions. *J Physiol.* 2009; 587(1): 253-250.
35. Findlay JM, Yan L, Procter J, Mieulet V, Lamb RF. A MAP4 kinase related to ste20 is a nutrient sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem J.* 2007; 403(1): 13-20.
36. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient responses. *Nat Cell Biol.* 2008; 10(8): 935-945.
37. Drummond MJ, Fry CS, Glynn EL, Timmerman KL, Dickinson JM, Walker DK, *et al.* Skeletal muscle amino acid transporter expression is increased in young and older adults following resistance exercise. *J Appl Physiol.* 2011; 111: 135-142.

38. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, *et al.* Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001; 3(11): 1014-1019.
39. Hornberger TA, McLoughlin TJ, Leszczynski JK, Armstrong DD, Jameson RR, Bowen PE, *et al.* Selenoprotein-deficient transgenic mice exhibit enhanced exercise-induced muscle growth. *J Nutr.* 2003; 133(10): 3091-3097.
40. Hornberger TA, Stuppard R, Conley KE, Fedele MJ, Fiorotto ML, Chin ER, *et al.* Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signaling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B-and growth factor independent mechanism. *Biochem J.* 2004; 380: 795-804.
41. Spangenburg EE, Le Roith D, Ward CW, Bodine SC. A functional insulin-like growth factor receptor is not necessary for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *J Physiol.* 2008; 586(1): 283-291.
42. O'Neil TK, Duffy LR, Frey JW, Hornberger TA. The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions. *J Physiol.* 2009; 587(14): 3691-3701.
43. Jacobs BL, You JS, Frey JW, Goodman CA, Gundermann DM, Hornberger TA. Eccentric contractions increase the phosphorylation of tuberous sclerosis complex-2 (TSC2) and alter the targeting of TSC2 and the mechanistic target of rapamycin to the lysosome. *J Physiol.* 2013; 591(18): 4611-4620.
44. Atherton PJ, Szewczyk NJ, Selby A, Rankin D, Hiller K, Smith K, *et al.* Cyclic stretch reduces myofibrillar protein synthesis despite increases in FAK and anabolic signalling in L6 cells. *J Physiol.* 2009; 3719-3727.
45. Gordon SE, Fluck M, Booth FW. Selected contribution: skeletal muscle focal adhesion kinase, paxilin, and serum response factor are loading dependent. *J Appl Physiol.* 2001; 90(3): 1174-1183.
46. Fluck M, Carson JA, Gordon SE, Ziemiecki E, Booth FW. Focal adhesion proteins FAK and paxilin increase in hypertrophied skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1999; 277: C152-C162.
47. Gan B, Yoo Y, Guan J-L. Association of focal adhesion kinase with tuberous sclerosis complex 2 in the regulation of S6 kinase activation and cell growth. *J Biol Chem.* 2006; 281: 37321-37329.
48. De Boer MD, Selby A, Atherton PJ, Smith K, Seynnes OR, Maganaris CN, *et al.* The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *J Physiol.* 2007; 585: 241-251.
49. Klossner S, Li R, Ruoss S, Durieux AC, Flück M. Mechano-transduction to muscle protein synthesis is modulated by FAK. *Eur J Appl Physiol.* 2009; 106(3): 389-398.
50. Crossland H, Kazi AA, Lang CH, Timmons JA, Pierre P, Wilkinson DJ, *et al.* Focal adhesion kinase is required for IGF-1-mediated growth of skeletal muscle cells via a TSC2/mTOR/S6K1-associated pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305(2): E183-E193.
51. Moore DR, Atherton PJ, Rennie MJ, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Resistance exercise enhances mTOR and MAPK signaling in human muscle over that seen at rest after bolus protein ingestion. *Acta Physiol.* 2011; 201(3): 365-372.
52. Terzis G, Georgiadis G, Stratakos G, Vogiatzis I, Kavouras S, Manta P, *et al.* Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. *Eur J Appl Physiol.* 2008; 102(2): 145-152.
53. McGlory C, White A, Treins C, Drust B, Close GL, MacLaren DP, *et al.* Application of the [γ -³²P] ATP kinase assay to study anabolic signaling in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2014; 116(5): 504-513.
