

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E MOTRICIDADE HUMANA

**EFEITO DO TREINAMENTO DE FORÇA DE BAIXA INTENSIDADE
COM RESTRIÇÃO DE FLUXO SANGUÍNEO NAS ÁREAS
MIOFIBRILAR E EXTRACELULAR DA FIBRA MUSCULAR**

Pesquisador responsável: Cleiton Augusto Libardi

**São Carlos – SP
2025**

Resumo: O treinamento de força (TF) com baixa intensidade associado à restrição de fluxo sanguíneo (TFBI-RFS) promove hipertrofia muscular semelhante à do treinamento de alta intensidade, mas seu efeito sobre a proporção de áreas miofibrilares e não-miofibrilares ainda é incerto. Assim, o objetivo do estudo é investigar os efeitos do TFBI-RFS e do TF com alta intensidade (TFAI) sobre a hipertrofia das fibras musculares tipo I e II, a proporção entre áreas miofibrilares e não-miofibrilares, o espaçamento extracelular, o conteúdo proteico e parâmetros morfofuncionais, incluindo força em jovens. **Métodos:** Participarão do estudo 30 mulheres e homens saudáveis, com idades entre 18 e 35 anos, sem experiência prévia em TF. Será realizada uma intervenção de treinamento intra-sujeito de membros inferiores, com um total de 22 sessões, contendo 2 sessões de familiarização. Uma perna do participante será alocada ao grupo TFBI-RFS, enquanto a perna contralateral será alocada ao grupo TFAI. Serão feitas avaliações de área de secção transversa do músculo vasto lateral por ultrassonografia, força máxima dinâmica, e biópsias musculares antes e após as 22 sessões de treinamento em ambos os membros inferiores. Os conteúdos proteicos de proteínas relacionadas ao conteúdo miofibrilar e não-miofibrilar serão analisados por *Western blotting*. Para a análise dos tipos de fibra muscular e da área de secção transversal, será utilizada a técnica de imuno-histoquímica. Além disso, coloração por faloidina será utilizado para quantificar as áreas miofibrilares e não-miofibrilares das fibras musculares. Os dados serão inicialmente inspecionados para verificação das premissas estatísticas (normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo teste de Levene). Atendidas as condições, será aplicada uma ANOVA de medidas repetidas de duas vias, com post hoc de Tukey quando necessário. Serão reportados tamanhos de efeito (diferença média não padronizada e padronizada com ajuste de Hedges e Olkin), médias $\pm$ desvios padrão e IC 95%. O nível de significância adotado será de $p < 0,05$. As análises serão conduzidas no software SAS *OnDemand for Academics*.

SUMÁRIO

1.	ENUNCIADO DO PROBLEMA	4
2.	OBJETIVOS	5
3.	MÉTODOS.....	6
3.1	Participantes.....	6
3.2	Delineamento experimental	6
3.3	Área de secção transversa muscular (AST)	7
3.4	Teste de 1 Repetição Máxima (1RM).....	8
3.5	Biópsias musculares.....	8
3.6	Imuno-histoquímica.....	9
3.7	Western blotting	10
3.8	Protocolo de restrição de fluxo sanguíneo	11
3.9	Protocolos de treinamento	11
3.9.1	<i>Treinamento de força com restrição de fluxo sanguíneo (TFBI-RFS).....</i>	<i>11</i>
3.9.2	<i>Treinamento de força de alta intensidade (TFAI)</i>	<i>12</i>
3.10	Análise Estatística.....	12
4	CRONOGRAMA.....	12
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

1. ENUNCIADO DO PROBLEMA

O treinamento de força (TF), popularmente conhecido como musculação, é recomendado por respeitadas organizações internacionais como o Colégio Americano de Medicina do Esporte para prevenir várias comorbidades e promover a saúde em geral (GARBER *et al.*, 2011). Dentre as adaptações decorrentes do TF, o aumento da área de secção transversa (AST) muscular (i.e., hipertrofia muscular) pode contribuir, por exemplo, na prevenção ou atenuação da obesidade, de doenças crônicas como a diabetes tipo 2 e redução na mortalidade (DANKEL *et al.*, 2016). De fato, diversos estudos têm demonstrado uma relação inversa entre a massa muscular e diversas causas de morte (LI *et al.*, 2018). Portanto, parece imperativo manter e/ou aumentar a massa muscular ao longo da vida.

