

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

MARCELO HENRIQUE SALVIANO DE FARIA

**EFEITOS AGUDO E CRÔNICO DO TREINAMENTO DE FORÇA NA
MUSCULAÇÃO SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS E URINÁRIOS DE
MOLÉCULAS DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM HOMENS
JOVENS E SAUDÁVEIS**

Belo Horizonte

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

**EFEITOS AGUDO E CRÔNICO DO TREINAMENTO DE FORÇA NA
MUSCULAÇÃO SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS E URINÁRIOS DE
MOLÉCULAS DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM HOMENS
JOVENS E SAUDÁVEIS**

Tese apresentada ao curso de
Doutorado em Medicina Molecular da
Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Medicina
Molecular.

Aluno: Marcelo Henrique Salviano de Faria

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Simões e Silva

Coorientador: Prof. Dr. Albená Nunes da Silva.

Belo Horizonte

2019

F224e Faria, Marcelo Henrique Salviano de.
Efeitos agudo e crônico do treinamento de força na musculação sobre os níveis plasmáticos e urinários de moléculas do Sistema Renina Angiotensina em homens jovens e saudáveis [manuscrito]. / Marcelo Henrique Salviano de Faria. -- Belo Horizonte: 2019.
59f.: il.
Orientador (a): Ana Cristina Simões e Silva.
Coorientador (a): Albená Nunes da Silva.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Força Muscular. 2. Educação Física e Treinamento. 3. Treinamento de Resistência. 4. Hipertrofia. 5. Angiotensina II. 6. Angiotensinas. 7. Dissertação Acadêmica. I. Silva, Ana Cristina Simões e. II. Silva, Albená Nunes da. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NI M: OT 256

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

**EFEITOS AGUDO E CRÔNICO DO TREINAMENTO DE FORÇA NA
MUSCULAÇÃO SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS E URINÁRIOS DE
MOLÉCULAS DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM HOMENS
JOVENS E SAUDÁVEIS**

Marcelo Henrique Salviano de Faria

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau Doutor.

Orientadora: Prof.^a Ana Cristina Simões e Silva
Professora Titular do Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientador: Prof. Albená Nunes da Silva
Professor Adjunto da Escola de Educação Física (EEF/UFOP)
Faculdade de Educação Física da Universidade Federal de Ouro Preto

Belo Horizonte

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Prof.^a Sandra Regina Goulart Almeida

Vice Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró Reitor de Pós Graduação: Prof. Fábio Alves da Silva Júnior

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Humberto José Alves

Vice Diretor: Prof.^a Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Sub-coordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof.^a Eli Iola Gurgel Andrade

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof.^a. Mônica Maria de Almeida Vasconcelos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

Coordenador: Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

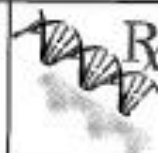
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR:

Prof.^a Carolina Cavaliéri Gomes

Prof.^a Débora Marques de Miranda

Prof. Humberto Correa da Silva

Discente - Eduardo de Souza Nicolau



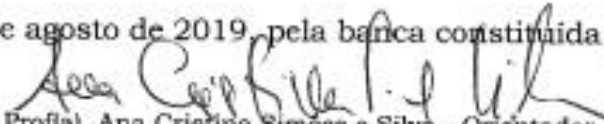
FOLHA DE APROVAÇÃO

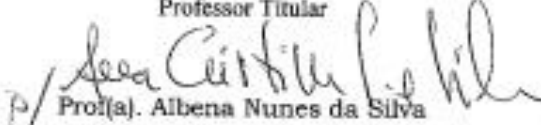
EFEITO DO TREINAMENTO DE FORÇA SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS E URINÁRIOS NAS MOLÉCULAS DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM HOMENS JOVENS E SAUDÁVEIS

MARCELO HENRIQUE SALVIANO DE FARIA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.


Aprovada em 16 de agosto de 2019, pela banca constituída pelos membros:

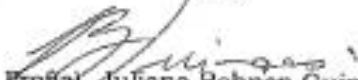

Prof(a). Ana Cristina Simões e Silva - Orientador
Professor Titular


p/ Prof(a). Albená Nunes da Silva
UFOP


Prof(a). Sálvina Maria de Campos Carli
Centro Universitário Una


Prof(a). Mauro Heleno Chagas
UFMG


Prof(a). Andreia Carvalho Alzamora
UFOP


Prof(a). Juliana Bohnen Guimarães
Universidade do Estado de Minas Gerais

Belo Horizonte, 16 de agosto de 2019.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jair e Neide, pelo constante esforço em minha educação e na busca do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus irmãos Ricardo, André e Guilherme, pelo companheirismo.

À minha esposa Marcia, pelo amor e companheirismo.

À Prof^a. Dra. Ana Cristina Simões e Silva, pela orientação, disponibilidade, confiança e exemplo de professora e profissional.

Ao Prof. Dr. Albená Nunes da Silva, pela amizade, coorientação e pelo exemplo como professor e profissional na nossa área;

À Érica Leandro Marciano Vieira e Lucélia Barroso pela grande colaboração na execução do trabalho.

A todos colegas e professores do LIIM pelo apoio e por compartilharem gratuitamente seus conhecimentos.

Ao UNIBH por ter cedido o espaço e equipamento, e autorizado a coleta de dados em suas dependências.

Aos alunos do UNIBH que de alguma maneira ajudaram na coleta de dados e das amostras.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

Não se pode criar experiência. É preciso passar por ela.

Albert Camus

RESUMO

A importância do exercício físico para um estilo de vida saudável é bem compreendida. Existem diferentes tipos de protocolos de exercício, incluindo treinamento intervalado de alta intensidade, treinamento aeróbio e treinamento de força (TF). Sabe-se que o TF pode modular sistemas regulatórios. No entanto, existem poucos estudos sobre as interações entre TF e o sistema renina angiotensina (SRA) em humanos. Neste estudo, foi investigado o efeito da TF nos níveis de moléculas do SRA na urina e no plasma. Doze voluntários do sexo masculino com idade de $23,4 \pm 2,7$ anos realizaram o protocolo de TF por 10 semanas (três vezes por semana), que consistiu de 3 séries em 65% de uma repetição máxima (1RM) de 3 exercícios de perna, pausa de 90" entre séries, e duração de tempo de repetição de 5 ". O efeito da TF foi avaliado na contagem de leucócitos circulantes, níveis urinários e plasmáticos de moléculas do SRA, incluindo Angiotensina (Ang) II, Ang- (1-7), enzima conversora de angiotensina (ECA)1 e ECA2, antes e imediatamente após a primeira (S1) e a última (S30) sessão de treinamento. O nível de força aumentou significativamente na última sessão de treino em comparação com a primeira sessão. O exercício aumentou agudamente os níveis de lactato sanguíneo pós-treino e a contagem de leucócitos. O protocolo de treinamento reduziu significativamente a porcentagem de gordura e aumentou a massa magra total. Em relação às moléculas do SRA, os níveis plasmáticos de Ang II foram maiores após a última sessão em comparação com os níveis anteriores a esta sessão e também se comparados aos valores após a primeira sessão de exercício. Os níveis de Ang-(1-7) aumentaram significativamente no plasma e na urina após a primeira e a última sessão e na comparação dos valores antes e depois da última sessão com os valores de antes e depois da primeira sessão, respectivamente. Os níveis de ECA1 e ECA2 não se modificaram em nenhuma condição. Em conclusão, as concentrações plasmáticas e urinárias de Ang II e Ang-(1-7) foram modificadas por TF. O efeito sobre Ang- (1-7) também foi observado nos níveis basais antes da última sessão de exercícios.

Palavras-chave: exercício físico, Sistema Renina Angiotensina, treinamento de força, Angiotensina II, Angiotensina-(1-7)

ABSTRACT

The importance of physical exercise for a healthy lifestyle is well understood. There are different types of exercising protocols, including high intensity intermittent training, endurance, and strength training (ST). It is known that ST can modulate regulatory systems. However, there are very few studies regarding the interactions between ST and renin angiotensin system (RAS) in humans. Here, we investigated the effect of ST on levels of RAS molecules in urine and plasma. Twelve male volunteers with 23.4 ± 2.7 years old performed our ST protocol for 10 weeks (three times a week), which consisted of 3 sets at 65% of one maximum repetition (1MR) of 3 leg exercises, pause of 90" between sets, and time duration of repetition of 5". The effect of ST was evaluated on circulating leukocytes count, urinary and plasma levels of RAS molecules, including Angiotensin (Ang) II, Ang-(1-7), angiotensin converting enzyme (ACE) 1 and ACE 2, before and immediately after the first (S1) and the last (S30) session of training. The level of strength significantly increased in last training session as compared to first session. Exercise acutely increased post-training blood lactate levels and leukocyte count. The training protocol significantly reduced the percentage of fat and increased the total lean mass. Regarding RAS molecules, plasma levels of Ang II were higher after the last session in comparison to levels before this session and also if compared to values after the first session of exercise. Levels of Ang-(1-7) significantly increased in plasma and urine after first and last sessions and in the comparison of values before and after last session to those before and after first session, respectively. Levels of ACE1 and ACE2 did not modify in any condition. In conclusion, plasma and urinary concentrations of Ang II and Ang-(1-7) were modified by ST. The effect on Ang-(1-7) was also observed in baseline levels before last exercise session.

Key-words: physical exercise, Renin Angiotensin System, strength training, Angiotensin II, Angiotensin-(1-7)

NOTA EXPLICATIVA

A apresentação da presente dissertação foi organizada sob a forma de artigo científico, de acordo com a resolução 03/2010, aprovada pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

A tese inclui as seguintes partes: resumo, introdução, objetivos, metodologia, artigo original e considerações. No artigo original, são apresentados e discutidos os resultados obtidos na tese em relação ao efeitos agudo e crônico do treinamento de força sobre enzimas e peptídeos do sistema renina-angiotensina em indivíduos jovens.

As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada sessão e do artigo original.

LISTA DE TABELAS

Artigo Original

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparisons of weight load (kg) of each apparatus and body composition (kg) at first (S1) and last (S30) training session.....	46
Tabela 2	Comparison of leukocytes and lactate results before (Pre) and after (Post) first (S1) and last (S30) session of exercise.....	46
Tabela 3	Comparisons of serum and urine levels of ACE (angiotensin converting enzyme) 1 and ACE2 before (Pre) and after (Post) first (S1) and last (S30) session of exercise.....	47
Tabela 4	Comparisons of serum and urine levels of ACE2 (angiotensin converting enzyme 2) before (Pre) and after (Post) first (S1) and last (S30) session of exercise.....	47

LISTA DE FIGURAS

MÉTODOS

Figura 1	Desenho do estudo.....	21
----------	------------------------	----

ARTIGO ORIGINAL

Figura 1	Schematic view of the study protocol.....	48
Figura 2	A) Comparison of serum levels of Angiotensin II (Ang II) evaluated before (pre) and after (post) the first (S1) session of exercise. B) Comparison of serum levels of Ang II evaluated before (pre) and after (post) the last (S30) session of exercise. C) Comparison of serum levels of Ang II evaluated before (pre) the first (S1) exercise session versus before (pre) the last (S30) exercise session. D) Comparison of serum levels of Ang II evaluated after (pre) the first (S1) exercise session versus after (pre) the last (S30) exercise session.....	49
Figura 3	A) Comparison of urine levels of Angiotensin II (Ang II) evaluated before (pre) and after (post) the first (S1) session of exercise. B)	

Comparison of urine levels of Ang II evaluated before (pre) and after (post) the last (S30) session of exercise. C) Comparison of urine levels of Ang II evaluated before (pre) the first (S1) exercise session versus before (pre) the last (S30) exercise session. D) Comparison of urine levels of Ang II evaluated after (pre) the first (S1) exercise session versus after (pre) the last (S30) exercise session.....50

Figura 4

A) Comparison of serum levels of Angiotensin-(1-7) (Ang 1-7) evaluated before (pre) and after (post) the first (S1) session of exercise. B) Comparison of serum levels of Ang 1-7 evaluated before (pre) and after (post) the last (S30) session of exercise. C) Comparison of serum levels of Ang 1-7 evaluated before (pre) the first (S1) exercise session versus before (pre) the last (S30) exercise session. D) Comparison of serum levels of Ang 1-7 evaluated after (pre) the first (S1) exercise session versus after (pre) the last (S30) exercise session.....51

Figura 5

A) Comparison of urine levels of Angiotensin-(1-7) (Ang 1-7) evaluated before (pre) and after (post) the first (S1) session of exercise. B) Comparison of urine levels of Ang 1-7 evaluated before (pre) and after (post) the last (S30) session of exercise. C) Comparison of urine levels of Ang 1-7 evaluated before (pre) the first (S1) exercise session versus before (pre) the last (S30) exercise session. D) Comparison of urine levels of Ang 1-7 evaluated after (pre) the first (S1) exercise session versus after (pre) the last (S30) exercise session.....52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACE2	Angiotensin II converting enzyme
AE	Acute exercise
ANG II	Angiotensina II
ANG-(1-7)	Angiotensina (I-7)
AT ₁	Receptor de Angiotensina tipo 1
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ECA1	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
FM	Faculdade de Medicina
IPAQ	International physical activity questionnaire
LAC	Lactato sanguíneo
Mas	Receptor Mas
PAR-Q	Physical activity readiness questionnaire
Pre	Antes do treino
Post	Imediatamente após o treino
RAS	Renin-angiotensin system
1RM	1 repetição máxima
S1	Primeira sessão de treinamento
S30	Última sessão de treinamento
SRA	Sistema Renina Angiotensina
ST	Strength Training
TF	Treinamento de força
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WBC	white blood cells

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	OBJETIVO.....	19
3.	METODOLOGIA.....	20
4.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
5.	MANUSCRITO ORIGINAL	28
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	56
ANEXOS		
	ANEXO I - PRODUÇÕES TÉCNICAS E PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS....	57
	ANEXO II - PARECER COEP/UFMG.....	59

1 INTRODUÇÃO

O treinamento da capacidade física de força provoca no organismo adaptações específicas que proporcionam alterações de desempenho nas diferentes formas de manifestação da força muscular. Uma resposta esperada com o treinamento de força é a “Hipertrofia Muscular” que ocorre com a prescrição de volume e intensidade moderadas, gerando significativa adaptação morfológica (ACSM, 2018). A intensidade do treinamento de força pode estar relacionada à força máxima no exercício específico em uma repetição máxima (1-RM), ou seja, o peso máximo em uma contração máxima voluntária (GORGENS et al, 2015).

