



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



LEONARDO BREDA

# **EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO CONTÍNUO DE BAIXA INTENSIDADE E INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO AMPK/mTOR E ROCK EM FIBRAS MUSCULARES DE CONTRAÇÃO RÁPIDA EM RATOS**

Effects of acute continuous low-intensity physical and high-intensity interval training on the AMPK/mTOR and Rock pathway signaling in fast-twitch muscle fibers in rats

Limeira  
2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



LEONARDO BREDA

# EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO CONTÍNUO DE BAIXA INTENSIDADE E INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO AMPK/mTOR E ROCK EM FIBRAS MUSCULARES DE CONTRAÇÃO RÁPIDA EM RATOS

Effects of acute continuous low-intensity physical and high-intensity interval training on the AMPK/mTOR and Rock pathway signaling in fast-twitch muscle fibers in rats

*Tese apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na área de Ciências do Esporte.*

Orientador: Prof. Dr. José Rodrigo Pauli

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO LEONARDO BREDA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ RODRIGO PAULI.

Limeira  
2022

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas  
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

B743e Breda, Leonardo, 1987-  
Efeitos do exercício físico agudo contínuo de baixa intensidade e intervalado de alta intensidade sobre a via de sinalização das vias AMPK/mTOR e Rock em fibras musculares de contração rápida em ratos / Leonardo Breda. – Limeira, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: José Rodrigo Pauli.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Exercícios Físicos. 2. Fibras musculares esqueléticas. 3. Proteínas quinases ativadas por AMP. 4. mTORC1. 5. Quinases associadas a rho. I. Pauli, José Rodrigo, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

**Informações Complementares**

**Título em outro idioma:** Effects of acute continuous low-intensity physical and high-intensity interval training on the AMPK/mTOR and Rock pathway signaling in fast-twitch muscle fibers in rats

**Palavras-chave em inglês:**  
Exercise

Muscle fibers, Skeletal  
AMP-Activated protein kinases  
mTORC1

Rho-associated kinases

**Área de concentração:** Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Titulação:** Doutor em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Banca examinadora:**

José Rodrigo Pauli [Orientador]  
Leonardo Coelho Rabello de Lima  
Paulo Henrique Canciglieri  
Matheus Mantuanelli Roberto

Natália de Menezes Bassan

**Data de defesa:** 15-12-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0855-8864>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6057583576034711>

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Autor:** Leonardo Breda

**Título:** Efeitos do exercício físico agudo contínuo de baixa intensidade e intervalado de alta intensidade sobre as vias de sinalização AMPK/mTOR e Rock em fibras musculares de contração rápida em ratos

**Natureza:** Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na área de Metabolismo e Biologia Celular.

**Área de Concetração:** Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo.

**Instituição:** Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

**Data da defesa:** Limeira-SP, 15 de dezembro de 2022.

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Rodrigo Pauli– Orientador  
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Prof. Dr. Leonardo Coelho Rabello de Lima – Avaliador  
Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto (EEFERP) da Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Paulo Henrique Canciglieri – Avaliador  
Fundação Hermínio Ometto – FHO

Profa. Dra. Natalia de Menezes Bassan– Avaliador  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Prof. Dr. Matheus Mantuanelli Roberto– Avaliador  
Fundação Hermínio Ometto - FHO

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## DEDICATÓRIA

*A Deus pelo Dom da vida e pela emoção de viver esse momento. Aos meus pais José Reinaldo Breda (in memoria) e Ana Maria Rocha Breda, por sempre acreditar em meu potencial. A minha esposa Verônica N. R. Chinaglia Breda pelo amor e compreensão em todas as etapas dessa minha trajetória e principalmente por realizar mais um sonho a paternidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço à Deus por tudo! Por sempre orientar meu caminho, por me blindar e fazer com que todos os obstáculos sirvam de fortalecimento e para valorizar ainda mais esse momento.

A minha esposa Verônica, obrigado pelo amor, pelo companheirismo, pela compreensão e principalmente por acreditar, aceitar e compartilhar meu sonho, você é a minha maior incentivadora, obrigado por ser um dos pilares que sustenta a minha vida.

Aos meus pais José Reinaldo (in memoriam) e Ana Maria, obrigado pela vida, por me ensinarem valores como integridade, honestidade e perseverança, agradeço de coração por serem meu alicerce.

Aos meus sogros Geraldo e Marta, por toda ajuda e suporte emocional, agradeço por todo suporte para a realização desse sonho.

Aos meus avós Carlos (in memoriam) e Luiz, pessoas mais amadas do mundo, que cuidaram de mim e me apoiaram sem medir esforços em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Rodrigo Pauli, pela oportunidade, por acreditar no meu potencial, você foi muito mais do que um orientador, você me ensinou a entender todas as partes da pesquisa acadêmica e o quanto ela deve ser realizada com amor, calma e sabedoria. Agradeço por dividir seu conhecimento e informações corriqueiras que foram importantes para o meu crescimento e desenvolvimento profissional e principalmente pessoal.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Canciglieri, meu pai acadêmico, você é minha referência profissional! Obrigado por compartilhar seus conhecimentos e sempre me orientar na vida pessoal e profissional, obrigado por me ajudar no início da minha carreira acadêmica e ser um dos principais incentivadores em acreditar que eu seria capaz de enfrentar os desafios que nossa profissão oferece.

Aos professores, Profa. Ma. Maria Elisete Brigatti, Prof. Dr. Alessandro Tosim, Prof. Me. Washington Spolidori, Prof. Dr. João Carlos de Oliveira, Prof. Dr. Alécio Perotti Jr, Prof. Dr. Armindo Antônio Alves e Prof. Dr. Fernando Oliveira Catanho da Silva obrigado pelos anos de aprendizado e batalhas constantes em prol da melhoria acadêmica e profissional.

De modo muito importante, também quero agradecer aos alunos do Laboratório de Biologia Molecular do Exercício (LABMEX) em especial os amigos Rafael Calais Gaspar, Vitor Rosetto Muñoz, Gabriel Keine Kuga, Thaís Dantis Pereira de Campos e Raphael dos Santos Canciglieri. Ao laboratório de Genômica Nutricional (LABGEN) da FCA.

Quero agradecer aos professores do programa de pós-graduação em ciências da nutrição e do esporte e metabolismo da FCA pelas disciplinas ministradas e que muito contribuíram na minha formação acadêmica.

## EPÍGRAFE

*“Se uma pessoa não tem mais sonhos, perde o sentido da vida.  
Sonhar é preciso”.*

**Ayrton Senna**

## RESUMO

A intensidade de exercício físico é uma variável relevante para as respostas metabólicas do músculo esquelético durante e após as sessões de esforço. Os efeitos do exercício físico sobre a regulação de vias de sinalização envolvendo a AMPK (proteína quinase ativada por AMP), mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) e Rock (proteína Rho-quiase), que exercem ações cruciais relacionadas a captação de glicose e síntese proteica no músculo esquelético têm sido alvo constante de investigação na ciência. O objetivo desse estudo, foi avaliar os efeitos de dois protocolos de exercícios agudos, sendo o primeiro de exercício contínuo de baixa intensidade e o segundo de exercício intervalado de alta intensidade sobre a via de sinalização da AMPK, mTOR e Rock em músculo extensor longo dos dedos (EDL) nas primeiras horas que sucedem o exercício. Foram utilizados ratos Wistar jovens (6 semanas de vida), distribuídos nos grupos: Controle (CTL), ratos que não foram submetidos a nenhum protocolo de exercício físico; Exercício Contínuo (CONT), ratos que foram submetidos a uma sessão aguda de exercício físico contínuo de corrida em esteira de baixa intensidade (50% da velocidade máxima de corrida/40 min); Exercício Intervalado (INT), ratos que foram submetidos a uma sessão aguda de exercício físico Intervalado de corrida em esteira de alta intensidade (50 e 90% da velocidade máxima de corrida, com intervalo de 2 min/série/40 min). Foram realizadas análises de bioinformática, de desempenho, zoométricas, fisiológicas e de biologia molecular nos animais e amostras de músculo esquelético. A análise de bioinformática demonstrou que a AMPK e a Rock são moléculas que possuem afinidade, ambas participam da captação de glicose e esse fator confirma sua ativação. Além disso, algumas moléculas ligadas a família da Rho-quinase ainda não tem os seus papéis totalmente elucidados. Já a mTOR está ligada à síntese proteica, ou seja, durante o esforço físico o nível de fosforilação foi reduzido devido a prioridade referente à demanda energética. Em adição a essa análise podemos verificar que a Akt (Proteína quinase B/Akt) possui participação significativa na ativação das três moléculas de interesse. Em relação à análise molecular, os resultados demonstraram que ambos os protocolos de exercício físico aumentaram a fosforilação da AMPK no músculo EDL imediatamente (0h) após o exercício se comparados aos ratos CTL. Também foi verificado que a fosforilação da Acetil-CoA carboxilase (ACC) no músculo EDL também aumentou nos dois grupos de ratos exercitados (CONT e INT) após 3 horas da sessão de exercício em relação aos seus pares controles. No entanto, apenas ratos que realizaram exercícios intervalados de alta intensidade apresentaram aumento na fosforilação da AMPK no músculo EDL 3 horas após a sessão de exercício agudo. Além disso, a fosforilação de mTOR e P70S6 aumentaram no músculo EDL de ratos do grupo INT 3 horas após o exercício físico. Em relação à Rock, o conteúdo proteico aumentou no músculo EDL dos grupos de ratos exercitados (CONT e INT) logo após o término da sessão de exercício (0h) em relação aos ratos do grupo controle. Considerando esses achados, conclui-se que o exercício físico agudo intervalado de alta intensidade induziu aumentos mais significativos na fosforilação de AMPK e mTOR no músculo EDL nas primeiras horas (0 – 3h) ao final de uma sessão aguda de exercício. Já o conteúdo proteico da Rock aumentou no músculo EDL dos grupos de ratos exercitados (CONT e INT) logo após o término da sessão de exercício (0h) em relação aos ratos do grupo controle (CTL). Nossos dados apontam que diferentes estratégias para a prescrição do exercício podem ser de grande valia para ativação de vias ligadas à captação de glicose e hipertrofia muscular, contudo a intensidade ainda parece ser a chave para prolongar essa função biológica após a prática de exercício físico.

