

Revisão

Bases metabólicas do crescimento muscular

Metabolic basis of muscle growth

Rodrigo Minoru Manda*, Nailza Maestá, D.Sc.** , Roberto Carlos Burini***

Biomédico, aprimorando pelo programa Laboratório em Metabolismo Nutricional e Desportivo do Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição (CeMENutri), Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), **Nutricionista do Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição (CeMENutri), Departamento de Saúde Pública, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), *Professor Titular do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e responsável pelo CeMENutri*

Resumo

O músculo esquelético é o maior tecido do corpo e guarda relação com a autonomia somatocinética e homeostase metabólica. A miogênese é decorrente da predominância de fatores proteicos miogênicos sobre miostáticos. O crescimento ocorre predominantemente de forma hipertrofica, após o nascimento, pelo predomínio da síntese sobre o catabolismo proteico. A síntese proteica é finamente mantida por cascata de quinases controladas ou controladoras da mTOR. A mTOR controla o complexo iniciador da síntese proteica, sendo influenciada pela contração muscular, fatores de crescimento e a leucina. O estado de privação energética (\uparrow AMP/ATP) inibe a mTOR pelo aumento da AMPK. A síntese proteica miofibrilar é estimulada por fatores hidratantes celulares (glicose, insulina, creatina, BCAA, glutamina). Seguindo-se a lesão e necrose miofibrilar, há resposta inflamatória e ação dos fagócitos, promovendo a fagocitose tecidual. Posteriormente, os macrófagos alteram seu fenótipo para resolver a inflamação e promover a miogênese e crescimento miofibrilar.

Palavras-chave: músculo esquelético, hipertrofia muscular, anabolismo proteico, mTOR, regeneração muscular.

Abstract

The skeletal-muscle is the largest tissue in the body with the major roles in kinetics and metabolic process. Myogenesis is the consequence of of myogenic over myostatic factors. The hypertrophic growth occurs in myofibrillar diameter and length by predominating protein synthesis over protein breakdown. Protein synthesis is finely controlled by kinase cascade having mTOR as central role. mTOR controls the protein synthesis initiation complex, being influenced positively by muscle contraction, growth factors and also by leucine. Muscle energy deprivation (\uparrow AMP/ATP) inhibits mTOR by increasing AMPK. Muscle protein synthesis is enhanced by cell hydrating factors (glucose, insulin, creatine, BCAA, glutamine). Postinjury skeletal muscle regeneration is characterized by two local subsequent phases. Sooner after injury, the infiltrated and residual macrophages are classically activated. They promote phagocytosis of tissue debris while preventing early myogenic differentiation. Then macrophages switch their phenotype to sort out inflammation and support myogenesis and myofiber growth.

Key-words: skeletal muscle, muscle hypertrophy, protein anabolism, mTOR, muscle regeneration.

Introdução

A musculatura esquelética constitui o maior tecido do corpo, o maior compartimento proteico e supridor de aminoácidos aos demais tecidos na situação de privação alimentar. É o maior removedor de glicose, insulino-dependente, da circulação e principal responsável pelo gasto energético voluntário. Assim, há relação direta da integridade morfofuncional da musculatura esquelética com a saúde e qualidade de vida do indivíduo [1].

A massa muscular estriada é constituída de estrutura citológica predominantemente sincicial em que as proteínas miofibrilares (actina e miosina) ocupam o maior espaço citosólico (sarcoplasma), comprimindo entre si as mitocôndrias.

Entre as miofibrilas e a membrana (sarcolema) encontram-se os mionúcleos e o retículo sarcoplasmático. Externamente ao sarcolema, há as células satélites, linhagem de células tronco musculares, responsáveis pela regeneração das fibras musculares após estímulos catabólicos, como o exercício excêntrico e lesão pós traumática [2].

Crescimento muscular

O crescimento muscular esquelético ocorre por hiperplasia (hiperplasia) ou hipertrofia sarcoplasmática.