Estudos recentes têm mostrado que tanto as células do sistema imune, quanto mediadores por elas produzidos possuem papel importante no processo de regeneração, reparo e crescimento muscular em resposta à lesão muscular ocasionada pelo treinamento de força (PEAK, et al.; 2005; PEAK, et al., 2015; TIDBALL, 2017; YANG e HU, 2018).

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é composto por dois eixos principais. Um eixo clássico formado pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), Angiotensina II (Ang II) e o receptor angiotensinérgico do tipo 1 da Ang II (AT₁) e um eixo alternativo ou contrarregulatório formado pela Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] e seu receptor acoplado à proteína G denominado MAS (TIPNIS, et al., 2002; DONOGHUE, et al., 2002; SANTOS, et al., 2003; SIMÕES E SILVA & TEIXEIRA, 2016). No músculo esquelético, o eixo clássico promove a degradação de proteínas e aumenta o estado inflamatório e o estresse oxidativo, levando à perda de massa muscular (FRANTZ, et al. 2018; TAKADA, et al. 2013). No entanto, o eixo alternativo desempenha um papel contrarregulador ao se opor aos efeitos da Ang II (FRANTZ, et al. 2018; NUNES-SILVA, et al, 2017; STEFAN, et al. 2003). O acúmulo de tecido adiposo e a perda de massa muscular estão associados a maior risco de morbidade e mortalidade (STEFAN, et al. 2005), o que poderia estar relacionado, em parte, à ativação excessiva do eixo clássico do SRA. Por outro lado, o treinamento físico poderia deslocar o equilíbrio do SRA para o eixo alternativo, promovendo efeitos protetores (NUNES-SILVA et al. 2017). Assim, a mobilização de gordura e a manutenção da massa e função muscular seriam estimulados.

Na literatura a maioria dos estudos relacionados a exercício físico e SRA foram feitos utilizando camundongos e ratos em modelos experimentais.

Em camundongos, o treinamento de corrida (8 semanas, 5x por semana e 60 minutos por dia) aumentou a expressão de ECA2 no coração e a função ventricular quando comparado aos camundongos destreinados (PEREIRA, et al, 2009). Em estudo subsequente, Guimarães (2012) propôs a hipótese que o treinamento físico ativaria a via contra regulatória do SRA e teria efeito sobre o remodelamento cardíaco. Os resultados desse estudo mostraram que treinamento físico (natação a 80% da carga máxima, por 6 semanas consecutivas, durante 1 hora por dia e em 5 dias por semana) em camundongos com deleção genética do receptor Mas apresentavam ativação exacerbada de ECA-Ang II-AT₁ que contribuiu para efeitos deletérios sobre o músculo cardíaco. Mesmo havendo aumento das concentrações de Ang-(1-7) nos animais com deleção genética do receptor Mas, tal elevação foi menor do que a detectada nos animais sem deleção.

Em ratos, o efeito de dois diferentes tipos de treinamento de natação (T1 e T2) foram investigados em relação aos mecanismos moleculares da hipertrofia cardíaca do ventrículo esquerdo. Os níveis de Ang I e Ang II foram menores nos tecidos cardíacos, e a atividade e expressão de ECA foram menores nos grupos T1 e T2 quando comparados aos animais sedentários. Além disso, ECA2 e Ang-(1-7) aumentaram seus níveis e sua expressão tecidual. O exercício induziu hipertrofia do ventrículo esquerdo do coração por meio de ativação do receptor AT₁ (FERNANDES, 2011). No estudo de Agarwal e colaboradores (2011) foram investigados os efeitos do exercício físico nos mecanismos centrais de regulação do sistema cardiovascular em ratos espontaneamente hipertensos. Os ratos se exercitaram em uma esteira durante 16 dias. O protocolo era de um exercício de intensidade moderada, 5 dias por semana, durante 60 minutos por dia e com a esteira numa inclinação de 18%. Os resultados mostraram que o exercício foi capaz de reduzir componente da via clássica do SRA, moléculas inflamatórias (TNF, IL-1 β) e o estresse oxidativo. Além disso, o treinamento induziu a ativação do eixo contrarregulatório do SRA e vias anti-inflamatórias no sistema nervoso central. Esses efeitos poderiam explicar em parte a redução da pressão arterial induzida pelo treinamento físico crônico.

No entanto, apesar de investigados em animais de experimentação, os mecanismos relacionados às alterações induzidas pelo exercício no SRA permanecem pouco claros, sobretudo em seres humanos (NUNES-SILVA, et al. 2017 e FRANTZ, et al. 2018). Além disso, não se sabe qual seria o melhor método de treinamento para redução dos marcadores de inflamação sistêmica e estímulo ao eixo alternativo do SRA (SLAMAT, et al. 2015; NUNES-SILVA, et al. 2017 e FRANTZ, et al. 2018).

Nesse contexto, o presente estudo teve como hipótese principal de que o treinamento de força em musculação fosse capaz de alterar as concentrações séricas e urinárias dos componentes do SRA em adultos jovens saudáveis do sexo masculino.

2 Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos agudos e crônicos do treinamento de força na musculação nos níveis plasmáticos do SRA em homens adultos jovens.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar leucometria e concentração sérica de lactato antes e após a primeira sessão de exercício e antes e após 10 semanas de treinamento (última sessão) para hipertrofia em musculação.
- 2- Avaliar composição corporal por meio de densitometria e capacidade física antes e após a primeira sessão de treinamento e antes e após 10 semanas de treinamento (última sessão) para hipertrofia em musculação.
- 3- Medir as concentrações séricas e urinárias de ECA1, ECA2, Ang II e Ang-(1-7) antes e após a primeira sessão de exercício e antes e após 10 semanas de treinamento (última sessão) para hipertrofia em musculação.
- 4- Comparar as mensurações e avaliações realizadas antes e após a primeira e última sessões de exercício e entre valores prévios e posteriores à primeira e à última sessão de exercício.

Delineamento e aspectos éticos

Trata-se de estudo longitudinal do efeito agudo e crônico do exercício de musculação com carga de treinamento orientada para o ganho de hipertrofia muscular em biomarcadores plasmáticos e urinários em jovens adultos universitários.

Participaram deste estudo 12 jovens adultos do sexo masculino, com idade entre 20 a 31 anos, sem distinção de raça, cor, sexo, idioma e crença. Este estudo respeitou todas as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional em Saúde envolvendo pesquisas com seres humanos (Resolução 466/2012) e somente teve início após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (UFOP) sob o número de parecer 1.881.170. Antes de iniciarem qualquer atividade neste projeto, os voluntários receberam todas as informações quanto aos objetivos, ao processo metodológico bem como os possíveis riscos e benefícios de participação no estudo. Os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) no qual tomaram ciência de que a qualquer momento poderiam deixar de participar da pesquisa. Foram tomadas precauções no intuito de preservar a privacidade dos voluntários, sendo que a saúde e o bem-estar estiveram sempre acima de qualquer outro interesse.

Crítérios de inclusão e exclusão

Como critério de inclusão os voluntários deveriam ser adultos jovens que não praticavam musculação por pelo menos 6 meses antes de iniciar o estudo e que não apresentassem nenhuma contraindicação ao exercício físico de moderada e alta intensidades.

Como critério de exclusão não participariam deste estudo, indivíduos com contraindicação à prática de exercício moderado e intenso, com sinais e sintomas de problemas ortopédicos, pulmonares, metabólicos e cardiovasculares. Assim como, indivíduos em uso crônico de medicamentos.

Protocolo de estudo

O estudo seguiu o protocolo mostrado na figura 1.

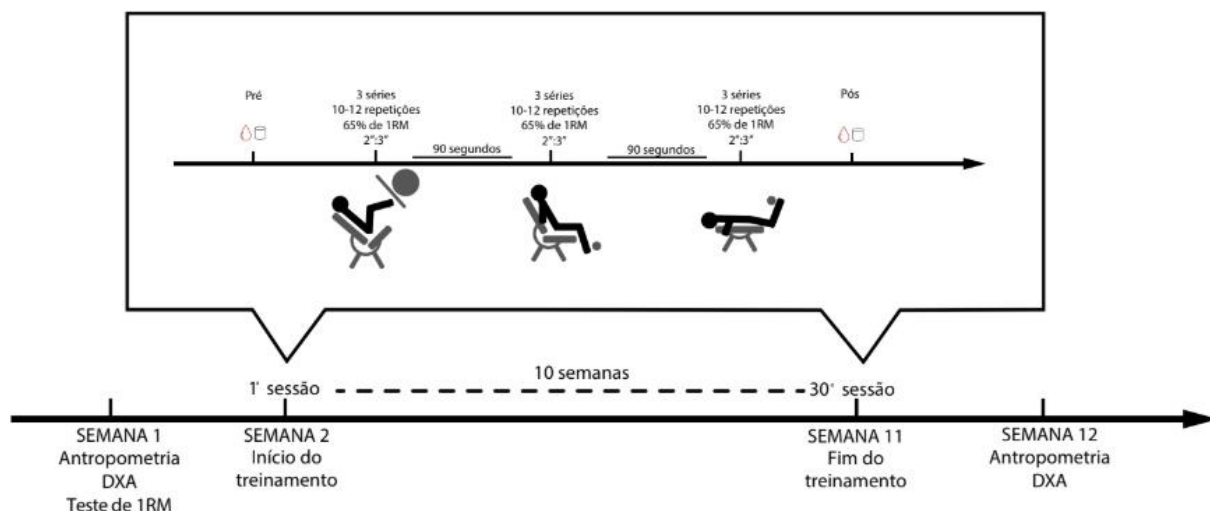


Figura 1: Protocolo do estudo. Legenda: DXA – densitometria por dupla emissão de raio X; 1RM – uma repetição máxima

Para a avaliação da integridade (PAR-Q) e aptidão do voluntário (IPAQ), assim como de sua atual condição no momento da pesquisa, foi aplicado um questionário de anamnese na primeira semana (semana 1) do protocolo (ACSM, 2018; MATSUDO, et al., 2001).

Inicialmente foram realizadas as medidas de massa corporal, estatura e o percentual de gordura também na semana 1. A massa corporal foi obtida por meio de uma balança antropométrica (MARTE, Brasil) com precisão de 0,1 kg, enquanto a estatura foi registrada através de estadiômetro acoplado à balança, com precisão de 0,5 cm (MARTE, Brasil).

Para avaliação da composição corporal pré e pós treinamento foi utilizado também o método de densitometria por dupla emissão de raio X (DXA) (BRAZ, 2017). Para esta avaliação houve um agendamento de horário para cada voluntário na Faculdade de Medicina-UFMG. O equipamento utilizado para o DXA foi o Discovery W (Hologic, Bedford, MA, USA), software versão 3.3.

Para se estimar a carga de treinamento, após a familiarização ao protocolo, foi realizado um teste de repetições máximas para os três aparelhos de musculação (Leg Press, Banco Extensor e Mesa Flexora), através da equação de Bryzick (1993). Durante a realização do teste de estimativa de 1 RM (Repetição Máxima) foi solicitado que o

voluntário se posicionasse de forma mais confortável possível nos aparelhos para que fossem registrados todos os ajustes necessários para a execução do exercício, permitindo assim que este posicionamento pudesse ser replicado em todos os procedimentos e sessões de coleta posteriores.