**Palavras-chave:** Exercício Físico. Intensidade. Fibras Brancas. AMPK/mTOR. Rock

## ABSTRACT

Physical exercise intensity is a relevant variable for skeletal muscle metabolic responses during and after effort sessions. The effects of physical exercise on the regulation of signaling pathways involving AMPK (AMP-activated protein kinase), mTOR (mammalian rapamycin target protein) and Rock (Rho-kinase protein), which exert crucial actions related to glucose uptake and protein synthesis in skeletal muscle have been a constant target of research in science. The aim of this study was to evaluate the effects of two protocols of acute exercise, the first of continuous low-intensity exercise and the second of high-intensity interval exercise on the AMPK, mTOR and Rock signaling pathway in the long extensor muscle of the fingers (EDL) in the first hours after the exercise. Young Wistar rats (6 weeks old) were used, divided into groups: Control (CTL), rats that were not submitted to any physical exercise protocol; Continuous Exercise (CONT), rats that were submitted to an acute session of continuous physical exercise running on a low intensity treadmill (50% of the maximum running speed/40 min); Interval Exercise (INT), rats that were submitted to an acute session of interval physical exercise running on a high-intensity treadmill (50 and 90% of the maximum running speed, with an interval of 2 min/set/40 min). Bioinformatics, performance, zoometric, physiological and molecular biology analyzes were performed on animals and skeletal muscle samples. The bioinformatics analysis demonstrated that AMPK and Rock are molecules that have affinity, both participate in glucose uptake and this factor confirms their activation. Furthermore, some molecules linked to the Rho-kinase family still do not have their roles fully elucidated. On the other hand, mTOR is linked to protein synthesis, that is, during physical exertion the level of phosphorylation was reduced due to priority regarding energy demand. In addition to this analysis, we can verify that Akt (Protein kinase B/Akt) has a significant participation in the activation of the three molecules of interest. Regarding the molecular analysis, the results demonstrated that both physical exercise protocols increased AMPK phosphorylation in the EDL muscle immediately (0h) after exercise compared to CTL rats. It was also verified that the phosphorylation of Acetyl-CoA carboxylase (ACC) in the EDL muscle also increased in both groups of exercised rats (CONT and INT) after 3 hours of the exercise session in relation to their control pairs. However, only rats that performed high-intensity interval exercise showed an increase in AMPK phosphorylation in the EDL muscle 3 hours after the acute exercise session. Furthermore, mTOR and P70S6 phosphorylation increased in the EDL muscle of INT group rats 3 hours after physical exercise. Regarding Rock, the protein content increased in the EDL muscle of the groups of exercised rats (CONT and INT) shortly after the end of the exercise session (0h) in relation to the rats of the control group. Considering these findings, it is concluded that acute high-intensity interval physical exercise induced more significant increases in AMPK and mTOR phosphorylation in the EDL muscle in the first hours (0 – 3h) at the end of an acute exercise session. The Rock protein content increased in the EDL muscle of the groups of exercised rats (CONT and INT) shortly after the end of the exercise session (0h) in relation to the rats of the control group (CTL). Our data indicate that different strategies for exercise prescription can be of great value for activating pathways linked to glucose uptake and muscle hypertrophy, however intensity still seems to be the key to prolonging this biological function after physical exercise.

**Keywords:** Physical Exercise. Intensity. White fibers. AMPK/mTOR. Rock

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Via de sinalização da insulina e captação de glicose no músculo esquelético.....	25
Figura 2	Sinalização da via AMPK.....	28
Figura 3	Sinalização da ativação AMPK e Insulina.....	30
Figura 4	Sinalização de mTOR após a prática de exercício .....	32
Figura 5	Sinalização da Proteína Rock em resposta ao exercício.....	36
Figura 6	Desenho experimental.....	43
Figura 7	Protocolo de Adaptação.....	44
Figura 8	Análise da Genemania.....	51
Figura 9	Análise da GEPIA.....	53
Figura 10	Análise da STRING.....	56
Figura 11	Análise dos Parâmetros Fisiológicos e de Desempenho.....	59
Figura 12	Efeitos do exercício agudo contínuo de baixa intensidade na via de sinalização AMPK e mTOR no músculo EDL de ratos Wistar.....	60
Figura 13	Efeitos do exercício agudo intervalado de alta intensidade sobre a via de sinalização da AMPK e mTOR no músculo EDL de ratos Wistar.....	61
Figura 14	Fosforilação da AMPK e mTOR 3h após a sessão aguda de exercício físico.....	62
Figura 15	Efeitos do exercício agudo contínuo de baixa intensidade sobre a via de sinalização da Rho-quinase no músculo EDL de ratos Wistar.....	63
Figura 16	Efeitos do exercício agudo contínuo de alta intensidade sobre a via de sinalização da Rho-quinase no músculo EDL de ratos Wistar.....	64
Figura 17	Efeitos do exercício agudo contínuo de baixa intensidade sobre a sinalização da Akt, IRS1632/635 e IRS1Y612 no músculo EDL de ratos Wistar.....	65
Figura 18	Efeitos do exercício agudo intervalado de alta intensidade sobre a sinalização da Akt, IRS1632/635 e IRS1Y612 no músculo EDL de ratos Wistar.....	66

Figura 19	Resumo dos resultados.....	66
-----------	----------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACC</b>	Acetil-Coa Carboxilase
<b>AICAR</b>	ribonucleotídeo 5-aminoimidazole – 4 – carboxamide
<b>Akt</b>	Proteína quinase B/Akt
<b>AMPK</b>	Proteína quinase ativada por AMP
<b>AMPK-MKO</b>	Camundongos que não expressam AMPK no músculo
<b>AS160</b>	Substrato da Akt de 160 Kda
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>CEMIBE</b>	Biotério Central da Unicamp
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no uso de Animal
<b>CONT</b>	Exercício Contínuo
<b>COX</b>	Citocromo C Oxidase
<b>CP</b>	Creatina fosfato
<b>CS</b>	Cintrato Sintase
<b>CTL</b>	Grupo Controle
<b>DM2</b>	Diabetes Mellitus do Tipo 2
<b>EDL</b>	Músculo extensor longo dos dedos
<b>FCA</b>	Faculdade de Ciências Aplicadas
<b>GEF</b>	Fator de troca de nucleotídeos guanina
<b>GLUT-4</b>	Transportador de glicose tipo 4
<b>GPCR</b>	Receptores acoplados a proteína G
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>HIIT</b>	Treinamento Intervalado de Alta Intensidade
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>INT</b>	Exercício Intenso
<b>IR</b>	Receptor de Insulina

<b>IRS-1</b>	Substrato do receptor de insulina 1
<b>IRS-2</b>	Substrato de receptor de insulina 2
<b>LAn</b>	Limiar Anaeróbio
<b>LIMK</b>	Proteína LIM-quinase
<b>MIRKO</b>	Nocautado do receptor de insulina no músculo
<b>MLC</b>	Cadeias leves de miosina
<b>MLCP</b>	MLC fosfatase
<b>mTOR</b>	Alvo da rapamicina em mamíferos
<b>MYPT-1</b>	Miosina fosfatase subunidade 1
<b>P70S6K</b>	Proteína ribossomal S6 quinase
<b>PCr</b>	Fosfocreatina
<b>PDK</b>	Quinase dependente de fosfatidilinositol
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Co-ativador ativado por proliferador do peroxissoma 1 alfa
<b>PI3-1</b>	Fosfatidilinositol-3quinase
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol bifosfato
<b>PIP3</b>	Fosfatilinositol trifosfato
<b>Rock</b>	Rho-quinase
<b>SBU</b>	Sistema de Bibliotecas da Unicamp
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TFAM</b>	Fator de transcrição mitocondrial A
<b>TTG</b>	Teste de tolerância à glicose
<b>VO<sub>2</sub>MÁX</b>	Consumo máximo de oxigênio

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	19
1.1	Captação de glicose no músculo esquelético e homeostase glicêmica.....	22
1.2	Mecanismo de captação de glicose mediada por insulina.....	24
1.3	A captação de glicose mediada pela proteína quinase ativada por AMP durante o exercício físico.....	27
1.4	Sinalização da mammalian target of rapamycin (mTOR) e a síntese proteica no músculo esquelético.....	31
1.5	Sinalização da Rho-quinase e captação de glicose mediada por insulina no músculo esquelético.....	33
1.6	Caracterização dos métodos de treinamento: contínuo e intervalado de alta intensidade.....	36
2	Objetivo.....	41
2.1	Objetivo Geral.....	41
2.1	Objetivo Específico.....	41
3	Metodologia.....	43
3.1	Animais.....	43
3.2	Adaptação ao ergômetro e ao exercício físico de corrida.....	43
3.3	Teste de carga incremental de corrida em esteira rolante .....	44
3.4	Protocolo de Exercício Agudo de corrida.....	45
3.4.1	Protocolo Contínuo em Esteira .....	45
3.4.2	Protocolo Intervalado de Alta Intensidade em Esteira .....	45
3.5	Análise da Lactacidemia.....	45
3.6	Teste de tolerância à glicose (TTG) .....	45
3.7	Extração tecidual e análise de Imunoblotting .....	46
3.8	Atividade da Rock .....	46
3.9	Análise da Bioinformática .....	47
3.10	Análise Estatística .....	48
4	Resultados .....	50
4.1	Análise da Bioinformática por Genemania.....	50
4.2	Análise da Bioinformática por GEPIA.....	53
4.3	Análise da Bioinformática por STRING .....	54