O crescimento muscular hiperplásico ocorre predominantemente na vida embrionária. A linhagem celular envolvida é constituída dos somitos, mioblasto, miócito e miotubo. A miogênese é decorrente do equilíbrio entre os fatores proteicos miogênicos (*myocyte-enhancer factor*, MEF-2; miogenina e *myogenic-differentiation factor*, MyoD) e os miostáticos (*growth and differentiation factor 8*, GDF-8 ou miostatina; *muscle atrophy F-box*, MAFbox ou atrogina 1 e o *muscle ring finger 1*, MURF-1) [3].

O crescimento muscular hipertrofico ocorre de forma predominante após o nascimento, naturalmente até a juventude, continuando também na maturidade e senescência frente aos esforços físicos contra resistência. Pode também ser observado pós-estimulação elétrica em seccionados de medula [4] e em idosos pós-cirurgia [4]. Contribui, para tanto, o predomínio da síntese sobre o catabolismo proteico miofibrilar.

Anabolismo proteico

As variações na síntese proteica muscular ocorrem antes das variações no conteúdo do mRNA (RNA mensageiro) [5], por isso é comumente aceito que a síntese proteica muscular seja controlada, predominantemente, após a fase de transcrição do DNA [6]. O passo limitante da síntese proteica muscular seria a iniciação da tradução do mRNA, que inclui a ligação entre tRNA (RNA transportador) iniciador (metionil-tRNA) e mRNA, com a subunidade ribossômica menor, 40S [7] (Figura 1).

A regulação da iniciação da tradução do mRNA seria pela ativação da *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e de suas proteínas sinalizadoras *downstream*, proteína ribossômica-70kDa S6 quinase (p70S6k1) e proteína ligadora do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) [7]. Ambas as proteínas (p70S6k1 e 4E-BP1) modulam a iniciação da tradução do mRNA por controlarem a ligação do mRNA à subunidade ribossomal 40S. A ligação eficiente da subunidade 40S ao mRNA necessita do fator de iniciação eucariótico 4F (eIF4F) cuja formação é reprimida pela ligação do fator eIF4E a 4E-BP1; complexo que atua como repressor da tradução [7,8] (Figura 1).

A fosforilação da 4E-BP1 (via mTOR) libera-a do fator eIF4E permitindo a ativação do eIF4E facilitando a ligação do mRNA à subunidade 40S (via eIF4F) e permitindo que o processo de iniciação da tradução do mRNA se perpetue [7].

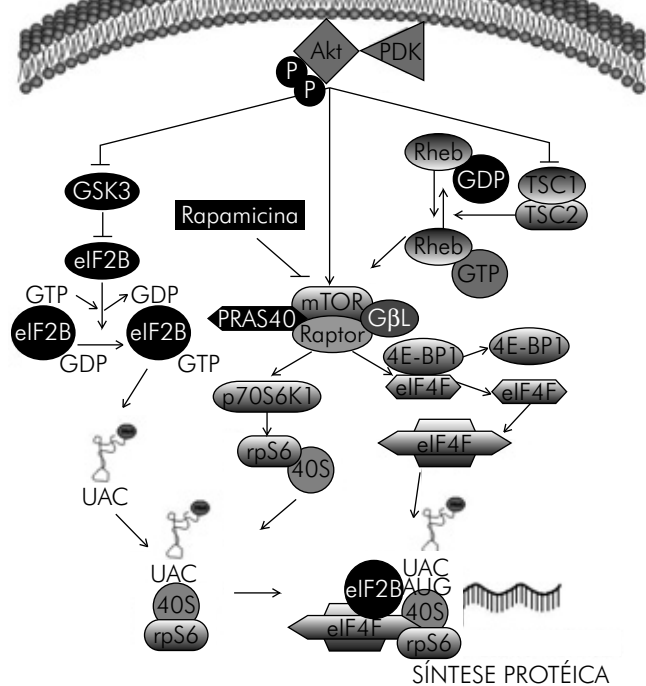
Outro mecanismo regulador da ligação do mRNA à subunidade 40S envolve a fosforilação da proteína ribossômica S6, que é controlada pela atividade da p70S6k1. A proteína S6 está localizada nas proximidades do fator de iniciação. A fosforilação da proteína S6 está relacionada com aumento da síntese de proteínas ribossomais e fatores de alongamento, resultando na interação da proteína da subunidade 40S com a molécula do mRNA promovendo a sua tradução [6] (Figura 1).