A restrição do fluxo sanguíneo (RFS) aplicada durante o TF com baixa intensidade (TFBI-RFS) é uma estratégia eficaz para aumentar a área de secção transversa das fibras musculares (AST_f), ou seja, para induzir hipertrofia muscular (PATTERSON *et al.*, 2019). Recentemente, foi demonstrado que o TFBI-RFS promove hipertrofia semelhante em fibras do tipo I e II quando comparado ao TF com alta intensidade (TFAI), independentemente do sexo (REECE *et al.*, 2023). Embora a hipertrofia das fibras musculares seja similar entre TFBI-RFS e TFAI, a expansão diferencial dos componentes miofibrilares (e.g., isoformas de miosina de cadeia pesada e leve, diversas isoformas de actina, proteínas da linha Z, etc.) e não-miofibrilares (e.g., fluidos intracelulares, proteínas e enzimas sarcoplasmáticas, glicogênio, mitocôndrias etc.) pode ser influenciada por esses diferentes protocolos de TF.

Nos últimos anos, tem havido um renovado interesse em investigar as adaptações miofibrilares decorrentes do TF (JORGENSEN *et al.*, 2020; ROBERTS *et al.*, 2020; ROBERTS *et al.*, 2023). MacDougall *et al.* (1982), por meio de análises com microscopia eletrônica, demonstraram que o TF prolongado aumenta desproporcionalmente o espaçamento sarcoplasmático. No entanto, evidências mais recentes sugerem que o TFAI tradicional tipicamente induz uma expansão proporcional das áreas miofibrilares e não-miofibrilares dentro das fibras musculares (FOX *et al.*, 2021; RUPLE *et al.*, 2021; VANN *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 1993). Além disso, observou-se que o aumento no número de miofibrilas, mas não necessariamente no seu tamanho, acompanha a elevação da AST_f ao longo das semanas de TF (JORGENSEN *et al.*, 2023). Contudo, algumas evidências sugerem que a expansão da área não-miofibrilar pode predominar durante a hipertrofia das fibras musculares em protocolos de TF que divergem dos métodos tradicionais (como abordagens não convencionais ou regimes de TF com volume extremamente alto) (FOX *et al.*, 2021; HAUN *et al.*, 2019; VANN *et al.*, 2022).

Apesar do crescente volume de pesquisas sobre essas alterações intracelulares nos últimos anos, pouco se sabe sobre o impacto do TFBI-RFS nessas características das fibras musculares.

Até o presente momento, apenas dois estudos investigaram os efeitos do TFBI-RFS no conteúdo intracelular de miofibrilas. Wilburn et al. (2021) conduziram um estudo de caso com uma única sessão de exercício, na qual uma das pernas do participante foi submetida ao TFBI-RFS, enquanto a perna contralateral realizou TFAI. Os achados principais indicaram que o TFBI-RFS induziu alterações miofibrilares agudas em um padrão ondulatório, possivelmente devido ao acúmulo de fluidos no sarcoplasma, o que parece ter perturbado o alinhamento linear dos sarcômeros. Além disso, os danos musculares (isto é, desorganização dos discos Z e rupturas dos filamentos espessos e finos) não foram observados na mesma intensidade que no TFAI. Esses achados indicariam que, ao menos de forma aguda, o acúmulo de fluidos induzido pelo TFBI-RFS pode causar modificações na área não-miofibrilar distintas das promovidas pelo TFAI. Contrariamente, utilizando-se de um design inter-sujeito, Libardi et al. (2024) demonstraram de maneira crônica, que apesar de ambos os protocolos promoverem hipertrofia significativa em ambos os tipos de fibra para TFBI-RFS e TFAI, não foram observadas diferenças significativas entre os protocolos na proporcionalidade das porções miofibrilares e não-miofibrilares. Entretanto, uma inspeção criteriosa dos tamanhos de efeito (ES) e intervalos de confiança (CI) das alterações na área miofibrilar das fibras tipo II (ES: 0,77; CI: -0,13 a 1,66, favorecendo TFAI) e da área não-miofibrilar das fibras tipo II (ES: -0,77; CI: -1,66 a 0,13, favorecendo TFBI-RFS), sugerem que uma potencial diferença entre os protocolos pode ter sido mascarada por limitações relacionadas ao delineamento experimental do estudo. Neste sentido, futuras investigações utilizando de maior tamanho amostral e um design capaz de minimizar a variabilidade inter-sujeito (i.e., design intra-sujeito) são necessárias para investigar este fenômeno a plausibilidade da ocorrência deste fenômeno.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos: i) investigar se a hipertrofia das fibras do tipo I e II induzida pelo TFBI-RFS ou pelo TFAI será acompanhada por alterações diferenciais nas áreas miofibrilar e não-miofibrilar; ii) analisar se o espaçamento extracelular será afetado de maneira distinta entre esses dois protocolos de TF; iii) analisar o conteúdo proteico de proteínas miofibrilares e não-miofibrilares; e iv) de maneira secundária, observar os efeitos de ambos os protocolos na força e AST do músculo vasto lateral.