4.4	Exercícios agudos de corrida de alta intensidade induzem estresse metabólico mais significativo em ratos.....	58
4.5	O exercício agudo de corrida contínua de baixa intensidade aumenta a fosforilação da AMPK imediatamente após o exercício no músculo EDL de ratos.....	59
4.6	Exercício agudo de corrida intervalado de alta intensidade aumenta a fosforilação da AMPK e mTOR no músculo EDL.....	60
4.7	O exercício intervalado agudo de alta intensidade levou a aumentos mais significativos nas fosforilações de AMPK e mTOR no músculo EDL de ratos Wistar jovens.....	61
4.8	Exercício agudo de corrida contínuo de baixa intensidade aumenta o conteúdo proteico de Rock1 e Rock 2 no músculo EDL.....	62
4.9	Exercício agudo de corrida intervalado de alta intensidade aumenta o conteúdo proteico de Rock 1 e Rock 2 no músculo EDL.....	63
4.10	Exercício agudo de corrida contínuo de baixa intensidade aumenta a fosforilação da Akt no músculo EDL.....	64
4.11	Exercício agudo de corrida intervalado de alta intensidade aumenta a fosforilação da Akt e IRS1 no músculo EDL.....	65
4.12	Resumo dos resultados.....	66
5	Discussão.....	68
6	Conclusão.....	75
7	Referência.....	76
8	Apêndice.....	94
9	Anexo.....	97

## 1 INTRODUÇÃO

Tem sido demonstrado que o exercício físico é um potente estimulador de diferentes vias moleculares e dependendo das variáveis do treinamento como volume, intensidade, frequência e tipo de atividade pode haver interferência em processos relacionados à captação de glicose, biogênese mitocondrial, oxidação de gordura e hipertrofia no músculo esquelético (SOHAIL et al.,2019; GOZÁLEZ-CHÁVES et al.,2020; SCHEFFER & LATINI, 2020; WANG & ZHOU, 2021).

Tais adaptações orgânicas positivas ao organismo em resposta ao exercício físico são relevantes tanto para a saúde quanto para a performance. Dentre as variáveis supracitadas relacionadas ao exercício físico, a intensidade tem sido alvo de investigação em inúmeros estudos científicos (BLAZEK et al., 2016; KJØBSTED et al.,2018; FULLER et al., 2019; RYAN et al.,2020). Nesse contexto, a intensidade de exercício impacta na regulação de proteínas cruciais no músculo esquelético envolvidas com captação de glicose (FUJII et al., 2000; TREEBAK et al., 2007; ROSE et al., 2009; EGAN et al., 2010; BARTLETT et al., 2012; EDGE et al., 2013) e hipertrofia muscular (KUROSKA et al., 2012; PUGH et al., 2015; FYFE et al., 2016; KIKUCHI et al.,2016).

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é uma enzima chave que funciona como um sensor energético celular. Com o aumento da intensidade de exercício e conseqüente aumento da demanda energética (razão AMP/ATP) ocorre maior ativação da AMPK no músculo esquelético (GIBALA et al., 2009; RICHTER & RUDERMAN, 2009; HARDIE et al., 2012; O'NEILL, 2013; MARTON et al., 2015). Em adição, com aumento da intensidade de exercício há maior recrutamento de fibras musculares de contração rápida, ou seja, do tipo II (Henneman et al., 1965). A fibra do tipo II é predominantemente glicolítica e requer glicose e glicogênio para manutenção da atividade contrátil do músculo esquelético. Desse modo, a ativação da AMPK tem papel crítico para disposição de energia e manutenção da contração da fibra muscular do tipo II no exercício de alta intensidade.

Uma vez ativada, a AMPK participa de processos de restauração energética da célula, ou seja, estimula a captação de glicose, oxidação de gordura (MERRILL et al., 1997) e simultaneamente inibe a síntese de proteínas (BOLSTER et al., 2002). Após fosforilação a AMPK induz a ativação de proteínas adjacentes, como a enzima AcetilCoA carboxilase (ACC) favorecendo a oxidação de gordura e também

a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para o sarcolema aumentando a captação de glicose na musculatura esquelética (HERZIG & SHAW, 2018; KOH et al., 2019; YUAN et al., 2019; SHRESTHA et al., 2021). A ativação da AMPK e a translocação do GLUT-4 através do exercício físico é um importante mecanismo de captação de glicose independente de insulina (PEHMØLLER et al., 2009; FRØSIG et al., 2010; JESSEN et al., 2011; TREEBAK et al., 2014).

Os estudos pioneiros que investigaram o papel do exercício em ativar a AMPK tanto em roedores (WINDER & HARDIE, 1996) quanto em humanos (CHEN et al., 2000; FUJII et al., 2000; WOJTASZEWSKI et al., 2000) demonstraram que essa molécula tem crucial impacto na homeostase metabólica (HARDIE, 2007). Entretanto, os níveis de fosforilação da AMPK rapidamente retornam aos níveis basais ao término da atividade contrátil do músculo.

Em 2015, Kristensen e colaboradores demonstraram que a regulação da AMPK é dependente da intensidade do exercício e do tipo de fibra muscular em seres humanos. Interessantemente, após exercício contínuo (30 min de exercício de ciclismo em aproximadamente 70% do VO<sub>2</sub>pico) foi observado significativo aumento na fosforilação da AMPK, sem diferença entre os tipos de fibras (tipo 1 e tipo 2) (KRISTENSEN et al., 2015). No entanto, imediatamente após o término do treinamento intervalado de ciclismo (6 séries/1,5 min a 100% do VO<sub>2</sub>pico) com intervalo de recuperação ativa (40% do VO<sub>2</sub>pico/por 2.5 min) a fosforilação da AMPK no resíduo Treonina 172 (Tre172) não teve aumento significativo em fibras do tipo 1, porém houve aumento significativo (184%) nas fibras do tipo 2 em homens jovens saudáveis. Esse ensaio aponta uma importante reflexão sobre a influência da intensidade do exercício e sua ativação em fibras brancas.

Em contraste com a sinalização da AMPK a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma serina/tirosina quinase integradora intracelular que recebe sinais de fatores de crescimento, nutrientes e do metabolismo, cuja fosforilação resulta em diversas atividades celulares ligadas ao crescimento celular (MANNING & CANTLEY, 2007; ZONCU et al., 2011; DAN et al., 2014). Sua função está relacionada com a tradução de RNAm e crescimento celular por meio da fosforilação da proteína-chave ribossomal S6K (S6K), conhecida como p70-S6K (PARKINGTON et al., 2003; FUJITA et al., 2007; DREYER et al., 2010).

Estudos prévios demonstraram que o exercício físico, principalmente o treinamento de força, é capaz de aumentar a ativação da mTOR (BODINE et al., 2001;

DREYER et al., 2008; HULMI et al., 2009; APRO & BLOMSTRAND, 2010; KAKIGI et al., 2011). No entanto, tem sido observado que o exercício intervalado de alta intensidade aplicado em diferentes aparelhos (esteira, cicloergômetro, etc.) pode ser uma estratégia capaz de promover a ativação de vias moleculares semelhantes às observadas pelo exercício resistido (COFFEY et al., 2009a; MCRAE et al., 2012; MACINNIS & GIBALA, 2017). Dessa maneira, o exercício intervalado com variação da intensidade de esforço pode ser uma alternativa para aumentar a fosforilação de mTOR quando aplicado com uma intensidade que favoreça o aumento do recrutamento de unidade motora (HAMILTON & PHILP, 2013).

Durante o exercício físico, a AMPK está mais ativa do que a mTOR, e isso está relacionado com as necessidades de suprir as demandas energéticas, porém após a realização do esforço físico a mTOR ,tem atividade intracelular aumentada, principalmente ligada à reconstrução muscular, com ativação permanecendo por um longo período (HULMI et al., 2009; KAKIGI et al., 2011; GARCIA & SHAW., 2017; DAMAS et al., 2018; JANZEN et al., 2018; KJOBSTED et al., 2018).

Desse modo, compreender a regulação das vias da AMPK e mTOR em respostas a diferentes propostas de exercício físico pode ser promissor para obtenção de uma melhor resposta metabólica e para o desempenho. Além disso, explorar o envolvimento de outras vias moleculares capazes de promover melhorias em processos como a captação de glicose no músculo esquelético é muito importante para obtenção de avanços na área do conhecimento em ciências do exercício físico para que seja direcionado à saúde ou ao desempenho.

Recentemente, uma nova molécula tem apresentando grande importância na via da sinalização da insulina, a proteína *Rho-quinase* (Rock). Essa molécula tem ação em tecidos periféricos (músculo, fígado e adipócitos) (FURUKAWA et al.,2005) assim como no sistema nervoso central (HUANG et al., 2012). Os estudos apontam que a Rock contribui com até 50% dos efeitos da sinalização da insulina nas células desses tecidos (MUÑOZ et al., 2020; MUÑOZ et al.,2021).