A ligação do tRNA iniciador (metionil-tRNA) é dependente da ativação do fator de iniciação eucariótico 2B (eIF2B), que consiste em fator de translocação de nucleotídeo guanina, convertendo o eIF2-GDP em eIF2-GTP. O eIF2B é reprimido pela *glycogen synthase kinase 3* (GSK3), e para sua ativação, é necessário inibir a atividade da GSK3, através da fosforilação, via Akt/PKB. Uma vez ativado, e em associação com os outros fatores, o complexo para tradução do mRNA encontra-se completo [9,10] (Figura 1).

A mTOR quinase está associada as suas proteínas regulatórias Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*), GβL (*G-protein β subunit-like*) e PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) formando o complexo referido como mTORC1 (*mTOR complex 1*) [11,12] (Figura 1).

A PRAS40 é uma proteína ligadora da Raptor que é fosforilada pela mTOR (na serina 183) e pela proteína quinase B (Akt/PKB) na treonina 246, resultando na fosforilação da S6k1 (quinase S6 da proteína ribossômica 70kDa) e maior síntese proteica muscular [13]. Assim, 4E-BP1 e S6k1 são proteínas *downstream* da mTOR, diretamente ligadas ao estímulo da síntese proteica muscular [14,15] (Figura 1).

Como produtos gênicos *upstream* a mTOR tem-se os TSC1 e TSC2 (*tuberous sclerosis complex*) formando o heterodímero estimulado pela insulina e ativador da reação do fator Rheb (*ras homologue enriched in brain*): Rheb-GTP → Rheb-GDP, ligado à estimulação da mTOR [16] (Figura 1).

Figura 1 - via de sinalização mTORC1 (mTOR complex 1).

(Akt: serina/treonina quinase Akt; PDK: quinase dependente de fosfoinositol; mTOR: mammalian target of rapamycin; PRAS40: proline-rich Akt substrate of 40 kDa; GBL: G-protein β subunit-like; RAPTOR: regulatory associated protein of mTOR; p70S6K1: proteína ribossômica-70 kDa S6 quinase; rpS6: proteína ribossômica S6; 40S: subunidade 40S do ribossomo; 4E-BP1: proteína ligadora do fator de iniciação 4E; eIF4E: fator de iniciação eucariótico 4E; eIF4F: fator de iniciação eucariótico 4F; GSK3: glycogen synthase kinase 3; eIF2B: fator de iniciação eucariótico 2B; TSC1/TSC2: tuberous sclerosis complex; Rheb: ras homologue enriched in brain).

Ativadores da mTOR

O mTOR é uma via de sinalização canônica que integra nutriente (leucina), hormônios (insulina; *insulin-like growth factor-1*, IGF-1), estado energético (ATP/GTP) intracelular e o treinamento resistido para controlar a tradução do mRNA [13] (Figura 2).

É sabido que o treinamento resistido induz hipertrofia muscular mediante processos mecânicos, metabólicos e hormonais [17]. A sobrecarga mecânica leva a eventos intracelulares que regulam a expressão gênica e síntese protéica. O exercício resistido pode alterar a atividade de aproximadamente 70 genes [18], ativar fatores envolvidos com a miogênese (ex. miogenina, MyoD) e reprimir fatores inibidores do crescimento (ex. miostatina) [19].

Oito semanas de exercícios com pesos resultam em hipertrofia (~10%) associadamente ao aumento do conteúdo protéico de Akt e GSK3 fosforiladas e de mTOR [4].

A síntese protéica no músculo humano aumenta após uma simples sessão de exercício resistido vigoroso [20], atingindo pico

máximo em 24 h, após o exercício, com o efeito anabólico permanecendo elevado de 2-3 horas até 36-48 h pós-exercício [21].

As adaptações neurais predominam durante os primeiros estágios do treino [22] e a hipertrofia muscular torna-se evidente dentro das primeiras 6 semanas [23].