3. MÉTODOS

3.1 Participantes

O cálculo do número de sujeitos foi realizado por meio do pacote “Power” no software R. Para a estimativa amostral, foram inseridos no código os valores do tamanho do efeito da diferença das médias entre os grupos para a variável “Myofibril Area Type I + II”, conforme reportado por Libardi et al. (2024), além do nível de significância ($\alpha = 0,05$) e do poder estatístico (0,8). Os resultados indicaram a necessidade de um total de 19 sujeitos. No entanto, por se tratar de um estudo que contém uma avaliação invasiva, trabalharemos com uma alta possibilidade de perda amostral, e portanto, serão selecionados 30 mulheres e homens com idade entre 18 e 35 anos. A divulgação do estudo será realizada, principalmente, por meio de panfletagem contendo as informações de contato do pesquisador responsável. Para serem admitidos no estudo, os potenciais participantes deverão atender aos seguintes critérios: não ter realizado TF nos últimos seis meses anteriores ao início da intervenção, apresentar condições físicas adequadas para a prática de exercícios físicos e não possuir lesões musculoesqueléticas nos membros inferiores ou distúrbios neuromusculares que possam comprometer a execução dos protocolos propostos. A fim de avaliar esses critérios, serão utilizados dois questionários: o Questionário de Prontoatendimento para Atividade Física (PAR-Q) e o Questionário Nórdico de Sintomas Musculoesqueléticos (QNSM), ambos traduzidos para o português. O PAR-Q tem como objetivo identificar a necessidade de avaliação médica prévia à prática de atividades físicas, enquanto o QNSM visa monitorar distúrbios musculoesqueléticos em contextos ergonômicos e para triagem nos serviços de saúde ocupacional. Caso o participante responda afirmativamente a qualquer questão do PAR-Q, será excluído do estudo e orientado a procurar atendimento médico para a realização dos exames necessários. Adicionalmente, como critérios de exclusão serão adotados sintomas cardíacos, diabetes e arritmias. Além disso, será solicitado que o voluntário forneça seu consentimento informado por escrito, conforme as diretrizes estabelecidas pela Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

3.2 Delineamento experimental

Inicialmente, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os participantes responderão o PAR-Q, serão submetidos a coleta de dados antropométricos e realizarão ultrassonografia para determinação da AST do músculo vasto lateral. Após 72h, a ultrassonografia será repetida, seguida pela coleta de biópsias no músculo vasto lateral de ambas as pernas de cada participante. Noventa e seis horas após a realização das biópsias, os participantes serão submetidos a um teste de uma repetição máxima (1RM) na cadeira

extensora. Após 72 horas, o teste de 1RM será repetido. As variabilidades observadas na ultrassonografia e no teste de 1RM serão reportadas como erro típico e respectivo coeficiente de variação. Após a realização das avaliações, cada participante terá um de seus membros inferiores aleatoriamente atribuídos para uma das condições experimentais usando um modelo de randomização em blocos e estratificação com base na dominância e força muscular. São elas: TF de baixa intensidade associado à restrição de fluxo sanguíneo (TFBI-RFS) e TF de alta intensidade (TFAI), ambos na cadeira extensora. Previamente ao início dos treinos, serão realizadas 2 sessões de familiarização com os protocolos de intervenção. Durante o período de intervenção, as sessões realizadas três vezes por semana, com um intervalo mínimo de 48 horas entre as sessões de treino. O agendamento das sessões será feito de forma individual, sempre que possível, levando em consideração as necessidades e preferências de horário de cada participante. Após 10 sessões de treinamento, o teste de 1RM será repetido a fim de reajustar o percentual da carga de ambos os protocolos de treinamento. Noventa e seis horas após a última sessão de treino, ultrassom e biópsias serão realizadas. Finalmente, após 96h o teste de 1RM será realizado.