Após os testes iniciais, tendo o desempenho de 1RM como parâmetro de referência, os voluntários realizaram uma sessão de treinamento, respeitando a mesma ordem da execução do teste para estimar o 1 RM. Os protocolos foram constituídos de 3 exercícios, com 3 séries de 10 a 12 repetições máximas voluntárias a 65% de 1RM, com uma pausa de 90s entre as séries e exercícios, com duração da repetição de 5 segundos, sendo 2 segundos para a concêntrica e 3 segundos para a excêntrica (KRAEMER e RATAMESS, 2004).

Como critério de interrupção do exercício, foi adotado o voluntário não conseguir manter a duração das ações musculares estabelecidas ou realizar uma amplitude incompleta de movimento durante duas repetições seguidas. Para que os voluntários mantivessem as durações das ações musculares durante o treinamento foi utilizado um metrônomo.

Na 1ª (S1) e última (S30) sessão de treinamento foram coletados sangue e urina antes (Pre) e após (Pos) o término da sessão de exercícios de musculação. Todas as coletas de sangue, 10 mL, foram realizadas através de punção venosa na veia antecubital e em local adequado (UNIBH). O sangue foi coletado em tubos sem anticoagulante (5 ml) e em tubos com EDTA (5 ml), posteriormente, centrifugado (3000 rpm a 4° C por 10 minutos). As amostras soro e plasma foram armazenadas a -80°C para posterior análise dos componentes do SRA, que foram mensurados por ELISA por meio de kits ultrasensíveis da My Bio-Source (San Diego, CA, USA). A contagem diferenciada de leucócitos foi analisada por método automatizado. Todos os materiais utilizados nas coletas foram descartáveis e esterilizados, obedecendo às normas de descarte para materiais contaminados.

Amostras de urina foram coletadas em recipientes estéreis apropriados para essa finalidade. Após homogeneização, 15 ml da urina coletada foi centrifugada a (3000 rpm a 4° C por 10 minutos). Posteriormente ao processamento, as amostras foram aliqüotadas (1 ml) em tubo tipo *ependorf* e armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises dos componentes do SRA por ensaio imunoenzimático (ELISA).

A osmolaridade das amostras de sangue e urina foram avaliadas para comparar o estado de hidratação dos voluntários.

Os níveis de lactato sanguíneo foram dosados por meio de tiras teste para a determinação quantitativa de lactato em sangue capilar fresco Acusport BM-Lactate®.

Como procedimentos prévios ao exercício físico, as instruções foram dadas aos participantes de forma padronizada para evitar uma possível interferência nos resultados. O plano de coleta e análise dos dados seguiu os seguintes passos:

Os voluntários chegaram à academia e receberam informações verbais de como seria realizada a coleta. Foi retirada uma amostra sanguínea, e o voluntário então encaminhado à bicicleta onde fez o aquecimento durante 5 minutos pedalando em intensidade baixa. Após o aquecimento geral o voluntário foi posicionado no aparelho onde foi feito o ajuste de banco e posicionamento dos segmentos corporais para realização da sessão de treino.

Durante as sessões de treino de musculação em três momentos o voluntário foi questionado sobre a Percepção Subjetiva de Esforço (PSE) e a Escala Visual Analógica (VAS) de dor. Ao final da sessão de treinamento na musculação foi coletada, novamente, a amostra sanguínea e urina com posterior liberação do voluntário.

O treinamento foi realizado durante 10 semanas, três vezes por semana, preferencialmente segundas, quartas e sexta feiras, nos mesmos horários. Todas as sessões foram orientadas por um profissional/pesquisador. A variável peso nos aparelhos foi aumentado ao longo do treinamento. Sempre que o voluntário conseguisse executar 12 repetições nas três séries do mesmo aparelho, o peso era aumentado na sessão seguinte em média 10%.

Determinação dos componentes do SRA por imunoenensaio enzimático

A determinação das moléculas do SRA [Ang II, Ang-(1-7), ECA e ECA2] foi realizada pela técnica de ELISA, seguindo as recomendações do fabricante (My Biosource, San Diego, CA, USA). A técnica de ELISA tipo sanduíche foi aplicada na determinação dos níveis urinários de Ang II, Ang-(1-7) e ECA2. O método de ELISA competitivo foi usado para a mensuração de ECA (FILHA, et al., 2019; ROCHA, et al., 2019).

O procedimento é baseado em interações antígeno-anticorpo do marcador investigado e um substrato de detecção colorimétrico específico para enzima. A

sensibilidade estimada do ensaio é de 1,0 pg/mL para ECA e ECA2 e 2,0 pg/mL para Ang II e Ang-(1-7).

Brevemente, foi feita a adição das amostras de soro ou urina e os padrões às microplacas revestidas com anticorpos específicos para cada marcador analisado e anticorpos específicos ligados à enzima. Após um período de incubação, as placas foram lavadas e um substrato específico para a enzima foi acrescido gerando cor, sendo a intensidade da cor diretamente proporcional às concentrações plasmáticas e urinárias de Ang II, Ang-(1-7), ECA2 e, inversamente proporcional, à concentração de ECA. Finalmente, uma solução de parada foi adicionada para interromper a reação. As placas foram lidas a 450 nm em espectrofotômetro (Emax – Molecular Devices).

Os níveis séricos e urinários dos marcadores nas amostras dos participantes foram obtidos interpolando os valores da absorbância em uma curva de calibração feita com padrões de concentração conhecida, fornecidos pelo fabricante, utilizando o software SoftMaxPro®. As concentrações foram expressas como pg / mL.

Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à distribuição Gaussiana. Quando a distribuição foi normal, foram expressos como média e desvio-padrão, caso contrário como mediana e intervalos interquartílicos. Para comparação entre as médias de dados de distribuição normal, foi utilizado o teste t de Student para dados pareados quanto o mesmo indivíduo foi comparado em dois tempos. Para comparação de medianas, foi usado teste de Wilcoxon quanto o mesmo indivíduo foi comparado em dois tempos. Também calculamos as proporções de moléculas representando os vias contra-regulatórias / clássicas do SRA [Razões ACE2 / ACE e Ang (1-7) / AngII]. O nível de significância adotado para as análises foi de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SPSS versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE (ACSM). Progression models in resistance training for healthy adults. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2009. ACSM. Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição. Editora Guanabara Koogan, 10ª Edição, 2018.

AGARWAL, D.; WELSCH, M.A.; KELLER, J.N.; FRANCIS, J. Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro-and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR. *Basic Res. Cardiol.*, **2011**.

BASTARD, J.P., MAACHI, M., LAGATHU, C., KIM, M.J., CARON, M., VIDAL, H., CAPEAU, J., FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*, 2006.

BESSA, A.L.; OLIVEIRA, V.N.; G. AGOSTINI, G.; OLIVEIRA, R.J.S.; OLIVEIRA, A.C.S.; WHITE, G.E.; WELLS, G. D.; TEIXEIRA, D.N.S.; ESPINDOLA, F.S. Exercise Intensity and Recovery: Biomarkers of Injury, Inflammation, and Oxidative Stress, *Journal of Strength and Conditioning Research*, 2016.

BRAZ NFT, ROCHA NP, VIEIRA ÉLM, GOMEZ RS, KAKEHASI AM, TEIXEIRA AL. Body composition and adipokines plasma levels in patients with myasthenia gravis treated with high cumulative glucocorticoid dose. *Journal of the Neurological Sciences*. 2017;381:169-75.

BRZYCKI, M. Strength Testing—Predicting a One-Rep Max from Reps-to-Fatigue. *Journal of Physical Education, Recreation & Dance*. 1993;64(1):88-90.

DINIZ, R.C.R.; MARTINS-COSTA, H.C.; MACHADO, S.C.; LIMA, F.V. e CHAGAS, M.H. Repetition duration influences ratings of perceived exertion. *Perceptual and Motor Skills*, 2014.

DONOGHUE, M. et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Clinical Research*. 2000.

FERNANDES, T. et al. Aerobic exercise training—induced left ventricular hypertrophy involves regulatory microRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*, 2011, 5, 182-189

FILHA R.D.S., PINHEIRO S.V.B., et al. Evidence for a role of angiotensin converting enzyme 2 in proteinuria of idiopathic nephrotic syndrome. *Biosci Rep*. 2019;39(1).

GUIMARÃES, G.G.; SANTOS, S.H., et al. Exercise induces renin–angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Masdeficient mice. *Peptides*, 2012, 38, 54-61

FRANTZ, E.D.C. Modulation of the renin–angiotensin system in White adipose tissue and skeletal muscle: focus on exercise training. *Clinical Science*, 2018

KRAEMER W.J., RATAMESS N.A. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(4):674-88.

MATSUDO S, ARAÚJO T, MATSUDO V, et al. International physical activity questionnaire (IPAQ): study of validity and reliability in Brazil. *Rev Bras Ativ Fís Saúde*. 2001; 6(2):5-18.

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I. e KATCH, V.L. *Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho humano*. Editora Guanabara Koogan. Sétima edição, 2011.

PEAKE, J. M.; SUZUKI, K.; WILSON, G. et al. Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, and markers of neutrophil activation, *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2005.

PEAKE, J.M., GATTA, P.D., SUZUKI, K., NIEMAN, D.C. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exercise Immunology Review*. 2015.

PEREIRA, M.G.; FERREIRA, J.C., et al. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **2009**, *105*, 843-850.

PEDERSEN, B.K., AKERSTRÖM, T.C.A., NIELSEN A.R., FISCHER C.P. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol*, 2007.

PETERSEN, A.M.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*, 2005.

ROCHA N.P., BASTOS F.M., et al. The protective arm of the renin-angiotensin system may counteract the intense inflammatory process in fetuses with posterior urethral valves. *Jornal de Pediatria (Versão em Português)*. 2019;95(3):328-33.

SALAMAT, K.M. et al. The response of pre-inflammatory cytokines factors the different exercises (endurance, resistance, concurrent) in overweight men. *Alexandria Journal of Medicine- Elsevier*, 2016.

SANTOS, R. et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, 2003.

SIMOES e SILVA, A.C ; TEIXEIRA, A. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1–7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. *Pharmacological Research*. 2016.

STEFAN, D. A. et al. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *The Lancet*. 2003.

STEFAN, E. et al. Weight Loss and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Hypertension*. 2005.

NUNES-SILVA, A. et al. Physical exercise and ACE2-Angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis of the Renin Angiotensin System. *Protein & peptides letters*, 2017.

TAKADA, S. et al. Angiotensin II receptor blocker improves the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *Journal Applied Physiology*. 2013.

TIDBALL, J.G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(3):165-78.

TIPNIS et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*. 2000.

YANG W., HU P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *Journal of orthopaedic translation*. 2018;13:25-32.

Original Article

**Strength training effect on plasma and urinary levels of Renin Angiotensin System
molecules in healthy young males**

Marcelo Henrique Salviano de Faria¹, Albená Nunes Silva², Lucélia Scarabeli Silva Barroso¹, João Luís Vieira Monteiro de Barros¹, Adriana Maria Kakehasi³, Erica Leandro Marciano Vieira¹, Ana Cristina Simões e Silva^{1*}

¹Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Room 281. Belo Horizonte, MG, Brazil. Postal Code: 30130-100.

²Departamento de Educação Física e Esportes, Centro Desportivo da Universidade Federal de Ouro Preto. Rua Dois, 110, Campus Universitário - Ginásio de Esportes. Ouro Preto, MG, Brazil. Postal Code: 35400-000.

³Departamento de Ortopedia e Reumatologia, Faculdade de Medicina, UFMG. Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Room 281. Belo Horizonte, MG, Brazil. Postal Code: 30130-100.

*Corresponding Author:

Ana Cristina Simões e Silva, MD, PhD

Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica

Avenida Alfredo Balena, 190, 2o andar, sala 281 | Belo Horizonte, MG, Brasil 30130-100 - E-mail: acssilva@hotmail.com | Phone: +55 31 34098073

Abstract:

The importance of physical exercise for a healthy lifestyle is well understood. There are different types of exercising protocols, including high intensity intermittent training, endurance, and strength training (ST). It is known that ST can modulate regulatory systems. However, there are very few studies regarding the interactions between ST and renin angiotensin system (RAS) in humans. Here, we investigated the effect of ST on levels of RAS molecules in urine and plasma. Twelve male volunteers with 23.4 ± 2.7 years old performed our ST protocol for 10 weeks (three times a week), which consisted of 3 sets, performed between 10 and 12 repetitions for each exercise at 65% of one maximum repetition (1RM) of 3 leg exercises, pause of 90" between sets, and time duration of repetition of 5". The effect of ST was evaluated on circulating leukocytes count, urinary and plasma levels of RAS molecules, including Angiotensin II, Ang-(1-7), angiotensin converting enzyme ACE 1 and ACE 2, before and immediately after the first (S1) and the last (S30) session of training. The level of strength significantly increased in last training session as compared to first session. Exercise acutely increased post-training blood lactate levels and leukocyte count. The training protocol significantly reduced the percentage of fat and increased the total lean mass. Regarding RAS molecules, plasma levels of Ang II were higher after the last session in comparison to levels before this session and also if compared to values after the first session of exercise. Levels of Ang-(1-7) significantly increased in plasma and urine after first and last sessions and in the comparison of values before and after last session to those before and after first session, respectively. Levels of ACE1 and ACE2 did not modify in any condition. In conclusion, plasma and urinary concentrations of Ang II and Ang-(1-7) were acutely and chronically modified by ST.