A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) responde aos estímulos anabólicos, da IGF-1, e mecânicos, da contração muscular, via PKB/Akt (Figura 2). A PI3K fosforila o fosfoinositol de membrana PI-4,5-bisfosfato a PI-3,4,5-trifosfato, criando, no sarcolema, o sítio de ligação para a serina/treoninaquinase Akt. Subsequentemente, a Akt é ativada pela fosforilação com a quinase dependente de fosfoinositol (PDK-1) [24] (Figura 2).

Os exercícios de resistência estimulam a síntese protéica muscular por até 48 horas [4]. Entretanto, o balanço protéico permanece negativo no pós-exercício imediato até a administração de proteínas e/ou aminoácidos [20,25].

A ampliação do processo hipertrofico induzido pelo exercício resistido ocorre com a ingestão de aminoácidos [26] e resposta endócrina [27].

Trabalhos experimentais mostram que tanto os exercícios de resistência [28], como ingestões de proteína e/ou leucina [10] resultam em fosforilação de ambos 4E-BP1 e S6k1 (Figura 1 e Figura 2).

O treinamento resistido constitui método excelente para promover o ganho de músculo esquelético. O mesmo pode ser potencializado pelos suplementos protéicos, em particular aqueles contendo elevadas concentrações de aminoácidos indispensáveis como a proteína do soro do leite. A proteína do soro do leite é especialmente rica em leucina (até 14g/100g proteína), conhecida como reguladora do início da tradução do mRNA para a síntese protéica muscular, atuando diretamente na fosforilação da mTOR [29].

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) têm habilidade única de estimular a síntese protéica muscular independentemente dos demais aminoácidos. Quando administrada oralmente, a leucina isolada estimula a síntese protéica muscular em animais e indivíduos exercitados ou subnutridos [8,30,31]. O estímulo da leucina não é via insulina/IGF-1/PI3K/PKB e sim, provavelmente, via PRAS40 [13] (Figura 2).

Adicionalmente aos anabolizantes protéicos musculares que agem na mTOR: treinamento contra-resistência, hormônios (IGF-1, GH, testosterona) e leucina há, também, as misturas facilitadoras da síntese protéica muscular: glicose, insulina, BCAA, glutamina, creatina etc., atuantes na hidratação celular e positividade do balanço celular de aminoácidos [32].

Bloqueadores da mTOR

A AMPk (*5'-AMP-activated protein kinase*) é uma enzima heterotrimérica que atua como o maior sensor energético celular. É ativada quando o ATP torna-se limitado. Nestas condições, a AMPk estimula as vias catabólicas e inibe as vias anabólicas no esforço de suprir o ATP para a sobrevivência celular.

A AMPk regula, no músculo, o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, pelos seus efeitos em múltiplas vias de sinalização e assim, suprime processos que demandam ATP e ativa vias que geram ATP.

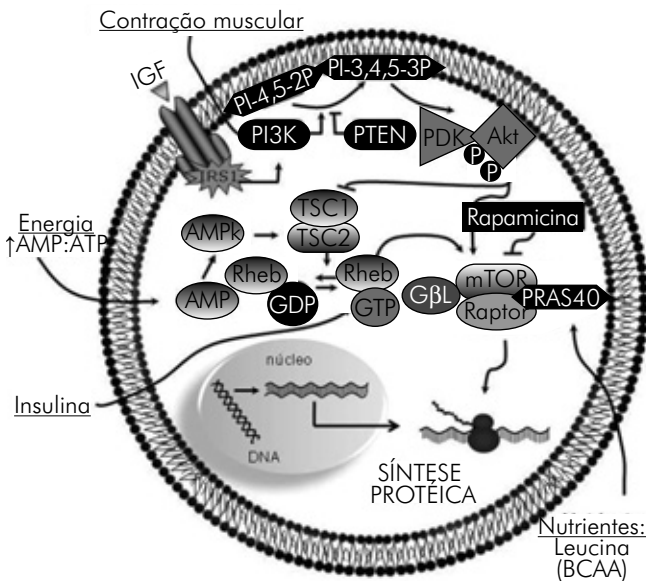
Nesse sentido, a AMPk é um regulador negativo *upstream* do mTORC1, reduzindo a síntese protéica muscular em condições de estresse energético como hipóxia, exercício de alta intensidade ou glicopenia celular [33].