3.3 Área de secção transversa muscular (AST)

A área de secção transversa (AST) do músculo vasto lateral será avaliada por meio de ultrassonografia, conduzida por um pesquisador experiente e cego para as condições experimentais, seguindo os procedimentos descritos por Lixandrão et al. (2014). Os participantes serão orientados a evitar a prática de exercícios físicos vigorosos por, no mínimo, 72 horas antes de cada avaliação da AST. Ao chegarem ao laboratório, permanecerão em posição supina por 15 minutos, com o objetivo de permitir a redistribuição de fluidos corporais. As imagens serão adquiridas por meio de ultrassom em modo B, utilizando uma sonda linear ajustada para 7,5 MHz, com o uso de gel condutor para garantir acoplamento acústico adequado e minimizar a compressão da epiderme. A demarcação da pele será realizada no ponto correspondente a 50% do comprimento femoral, definido como a distância entre o trocânter maior e o epicôndilo lateral do fêmur. A partir desse ponto, marcas sucessivas serão feitas transversalmente em direção aos aspectos medial e lateral da coxa, com intervalos de 2 cm, a fim de orientar o deslocamento da sonda ao longo do plano sagital. As imagens sequenciais do músculo vasto lateral serão capturadas a cada 2 cm, iniciando-se na marca mais medial (localizada sobre o músculo reto femoral) e avançando em direção ao aspecto lateral da coxa. Cada sessão de aquisição terá duração média de 30 minutos. Posteriormente, as imagens serão importadas para o software PowerPoint (Microsoft), onde serão rotacionadas e organizadas

manualmente para a reconstrução da imagem composta da secção transversa completa do músculo vasto lateral. Em seguida, essa imagem será transferida para o software ImageJ, no qual a ferramenta “polígono” será utilizada para o delineamento da borda muscular e o cálculo da área de secção transversa, excluindo-se estruturas não contráteis, como tecido conjuntivo e ósseo. Para estimar a confiabilidade da técnica, serão calculados o coeficiente de variação (CV) e o erro típico da medida (ET). Para isso, a AST obtida no momento pré-intervenção será reconstruída e analisada em duplicata, com um intervalo de 72 horas entre as medições.

3.4 Teste de 1 Repetição Máxima (1RM)

Os testes de uma repetição máxima (1RM) serão conduzidos de maneira unilateral na cadeira extensora, conforme as diretrizes estabelecidas por Brown e Weir (2001). Inicialmente, os participantes realizarão um aquecimento geral em bicicleta ergométrica, mantendo uma velocidade de 20 km/h por um período de cinco minutos. Em seguida, será realizado um aquecimento específico na cadeira extensora, composto por duas séries de carga progressiva. A primeira série consistirá em oito repetições utilizando uma carga correspondente a 50% da carga máxima estimada pelo avaliador. Na segunda série, os participantes executarão três repetições com uma carga equivalente a 70% da 1RM estimada. O intervalo entre as séries de aquecimento será de dois minutos. Após o aquecimento, serão realizadas cinco tentativas para determinar a 1RM de extensão do joelho, com intervalos de três minutos entre cada tentativa para identificar a 1RM na cadeira extensora. Durante o teste, os participantes iniciarão o movimento com o joelho flexionado em aproximadamente 90 graus, realizando a fase concêntrica até alcançar a extensão máxima confortável (próxima a 0 graus), retornando então à posição inicial. Para garantir a imparcialidade das avaliações, o pesquisador responsável pela mensuração desse desfecho não participará da condução dos treinamentos, assegurando que ele permaneça cego quanto à atribuição das condições experimentais.

3.5 Biópsias musculares

As biópsias musculares serão realizadas no músculo vasto lateral dos participantes usando agulhas de biópsia percutânea acopladas a um aparelho de sucção. Antes do procedimento, ~2,5 ml de lidocaína a 1% será aplicada no local da biópsia e será permitido um tempo de 5-10 minutos para que a anestesia faça o efeito desejado. Aproximadamente 100-120 mg de tecido muscular será coletado e limpo de sangue e tecido conjuntivo. Destes, cerca de 20 mg de tecido muscular serão armazenados para imuno-histoquímica. Este tecido deverá ser preservado em *optimum cutting temperature* (OCT), com as fibras orientadas

perpendicularmente à superfície horizontal. Em seguida serão congelados em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido. O restante do tecido muscular será armazenado em criotubos livres de RNA para a realização das análises de conteúdo proteico via *Western blotting* (descrito a seguir). Todas as amostras serão armazenadas em um freezer a -80°C até a análise.