Abbreviations lists

S1 = first training session; S30 = last training session; AE = acute exercise; RAS = renin-angiotensin system; ACE = angiotensin converting enzyme; ACE2 = angiotensin II converting enzyme; AT₁ = angiotensin II type 1 receptor; LAC= blood lactate; Pre= before session; Post= after session; ST= Strength Training; 1RM = one-repetition maximum; IPAQ = international physical activity questionnaire; PAR-Q = physical activity readiness questionnaire; ELISA = enzyme - linked immunosorbent assay; white blood cells = WBC

INTRODUCTION

In the past years, strength training (ST) has received more attention from the scientific community due to its role in health promotion. ST protocols consist primarily of anaerobic exercises that vary in intensity and time duration (1, 2). ST promotes skeletal muscle hypertrophy, which not only prevents aging- and neurodegenerative-related atrophy but also improves athletic performance (3-7). However, the mechanisms that underlie such muscle gain are still not well understood (7, 8).

Previous studies showed that even a single acute exercise (AE) session increases the concentration of circulating leukocytes (9-11). AE was shown to play a role in white blood cells (WBC) activation (12-14). Inflammatory processes, such as the synthesis of interleukin (IL)-6 and IL-8, are also associated to the physiological responses to tissue injury by stimulating migration of neutrophils, monocytes, and lymphocytes to the site of muscle injury (3, 15). Accordingly, untrained individuals subjected to ST also display an increase in WBC concentration immediately after the exercises, and such spike comes back to basal levels 24 hours later (16). WBC migration may also play a regenerative role on the injured skeletal muscle tissue (17, 18). These processes might contribute to muscle hypertrophy in ST (19, 20).

The Renin Angiotensin System (RAS) may take part in the physiological process of muscle hypertrophy as well (5, 21, 22). RAS molecules are present in white adipose tissue and skeletal muscle and act co-operatively in response to pathophysiological changes in these tissues (5, 23). However, the effects of ST on the modulation RAS molecules in humans are still not elucidated (5, 6, 24). On one hand, the classical RAS axis, comprising angiotensin converting enzyme (ACE), the octapeptide Angiotensin II (20) released from the skeletal muscle, and Ang type 1 (AT₁) receptor, promotes protein degradation via inflammation and oxidative stress, which leads to muscle mass loss (25).

On the other hand, Ang II binding to AT₁ receptor may also exert proliferative effects, thus contributing to muscle hypertrophy (26, 27). The alternative RAS axis, formed by the enzyme homologue to ACE named ACE2, the heptapeptide Ang-(1-7) and its receptor Mas, generally plays a counter regulatory role that opposes the effects of Ang II (28, 29) from the classical RAS axis. Previous studies on animal models showed that physical training could shift the balance of RAS molecules to those of the alternative axis, thus promoting beneficial effects to the cardiovascular system and systemic metabolism (6). Accordingly, fat mobilization and maintenance of muscle mass are stimulated via physical exercise by means of changes in local RAS components (22, 30). In addition, acute and chronic physical exercise frequently leads to blood pressure reduction in part due to interaction with RAS-related molecules (6).

Unfortunately, studies with human subjects on the role of physical exercise upon RAS molecules are very scarce. Only components belonging to the classical RAS axis have been investigated in healthy and hypertensive adults submitted to physical exercise (30). Their findings demonstrate that physical training may act as a stimulus to decrease blood pressure by reducing the generation of reactive oxygen species and AT₁ receptor. Therefore, the main objective of the present study was to evaluate the effect of ST on plasma and urinary concentrations of RAS hormones in healthy adults.

PATIENTS AND METHODS

Study design and ethical aspects

This is a prospective study that aimed at evaluating acute and chronic effects of ST on plasma and urinary RAS molecules in young adult males. Twelve young adult males, aged from 20 to 31 years old, enrolled in the present study. Inclusion criteria included healthy young male adults who had not practiced ST for at least 6 months prior to the study. To evaluate volunteer integrity and physical fitness, a questionnaire (PAR-Q) was applied (30). Physical evaluation including body mass, height, and body fat percentage, was performed before and after 10 weeks of training (Figure 1). Body mass was obtained via an anthropometric scale (MARTE, Brazil). Height was measured with a stadiometer coupled to the scale (MARTE, Brazil). Pre- and post-training body composition was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) using the Discovery W equipment (Hologic, Bedford, MA, USA), software version 3.3 (31).

In order to estimate the training load, a maximal repetition (1RM) test was performed for the three types of exercises (Leg Press, Leg Extension and Leg Curl) and calculated with Bryzick's equation (32). Volunteers were allowed to warm up for 5 minutes in a bicycle by pedaling at a low intensity. Next, they were asked to position themselves as comfortably as possible on the device in order to record all the necessary adjustments for the sake of consistency throughout the study. After the initial tests, volunteers performed a training session. The protocols consisted of 3 exercises within 3 sets, performed between 10 and 12 repetitions at 65% of 1RM (1). Ninety second breaks intercalated each set. Repetition duration time was of 2 seconds for concentric muscle action and 3 seconds for eccentric muscle action (1). If the volunteer was able to perform 12 repetitions of the same exercise perfectly, the weight would increase by approximately 10% in the next session.

Exercise interruption was only done when the volunteer was unable to either keep the time duration for the established muscle actions or to perform exercises in complete range of motion during two following repetitions. A metronome was used to keep time duration of muscle action consistent. Training happened three times a week, on Mondays, Wednesdays and Fridays, at the same time of the day. The volunteers were instructed to maintain their routine of physical exercises as well as their dietary habits throughout the period of this study. Training sessions were guided by a trained professional.

This study complied with all norms established by the National Health Council involving research with humans (Resolution 466/2012) and was approved by the Ethics Committee on Research in Human Beings (UFOP) under the number 1881.170.

Sample Collection

Blood and urine samples were collected from each volunteer before and immediately after the first (S1) and last (S30) training sessions. A total of 10 mL of venous blood was collected via peripheral venipuncture by a trained professional. Blood was collected in both EDTA and heparin tubes, containing 5 mL of sample each, and centrifuged (3000 rpm at 4°C for 10 minutes). Plasma and serum samples were stored at -80°C.

Urine samples of 15 mL were collected in sterile containers, homogenized. Next, collected urine was centrifuged at 3000 rpm 4°C for 10 minutes. Each sample was aliquoted (1 mL) into eppendorf tubes and stored in a freezer at -80°C.

Measurements of WBC and Lactate concentration

Differential WBC count was obtained by fluorescent flow cytometry via an automated instrument (CELL-DYN Ruby, Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA). All materials used in the collection process were disposable and sterilized.

Lactate levels were measured before and immediately (3 minutes) after S1 and S30 through test strips using fresh capillary blood (Acusport BM-Lactate®).

Measurement of RAS components

RAS molecules [Ang II, Ang-(1-7), ACE and ACE2] were measured via enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using My Bio-Source kits (My Biosource, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's protocol as previously described elsewhere (33, 34). Sandwich ELISA technique was used to determine the urinary levels of Ang II, Ang- (1-7) and ACE2, whereas competitive ELISA method was used to measure ACE. Assays' levels of detection were estimated as 1.0 pg/ml for ACE and ACE2, and of 2.0 pg/ml for Ang II and Ang-(1-7). Results were read as the absorbance at 450 nm in the spectrophotometer (TP-Reader NM, Thermo Plate, USA). Concentrations of all molecules were expressed in pg/ml and data were generated by the software SoftMaxPro® (Molecular Devices Corporation, 2005, USA). All samples were assayed in duplicate and simultaneously to avoid inter-assay variability. The intra-assay variability was below 3%.

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using SPSS software version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA). Variables were initially checked for normal distribution by Shapiro Wilk tests. For quantitative variables with Gaussian distribution, values were expressed as means and standard deviations. Medians and interquartile ranges were used for non-parametric quantitative variables. Comparisons between the same individual at two time-points (before versus after exercise session or before first session versus before last session or after first session versus after last session) were calculated via paired student's

t-tests (Gaussian variables) or Wilcoxon's tests (non-parametric variables). Significance level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

General characteristics and measurements

A total of 12 healthy young adult males, aging from 20 to 31 years old (23.4 ± 2.7), weighing 75.4 ± 10.4 kg and with heights of approximately 173.0 ± 0.7 cm were enrolled in the present study. The mean body fat percentage of volunteers was of 26.2 ± 4.6 %.

Table 1 shows the weigh load of three apparatuses used at first (S1) and last training (S30) sessions. As expected, there was a progressive and significant increase of weight load from S1 to S30 in all apparatuses.

Results of blood cell count before and after the first (S1) and the last (S30) training sessions are displayed on table 1. Neutrophils and monocytes increased significantly after S1, whereas lymphocytes, basophils and eosinophils did not exhibit statistically significant differences. Leukogram analyses before and after S30 showed a significant increase in the total number of WBC, neutrophils, lymphocytes, and monocytes. Basophil and eosinophils did not differ significantly (Table1).

Table 2 shows results obtained on body composition. Leg fat percentage decreased throughout the study ($p < 0.05$). Total lean mass increased significantly ($p = 0.0037$) and leg lean mass also increased ($p = 0.0037$). Total body mass and fat mass were not statistically different ($p > 0.05$).

Lactate levels increased significantly before and after the S1 and S30 sessions ($p < 0.0005$) as show in table 2. However, lactate levels did not differ significantly when comparing S1 to S30 levels, both before ($p = 0.5830$) and after ($p = 0.7002$) the sessions.

In order to evaluate if ST affect the state of hydration, urinary and serum osmolalities were measured before (pre) and after (post) first (S1) and last (S30) exercise

sessions (Table 2). No changes were detected in the comparisons of pre and post values of S1 and of S30. In addition, pre S1 versus pre S30 and post S1 versus post S30 results did not differ significantly (Table 2).

RAS molecules measurements

The effect of ST on serum and urinary levels of RAS molecules were also analysed during the first (S1) and the last (S30) training sessions. Comparisons were conducted on RAS molecule levels before and after the same training sessions as well as on basal levels before the first (S1) versus before the last (S30) sessions, and on post-training levels after S1 versus after S30 sessions.

Serum and urinary levels of Ang II

When comparing pre- and post-training levels of Ang II for the same training session, serum Ang II concentrations significantly increased only after S30 ($p=0.0011$, Figure 2B). Post-training serum levels of Ang II at S30 were significantly higher than Ang II levels post S1 ($p=0.0151$, Figure 2D). No significant differences were found between pre- and post-training serum levels of Ang II in the first (S1) training session ($p=0.7911$). Neither was found a statistical difference when comparing pre-training Ang II serum levels before the first and last training sessions ($p=0.0714$) (Figure 2).

Urinary levels of Ang II increased significantly when post-training concentrations were compared to pre-training levels at both S1 and S30 sessions ($p=0.0001$ for both comparisons). The comparison between levels before the first (S1) and before the last (S30) training sessions also revealed significant differences. Urinary levels of Ang II before S30 were higher than before S1 ($p=0.0001$). The same was true when comparing levels after both training sessions. Post-training urinary levels of Ang II were higher after S30 than it was after S1 ($p=0.0001$) (Figure 3).

Serum and urinary levels of Ang-(1-7)

Serum levels of Ang-(1-7) significantly increased after the first (S1) and after the last (S30) training sessions in comparison to basal concentrations before both training sessions (Figure 4, panels A and B).

Ang-(1-7) was significantly increased when comparing pre- and post-training plasma and urinary levels in both S1 and S30 training sessions ($p < 0.05$ for both comparisons). Ang-(1-7) was also significantly increased when comparing S1 to S30 pre- and post-training in urine and plasma ($p < 0.05$ for both comparisons) (Figure 4 and 5).

Serum and urinary levels of ACE1 and ACE2

Serum and urinary levels of both ACE1 and ACE2 did not differ significantly in any of analyzed situations ($p > 0.05$) (Table 3).

DISCUSSION

The present study investigated the role of ST on RAS molecules in healthy male individuals. It was found that ST significantly changed plasma and urinary levels of Ang II and Ang-(1-7) without modifying ACE1 and ACE2 concentrations. In addition, ST acutely and chronically modulates angiotensin peptides, since changes were detected just after a single exercise session and as a response of successive sessions.

The first characterization of our protocol was the evaluation of blood leucocytes and lactate concentration. As expected, a single session of ST increased total blood leukocytes and lactate concentration. The comparison between total blood leukocytes and serum lactate showed higher values after S1 and S30 versus before both training sessions. Accordingly, protocols of acute aerobic exercise and of high intensity interval training (HIIT) promoted acute changes in total blood leukocytes, lymphocytes and granulocytes both in sedentary and active subjects (35, 36). The same was reported for lactate levels. Wirtz et al. showed that a single session of intensive exercise like ST increases blood lactate concentration (37). Indeed, levels of lactate have been used as one variables related to the index of effort during resistance exercises (38). However, as also reported in the literature for HIIT and aerobic exercise (35, 36, 38, 39), ST did not chronically change these parameters, since lactate levels and leukocyte were similar before S1 and S30 as well as after both exercise sessions.