Em 2005, Furukawa e colaboradores demonstraram que a inibição dessa proteína induzia a resistência à insulina em camundongos. A ativação dessa molécula sobre a via da sinalização da insulina ocorre através da fosforilação dos resíduos de ser632/635 do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), esses resíduos fosforilados intensificam a via da insulina ampliando a captação de glicose no músculo esquelético (BEGUM et al., 2002; FARAH, 1998; FURUKAWA et al., 2005).

Em relação ao aumento da atividade da Rock mediada pelo exercício físico, Muñoz e colaboradores (2018), foram os pioneiros a analisar essa correlação. Esse elegante estudo utilizou ratos Fisher 344 (3 meses de idade), que foram submetidos a um protocolo de curta duração de natação, com um volume de duas horas por dia e uma intensidade de 1,5% do peso corporal. Como resultados apresentados, verificou-se um aumento no conteúdo e na atividade da Rock.

Além de intensificar a sinalização da insulina, a Rock tem uma relação com a sinalização da AMPK (KANAZAWA et al., 2009; NODA et al., 2014), que ainda precisa ser esclarecida em resposta ao exercício físico. Por isso, entender como se comportam a AMPK, mTOR e a Rock nas primeiras horas após sessão aguda de exercício físico, seja contínuo de baixa intensidade ou intervalado de alta intensidade poderá contribuir de maneira importante para elucidar das adaptações específicas sobre essas vias moleculares em músculo com predominância de fibras rápidas.

Consideramos que o exercício físico de corrida em esteira intervalado de alta intensidade seja capaz de promover aumento na sinalização das vias da AMPK, mTOR e da proteína Rock nas primeiras horas após o exercício físico (0-3 horas) no músculo EDL em comparação ao exercício contínuo de baixa intensidade. Então, tal regulação das proteínas AMPK, mTOR e Rock pode contribuir para melhores respostas relacionadas ao metabolismo energético e reconstrução do músculo esquelético.

### **1.1 Captação de glicose no músculo esquelético e homeostase glicêmica.**

Há muito tempo inúmeros estudos demonstram que o exercício físico desempenha papel primordial para a manutenção da saúde e prevenção de doenças (GUALANO & TINUCCI, 2011). Esse reconhecimento já era visto na Grécia antiga nas obras do filósofo Hipócrates e suas reflexões mencionavam que o exercício físico associado com uma alimentação adequada poderia promover saúde e prevenir doenças (MACEDO et al, 2012).

Apesar de Hipócrates realizar argumentos considerados modernos para sua época, foi somente nas últimas décadas com o surgimento de novas metodologias na área de biologia molecular que foi possível verificar que o exercício físico promovia adaptações fisiológicas e moleculares, e que adaptações acontecem durante e logo

após a uma sessão de esforço físico, permitindo com isso avanços consideráveis na compressão de mecanismos intracelulares relacionados a diferentes processos como captação de glicose, hipertrofia do músculo, biogênese mitocondrial, entre outros (GUALANO & TINUCCI, 2011).

Nesse cenário, uma das linhas de pesquisa com grande relevância na área do exercício é o entendimento do efeito do exercício físico em relação a captação de glicose, principalmente ocorrida no músculo esquelético. O músculo esquelético por ser abundante no organismo, tem ações relevantes sobre o metabolismo e está diretamente relacionado com os estímulos promovidos pelo esforço físico, sendo esse mecanismo alvo de inúmeros estudos científicos (PAULI et al, 2009; SAMUEL & SHULMAN 2012; CAMPOREZ et al, 2013). O tecido muscular esquelético representa por volta de 45% da massa corporal total e exerce papel fundamental no metabolismo da glicose, atuando na captação, metabolização e armazenamento dessa molécula (FEBBRAIO et al., 2004).

O estímulo promovido pelo exercício físico de ordem regular ativa mecanismos moleculares envolvidos com a captação de glicose e tais mecanismos têm sido amplamente explorados, uma vez que a homeostase glicêmica é fundamental tanto para o desempenho físico como para a manutenção da saúde. O estudo pioneiro em verificar o efeito da contração muscular na captação de glicose foi promovido por Chaveau & Kaufmann (1887), onde demonstraram redução dos níveis de glicose em cavalos que foram submetidos a uma dosagem arteriovenosa de glicose durante a contração do músculo masseter no processo da mastigação em cavalos.

Em 1926, Lawrence constatou que o exercício físico pode aumentar os efeitos da insulina, promovendo um aumento no consumo de glicose e internalização, sugerindo que o exercício físico poderia ser importante para o tratamento de pacientes diabéticos. A partir da década de 50, outros estudos demonstraram que o exercício físico aumentava a utilização de glicose tanto em animais quanto em seres humanos (CHRISTOPHE & MAYER, 1958; GOLDSTEIN et al., 1953).

Nesse contexto, a captação de glicose está diretamente relacionada com o conteúdo e a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) para a membrana (REN et al., 1994; HOST et al., 1998). Em relação ao exercício físico, esse efeito celular pode permanecer ativo por até 48 horas após o término do esforço físico, porém vale destacar que o volume e a intensidade do protocolo são determinantes para promover esse impacto (COYLE et al., 1983). Tais respostas ao exercício físico

geram adaptações orgânicas que são relevantes para a saúde, conseqüentemente a prática de maneira crônica promove essas ações biológicas. Após a identificação do GLUT-4, outros estudos foram promovidos demonstrando que o esforço físico aumenta a captação de glicose no músculo esquelético (CHARROM et al., 1989; LUCIANO et al., 2002; CHRIST-ROBERTS et al., 2004).

Stenbit e colaboradores (1997), utilizaram animais nocaute para esclarecer melhor a importância do GLUT-4 na captação de glicose no músculo esquelético. Os camundongos nocautes para esse transportador (GLUT-4<sup>-/-</sup>) apresentaram alterações relevantes no metabolismo da glicose e manifestaram o diabetes tipo 2 (DM2), sendo tais mudanças biológicas diretamente relacionadas com a diminuição da captação de glicose promovida pelo tecido muscular, de modo a comprovar que o GLUT-4 é fundamental para a captação de glicose no músculo esquelético.

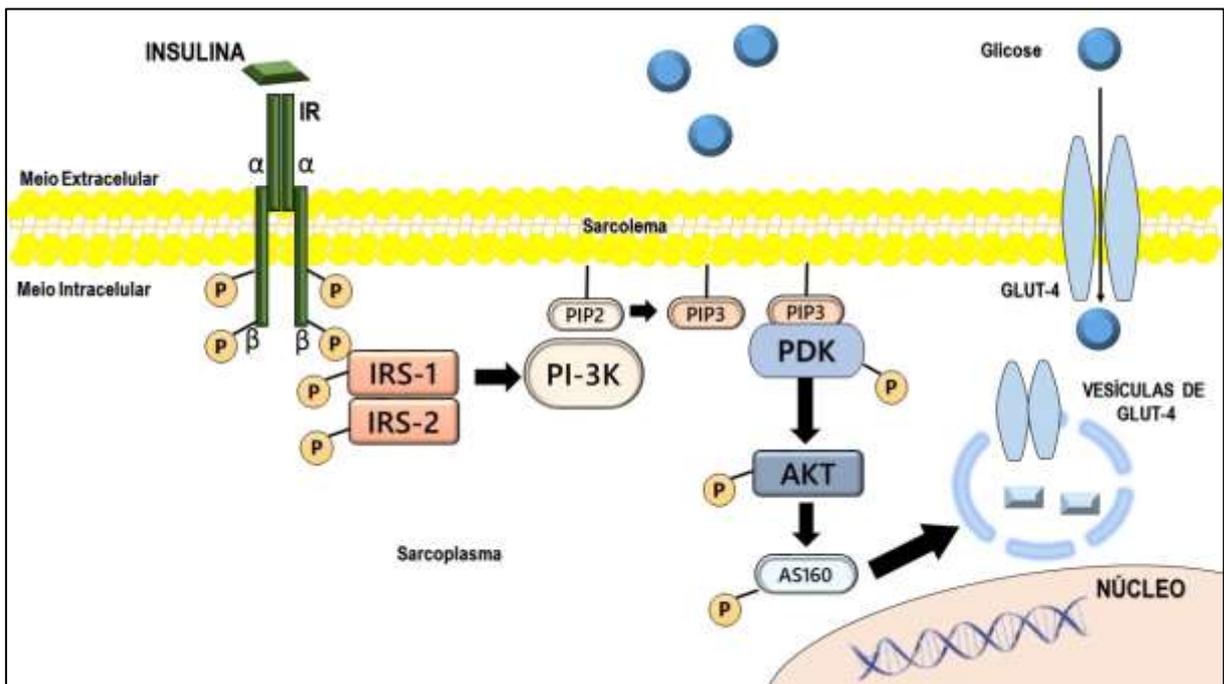
Uma vez que as evidências demonstraram que a contração muscular promovia o aumento na captação de glicose, as vias independentes de insulina começaram a ser investigadas para verificar a sua contribuição em relação a esse processo promovido pelo esforço físico. Vale ressaltar que alguns ensaios foram capazes de constatar a captação de glicose promovida pelo exercício físico na ausência de insulina, propondo que o recrutamento muscular sinaliza moléculas intracelulares que ativam a translocação de GLUT-4 mesmo sem a liberação desse hormônio (UMPIERRE et al., 2011; WAY et al., 2016).