3.6 Imuno-histoquímica

As adaptações hipertróficas na área de secção transversa (AST) das fibras musculares tipo I (BA-D5) e II, assim como a expressão de CS (Pax7) e contagem de mionúcleo (DAPI) serão determinados pela análise de imuno-histoquímica. O tecido preservado em OCT será cortado transversalmente ($\sim 12\ \mu$) em triplicata, montado em lâminas com carga eletrostática positiva e armazenada em freezer -80°C até que as análises sejam realizadas. As marcações utilizadas para determinação da AST, tipo de fibra, CS e mionúcleos serão realizadas na mesma lâmina. Para análise, as lâminas deverão secar em temperatura ambiente por cerca de 120 minutos, até subsequente fixação em acetona à -20°C por cinco minutos. As amostras serão incubadas em peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos e bloqueadas em *True Black* por 1 min. Em seguida uma solução contendo soro de cabra a 5%, soro de cavalo a 2,5% e Triton-X 100 a 0,1% será aplicada por 1h para bloquear ligações inespecíficas. Após, soluções de estreptavidina e biotina serão aplicadas por 15 minutos cada uma até serem incubadas em anticorpo primário por uma noite a 4°C . O coquetel será composto por anti-Pax-7 IgG1 de camundongo (1:20) (sobrenadante), anti-distrofina de coelho (1:200) e 2,5% de soro de cavalo. No dia seguinte, as amostras serão incubadas com IgG1 de cabra anti-camundongo + SP (1:1.000) serão diluídos em soro de cavalo 2,5% por 90 minutos. Em seguida serão incubadas em um coquetel de anticorpo secundário composto por SA-HRP (1:500), anti camundongo IgG2b AF647 (1:250) e cabra anti-coelho AF488 (1:250) por 1h. Subsequentemente, serão utilizados TSA AF555 (1:200) por 20 min e DAPI por 10 min até montagem com lamínulas. Um microscópio de fluorescência será utilizado com foco em 20x para a obtenção de cerca de 10 imagens digitais por amostra. As imagens serão então analisadas através do software Myovision, que quantificará as áreas das fibras, a quantidade de fibras tipo I e II e de mionúcleos por tipo de fibra. Um avaliador experiente deverá excluir quaisquer fibras quantificadas pelo software que não atendam padrões de normalidade, tal como fibras cujas bordas estejam descontinuas ou quantificações de espaços intercelulares. Para a utilização da amostra, um mínimo de 50 fibras deverá ser quantificado (MACKEY *et al.*, 2009). As CS serão contadas manualmente por um avaliador que usará como critério a co-coração PAX-7 e DAPI (PAX-7+

/ DAPI+), no qual as estruturas devem estar localizadas de maneira sobreposta à borda de distrofina, voltada para a parte externa.

Para analisar os conteúdos miofibrilares e não-miofibrilares, o método utilizado será a coloração por faloidina, como descrito em Rupple et al. (2021). Brevemente, a faloidina conjugada a fluoróforos específicos, como o Alexa Fluor 488, é empregada para marcar a actina filamentar (F-actina) presente nas fibras musculares. Essa técnica permite a visualização e quantificação precisas da distribuição de actina nos compartimentos miofibrilar e sarcoplasmático. Após a aplicação da faloidina, as amostras são analisadas por microscopia de fluorescência, capturando imagens digitais das fibras musculares. A intensidade e a extensão do sinal fluorescente são então utilizadas para estimar a área ocupada pelos componentes miofibrilares e sarcoplasmáticos, permitindo a avaliação das alterações estruturais induzidas por TFBI-RFS e TFAI.

3.7 Western blotting

Após homogeneização dos tecidos, as concentrações proteicas determinadas por kit de ácido bicinonínico comercialmente disponível serão utilizados para preparo das amostras para Western blotting. Para esta preparação, serão aplicados tampão Laemmli 4x e água deionizada (diH₂O) a fim de padronizar as concentrações de cada amostra em 1 µg/µL, que será fervida e desnaturada por 5 minutos a 100° C. Um total de 10 µL de padrão de proteínas pré-corado será carregado na primeira lacuna de um gel de SDS–poliacrilamida (4%–15%) e 15 µL de cada amostra será adicionado nas lacunas seguintes. Após o carregamento, os géis serão submetidos à eletroforese a 180 V por 50 minutos. As proteínas serão transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno previamente ativadas em metanol e submetida a 200 mA por duas horas. As membranas serão coradas com *Ponceau* por 10-12 minutos e imagens serão capturadas usando um sistema de documentação de gel no modo “colorimétrico”. Em seguida, as membranas serão reativadas em metanol e bloqueadas em leite desnatado em pó por 1 h [5% peso/volume diluído em solução salina tamponada com Tris e 0,1% Tween 20 (TBS-T)]. Após o bloqueio, as membranas serão incubadas por 24 h a 4°C com anticorpos primários para proteínas miofibrilares e não-miofibrilares. No dia seguinte, as membranas serão incubadas por 1 h com anticorpos secundários para os respectivos anticorpos primários, diluídos em 1:2000 em 5% de BSA. Em seguida as membranas serão desenvolvidas em substrato de quimioluminescência e as imagens serão capturadas usando o modo “quimioluminescência”. Utilizando o software ImageLab, a densidade de *Ponceau* e a densidade bruta das bandas alvo serão analisadas usando as ferramentas “lane” e “rectangle”, respectivamente. A expressão

absoluta de proteína será obtida pela razão entre a densidade bruta da banda alvo e a densidade das respectivas faixas de *Ponceau*.