A AMPk inibe a sinalização mTORC1 em 2 vias: via fosforilação do Raptor que leva a diminuição da atividade da mTOR quinase e via fosforilação da TSC2 (ou tuberina) [34] (Figura 2).

A AMPk desempenha papel importante na regulação da síntese protéica muscular. Uma simples sessão de exercício resistido, feita em jejum, resulta na inibição da síntese protéica muscular via AMPk com redução da fosforilação da 4E-BP1 [35-37]. Entretanto, quando o exercício é feito na situação alimentado, a inibição da síntese protéica não ocorre, pois a alimentação reduz a AMPk [26].

Condições em que a leucina é inefetiva em estimular o anabolismo protéico muscular (sepsis, intoxicação alcoólica e excesso de glicocorticóides) caracterizam o estado de resistência à leucina [13]. A ativação da AMPk, presente em várias condições de estresse, tem participação provável no desenvolvimento da resistência a leucina no músculo esquelético [13].

Figura 2 - estimuladores da mTOR complex 1.



(IGF: insulin-like growth factor; IRS 1: insulin receptor substrate-1; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; PTEN: phosphatase and tensin homolog; PI-4,5-2P: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PI-3,4,5-3P: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; Akt: serina/treonina quinase Akt; PDK: quinase dependente de fosfoinositol; mTOR: mammalian target of rapamycin; PRAS40: proline-rich Akt substrate of 40 kDa; GBL: G-protein β subunit-like; RAPTOR: regulatory associated protein of mTOR; TSC1/TSC2: tuberous sclerosis complex; Rheb: ras homologue enriched in brain; AMPk: 5'-AMP-activated protein kinase; BCAA: branched-chain amino acid).

Anabolismo pós-lesão por sobrecarga

Após a lesão muscular por sobrecarga há a regeneração, remodelamento e crescimento muscular (Figura 3). Nestas condições o crescimento muscular é tanto hipertrófico como hiperplásico.

A regeneração do músculo esquelético é fortemente associada a células como macrófagos e células satélites. Os macrófagos participantes são residentes, recrutados de compartimentos musculares específicos como epimísio/perimísio (ou fásia muscular) ou resultantes da diferenciação de monócitos sanguíneos. Estes últimos são atraídos tanto pela ação quimiotática das células miogênicas como pela MCP-1 (*monocytes chemoattractant protein 1*) expressados pelos macrófagos residuais [38].

No músculo os macrófagos adotam funções heterogêneas de acordo com a localização anatômica e estímulos diferentes. Dentre as atividades que ilustram os diferentes fenótipos dos macrófagos figuram: pró-inflamatório x anti-inflamatório, imunogênico x tolerogênico e destruição x reparo tecidual. A ativação clássica dos macrófagos (chamada M₁) induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas do oxigênio que refletem o estado primário da ativação macrofágica após lesão tecidual ou conflito imunológico. A ativação alternativa (chamada M2a) é observada em ambiente Th2 e é associada à inflamação crônica mas evidenciada também em infecções parasitárias. A ação macrofágica anti-inflamatória ou de desativação (chamada M2c) é relacionada a fase de reparo tecidual durante a qual os macrófagos secretam TGF-β (*transforming growth factor β*) [39].

O músculo esquelético lesado recruta rapidamente (1-2 dias) monócitos sanguíneos que se tornam macrófagos com padrão comportamental inflamatório. Um a três dias após serem recrutados, esses macrófagos mudam seu fenótipo para anti-inflamatórios. Essa mudança ocorre após a fagocitose tanto das células apoptóticas como das miofibras necrosadas (figura 3). Assim a regeneração muscular pós-lesão é caracterizada por populações sequenciais de macrófagos. Primeiro, os macrófagos residuais, que são pró-inflamatórios, associam-se aos monócitos recrutados para a remoção do material necrosado. A seguir, os macrófagos anti-inflamatórios aparecem e estão associados à cicatrização e reparo tecidual. Desta forma a inflamação desencadeada por macrófagos, pós-lesão muscular, é benéfica à regeneração muscular [38]. Os macrófagos anti-inflamatórios parecem estar envolvidos na diferenciação celular e/ou crescimento miofibrilar [40] (figura 3).