Concerning RAS molecules, our findings showed that ST acutely and chronically changes circulating and urinary levels of Ang II and of Ang-(1-7). An acute effect was initially detected after the first session of exercise, in which serum and urinary levels of both Ang-(1-7) and Ang II significantly increased. This acute effect of a single session also persisted after the last exercise session, since post-training serum and urinary levels of both Ang II and Ang-(1-7) significantly increased. There are at least two possible

explanations for this acute effect of exercise on angiotensin peptides. Firstly, ST may cause an overall activation of RAS, resulting in changes of serum and urinary levels of these molecules. The acute inflammatory response induced by exercise may stimulate both RAS axes (40). Secondly, ST may stimulate local production of angiotensin peptides in muscle tissue. Thus, high levels of Ang II and Ang-(1-7) might reflect enhanced local synthesis at muscle tissue. It has been shown that skeletal muscle expresses several components of RAS (41-43) ACE was expressed in the sarcolemma and endothelial cells of local capillaries in skeletal muscle (41). Ang II receptors, AT₁ and AT₂, are also found in fetal and adult skeletal muscle fibers, satellite cells and microcirculation in both humans and rodents (42, 43). Therefore, the most likely arrangement of the local RAS is a combination of local synthesis and uptake from the systemic RAS components.

The metabolic and molecular responses to an acute exercise load are different between chronic exercise training. Chronic exercise generates different physiological and functional adaptations. In this regard, strength or resistance training is recommended to improve muscle strength and muscle resistance and to stimulate muscle hypertrophy (44). RAS molecules very likely contribute to chronic adaptations to physical training. In regard to Ang II, urinary levels were significantly higher before and after S30 when compared to before and after S1, respectively, while serum concentrations were only higher when comparing post S30 versus post S1 concentration. Previous studies reported a role for the classical RAS axis in heart hypertrophy in response to exercise. In an experimental model with rats, resistance training promoted cardiac hypertrophy associated with increased expression of the AT₁ receptor in heart tissue (27). In addition, a living high training low protocol of exercise also resulted in heart hypertrophy associated with increased protein expression for ACE and AT₁ receptor in the endocardium (45). Interestingly, in recent years, many studies have proposed that ACE2-

Ang-(1-7)-Mas receptor axis exerts beneficial effects in skeletal muscle, including improvement in insulin sensitivity (21, 29, 46) and protection against muscle atrophy (47, 48). Additionally, Ang-(1-7) seems to have a critical role for muscle hypertrophy induced by exercise since ACE2 knockout mice did not show an increase in muscle diameter after exercise (22). In line with these experimental data, our study showed that the comparisons between urinary and serum levels before first versus before last ST sessions revealed higher levels of Ang-(1-7) in S30 than in S1. The same was true for the comparisons between levels of Ang-(1-7) after S30 versus after S1 in serum and urine. Therefore, our findings indicated that ST significantly enhances Ang-(1-7) levels in plasma and urine, which, in turn, may contribute to muscle hypertrophy possibly benefiting the cardiovascular system and metabolic processes. In addition, Ang-(1-7) may counteract the deleterious effects of high concentrations of Ang II.

To the best of our knowledge, our study was the first one that measured RAS molecules in healthy individuals submitted to ST. Despite the significant changes in Ang II and Ang-(1-7), we were not able to investigate the mechanisms responsible for these enhancements and the local effects elicited by these molecules. Further studies are necessary to understand the physiological role of RAS on acute and chronic adaptations to physical exercise.

Perspectives: (i) This study evaluated the effect of ST on RAS molecules; (ii) The ST significantly produced muscle hypertrophy and increased levels of Ang II and Ang-(1-7) in acute and chronic manner; (iii) Our findings support a role of ACE2-Ang-(1-7)-Mas receptor axis in skeletal muscle hypertrophy and in benefits to metabolism and cardiovascular system.

Acknowledgements: UNIBH Faculty for lending equipment and space for execution of the exercise protocols.

Declarations of interest: The authors declare that there is no conflict of interest associated with this manuscript.

Funding information: This study was supported by Brazilian funding agencies FAPEMIG, CAPES and CNPq.

Author contribution statement

ACSS made general supervision of the study. MHSF and ANS wrote the study protocol. MHSFF and LSSB identified the eligible participants, and conducted study. MHSF, LSSB, JLMB and ELMV conducted the laboratory experiments and analyzed data. AMK performed and analyzed densitometry. MHSF wrote the first draft of the manuscript. ANS, JLVMB and ACS revised the manuscript. All authors reviewed the manuscript and approved the final version. They also are the only ones who qualify for the authorship and agree to be accountable for accuracy and integrity of any part of the present study.

References

1. Kraemer WJ, Ratamess NA. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(4):674-88.
2. Franchi MV, Reeves ND, Narici MV. Skeletal Muscle Remodeling in Response to Eccentric vs. Concentric Loading: Morphological, Molecular, and Metabolic Adaptations. *Front Physiol.* 2017;8:447.
3. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature reviews Endocrinology.* 2012;8(8):457-65.
4. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews.* 2008;88(4):1379-406.
5. Frantz EDC, Prodel E, Braz ID, Giori IG, Bargut TCL, Magliano DC, et al. Modulation of the renin-angiotensin system in white adipose tissue and skeletal muscle: focus on exercise training. *Clinical science (London, England : 1979).* 2018;132(14):1487-507.
6. Nunes-Silva A, Rocha GC, Magalhaes DM, Vaz LN, Salviano de Faria MH, Simoes ESAC. Physical Exercise and ACE2-Angiotensin-(1-7)-Mas Receptor Axis of the Renin Angiotensin System. *Protein and peptide letters.* 2017;24(9):809-16.
7. Bamman MM, Roberts BM, Adams GR. Molecular Regulation of Exercise-Induced Muscle Fiber Hypertrophy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2018;8(6).
8. Schoenfeld BJ. Does exercise-induced muscle damage play a role in skeletal muscle hypertrophy. *Journal of strength and conditioning research.* 2012;26(5):1441-53.
9. Mendham AE, Donges CE, Liberts EA, Duffield R. Effects of mode and intensity on the acute exercise-induced IL-6 and CRP responses in a sedentary, overweight population. *Eur J Appl Physiol.* 2011;111(6):1035-45.
10. Fortunato AK, Pontes WM, De Souza DMS, Prazeres JSF, Marcucci-Barbosa LS, Santos JMM, et al. Strength Training Session Induces Important Changes on Physiological, Immunological, and Inflammatory Biomarkers %J *Journal of Immunology Research.* 2018;2018:12.
11. Peake JM, Suzuki K, Wilson G, Hordern M, Nosaka K, Mackinnon L, et al. Exercise-Induced Muscle Damage, Plasma Cytokines, and Markers of Neutrophil Activation. *2005;37(5):737-45.*
12. Nimmo MA, Leggate M, Viana JL, King JA. The effect of physical activity on mediators of inflammation. *Diabetes Obes Metab.* 2013;15 Suppl 3:51-60.
13. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2011;17:6-63.
14. Walsh NP, Gleeson M, Pyne DB, Nieman DC, Dhabhar FS, Shephard RJ, et al. Position statement. Part two: Maintaining immune health. *Exerc Immunol Rev.* 2011;17:64-103.
15. Calle MC, Fernandez ML. Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutrition research and practice.* 2010;4(4):259-69.
16. Fortunato AK, Pontes WM, De Souza DMS, Prazeres JSF, Marcucci-Barbosa LS, Santos JMM, et al. Strength Training Session Induces Important Changes on Physiological, Immunological, and Inflammatory Biomarkers. *Journal of immunology research.* 2018;2018:9675216.
17. Forbes SJ, Rosenthal N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat Med.* 2014;20(8):857-69.
18. Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(3):165-78.
19. Koh TJ, Pizza FX. Do inflammatory cells influence skeletal muscle hypertrophy? *Frontiers in bioscience (Elite edition).* 2009;1:60-71.
20. Yang W, Hu P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *Journal of orthopaedic translation.* 2018;13:25-32.
21. Munoz MC, Giani JF, Dominici FP. Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of Akt in rat extracardiac tissues in vivo via receptor Mas. *Regulatory peptides.* 2010;161(1-3):1-7.
22. Motta-Santos D, Dos Santos RA, Oliveira M, Qadri F, Poglitsch M, Mosienko V, et al. Effects of ACE2 deficiency on physical performance and physiological adaptations of cardiac

- and skeletal muscle to exercise. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2016;39(7):506-12.
23. Johnston AP, Baker J, De Lisio M, Parise G. Skeletal muscle myoblasts possess a stretch-responsive local angiotensin signalling system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011;12(2):75-84.
 24. Salamat KM, Azarbayjani MA, Yusof A, Dehghan F. The response of pre-inflammatory cytokines factors to different exercises (endurance, resistance, concurrent) in overweight men. *Alexandria Journal of Medicine*. 2016;52(4):367-70.
 25. Takada S, Kinugawa S, Hirabayashi K, Suga T, Yokota T, Takahashi M, et al. Angiotensin II receptor blocker improves the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *J Appl Physiol* (1985). 2013;114(7):844-57.
 26. E. Gordon S, S. Davis B, J. Carlson C, Booth F. ANG II is required for optimal overload-induced skeletal muscle hypertrophy. 2001. E150-9 p.
 27. Barauna VG, Magalhaes FC, Krieger JE, Oliveira EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008;295(2):R381-7.
 28. Fernandes T, Hashimoto NY, Oliveira EM. Characterization of angiotensin-converting enzymes 1 and 2 in the soleus and plantaris muscles of rats %J *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2010;43:837-42.
 29. Echeverria-Rodriguez O, Del Valle-Mondragon L, Hong E. Angiotensin 1-7 improves insulin sensitivity by increasing skeletal muscle glucose uptake in vivo. *Peptides*. 2014;51:26-30.
 30. American College of Sports M, Riebe D, Ehrman JK, Liguori G, Magal M. *ACSM's guidelines for exercise testing and prescription*. 2018.
 31. Braz NFT, Rocha NP, Vieira ÉLM, Gomez RS, Kakehasi AM, Teixeira AL. Body composition and adipokines plasma levels in patients with myasthenia gravis treated with high cumulative glucocorticoid dose. *Journal of the Neurological Sciences*. 2017;381:169-75.
 32. Brzycki M. Strength Testing—Predicting a One-Rep Max from Reps-to-Fatigue. *Journal of Physical Education, Recreation & Dance*. 1993;64(1):88-90.
 33. Filha RDS, Pinheiro SVB, Macedo ECT, Feracin V, Vieira ELM, Miranda AS, et al. Evidence for a role of angiotensin converting enzyme 2 in proteinuria of idiopathic nephrotic syndrome. *Biosci Rep*. 2019;39(1).
 34. Rocha NP, Bastos FM, Vieira ÉLM, Prestes TRR, Silveira KDd, Teixeira MM, et al. The protective arm of the renin-angiotensin system may counteract the intense inflammatory process in fetuses with posterior urethral valves. *Jornal de Pediatria (Versão em Português)*. 2019;95(3):328-33.
 35. Belviranlı M, Okudan N, Kabak B. The Effects of Acute High-Intensity Interval Training on Hematological Parameters in Sedentary Subjects. 2017;5(3):15.
 36. Jamurtas AZ, Fatouros IG, Deli CK, Georgakouli K, Poullos A, Draganidis D, et al. The Effects of Acute Low-Volume HIIT and Aerobic Exercise on Leukocyte Count and Redox Status. *J Sports Sci Med*. 2018;17(3):501-8.
 37. Wirtz N, Wahl P, Kleinöder H, Mester J. Lactate Kinetics during Multiple Set Resistance Exercise. *J Sports Sci Med*. 2014;13(1):73-7.
 38. Ihalainen JK, Ahtiainen JP, Walker S, Paulsen G, Selänne H, Hämmäläinen M, et al. Resistance training status modifies inflammatory response to explosive and hypertrophic resistance exercise bouts. 2017;73(4):595-604.
 39. Ihalainen JK, Peltonen H, Paulsen G, Ahtiainen JP, Taipale RS, Hämmäläinen M, et al. Inflammation status of healthy young men: initial and specific responses to resistance training. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2017;43(3):252-8.
 40. Rodrigues Prestes TR, Rocha NP, Miranda AS, Teixeira AL, Simoes e Silva AC. The Anti-Inflammatory Potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis: Evidence from Basic and Clinical Research. *Current drug targets*. 2017;18(11):1301-1313.
 41. Reneland R, Lithell H. Angiotensin-converting enzyme in human skeletal muscle. A simple in vitro assay of activity in needle biopsy specimens. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1994;54(2):105-11.