3.8 Protocolo de restrição de fluxo sanguíneo

Para a mensuração da pressão de restrição, os participantes permanecerão em posição supina em repouso por um período de 15 minutos. A aferição será realizada por meio de um manguito pressórico com 17,5 cm de largura e 94 cm de comprimento, acoplado a um manômetro de pressão, posicionado sobre o músculo quadríceps, na região da dobra inguinal de ambos os membros. Em seguida, uma sonda Doppler vascular será utilizada para a detecção do pulso auscultatório, sendo posicionada sobre a artéria tibial posterior. A determinação da pressão de oclusão será realizada mediante a insuflação do manguito até o ponto em que houver interrupção do pulso auscultatório. Este valor será registrado como 100% da pressão de oclusão vascular de cada indivíduo. As mensurações serão repetidas a cada 6 sessões.

3.9 Protocolos de treinamento

3.9.1 Treinamento de força com restrição de fluxo sanguíneo (TFBI-RFS)

Um dos membros inferiores de cada indivíduo (i.e., unidade experimental) será submetido a um programa de TFBI-RFS, composto por 24 sessões de exercícios unilaterais de extensão do joelho na cadeira extensora. As sessões ocorrerão três vezes por semana, respeitando um intervalo mínimo de 48 horas entre cada sessão. Todas as sessões iniciarão com um aquecimento geral de 5 minutos em um cicloergômetro a uma velocidade de 20 km/h, seguidos por um aquecimento específico na mesma cadeira extensora em que o treinamento será realizado, consistindo em 1 série de 10 repetições a 20% de 1RM sem adição de oclusão vascular. O protocolo TFBI-RFS consistirá em quatro séries, sendo a primeira composta por 30 repetições e as três subsequentes por 15 repetições, realizadas a 20% de 1RM e associadas a 50% da pressão de oclusão vascular total previamente determinada. A restrição de fluxo será mantida durante todo o protocolo, inclusive nos intervalos de 1 minuto entre as séries. A carga será reajustada por meio de re-teste de 1RM após 12 sessões. Todas as sessões serão supervisionadas por pesquisadores experientes, que fornecerão incentivo verbal durante a execução do protocolo, assegurando o cumprimento adequado da metodologia proposta.

3.9.2 Treinamento de força de alta intensidade (TFAI)

O outro membro inferior de cada indivíduo será submetido a um programa de TFAI, também composto por 24 sessões de exercícios unilaterais de extensão do joelho na cadeira extensora. As sessões ocorrerão três vezes por semana, respeitando um intervalo mínimo de 48 horas entre cada sessão. Todas as sessões iniciarão com um aquecimento geral de 5 minutos em um cicloergômetro a uma velocidade de 20 km/h, seguidos por um aquecimento específico na mesma cadeira extensora em que o treinamento será realizado, consistindo em 1 série de 10 repetições a 50% de 1RM. O protocolo TFAI consistirá em quatro séries de 10 repetições realizadas a 80% de 1RM, respeitando um intervalo de 1 minuto entre as séries. A carga será reajustada por meio de re-teste de 1RM após 12 sessões. Todas as sessões serão supervisionadas por pesquisadores experientes, que fornecerão incentivo verbal durante a execução do protocolo, assegurando o cumprimento adequado da metodologia proposta.

3.10 Análise Estatística

Será realizada uma inspeção visual dos dados para verificar se eles atendem às premissas dos testes estatísticos previstos para a análise. Para essa verificação, o teste de Shapiro-Wilk será empregado para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. A seguir, a esfericidade será verificada utilizando o teste de Levene. Caso todas as premissas sejam satisfeitas, será conduzida uma ANOVA de medidas repetidas de duas vias. Se os resultados de F forem significativos, será aplicado o teste post hoc de Tukey para realizar comparações entre os grupos para todas as variáveis dependentes. Os tamanhos de efeito (ES) e os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC) entre os grupos serão apresentados de duas formas: i) Diferença média não padronizada e ii) Diferença média padronizada. Para o cálculo da padronização, será utilizado o ajuste de Hedges e Olkin (1985) para amostras pequenas. O nível de significância será estabelecido em $p < 0,05$. As análises estatísticas serão realizadas utilizando o software *SAS OnDemand for Academics*, versão online (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA). Os resultados serão reportados como média $\pm$ desvio padrão (IC 95%).

4 CRONOGRAMA

03/2025: Submissão e aprovação ética.

09/2025: Recrutamento inicial e triagem dos participantes.