## **1.2 Mecanismo de captação de glicose mediada por insulina.**

A insulina é um hormônio formado por 51 aminoácidos fragmentados em duas cadeias: cadeia A, constituída de 30 aminoácidos; e cadeia B, formada por 21 aminoácidos. Esse hormônio é sintetizado pelas células  $\beta$  pancreáticas devido ao aumento de glicose circulante. Suas principais funções são: aumento da captação e glicose em tecidos insulino-dependentes; aumento na síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio; inibição de processos catabólicos (CARTEE, G.D., 2015; FRITZEN, et al., 2016; FRANK et al., 2018; DUNGAN et al., 2019)

A captação de glicose promovida pela ação da insulina ocorre quando esse hormônio se liga em seu receptor de membrana (receptor de insulina ou IR), ocorrendo uma modificação estrutural no IR ocasionando sua auto fosforilação em resíduos de

tirosina. Isso proporciona a transdução do sinal da insulina para o interior da célula. Na continuação desse mecanismo os substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) são fosforilados em tirosina, quando isso acontece ocorre a associação da fosfatidilinositol-3quinase (PI3-q) aos receptores de insulina conduzindo a fosforilação do fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) para ativar o fosfatilinositol trifosfato (PIP3). Isso possibilita que a quinase dependente de fosfatidilinositol (PDK) seja ativada. Desse modo a proteína quinase B/Akt (Akt) é fosforilada nos resíduos de serina/treonina, isso automaticamente viabiliza a ativação da AS160 (substrato da Akt de 160 Kda) sensibilizando a translocação do GLUT-4 do retículo sarcoplasmático para o sarcolema, em seguida ocorre a captação de glicose do meio extracelular para o meio intracelular (BOUCHER et al. 2014; LETO et al. 2012; SALTIEL et al. 2001). A figura 1, ilustra o mecanismo de captação de glicose mediado pela insulina.



**Figura 1. Via de sinalização da insulina e captação de glicose no músculo esquelético.** A insulina se liga ao receptor da membrana (IR) de insulina e com isso proporciona uma cascata de sinalização intracelular, ativando os substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2), a fosfatidilinositol-3-quinase (PI-3K), a quinase dependente de fosfatidilinositol de membrana (PDK), a proteína quinase B (Akt) e o transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4). Em seguida acontece o efeito biológico final da translocação do GLUT-4 para a captação de glicose do meio extracelular para o intracelular no músculo esquelético (Adaptado de Pauli et al., 2009).

Inúmeros estudos apontam que qualquer comprometimento desta via pode reduzir a captação de glicose, resultando em alterações fisiológicas relevantes que podem contribuir para o desenvolvimento de novas patologias ligadas ao metabolismo como o Diabetes *Mellitus* do Tipo 2 (DM2) (KALWAT & COBB, 2017; RORSMAN & ASHCROFT, 2018; ZHAO et al., 2019; CHAWLA et al., 2020; AWAD et al., 2021).

No entanto, o organismo pode suprir em determinado momento algum comprometimento que possa estar ocorrendo com a via da insulina. Em 2006, He e colaboradores utilizaram animais MIRKO (*muscle insulin receptor knockout*) para demonstrar que o organismo compensa a ausência do receptor de insulina por meio do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*insulin like growth factor 1* ou *IGF-1*), contribuindo para o não desenvolvimento do diabetes severo, indicando que outras moléculas podem gerar esse papel compensatório diante a prejuízos de certos sinais metabólicos.

Além disso, o exercício físico é um importante estimulador fisiológico na captação de glicose no músculo esquelético. Apesar de não aumentar a autofosforilação do receptor de insulina, o exercício físico é capaz de aumentar a fosforilação de alguns substratos desses receptores os quais ativam proteínas importantes no transporte da glicose (FERRARI et al., 2019; BATTISTA et al., 2021; MCKEEGAN et al., 2021).

O exercício físico promove aumento no fluxo sanguíneo e do recrutamento de capilares para aqueles grupos musculares que estão ativos. Essa vasodilatação amplia a superfície disponível para o transporte de glicose. No decorrer da contração muscular, os níveis de insulina intracelular não sofrem muitas modificações mesmo estando reduzidos nos níveis plasmáticos decorrente ao aumento do fluxo sanguíneo. Em associação à contração muscular, a ação da insulina e o aumento do fluxo sanguíneo contribuem para sinalizar a translocação do GLUT-4 aumentando a captação de glicose no tecido muscular (DEFRONZO et al., 1981).

A sinalização da insulina aumenta a quantidade de GLUT-4 na membrana por ampliar o estímulo à exocitose, ao mesmo tempo que as contrações musculares não só fazem aumentar à exocitose, como favorecem a redução a taxa de endocitose do GLUT-4. Esse fator biológico é uma das justificativas para o efeito complementar promovido pelo exercício físico à ação da insulina na captação de glicose, promovendo maior sensibilidade ao hormônio no organismo (PLOUG et al., 1987). Em adição, o exercício físico é capaz de induzir a ativação de uma série de proteínas que

desencadeiam alterações funcionais e/ou estruturais de outras moléculas que permitem uma ativação de eventos em cascata, favorecendo a translocação do GLUT-4 e estimulando a captação de glicose (DELA et al., 1993).

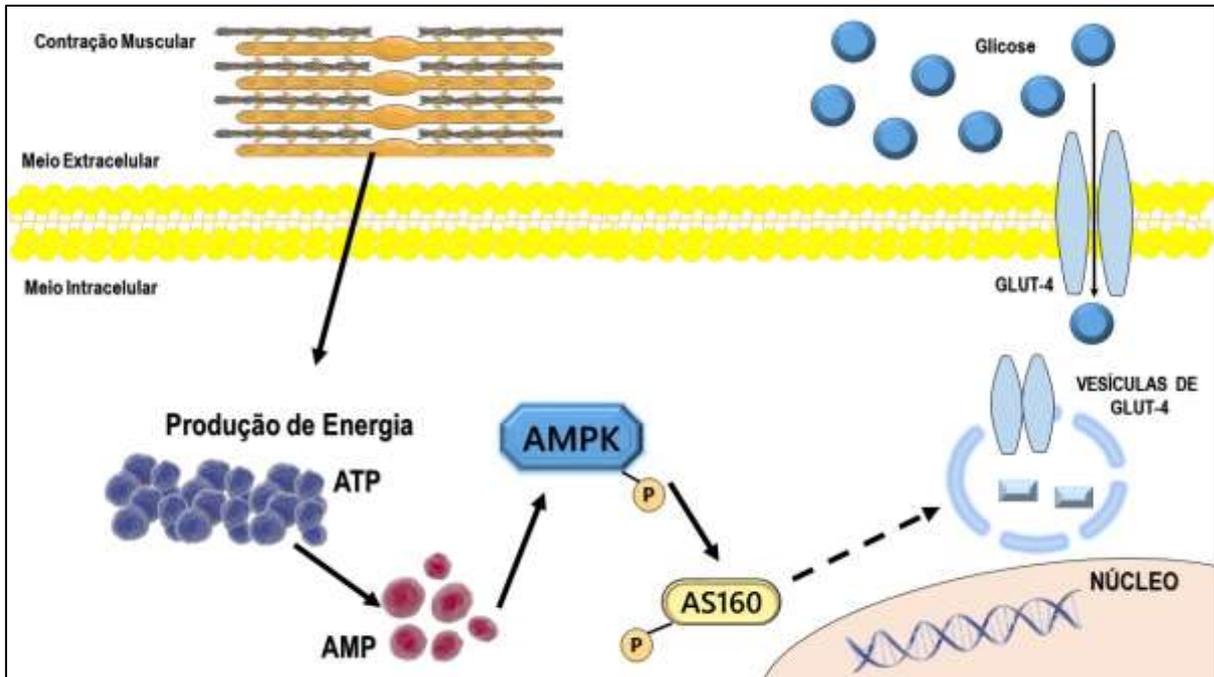
Os efeitos adjacentes que ocorrem após a ligação da insulina no músculo esquelético são específicos e regulados e qualquer deficiência nessa cascata de sinalização pode colaborar para o aumento dos níveis de glicose circulante. Porém existem “caminhos alternativos” para a captação de glicose que são independentes da presença de insulina, como a ativação dessa sinalização mediada pelo exercício físico, demonstrando papel primordial para esse fenômeno biológico.

### **1.3 A captação de glicose mediada pela proteína quinase ativada por AMP durante o exercício físico.**

A AMPK foi identificada na década de 80, como uma enzima fundamental para a manutenção energética intracelular principalmente durante a execução do exercício físico ou pela privação alimentar. Essa molécula heterotrimétrica contém uma subunidade catalítica  $\alpha$  e duas subunidades regulatórias  $\beta$  e  $\gamma$ . A AMPK é fosforilada pelo resíduo de treonina na posição 172 da alça de ativação da subunidade  $\alpha$ , causada pela redução energética celular. Vários estudos apontam a sinalização dessa via em diferentes processos metabólicos: lipólise (adiposo), metabolismo de lipídeos (músculo e adiposo), transporte de glicose (músculo e adiposo), metabolismo de glicogênio (músculo e fígado) e controle de ingestão alimentar (hipotálamo). A funções biológicas da AMPK em resposta ao exercício são de suma importância para o controle da homeostase glicêmica (HOFFMAN et al., 2015; RANA et al., 2015; HUYNH et al., 2016; HERZIG & SHAW, 2017; GLOSSE & FÖLLER, 2018; WU & ZOU, 2020)

Em respostas aos efeitos fisiológicos promovidos pelo exercício físico o aumento da demanda energética ocasiona uma depleção dos níveis de Adenosina Trifosfato (ATP), que são ressintetizados de maneira rápida e eficaz para manter a homeostase no organismo. Porém na formação energética o organismo não consegue ressintetizar a molécula de ATP na mesma velocidade de seu consumo, devido a uma série de fatores, entre eles a diminuição da enzima de creatina fosfato (CP) ou até mesmo de glicose. A contração muscular promove o aumento do consumo de glicose

através da Proteína Quinase Dependente de AMP (AMPK). Essa função fisiológica que associa a conexão das pontes de actina com a miosina proporcionam um gasto energético que favorece a ativação da proteína AMPK. A figura 2, ilustra a ativação dessa via a partir da contração muscular.