42. Malendowicz SL, Ennezat PV, Testa M, Murray L, Sonnenblick EH, Evans T, et al. Angiotensin II Receptor Subtypes in the Skeletal Muscle Vasculature of Patients With Severe Congestive Heart Failure. 2000;102(18):2210-3.
43. Yoshida T, Huq TS, Delafontaine P. Angiotensin type 2 receptor signaling in satellite cells potentiates skeletal muscle regeneration. J Biol Chem. 2014;289(38):26239-48.
44. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. Medicine and science in sports and exercise. 2009;41(3):687-708.
45. Shi W, Meszaros JG, Zeng SJ, Sun YY, Zuo MX. Living high training low induces physiological cardiac hypertrophy accompanied by down-regulation and redistribution of the renin-angiotensin system. Acta pharmacologica Sinica. 2013;34(3):342-51.
46. Giani JF, Mayer MA, Munoz MC, Silberman EA, Hocht C, Taira CA, et al. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2009;296(2):E262-71.
47. Cisternas F, Morales MG, Meneses C, Simon F, Brandan E, Abrigo J, et al. Angiotensin-(1-7) decreases skeletal muscle atrophy induced by angiotensin II through a Mas receptor-dependent mechanism. Clinical science (London, England : 1979). 2015;128(5):307-19.
48. Abrigo J, Rivera JC, Simon F, Cabrera D, Cabello-Verrugio C. Transforming growth factor type beta (TGF-beta) requires reactive oxygen species to induce skeletal muscle atrophy. Cellular signalling. 2016;28(5):366-76.

TABLES

Table 1. Comparisons of weight load (kg) of each apparatus and body composition (kg) at first (S1) and last (S30) training session

APPARATUS	MEAN ± SD (S1)	MEAN ± SD (S30)	P
Leg press	122.25±29.50	233.83±55.63	0.0001
Leg extension	27.05±7.53	47.05±13.73	0.0001
Leg curl	26.25±7.11	38.33±7.78	0.0005
Body weight	75.4±10.5	76.0±10.7	0.1986
% Body fat Dxa	26.2±4.6	25.3±5.7	0.0487
Fat mass Dxa	19.8±6.1	19.3±5.5	0.1835
Total lean mass Dxa	51.7±5.9	52.9±6.6	0.0057
Leg lean mass Dxa	17.9±2.3	18.9±2.8	0.0037

Legend: Dxa Dual-energy X-ray absorptiometry; kg kilogram; SD Standard deviation.

Values in pre and post exercise sessions (S1 and S2) are expressed as means and standard deviations. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (Paired t Test).

Table 2 – Comparison of leukocytes, serum lactate levels, urinary and serum osmolalities before (Pre) and after (Post) first (S1) and last (S30) sessions of exercise.

	Pre S1	Post S1	P	Pre S30	Post S30	P
TOTAL LEUKOCYTES	7466±1832	8856±2583	0.0009	6548±1571	8448±1980	0.0001
NEUTROPHILS	4297±1817	5117±2061	0.0007	3585±1050	4421±1179	0.0002
LYMPHOCYTES	2301±445	2733±927	0.0829	2141±492	3005±767	0.0003
BASOPHILS	42±26	38±18	0.4073	35±14	41±22	0.1675
MONOCYTES	597±176	723±297	0.0253	559±170	727±239	0.0020
EOSINOPHILS	229±167	246±168	0.2479	224±118	254±133	0.0509
LACTATE	2.74±0.62	8.31±3.03	0.0005	2.96±1.02	9.25±1.02	0.0005
URINARY OSMOLALITY	696,8±344	558,3±307	0,1950	818,0±313	585,9±300	0,0601
SERUM OSMOLALITY	341,9±62,8	324,7±49,0	0,4333	337,0±80,3	324,8±53,5	0,9238

Legend: Values in pre and post exercise sessions (S1 and S30) are expressed as means and standard deviations. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (Paired t Test).

Table 3– Comparisons of serum and urine levels of ACE1 (angiotensin converting enzyme 1) before (Pre) and after (Post) first (S1) and last (S30) session of exercise.

	Serum		Urine	
	ACE1	P value	ACE1	P value
Pre S1	149.9 (124.6-295.0)	0.0640(a)	114.7 (84.91-144.91)	0.1514(a)
Pos S1	151.5 (117.2-264.2)	0.2234(b)	82.30 (63.76-115.9)	0.1050(b)
Pre S30	136.6 (130-247.8)	0.2661(c)	109.6 (80.54-73.16)	0.4648(c)
Pos S30	136.9 (126.9-265.5)	0.3804(d)	86.01 (73.16-109.2)	0.5186(d)

Legend: Values in pre and post exercise sessions (S1 and S2) are expressed as medians and interquartile range (percentile 25 and percentile 75). (a) p value for the comparisons Pre S1 versus Pos S1, (b) p value for the comparisons Pre S30 versus Pos S30, (c) p value for the comparisons Pre S1 versus Pre S30 and (d) p value for the comparisons Pos S1 versus Pos S30. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (Wilcoxon test).

Table 4– Comparisons of serum and urine levels of ACE2 (angiotensin converting enzyme 2) before (Pre) and after (Post) first (S1) and last (S30) session of exercise.

	Serum		Urine	
	ACE2	P value	ACE2	P value
Pre S1	47,4 (26.82-86.41)	0.0923(a)	4.96 (0.00-9.86)	0.2661(a)
Pos S1	67.48 (38.4-120.0)	0.1763(b)	10.52 (3.77-12.12)	0.1294(b)
Pre S30	43.12 (26.16-61.06)	0.8561(c)	4.92 (3.02-8.88)	0.9854(c)
Pos S30	68.80 (52.83-111.3)	0.8501(d)	12.10 (7.22-58.26)	0.4697(d)

Legend: Values in pre and post exercise sessions (S1 and S2) are expressed as medians and interquartile range (percentile 25 and percentile 75). (a) p value for the comparisons Pre S1 versus Pos S1, (b) p value for the comparisons Pre S30 versus Pos S30, (c) p value for the comparisons Pre S1 versus Pre S30 and (d) p value for the comparisons Pos S1 versus Pos S30. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (Wilcoxon test).

FIGURES

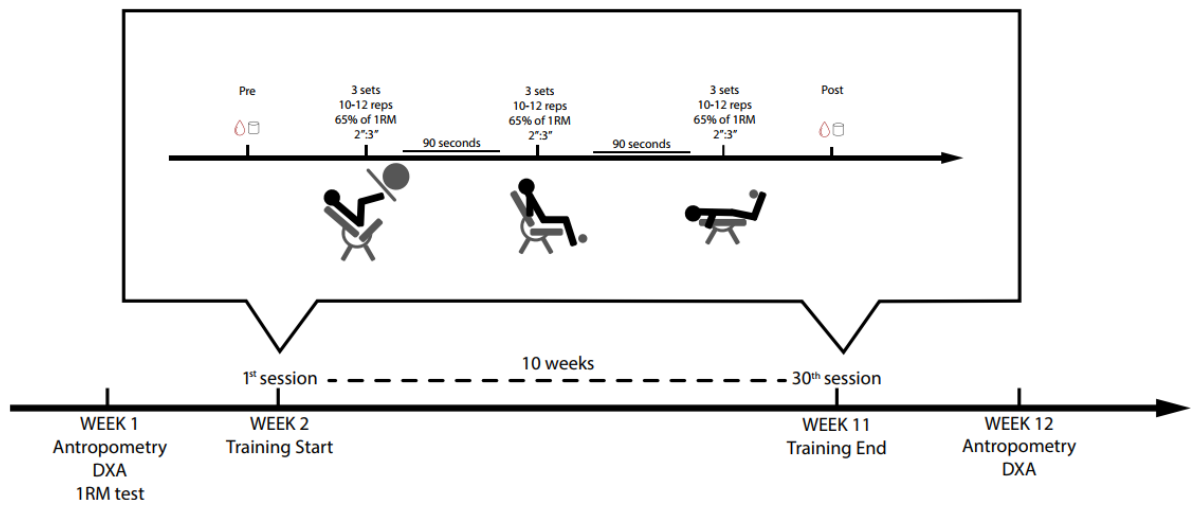


FIGURE 1- Schematic view of the study protocol.

Legend: MR – maximal repetition; DXA - Dual-energy X-ray absorptiometry; reps – repetitions.

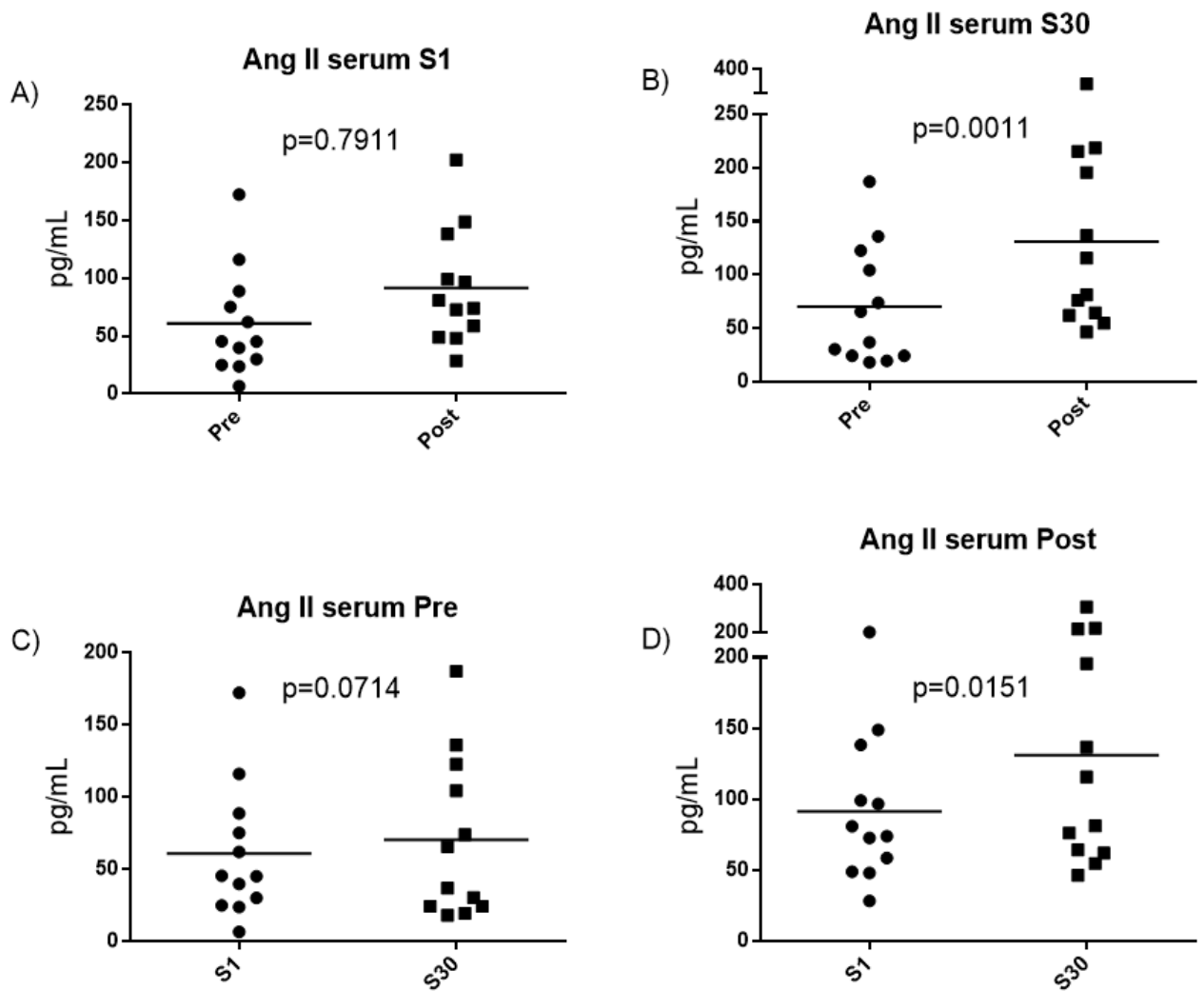


FIGURE 2 - A) Comparison of serum levels of Angiotensin II (Ang II) evaluated before (pre) and after (post) the first (S1) session of exercise. B) Comparison of serum levels of Ang II evaluated before (pre) and after (post) the last (S30) session of exercise. C) Comparison of serum levels of Ang II evaluated before (pre) the first (S1) exercise session versus before (pre) the last (S30) exercise session. D) Comparison of serum levels of Ang II evaluated after (pre) the first (S1) exercise session versus after (pre) the last (S30) exercise session. The results were expressed as medians and individual values. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (Wilcoxon test).