10/2025: Início das avaliações.

10/2025: Início dos treinos.

12/2025: Avaliações finais.

02/2025: Início das análises.

06/2025: Análise estatística e escrita do artigo.

07/2025: Submissão do artigo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATKINSON, G.; BATTERHAM, A. M. J. E. p. True and false interindividual differences in the physiological response to an intervention. 100, n. 6, p. 577-588, 2015.

BIAZON, T. M.; UGRINOWITSCH, C.; SOLIGON, S. D.; OLIVEIRA, R. M. *et al.* The association between muscle deoxygenation and muscle hypertrophy to blood flow restricted training performed at high and low loads. 10, p. 446, 2019.

BROWN, L. E.; WEIR, J. P. J. J. o. E. P. O. ASEP procedures recommendation I: accurate assessment of muscular strength and power. 4, n. 3, 2001.

CAHALIN, L. P.; FORMIGA, M. F.; ANDERSON, B.; CIPRIANO, G., Jr. *et al.* A call to action for blood flow restriction training in older adults with or susceptible to sarcopenia: A systematic review and meta-analysis. **Front Physiol**, 13, p. 924614, 2022.

CENTNER, C.; LAUBER, B.; SEYNNES, O. R.; JERGER, S. *et al.* Low-load blood flow restriction training induces similar morphological and mechanical Achilles tendon adaptations compared with high-load resistance training. **J Appl Physiol (1985)**, 127, n. 6, p. 1660-1667, Dec 1 2019.

CLARK, B. C.; MANINI, T. M. Functional consequences of sarcopenia and dynapenia in the elderly. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 13, n. 3, p. 271-276, May 2010.

DANKEL, S. J.; LOENNEKE, J. P.; LOPRINZI, P. D. Determining the Importance of Meeting Muscle-Strengthening Activity Guidelines: Is the Behavior or the Outcome of the Behavior (Strength) a More Important Determinant of All-Cause Mortality? **Mayo Clin Proc**, 91, n. 2, p. 166-174, Feb 2016.

EVANS, J. D. **Straightforward statistics for the behavioral sciences.** . 1996. 0534231004.

FOX, C. D.; MESQUITA, P. H. C.; GODWIN, J. S.; ANGLERI, V. *et al.* Frequent Manipulation of Resistance Training Variables Promotes Myofibrillar Spacing Changes in Resistance-Trained Individuals. **Front Physiol**, 12, p. 773995, 2021.

GARBER, C. E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M. R.; FRANKLIN, B. A. *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc**, 43, n. 7, p. 1334-1359, Jul 2011.

HAUN, C. T.; VANN, C. G.; OSBURN, S. C.; MUMFORD, P. W. *et al.* Muscle fiber hypertrophy in response to 6 weeks of high-volume resistance training in trained young men is largely attributed to sarcoplasmic hypertrophy. 14, n. 6, p. e0215267, 2019.

HECKSTEDEN, A.; KRAUSHAAR, J.; SCHARHAG-ROSENBERGER, F.; THEISEN, D. *et al.* Individual response to exercise training-a statistical perspective. 118, n. 12, p. 1450-1459, 2015.

HEDGES, L.; OLKIN, I. Estimation of a Single Effect Size: Parametric and Nonparametric Methods. 1985.

JORGENSEN, K. W.; HIBBERT, J. E.; SAYED, R. K. A.; LANGE, A. N. *et al.* A Novel Imaging Method (FIM-ID) Reveals that Myofibrillogenesis Plays a Major Role in the Mechanically Induced Growth of Skeletal Muscle. **bioRxiv**, Dec 13 2023.

JORGENSEN, K. W.; PHILLIPS, S. M.; HORNBERGER, T. A. Identifying the Structural Adaptations that Drive the Mechanical Load-Induced Growth of Skeletal Muscle: A Scoping Review. **Cells**, 9, n. 7, Jul 9 2020.

KARABULUT, M.; ABE, T.; SATO, Y.; BEMBEN, M. G. The effects of low-intensity resistance training with vascular restriction on leg muscle strength in older men. **Eur J Appl Physiol**, 108, n. 1, p. 147-155, Jan 2010.

LI, R.; XIA, J.; ZHANG, X. I.; GATHIRUA-MWANGI, W. G. *et al.* Associations of Muscle Mass and Strength with All-Cause Mortality among US Older Adults. **Med Sci Sports Exerc**, 50, n. 3, p. 458-467, Mar 2018.

LIBARDI, C. A.; GODWIN, J. S.; REECE, T. M.; UGRINOWITSCH, C. *et al.* Effects of low-load resistance training with blood flow restriction on muscle fiber myofibrillar and extracellular area. **Front Physiol**, 15, p. 1368646, 2024.