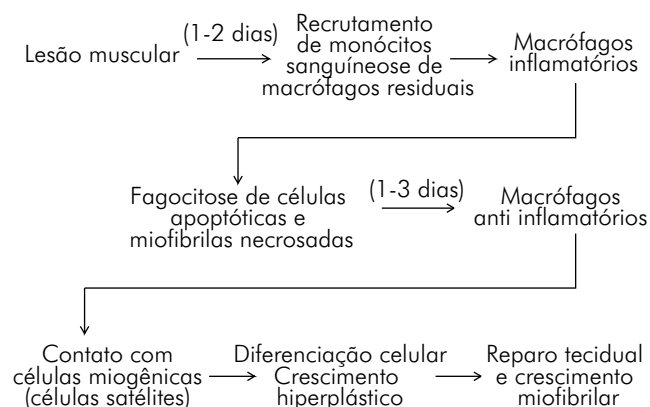
Quando em contato com macrófagos, as células miogênicas apresentam crescimento. Este estímulo pode ser causado: 1) pela resposta eficiente das células miogênicas aos fatores de crescimento secretados pelos macrófagos ou 2) pelo contato estabelecido de célula: célula que protege as células miogênicas contra apoptose. As células miogênicas multinucleadas diferenciadas (miotubos) são mais protegidas da apoptose, comparativamente aos mioblastos indiferenciados. Isto sugere

que a proteção do macrófago estender-se-ia até a associação final do miotubo à matriz [38].

Quando em cultura, os macrófagos inflamatórios estimulam a proliferação de células miogênicas e inibem sua diferenciação. Inversamente, os macrófagos anti-inflamatórios exibem estímulo da fusão dos mioblastos, isto é, diferenciação de células miogênicas. Estes resultados sugerem que o estado de ativação dos macrófagos pode modular o processo miogênico [40,41].

O processo de miogênese *in vitro* envolve 3 etapas principais: diferenciação celular com cessação do ciclo celular e expressão do programa miogênico, migração celular em direção a outra e fusão eventual em estruturas multinucleadas. Os macrófagos pró-inflamatórios exercem efeitos negativos tanto na diferenciação miogênica como na fusão. A menor fusão pode ser consequente ao estímulo destes macrófagos exercido sobre a maior mobilidade das células miogênicas. Por outro lado, macrófagos anti-inflamatórios estimulam tanto a diferenciação miogênica como o processo de fusão [38].

Figura 3 - Lesão pós-carga e reparo/crescimento muscular [38].



Embora ainda sob estudos, é provável que os mecanismos envolvidos estejam associados às citocinas liberadas pelos macrófagos ativados que influenciariam o comportamento da célula miogênica. Por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF α) é mitogênico para mioblastos e inibe suas diferenciações [42], o TNF- β_1 parece associado ao diâmetro das miofibras regeneradas [43].

A ciclooxigenase 2 e seus metabólitos também parecem exercer papel crítico, uma vez que promovem fusão dos mioblastos, necessária à qualidade do reparo muscular [44,45].

Na lesão miofibrilar por trauma, há liberação local da isoforma muscular do IGF-1, o *mecano-growth factor* (MGF), responsável pelo recrutamento e ativação das células satélites quiescentes que se fundirão formando o miotubo, que substituirá as miofibrilas fagocitadas e acrescentará novos mionúcleos à massa sincicial. As células tronco musculares recrutadas reagirão com a integrina (proteína transmembrana) que permitirá a migração do já mioblasto até sua adesão

à laminina, arcabouço colágeno da miofibrila fagocitada, permitindo a regeneração da área lesada [46].

Sinalizadores anabólicos como Akt/PKB, ativados pela contração muscular, participam do remodelamento muscular e funcionamento normal do sarcolema [47]. As maiores secreções de andrógenos e GH decorrentes do esforço de alta intensidade (e lesão muscular) estimulam a síntese miofibrilar e o crescimento muscular hipertrófico [46].