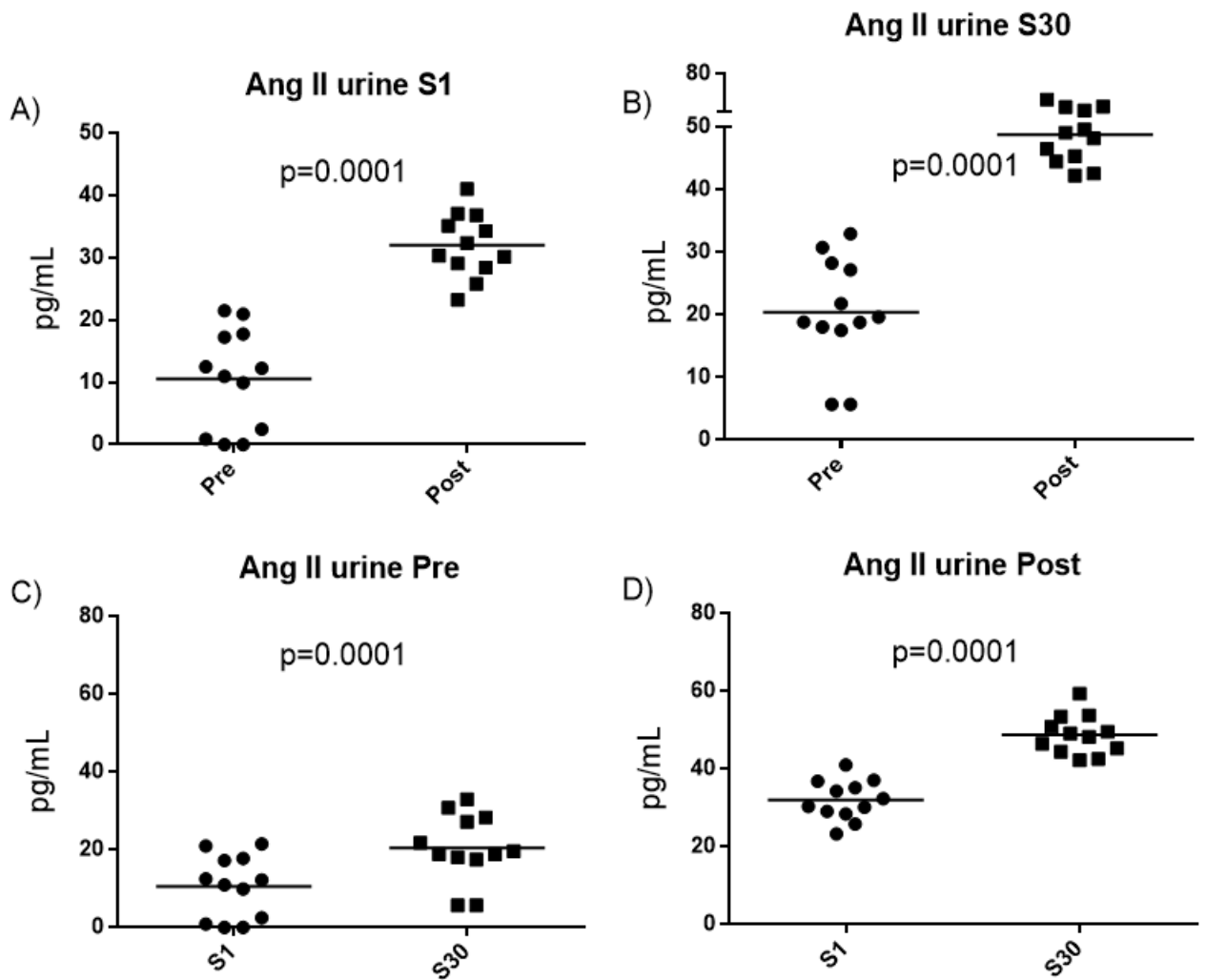


FIGURE 3 - A) Comparison of urine levels of Angiotensin II (Ang II) evaluated before (pre) and after (post) the first (S1) session of exercise. B) Comparison of urine levels of Ang II evaluated before (pre) and after (post) the last (S30) session of exercise. C) Comparison of urine levels of Ang II evaluated before (pre) the first (S1) exercise session versus before (pre) the last (S30) exercise session. D) Comparison of urine levels of Ang II evaluated after (pre) the first (S1) exercise session versus after (pre) the last (S30) exercise session. The results were expressed as medians and individual values. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (Wilcoxon test).

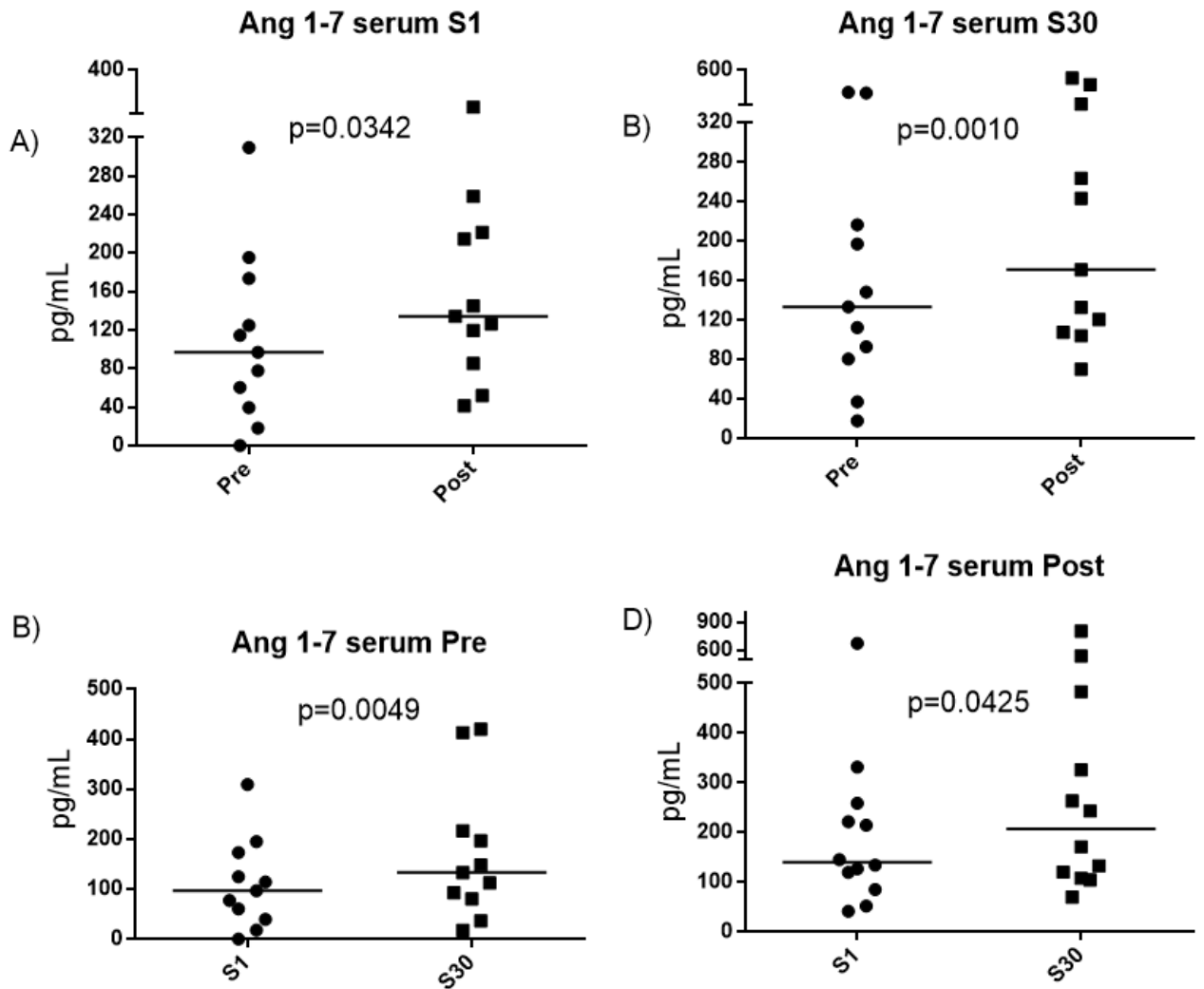


FIGURE 4 - A) Comparison of serum levels of Angiotensin-(1-7) (Ang 1-7) evaluated before (pre) and after (post) the first (S1) session of exercise. B) Comparison of serum levels of Ang 1-7 evaluated before (pre) and after (post) the last (S30) session of exercise. C) Comparison of serum levels of Ang 1-7 evaluated before (pre) the first (S1) exercise session versus before (pre) the last (S30) exercise session. D) Comparison of serum levels of Ang 1-7 evaluated after (pre) the first (S1) exercise session versus after (pre) the last (S30) exercise session. The results were expressed as medians and individual values. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (Wilcoxon test).

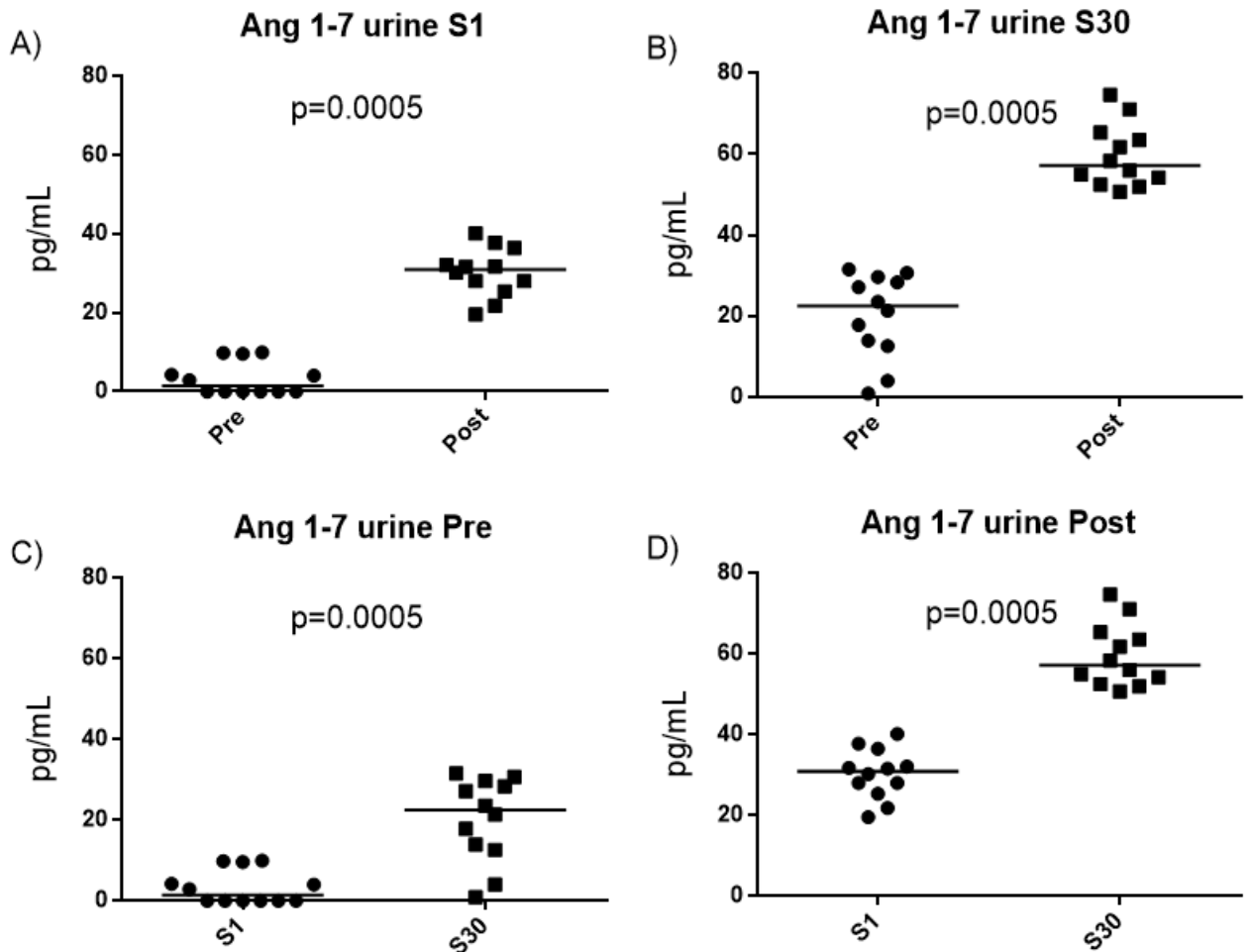


FIGURE 5- A) Comparison of urine levels of Angiotensin-(1-7) (Ang 1-7) evaluated before (pre) and after (post) the first (S1) session of exercise. B) Comparison of urine levels of Ang 1-7 evaluated before (pre) and after (post) the last (S30) session of exercise. C) Comparison of urine levels of Ang 1-7 evaluated before (pre) the first (S1) exercise session versus before (pre) the last (S30) exercise session. D) Comparison of urine levels of Ang 1-7 evaluated after (pre) the first (S1) exercise session versus after (pre) the last (S30) exercise session. The results were expressed as medians and individual values. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (Wilcoxon test).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados desse estudo mostraram que o treinamento de força induz em indivíduos adultos jovens e saudáveis aumentos significativos em alguns componentes do SRA. Ang II aumentou apenas na última sessão de treinamento e cronicamente quando comparados os valores de Pré e Pós no soro. Já na urina, foram detectados aumentos significativos em todas situações avaliadas, inclusive logo após a primeira sessão de treinamento. Em relação à ECA1, não foram encontradas alterações significativas tanto aguda como cronicamente. O aumento de Ang II pode ser interpretado como uma ativação sistêmica e/ou local do SRA.