LIBARDI, C. A.; SOUZA, T. M. F.; CONCEIÇÃO, M. S.; CHACON-MIKAHIL, M. P. T. *et al.* The number of sessions required to stabilize peak torque and rate of torque development in isometric contractions in young, middle-age and older individuals. 24, n. 2, p. 165-170, 2016.

LIXANDRÃO, M. E.; UGRINOWITSCH, C.; BOTTARO, M.; CHACON-MIKAHIL, M. P. *et al.* Vastus lateralis muscle cross-sectional area ultrasonography validity for image fitting in humans. **J Strength Cond Res**, 28, n. 11, p. 3293-3297, Nov 2014.

MACDOUGALL, J. D.; SALE, D. G.; ELDER, G. C.; SUTTON, J. R. Muscle ultrastructural characteristics of elite powerlifters and bodybuilders. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, 48, n. 1, p. 117-126, 1982.

MACINNIS, M. J.; MCGLORY, C.; GIBALA, M. J.; PHILLIPS, S. M. J. A. P., Nutrition, *et al.* Investigating human skeletal muscle physiology with unilateral exercise models: when one limb is more powerful than two. 42, n. 6, p. 563-570, 2017.

MACKEY, A. L.; KJAER, M.; CHARIFI, N.; HENRIKSSON, J. *et al.* Assessment of satellite cell number and activity status in human skeletal muscle biopsies. **Muscle Nerve**, 40, n. 3, p. 455-465, 2009.

PASMA, J. H.; STIJNTJES, M.; OU, S. S.; BLAUW, G. J. *et al.* Walking speed in elderly outpatients depends on the assessment method. 36, n. 6, p. 9736, 2014.

- PATTERSON, S. D.; HUGHES, L.; WARMINGTON, S.; BURR, J. *et al.* Blood flow restriction exercise: considerations of methodology, application, and safety. 10, p. 533, 2019.
- PENG, P.; LU, Y.; WANG, Y.; SUI, X. *et al.* Effect of Low-Intensity Bloodflow Restriction Training on Nontraumatic Knee Joint Conditions: A Systematic Review and Meta-analysis. **Sports Health**, 17, n. 2, p. 226-235, Mar 2025.
- REECE, T. M.; GODWIN, J. S.; STRUBE, M. J.; CICCONE, A. B. *et al.* Myofiber hypertrophy adaptations following 6 weeks of low-load resistance training with blood flow restriction in untrained males and females. **J Appl Physiol** (1985), 134, n. 5, p. 1240-1255, May 1 2023.
- ROBERTS, M. D.; HAUN, C. T.; VANN, C. G.; OSBURN, S. C. *et al.* Sarcoplasmic Hypertrophy in Skeletal Muscle: A Scientific "Unicorn" or Resistance Training Adaptation? **Front Physiol**, 11, p. 816, 2020.
- ROBERTS, M. D.; MCCARTHY, J. J.; HORNBERGER, T. A.; PHILLIPS, S. M. *et al.* Mechanisms of mechanical overload-induced skeletal muscle hypertrophy: current understanding and future directions. **Physiol Rev**, 103, n. 4, p. 2679-2757, 2023.
- RUPLE, B. A.; GODWIN, J. S.; MESQUITA, P. H. C.; OSBURN, S. C. *et al.* Myofibril and Mitochondrial Area Changes in Type I and II Fibers Following 10 Weeks of Resistance Training in Previously Untrained Men. **Front Physiol**, 12, p. 728683, 2021.
- VANN, C. G.; SEXTON, C. L.; OSBURN, S. C.; SMITH, M. A. *et al.* Effects of High-Volume Versus High-Load Resistance Training on Skeletal Muscle Growth and Molecular Adaptations. **Front Physiol**, 13, p. 857555, 2022.
- WANG, N.; HIKIDA, R. S.; STARON, R. S.; SIMONEAU, J. A. Muscle fiber types of women after resistance training--quantitative ultrastructure and enzyme activity. **Pflugers Arch**, 424, n. 5-6, p. 494-502, Sep 1993.
- WILBURN, D. T.; MACHEK, S. B.; ZECHMANN, B.; WILLOUGHBY, D. S. Comparison of skeletal muscle ultrastructural changes between normal and blood flow-restricted resistance exercise: A case report. 106, n. 11, p. 2177-2184, 2021.
- YANG, K.; CHEE, C. S.; ABDUL KAHAR, J.; TENGKU KAMALDEN, T. F. *et al.* Effects of blood flow restriction training on physical fitness among athletes: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**, 14, n. 1, p. 16615, Jul 18 2024.