Anabolismo pós-desuso

Na recuperação da massa muscular pós-desuso a expressão gênica da IL-6 está aumentada e funciona como regulador miogênico e anabólico [48]. Frente ao trabalho muscular possui elevação temporal com pico intermediário entre o TNF- α (pró-inflamatório) e a IL-10 (anti-inflamatória). Metabolicamente a IL-6 bloqueia as ações musculares (catabólicas e de resistência à insulina) do TNF- α [49].

A IL-6 liberada no exercício físico é considerada a primeira miocina com ação integrativa entre órgãos resultando em desbloqueio do IGF-1, sensibilidade insulínica, lipólise intramuscular e economia do glicogênio muscular [50]. A maior expressão da IL-6 pelo músculo exercitado pode ser decorrente de quaisquer dos estímulos Ca⁺⁺ intracelular, AMPk ou hipóxia local [51].

Conclusão

O *turnover* miofibrilar ocorre, fisiologicamente, a cada 5-6 dias, podendo ser retardado pelos estresses inflamatório e energético (\uparrow AMP/ATP) e acelerado por fatores anabólicos (estímulo de contração muscular contra resistência, estímulo elétrico (em medulados), fatores nutricionais (leucina) e hormonais). Estes fatores anabólicos agem via cascata de quinases que estimulam a tradução do mRNA miofibrilar e/ou fatores de diferenciação miogênicos. Figuram como indicadores moleculares das vias do crescimento muscular Akt/PKB, mTOR, p70S6K, 4E-BP1, GSK3 e miogenina.

Referências

1. Robergs RA, Roberts SO. Função neuromuscular e adaptação ao exercício. In: Princípios fundamentais de fisiologia do exercício para adaptação, desempenho e saúde. 1ª ed. São Paulo: Phorte; 2002. p.76-109.
2. Nair KS. Aging muscle. Am J Clin Nutr 2005;81:953-63.
3. Mascher H, Tannerstedt J, Brink-Elfegoun T, Ekblom B, Gustafsson T, Blomstrand E. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;294:E43-51.
4. Leger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Dériaz O, Crettenand A, et al. Akt signalling through GSK-3 β , mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. J Physiol 2006;576:923-33.