54. Deldicque L, De Bock B, Maris M, Ramaekers M, Nielens H, Francaux M, *et al.* Increased p70s6k phosphorylation during intake of a protein-carbohydrate drink following resistance exercise in the fasted state. *Eur J Appl Physiol.* 2010; 108(4): 791-800.
55. Farnfield MM, Carey KA, Gran P, Trenerry MK, Cameron-Smith D. Whey protein ingestion activates mTOR-dependent signaling after resistance exercise in young men: a double-blinded randomized controlled trial. *Nutrients.* 2009; 1(2): 263-275.
56. Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, Chinkes DL, Volpi E, Rasmussen BB. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2006; 576(2): 613-624.
57. Areta JL, Burke LM, Ross ML, Camera DM, West DW, Broad EM, *et al.* Timing and distribution of protein ingestion during prolonged recovery from resistance exercise alters myofibrillar protein synthesis. *J Physiol.* 2013; 591(9): 2319-2331.
58. Glover EL, Oates BR, Tang JE, Moore DR, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Resistance exercise decreases

- eIF2Bepsilon phosphorylation and potentiates the feeding-induced stimulation of p70S6K1 and rpS6 in young men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295(2): R604-610.
59. Burd NA, Holwerda AM, Selby KC, West DW, Staples AW, Cain NE, *et al.* Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men. *J Physiol.* 2010; 588: 3119-3130.
60. Gonzalez AM, Hoffman JR, Townsend JR, Jajtner AR, Boone CH, Beyer KS, *et al.* Intramuscular anabolic signaling and endocrine response following high volume and high intensity resistance exercise protocols in trained men. *Physiol Rep.* 2015; 3(7): e12466.
61. Mitchell CJ, Churchward-Venne TA, West DW, Burd NA, Breen L, Baker SK, *et al.* Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men. *J Appl Physiol.* 2012; 113(1): 71-77.
62. Hulmi JJ, Walker S, Ahtiainen JP, Nyman K, Kraemer WJ, Hakkinen K. Molecular signaling in muscle is affected by the specificity of resistance exercise protocol. *Scand J Med Sci Sports.* 2012; 22(2): 240-8.
63. Oishi Y, Tsukamoto H, Yokokawa T, Hirotsu K, Shimazu M, Uchida K, *et al.* Mixed lactate and caffeine compound increases satellite cell activity and anabolic signals for muscle hypertrophy. *J Appl Physiol.* 2015; 118(6): 742-749.
64. Gundermann DM, Dickinson JM, Fry CS, Walker DK, Volpi E, Rasmussen BB. Inhibition of glycolysis and mTORC1 activation in human skeletal muscle with blood flow restriction exercise. *FASEB J.* 2012; 26(26): 3.
65. Eliasson J, Elfegoun T, Nilsson J, Köhnke R, Eklom 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.* 2006; 291(6): E1197-11205.
66. Hoschel H, Ugrinowitsch C, Barroso R, Batista MA, Souza EO, Aoki MS, *et al.* Effect of eccentric exercise velocity on akt/mtor/p70(S6K) signaling in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2011; 36(2): 283-290.
67. Hakkinen K, Komi PV, Alén M, Kauhanen H. EMG, muscle fibre and force production characteristics during a 1 year training period in elite weight-lifters. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1987; 56(4): 419-427.
68. Coffey V, Zhong Z, Shield A, Canny BJ, Chibalin AV, Zierath JE, *et al.* Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans. *FASEB J.* 2006; 20(1): 190-192.
69. White JP, Wrann CD, Rao RR, Nair SK, Jedrychowski MP, You JS, *et al.* G protein-coupled receptor 56 regulates mechanical overload-induced muscle hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci.* 2014. 111(44): 15756-15761.
70. Hubal MJ, Gordish-Dressman H, Thompson PD, Price TB, Hoffman EP, Angelopoulos TJ, *et al.* Variability in muscle size and strength gain after unilateral resistance training. *Med Sci Sports Exerc.* 2005; 37(6): 964-972.