**Figura 2. Sinalização da via AMPK.** O estímulo para captação de glicose ocorre através da contração muscular. Quando ocorre a conexão dos filamentos de actina pelos filamentos de miosina acontece o aumento do gasto energético. O aumento dessa razão AMP/ATP ocasiona a fosforilação da proteína AMPK que conseqüentemente expressa a ativação dos transportadores de glicose. (Adaptado de Pauli et al., 2009).

O exercício físico promove a principal condição fisiológica para a ativação da AMPK. Em resposta à contração muscular, ocorre o aumento da demanda energética e a depleção dos níveis de ATP, que são imediatamente ressintetizados para manter o aporte energético. Perante a situação em que a relação AMP:ATP é aumentada, acontece a mudança conformacional da molécula, favorecendo sua ativação. Quando essa molécula está ativa ocorre o aumento de ATP e a oxidação de ácidos graxos e simultaneamente redução de vias metabólicas que consomem energia, como a formação de ácidos graxos. A fosforilação da AMPK em resposta ao exercício está envolvida na captação de glicose em animais e humanos, mediada pelo aumento da translocação do GLUT-4 para a membrana celular (TREEBAK et al.,

2006). Está bem estabelecido que a contração muscular por eletroestimulação (*in situ*) e a contração muscular de ratos aumentam significativamente a fosforilação da AMPK. Além disso, protocolos no ciclismo podem promover o aumento dessa molécula em humanos, porém, a ativação é dependente da intensidade e da duração do esforço.

Outro fator que é determinante para influenciar a ativação dessa via é o condicionamento físico. Coffey e colaboradores (2006), demonstram que a ativação dessa via é reduzida de acordo com a adaptação do indivíduo em relação ao exercício e esse fator é um indicativo para melhoria na capacidade oxidativa das fibras musculares. Vale ressaltar que além do condicionamento físico influenciar na ativação da AMPK, a intensidade do exercício também possui papel relevante para essa sinalização; protocolos de intensidade moderada e de alta intensidade parece ser os mais relevantes para essa ativação.

Experimentos com animais demonstraram que ativação da AMPK no músculo esquelético promove a degradação de lipídeos e o aumento da ressíntese de glicogênio em resposta ao treinamento de força (COFFEY et al., 2006). Posteriormente, foram realizados alguns ensaios utilizando inibidores para a AMPK, um deles foi o composto C, que comprovaram que a ação dessa proteína é necessária para a captação de glicose estimulada pelo ribonucleotídeo 5-aminoimidazole – 4 – carboxamide (AICAR) (JENSEN, et al., 2009).

O estímulo da contração muscular ativa a proteína AMPK favorecendo o aumento da captação de glicose por estimular a translocação do GLUT-4 até a membrana pelo processo de exocitose, além de reduzir a velocidade do processo inverso pelo processo de endocitose, tal função biológica é um estímulo complementar proporcionado pela contração muscular, contribuindo para a entrada da glicose na célula muscular esquelética e otimizando a utilização desse substrato (GOODYEAR et al., 1998).

As ações promovidas pela fosforilação da AMPK promovem a melhora na sensibilidade à insulina no tecido muscular esquelético, sendo esta relação diretamente relacionada com a resposta ao exercício físico. Animais AMPK-MKO (camundongos que não expressam AMPK no músculo esquelético – AMPK Muscle Knockout), e portanto, não possuem atividade da AMPK, demonstraram diminuição na resistência ao exercício e na captação de glicose ocasionada pela contração muscular, porém esse fator não afetou a tolerância à glicose muito menos a



O efeito agudo promovido pelo exercício físico sobre a captação de glicose pode ser avaliado em períodos variáveis, que podem se estender até 48 horas após a prática de exercício físico (HOLLOSZY, 2005; BOGARDUS et al., 1983). Todavia, alguns ensaios destacam que a prática frequente de exercício físico seria capaz de prevenir a resistência à insulina como uma medida não-farmacológica efetiva de baixo custo para a prevenção dessa doença (GOODYEAR et al., 1998). Analisando os estudos abordados e diversos outros da literatura, a proteína AMPK é um importante alvo de estudo para ensaios futuros pois essas metodologias podem aprimorar o combate de doenças crônicas não degenerativas como a obesidade e o diabetes. Em busca da compreensão de como combater as doenças crônicas não degenerativas, outras moléculas foram surgindo e apresentaram grande importância na contribuição da sinalização da insulina. As verificações dessas vias em resposta ao exercício podem ser determinantes para compreender como podemos utilizar as diferentes metodologias para corroborar com os tratamentos dessas patologias.

#### **1.4 Sinalização da *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e a síntese proteica no músculo esquelético**

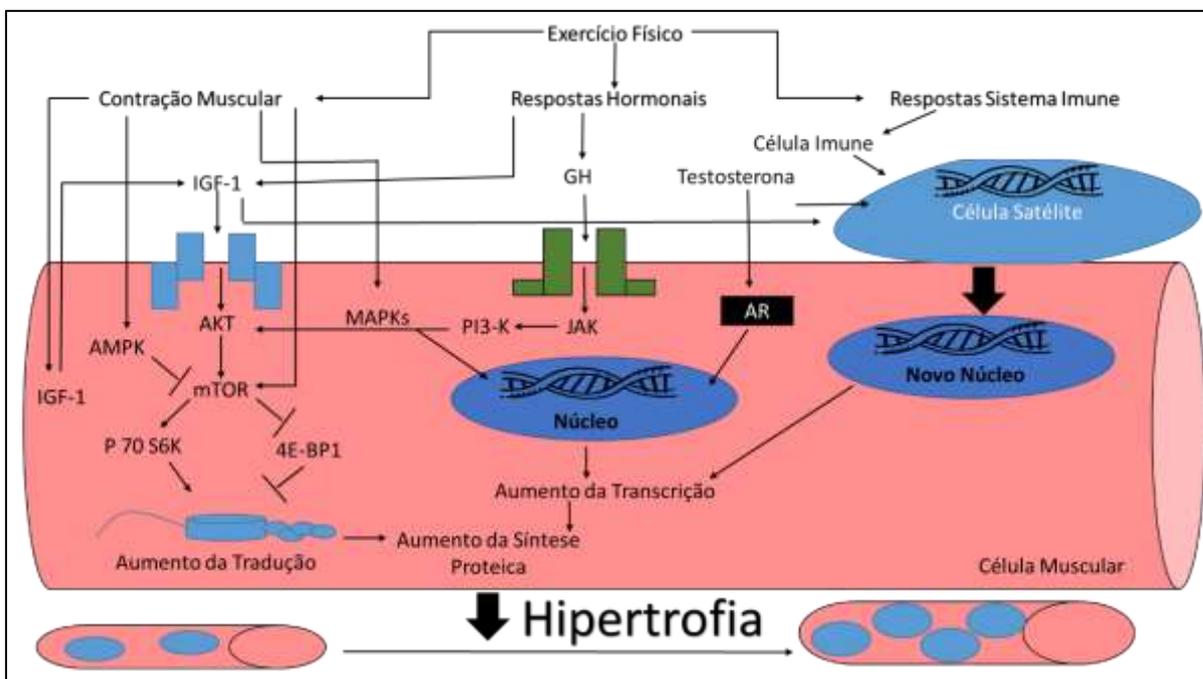
No início dos anos 90, a identificação da proteína mTOR uma serina/treonina, pertencente a sinalização PI3K/Akt que realiza atividades celulares como: transcrição, tradução, estabilização proteica, o volume de mRNA, biogênese ribossomal e a organização do citoesqueleto. Essa molécula foi classificada como uma integradora intracelular que recebe sinais de fatores de crescimento, nutrientes e do metabolismo energético (CORTOT et al., 2006; MORETTI et al., 2007 SCHENONE et al., 2011).

A mTOR encontra-se em dois complexos, a mTORC1 e a mTORC2. A mTORC1 é um complexo sensível à rapamicina, o qual inclui as proteínas mTOR, mLST8 (*lethal with SEC13 protein 8*) e Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*). Sua função está relacionada ao controle de tradução de RNAm e ao crescimento celular por meio da fosforilação de proteínas-chave como S6K (*ribosomal protein S6 kinase*) (LONG et al., 2005; JIANG et al., 2008; SCHENONE et al., 2011).

O complexo mTORC2, diferencialmente do mTORC1 não é sensível à rapamicina, é formado por mTOR, mLST8 e Rictor (*rapamycin-insensitive companion*

of *mTOR*). Uma de suas funções é fosforilar a Akt em serina na posição 473 induzindo a ativação completa dessa proteína. Além disso a mTORC2 está associada no controle da dinâmica da actina no citoesqueleto.

A fosforilação da mTOR, possui associação com o aumento da síntese proteica no músculo esquelético, o aumento do recrutamento de fibras musculares durante a contração de exercício (figura 4), pode amplificar essa sinalização e favorecer o anabolismo nesse tecido. A figura 4, ilustra a ativação dessa via após a prática de exercício físico.