Em nosso estudo, os níveis de Ang-(1-7) aumentaram significativamente no plasma e na urina após a primeira e a última sessão e na comparação dos valores antes e depois da última sessão com os valores de antes e depois da primeira sessão, respectivamente. Os níveis de ECA2, outro componente da via contra-regulatória, não se modificaram em nenhuma condição. O aumento de Ang-(1-7) pode representar uma resposta compensatória à elevação de Ang II. Ressalta-se que apenas a Ang-(1-7) apresentou aumento significativo no plasma e na urina dos valores anteriores à última sessão em relação aos valores anteriores à primeira sessão. Esse resultado sugere que o treinamento de força promova cronicamente aumento dos níveis basais de Ang-(1-7) no soro e na urina. Tal aumento poderia se associar, pelo menos em parte, aos efeitos benéficos promovidos pelo treinamento de força, tais como hipertrofia muscular, melhora do perfil metabólico e cardioproteção.

Nossos resultados podem contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos nas adaptações cardiovasculares e renais promovidas pelo treinamento de força. Além disso, faz-se necessária a investigação dos efeitos do exercício físico em indivíduos com doenças relacionadas ao comprometimento do eixo ECA2/Ang(1-7)/Mas para identificar se há potencial terapêutico do treinamento de força para esta população. Além disso, vale ressaltar que o presente estudo é o primeiro que investigou os eixos clássico e contra-regulatório do SRA em humanos submetidos a protocolo de exercício físico.

Todavia, este estudo tem limitações que devem ser reconhecidas. Primeiro, as alterações moleculares relatadas na periferia (ou seja, sangue e urina) podem não refletir com exatidão mudanças recíprocas nos outros sistemas como tecido muscular, coração,

entre outros. As análises nestes órgãos e tecidos poderiam ter acrescentado informações significativas a esse respeito, embora questões éticas não permitam sua realização. Outra limitação diz respeito ao fato de que nosso estudo não avaliou os mecanismos subjacentes ao aumento de moléculas do SRA.

7 PERPECTIVAS FUTURAS

Como desdobramentos de nosso estudo, pretendemos avaliar associações entre medidas de marcadores inflamatórios, adipocinas, miocinas e moléculas do SRA nos indivíduos submetidos ao treinamento de força em musculação.. Nossa principal intenção é tentar entender as vias metabólicas ativadas ou inibidas em resposta ao treinamento de força e sua possível associação com alterações morfológicas e funcionais de órgãos importantes como o músculo esquelético, o coração e os rins.

ANEXOS

ANEXO I PRODUÇÕES TÉCNICAS E PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1 Artigo de revisão publicado:

Nunes –Silva, A. , Rocha, G.C. ,Magalhães, D.M. ,Vaz, L.N. ,**Faria. M.H.S.** ,Simões e Silva, A.C. Physical Exercise and ACE2 – Angiotensin-(1-7) - Mas Receptor Axis of the Renin Angiotensin System. **Protein and Peptide Letters**, v. 24, n. 9, p. 809-816, 2017.

2 Artigo submetido 13/06/2019:

Journal: Life Sciences

Title: Two protocols of aerobic exercise modulate the counter-regulatory axis of the Renin-Angiotensin System. Corresponding Author: Ana Cristina Simoes e Silva. Co-Authors: Daniel M Magalhães; Albená Nunes-Silva; Guilherme C Rocha; Lucas N Vaz; **Marcelo Henrique S Faria**; Erica Leandro M Vieira; Natalia P Rocha

3 Apresentação dos resultados em eventos internacionais (pôsteres):

13TH INTERNATIONAL SOCIETY OF EXERCISE AND IMMUNOLOGY SYMPOSIUM - **Coimbra, Portugal;**

III SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE IMUNOLOGIA NO ESPORTE – **São Paulo, Brasil.**

- CHANGES IN INFLAMMATORY MOLECULES FOLLOWING MODERATE INTENSITY CONTINUOUS AND HIGH INTENSITY INTERMITTENT ACUTE EXERCISES IN YOUNG HEALTHY MEN
Daniel Massote Magalhães; Guilherme Carvalho Rocha; Lucas Neves Vaz; Marcelo Henrique Salviano de Faria; Albená Nunes-Silva; Natália Pessoa Rocha; Erica Leandro Marciano Vieira; Ana Cristina Simões e Silva
- PLASMA AND URINE LEVELS OF IRISIN IN RESPONSE TO MODERATE INTENSITY CONTINUOUS AND TO HIGH INTENSITY INTERMITTENT ACUTE EXERCISES
Daniel Massote Magalhães; Lucas Neves Vaz; Guilherme Carvalho Rocha; Erica Leandro Marciano Vieira; Marcelo Henrique Salviano de Faria; Natália Pessoa Rocha; Albená Nunes Silva; Ana Cristina Simões e Silva

- **ADIPOKINES LEVELS IN RESPONSE TO DIFFERENT INTENSITY PHYSICAL EXERCISE PROTOCOLS IN YOUNG HEALTHY MEN**
Daniel Massote Magalhães; Lucas Neves Vaz; Guilherme Carvalho Rocha; Natália Pessoa Rocha; Marcelo Henrique Salviano de Faria; Erica Leandro Marciano Vieira; Albená Nunes Silva; Ana Cristina Simões e Silva
- **PHYSICAL EXERCISE WITH DIFFERENT INTENSITIES ACUTELY MODULATES BOTH AXES OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN HEALTHY SUBJECTS**
Daniel Massote Magalhães; Guilherme Carvalho Rocha; Lucas Neves Vaz; Albená Nunes Silva; Marcelo Henrique Salviano de Faria; Erica Leandro Marciano Vieira; Natália Pessoa Rocha; Ana Cristina Simões e Silva

4 Apresentação dos resultados em eventos científico (pôsteres e oral):

- **I encontro Científico do LABIIEx/2017 (UFOP)- EFEITO DE 10 SEMANAS DE TREINAMENTO PARA HIPERTROFIA EM BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E NO VOLUME MUSCULAR.** (Apresentação oral e pôster)
- **II encontro Científico do LABIIEx/2018 (UFOP)- EFEITO DE DEZ SEMANAS DE TREINAMENTO EM MUSCULAÇÃO PARA HIPERTROFIA SOBRE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS E URINÁRIOS E SOBRE O VOLUME MUSCULAR DE INDIVÍDUOS JOVENS.** (Apresentação oral e pôster)
- **Seminário de Avaliação externa do Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular.FM-UFMG/2019: EFFECTS OF TEN WEEKS OF STRENGTH TRAINING ON SERUM AND URINARY RENIN ANGIOTENSIN SYSTEM (RAS) BIOMARKERS IN YOUNG INDIVIDUALS.** (Apresentação de pôster)

ANEXO II - PARECER COEP/UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
OURO PRETO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos de diferentes protocolos de exercício físico, agudos e crônicos no comportamento, qualidade de vida, marcadores imunológicos, inflamatórios, de estresse oxidativo e do sistema renina angiotensina.

Pesquisador: Albená Nunes da Silva

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 60064216.5.0000.5150

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ouro Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.881.170

Apresentação do Projeto:

"Pesquisa interinstitucional (UFMG, UFOP, UNIBH) cujo objetivo será avaliar o efeito, em biomarcadores no sangue, tanto de uma sessão de exercício físico quanto do treinamento crônico. Prevê 80 participantes voluntários (estudantes do centro universitário UNIBH Belo Horizonte) serão submetidos a uma sessão de treino e as amostras sanguíneas serão coletadas imediatamente antes e após uma sessão de treino. Os participantes também serão submetidos a um período de 8 semanas de treinamento e as amostras serão coletadas, antes, no meio (semana 4) e ao final do treinamento crônico de 8 semanas. A coleta será realizada no Laboratório de biomecânica e a sessão de treinamento acontecerá no laboratório de musculação, ambos localizados no Centro Desportivo da UFOP(CEDUFOP) sob a supervisão de um ou mais profissionais de educação física devidamente treinados. Em seguida, as amostras serão conduzidas para o Laboratório de Imunobiologia da Inflamação (LABIIN, UFMG) e para o Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Farmácia(LAPAC/UFOP).

As análises das mesmas moléculas serão realizadas antes e após este período de treinamento."

Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Primário:

Avaliar e analisar o efeito de diferentes protocolos de exercício físico, agudos e crônicos no

Continuação do Parecer: 1.881.170

comportamento, qualidade de vida, marcadores imunológicos, inflamatórios, de estresse oxidativo e do sistema renina angiotensina.

Objetivo Secundário:

Objetivo 1- Quantificar as células do sistema imunológico (neutrófilo, basófilo, neutrófilo e monócito) em voluntários submetidos a um protocolo de treinamento de força na musculação com duração de 08 semanas. Objetivo 2- Quantificar a produção de biomarcadores plasmáticos e urinários (CCL2, IL-8, CCL5, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 e TNF) em voluntários submetidos a um protocolo de treinamento de força na musculação com duração de 08 semanas. Objetivo 3- Quantificar marcadores de lesão muscular (CK, LDH e escala subjetiva de dor) em um protocolo de treinamento de força na musculação com duração de 08 semanas. Objetivo 4- Avaliar o equilíbrio oxidante redutor através da análise das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), relação nitrito/nitrato, glutatona reduzida (GSH) capacidade antioxidante do plasma (CAP) e produtos de oxidação proteica (AOPP). Objetivo 5- Avaliar a hipertrofia muscular e o aumento da capacidade física força após um período de 08 semanas de treinamento na musculação. Objetivo 6- Avaliar os níveis plasmáticos de Angiotensina II, Angiotensina-(1-7), enzima conversora de angiotensina (ECA) e ECA2 após um período de 08 semanas de treinamento de hipertrofia na musculação. Objetivo 7- Avaliar comportamento humano e qualidade de vida em praticantes de atividade física."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:

Este estudo respeitará todas as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional em Saúde envolvendo pesquisas com seres humanos (Resolução 466/2012) e somente terá início após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (UFOP). Antes de iniciarem qualquer atividade neste projeto, os voluntários receberão todas as informações quanto aos objetivos, ao processo metodológico, bem como os possíveis riscos e benefícios de participação no estudo. Caso aceitem participar, os voluntários assinarão um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) no qual tomarão ciência de que a qualquer momento poderão deixar de participar da pesquisa. Serão tomadas precauções no intuito de preservar a privacidade dos voluntários, sendo que a saúde e o bem-estar estarão sempre acima de qualquer outro interesse. Todos os procedimentos adotados neste estudo estão de acordo com as "Diretrizes e Normas Regulamentadoras das Pesquisas Envolvendo Seres Humanos" do Conselho Nacional da Saúde (Res. 196 / 96) envolvendo pesquisas com seres humanos. A coleta será realizada no Laboratório de biomecânica e a sessão de treinamento acontecerá no laboratório de musculação, ambos

Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP
Bairro: Campus Universitário CEP: 35.400-000
UF: MG Município: OURO PRETO
Telefone: (31)3559-1368 Fax: (31)3559-1370 E-mail: cep@propp.ufop.br

Codificação do Parecer: 1.881.170

localizados no Centro Desportivo da UFOP (CEDUFOP) sob a supervisão de um ou mais profissionais de educação física devidamente treinados. Em seguida, as amostras serão conduzidas, em condições de transporte de amostras biológicas padrão, para o Laboratório de Imunobiologia da Inflamação (LABIIN) e para o Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Farmácia (LAPAC). A realização deste estudo envolve os riscos gerais relacionados à prática de exercícios físicos, como lesões músculoesqueléticas e traumatismo. Porém, a frequência com que esses eventos ocorrem em condições laboratoriais é mínima.

Benefícios:

Com os dados gerados por este estudo, será possível um melhor entendimento do efeito de uma sessão de treinamento de força na musculação em biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, o que permitirá um melhor entendimento da carga de treinamento e suas consequências. Com estes dados será possível analisar a melhor maneira de aplicar uma sessão de treino, bem como no tempo necessário para recuperação. Ainda será possível fazer inferências sobre os níveis de citocinas e as possíveis respostas adaptativas geradas por estes estímulos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados e adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_773635.pdf	14/12/2016 07:40:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_UFOP.docx	14/12/2016 07:39:32	Albená Nunes da Silva	Aceito
Outros	CARTA_CEP1.doc	14/12/2016 07:39:16	Albená Nunes da Silva	Aceito

Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 - PROPP/UFOP
 Bairro: Campus Universitário CEP: 35.400-000
 UF: MG Município: OURO PRETO
 Telefone: (31)3559-1368 Fax: (31)3559-1370 E-mail: cep@propp.ufop.br