5. Welle S, Bhatt K, Thornton CA. Stimulation of myofibrillar synthesis by exercise is mediated by more efficient translation of mRNA. *J Appl Physiol* 1999;86:1220-5.
6. Witard OC, Tieland M, Beelen M, Tipton KD, van Loon LJ, Koopman R. Resistance exercise increases postprandial muscle protein synthesis in humans. *Med Sci Sports Exerc* 2009;41:144-54.
7. Mitchell JW, Nadel ER, Stolwijk JA. Respiratory weight losses during exercise. *J Appl Physiol* 1972;32:474-6.
8. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr* 2001;131:856S-860S.
9. Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004;23:3151-71.
10. Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS. Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J Appl Physiol* 2002;93:1168-80.
11. Oshiro N, Takahashi R, Yoshino K, Tanimura K, Nakashima A, Eguchi S, et al. The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem* 2007;282:20329-39.
12. Proud CG. Amino acids and mTOR signalling in anabolic function. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1187-90.
13. Pruznak AM, Kazi AA, Frost RA, Vary TC, Lang CH. Activation of AMP-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose nucleoside prevents leucine-stimulated protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr* 2008;138:1887-94.
14. Lang CH, Frost RA, Jefferson LS, Kimball SR, Vary TC. Endotoxin-induced decrease in muscle protein synthesis is associated with changes in eIF2B, eIF4E, and IGF-I. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E1133-43.
15. Svanberg E, Frost RA, Lang CH, Isgaard J, Jefferson LS, Kimball, et al. IGF-I/IGFBP-3 binary complex modulates sepsis-induced inhibition of protein synthesis in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E1145-58.
16. Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 2008;412:179-90.
17. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc* 2009;41:687-708.
18. Roth SM, Ferrell RE, Peters DG, Metter EJ, Hurley BF, Rogers MA. Influence of age, sex, and strength training on human muscle gene expression determined by microarray. *Physiol Genomics* 2002;10:181-90.
19. Roth SM, Martel GF, Ferrell RE, Metter EJ, Hurley BF, Rogers MA. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:706-9.
20. 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:E99-107.
21. MacDougall JD, Gibala MJ, Tarnopolsky MA, MacDonald JR, Interisano SA, Yarasheski KE. The time course for elevated muscle protein synthesis following heavy resistance exercise. *Can J Appl Physiol* 1995;20:480-6.
22. Moritani T, deVries HA. Neural factors versus hypertrophy in the time course of muscle strength gain. *Am J Phys Med* 1979;58:115-30.
23. Phillips SM. Short-term training: when do repeated bouts of resistance exercise become training? *Can J Appl Physiol* 2000;25:185-93.
24. Miyazaki M, Noguchi M, Takemasa T. Intermittent reloading attenuates muscle atrophy through modulating Akt/mTOR pathway. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40:848-55.
25. Biolo G, Tipton KD, Klein S, Wolfe RR. An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *Am J Physiol* 1997;273:E122-9.
26. Fujita S, Dreyer HC, Drummond MJ, Micah J, Glynn EL. Nutrient signaling in the regulation of human muscle protein synthesis. *J Physiol* 2007;582:813-23.
27. Kraemer WJ, Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med* 2005;35:339-61.
28. Kubica N, Bolster DR, Farrell PA, Kimball SR, Jefferson LS. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2B epsilon mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem* 2005;280:7570-80.
29. Roth E. Skeletal muscle gain: how much can be achieved by protein and amino acid administration? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:32-3.
30. Drummond MJ, Rasmussen BB. Leucine-enriched nutrients and the regulation of mammalian target of rapamycin signalling and human skeletal muscle protein synthesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:222-6.
31. Rieu I, Balage M, Sornet C, et al. Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *J Physiol* 2006;575:305-15.
32. Rivas DA, Lessard SJ, Yaspelkis BB, Hawley JA. Regulation of mTORC1/2 formation in response to a high-fat diet and exercise training. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(5):S3-S4.
33. Hardie DG, Sakamoto K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:48-60.
34. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008;30:214-26.
35. Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* 2002;277:23977-80.
36. 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;576:613-24.
37. Koopman R, Zorenc AH, Gransier RJ, Cameron-Smith D, van Loon LJ. Increase in S6K1 phosphorylation in human skeletal muscle following resistance exercise occurs mainly in type II muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E1245-52.
38. Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C et al. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev* 2009;37:18-22.

39. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 2004;76:509-13.
40. Arnold L, Henry A, Poron F, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 2007;204:1057-69.
41. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953-64.
42. Li YP. TNF-alpha is a mitogen in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C370-6.
43. Lefaucheur JP, Gjata B, Lafont H, Sebille A. Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J Neuroimmunol* 1996;70:37-44.
44. Bondesen BA, Mills ST, Pavlath GK. The COX-2 pathway regulates growth of atrophied muscle via multiple mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C1651-9.
45. Shen W, Li Y, Zhu J, Schwendener R, Huard J. Interaction between macrophages, TGF-beta1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury. *J Cell Physiol* 2008;214:405-12.
46. Boppart MD, Liu J, Alexander NM, Kaufman SJ. The alpha-7beta1 integrin recruits a Sca-1+/CD45- stem cell population in skeletal muscle following exercise-induced injury. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(5):S33.
47. Moore NA, Devaney JM, Hoffman E, Zambraski E, Gordish H, Clarkson PM. Association of Akt2 genotypes and exercise muscle damage. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(5):S32.
48. Washington TA, Davis JM, Lowe LL, Wilson LB, Durstine JL, Carson JA. Interleukin-6 deficiency attenuates the recovery of gastrocnemius muscle mass from disuse-induced atrophy. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(5).
49. Carey AL, Bruce CR, Sacchetti M, Anderson MJ, Olsen DB, Saltin B, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are not increased in patients with Type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness. *Diabetologia* 2004;47:1029-37.
50. Pedersen BK, Fischer CP. Beneficial health effects of exercise--the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:152-6.
51. Mehan RS, Allen DL, Uyenishi J, Cleary A, Lindsay SF, Reed JM. Transcriptional regulation of interleukin-6 expression in mouse skeletal muscle in vivo and in myotubes in vitro. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(5):S163-S164.