**Figura 4. Sinalização de mTOR após a prática de exercício.** Desenho esquemático sobre a hipertrofia no músculo esquelético após a prática de exercício físico. Estímulo de moléculas que resultam na fosforilação das proteínas intracelulares envolvidas na hipertrofia muscular celular (Adaptado de Zeng et al., 2020).

O exercício físico é uma estratégia eficaz para aumentar a força e a hipertrofia muscular e vários estudos demonstram que a fosforilação de mTOR é aumentada durante o período pós exercício físico (LLOYD et al., 2017; SONG et al., 2017; ZENG et al., 2020; JONES et al., 2021). Por essa razão, pesquisadores analisam diferentes protocolos de exercício e a resposta referente à sinalização de mTOR.

A mTOR pode ser ativada em resposta à sessão aguda de exercício físico. Contudo, para estender sua sinalização a manipulação das variáveis de treino é fator crucial para prorrogar seus efeitos moleculares. O aumento da intensidade de exercício promove um desequilíbrio na homeostase que conseqüentemente leva à reorganização das respostas fisiológicas, favorecendo a ativação dessa molécula.

Souza e colaboradores (2013) utilizaram ratos para investigar os efeitos agudos do exercício físico em diferentes protocolos e a ativação de mTOR. Esses autores mostraram que após 2h de exercício não houve ativação dessa molécula, então eles hipotetizaram que a ausência da ativação de mTOR pode estar atrelada à intensidade do exercício.

Em 2014, Ogasawara e colaboradores avaliaram se a ordem dos estímulos influenciaria diretamente na sinalização de mTOR. Os pesquisadores utilizaram ratos da linhagem Sprague-Dawley e fizeram uma avaliação temporal da fosforilação de mTOR e p70S6k, após a execução de diferentes sessões de exercício. Os autores revelaram que as respostas moleculares rápidas (0 e 120 minutos após a sessão de exercício físico), são influenciadas pela ordem dos estímulos aplicados. Os autores ainda destacaram que uma série de endurance após o exercício resistido pode reduzir a síntese proteica ativada pela mTOR. Essa influência é decorrente da utilização das magnitudes de treinamento (volume e intensidade).

Todavia alguns ensaios destacam que a prática frequente de exercício físico seria capaz de favorecer as adaptações musculares e melhorar a ativação de mTOR. Analisando os estudos abordados e diversos outros da literatura, essa proteína é um importante alvo de estudo para ensaios futuros, pois essas metodologias podem aprimorar o combate de doenças musculoesqueléticas. Em busca da compreensão de como prolongar essa ativação, as verificações dessas moléculas em resposta ao exercício físico podem ser determinantes para compreender e melhorar a prescrição de exercício físico.

### **1.5 Sinalização da Rho-quinase e captação de glicose mediada por insulina no músculo esquelético**

Nas últimas décadas tem sido demonstrado que a Rho-quinase (Rock) participa de maneira importante da sinalização da insulina no músculo esquelético,

contribuindo com um aumento de até 50% na sinalização da insulina nesse tecido (FURUKAWA et al., 2005). Com isso, a proteína Rock tem sido alvo de investigação e se mostra promissora na melhora da homeostase glicêmica (HUANG et al., 2012).

A Rock é uma proteína serina/treonina quinase ligante ao GTP e possui duas isoformas Rock1 e Rock2 (NAKAGAWA et al., 1996; LEUNG et al., 1995). A ativação dessa proteína é mediada por outras duas moléculas RhoA e RhoE (RIENTO et al., 2003). A ativação da RhoA acontece quando se liga ao GTP e inativa quando se liga ao GDP, sendo a reação mediada por duas enzimas, a GEF (fator de troca de nucleotídeos guanina) e a GAP (proteína ativadora de GTPase). Quando a GEF é ativada ocasiona o estímulo dos receptores acoplados a proteína G (GPCR) através da via Gαq e Gα12/13, para ser inativa, a RhoA sofre ação GAP promovendo hidrólise do GTP em GDP. Após essa ativação, a RhoA/GTP se conecta ao domínio de ligação presente na Rock gerando uma mudança de conformação em seu domínio quinase, porém em compensação quando há ligação da RhoE ao terminal N da Rock ocorre a inativação (RIENTO et al., 2003; RIKITAKE et al., 2005).

Em 2005, Furukawa e colaboradores em um elegante estudo revelaram que a Rock colabora com o aumento da captação de glicose no músculo esquelético através de seu efeito sobre proteínas chaves da via de sinalização da insulina. O aumento do conteúdo de Rock e da sua atividade induz aumento na fosforilação dos resíduos de serina 632/635 do IRS-1 em resposta ao estímulo com insulina e provoca um aumento na fosforilação da Akt e conseqüentemente da captação de glicose no músculo esquelético (FURUKAWA et al., 2005; BEGUM et al., 2002; FARAH et al., 1998).

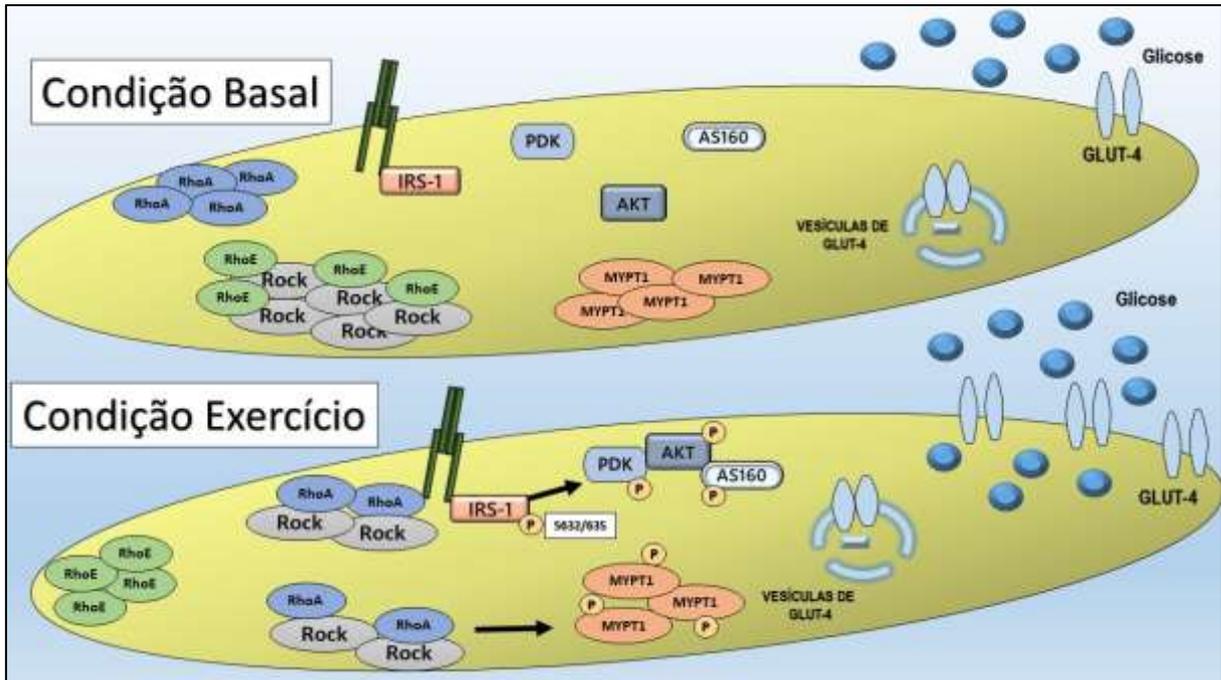
As isoformas da proteína Rock (Rock1 e Rock2), apresentam o mesmo peso molecular (160KDa) (RIENTO et al., 2003). Além de contribuir para a sinalização da insulina, essas proteínas possuem outras funções celulares como: adesão celular, organização da actina, motilidade celular e vascular e na contração do músculo liso (AMANO et al., 1996). Quando a proteína Rock está ativa, ela fosforila as cadeias leves de miosina (MLC), proporcionando a interação entre actina e miosina promovendo a contração celular. Em acréscimo às funções da Rock, ela pode inativar MLC fosfatase (MLCP) através da ativação da miosina fosfatase subunidade 1 (MYPT1) nos resíduos de thr696/853 (KIMURA et al., 1996).

A proteína Rock também participa da reorganização do citoesqueleto onde é mensurado pela ativação da proteína LIM-quinase (LIMK) no resíduo thr508, quando

é ativado a LIMK fosforila e inativa a proteína Cofilina no resíduo ser3 (YANG et al., 1998). Os estudos pioneiros envolvendo a proteína da família Rho foram realizados por Chong (1994), Takai (1994) e Ridley (1994). A partir desses trabalhos surgiram as primeiras indicações que essas proteínas poderiam desencadear sinais intracelulares em diferentes tecidos (TAKAI et al., 1994; RIDLEY et al., 1994; LEE et al., 2009). Em adição a esses conhecimentos sobre as proteínas da família Rho, foi evidenciado uma relação entre a Rock com a sinalização da via da insulina no estudo por Furukawa em 2005. Esse estudo analisou que a proteína Rock poderia atuar sobre o controle glicêmico através da fosforilação da proteína Akt nos tecidos muscular e adiposo. Essa ativação da Akt é decorrente de uma sinalização anterior, ou seja, a Rock interage na fosforilação do IRS-1 (resíduo de ser632/935), potencializando a captação de glicose. Essa hipótese foi confirmada graças a deleção dessa proteína corroborando com a diminuição da captação de glicose em células musculares e em adipócitos, proporcionando a resistência à insulina no músculo esquelético (FURUKAWA et al., 2005).

Nessa mesma década, Lee em 2009, avaliou os efeitos da inibição da proteína Rock em camundongos machos e fêmeas, verificando que independentemente do animal, ambos tiveram tendência em desenvolver a resistência à insulina, com diminuição na fosforilação do IRS-2 em ser632/635 e menor atividade da PI3-q (LEE et al., 2009). Estudos com seres humanos já demonstraram que em indivíduos hiperglicêmicos com os níveis de RNA mensageiro de insulina aumentado, assim como o elevado nível de transcrição do gene da insulina, isso ocorre pela supressão da via Rho/Rock (NAKAMURA et al., 2006). Nessa perspectiva foi observado que o tecido muscular de indivíduos magros e obesos classificados como não diabéticos, após o estímulo com insulina há aumento na ativação da via da Rock, porém vale ressaltar que a capacidade da insulina em aumentar essa sinalização está atenuada em indivíduos obesos e diabéticos (CHUN et al., 2011).

Por outro lado, o exercício físico também promove ativação da família Rock. Muñoz e colaboradores (2017), analisaram que o exercício de natação de curta duração em ratos Fischer 344, favoreceu a melhora da sensibilidade à insulina e aumentou a ativação de proteínas envolvidas nessa sinalização. Esse estudo foi pioneiro em abordar o papel da Rho-quinase. A figura 5 ilustra a ativação da proteína Rock.



**Figura 5 Sinalização da Rock em resposta ao exercício.** Desenho esquemático sobre a captação de glicose no tecido muscular esquelético em resposta ao exercício pela via Rhoquinase aumentando a translocação do GLUT-4 para membrana celular (Adaptado de Muñoz et al., 2017).

A proteína Rock pode ser um grande aliado para o controle da homeostase glicêmica. Dessa forma, entender a resposta dessa molécula no músculo esquelético em diferentes métodos de exercício pode esclarecer o tempo de ativação e sua participação nesse mecanismo. Ademais, se faz necessário compreender a influência do volume e da intensidade do exercício em relação ao metabolismo da Rock, pois até o momento não foram utilizados métodos intervalados de alta intensidade para analisar a resposta dessa via em relação ao aumento do esforço físico.

## 1.6 Caracterização dos métodos de treinamento: contínuo e intervalado de alta intensidade.

O método contínuo de treinamento físico, foi sistematizado em 1952 na Austrália, fundamentado na experiência de Perry Wells Cerutti, treinador de atletismo nas décadas de 50 e 60 (DANTAS, 1985). Esse método é definido pela realização de esforço físico em alguma intensidade previamente estabelecida sem oscilações ou

interrupções durante um determinado período (DAUSSIN et al., 2007; GOBBI; VILLAR; ZAGO, 2005; SZMUCHROWSKI, 1999). O treinamento contínuo é realizado eminentemente em modalidades cíclicas, caracterizado pelo predomínio do volume sobre a intensidade corroborando com o desenvolvimento da resistência muscular (DANTAS, 2003; TUBINO & MOREIRA, 2003). Em adição, o método contínuo geralmente é aplicado abaixo do limiar anaeróbio (LAN), promovendo trabalhos predominantemente aeróbio. As principais intensidades utilizadas no método contínuo são prescritas entre 50 a 75% do  $VO_{2máx}$ , em ritmo cadenciado e a principal adaptação fisiológica analisada é o aumento no transporte de oxigênio nas células musculares favorecendo o aumento da resistência aeróbia. O método contínuo é um dos mais atribuídos para proporcionar a adaptação a métodos mais intensos, muitos estudos utilizam dessa estratégia para que o indivíduo consiga desenvolver uma adaptação base para suportar intensidades mais elevadas.

Um dos principais parâmetros para a prescrição do método contínuo é a utilização do  $VO_{2máx}$ . Em 1968, Kenneth H. Cooper, um preparador físico norte-americano desenvolveu um protocolo para verificar o nível de condicionamento físico de soldados das forças armadas. Esse protocolo consiste em uma corrida constante e seu resultado pode determinar e classificar o  $VO_{2máx}$ . Após convalidar esse protocolo, vários profissionais de diferentes áreas aderiram esse teste para mensurar a resistência aeróbia de atletas e não atletas. O teste de Cooper é referenciado nos dias atuais para quem busca iniciar a prática nos exercícios para quantificar a intensidade de treino. Após a constatação que a utilização do  $VO_{2máx}$  era relevante para análise e prescrição do exercício, alguns pesquisadores começaram a verificar as diferentes intensidades utilizadas no método contínuo e acompanhar os efeitos proporcionados por esse método.

Em 2004, Fernandez e colaboradores observaram a influência do exercício contínuo em adolescentes entre 15 a 19 anos, submetidos a um protocolo no cicloergômetro durante 50 minutos, cujos resultados mostraram redução no IMC e na porcentagem de gordura. Nesse mesmo ano, Sabia e colaboradores (2004), verificam o efeito do exercício aeróbio associado à orientações alimentares em adolescentes obesos submetidos a protocolos de caminhada. Os resultados mostram que além da alimentação potencializar. Os resultados os adolescentes tiveram melhora satisfatória na composição corporal e na resistência aeróbia.

A resistência aeróbia. é considerada um dos pilares das capacidades físicas. Indivíduos que conseguem suportar intensidades de treino por períodos prolongados podem desenvolver adaptações nos componentes centrais e periféricos do sistema cardiorrespiratório aprimorando o fornecimento de oxigênio pela musculatura recrutada. Em 1984, Pate e Kriska já destacavam que existem três contextos que influenciam a resistência aeróbia: o Limiar de lactato, a economia de corrida e o consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2máx}$ ). O  $VO_{2máx}$ , apresenta a mais elevada quantidade de oxigênio que pode ser captada, transportada e metabolizada, para Valenzuela e colaboradores (2022), o  $VO_{2máx}$  pode ser um marcador interessante para avaliar o condicionamento aeróbio. Contudo, para avaliar e quantificar os níveis de treinamento e periodizar um protocolo consistente vale complementar as análises utilizando a potência crítica ou até mesmo o Lan (PODLOGAR et al., 2022).

Os métodos contínuos foram conhecidos popularmente como exercícios aeróbios, que eram destacados por reduzir significativamente a porcentagem de massa gorda e melhorar o condicionamento cardiorrespiratório (AHLERT et al, 2019). Ao longo do tempo, surgiram diversos estudos relatando as intensidades utilizadas no método contínuo para diferentes indivíduos de acordo com seu condicionamento físico.

Em relação a AMPK o método contínuo já foi utilizado para quantificação da sua fosforilação. Em 2015, Combes e colaboradores utilizaram nove homens ativos em um protocolo de 30min a uma intensidade de 70% da taxa de trabalho pico no cicloergômetro. Esse estudo demonstrou aumento na AMPK imediatamente após o término da sessão, porém não relatou aumento significativo 3h após o término do esforço físico. Em relação a Rock, são poucos estudos que discutem volume e intensidade sobre o aumento do conteúdo proteico dessa via. Por isso, analisar outros parâmetros de aplicação desse método pode contribuir para os avanços em relação à prescrição de exercício para ativação das vias independentes de insulina.

O treinamento intervalado de alta intensidade (high intensity intermittent training – HIIT), já tem seu histórico descrito na literatura a partir da década de 1920. É um interessante método onde proporciona um volume curto de exercício, com uma intensidade mais elevada. O HIIT é definido como o uso do esforço físico em alta intensidade (acima do limiar anaeróbio) em períodos de curta duração, seguidos de períodos de descanso ativo (em baixa intensidade) ou passivo (repouso), com a

proposta de recuperar parcialmente as reservas energéticas a cada esforço (LAURSEN et al., 2006).

A ideia dessa metodologia não é apenas diminuir as longas sessões de treinamento aeróbio, que visam o aumento da capacidade aeróbia e/ou emagrecimento, mas também propor um esforço físico relevante que consiga estressar a musculatura em uma magnitude muito maior, possibilitando as adaptações promovidas pelo exercício físico em sessões mais curtas, podendo ser realizada em diversas modalidades como: corrida, natação e ciclo ergômetros.

De forma gradual, as pausas entre o esforço físico de alta intensidade pode ser reduzidas, de modo que o metabolismo anaeróbio aumente sua ativação de maneira significativa para formação de energia pela metabolização do lactato via de ciclo Cori e da ressíntese de fosfocreatina (PCr), quando ocorre o aumento da produção energética por essas vias, fisiologicamente as vias do metabolismo aeróbio também aumentam sua resistência (LINOSSIER et al., 1993; MACDOUGALL et al., 1998).

Para prescrever uma metodologia de treino, recomenda-se a manipulação de algumas variáveis metodológicas, pautadas de acordo com o objetivo do sujeito e as principais adaptações fisiológicas que precisam ser melhoradas. Essas variáveis de treino são: intensidade, intervalo de recuperação, volume (número de séries), densidade (pausa entre séries), amplitude de movimento e ação muscular, que podem ser utilizadas para a prescrição de qualquer metodologia de treino (BUCHHEUT et al., 2013). Considerando que os efeitos positivos do exercício promovidos pelo HIIT são similares ao treinamento de endurance e nesse sentido, é relevante entender as principais adaptações fisiológicas promovidas por essa metodologia.

Primeiramente, uma das principais adaptações é a biogênese mitocondrial, mediada pelo aumento das enzimas Citocromo C Oxidase (COX) e Citrato Sintase (CS), além do prolongamento do conteúdo do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) e de Sirt1 (GIBALA et al., 2010). Com o aumento do conteúdo da atividade mitocondrial na musculatura exercitada, há também um aumento na taxa de oxidação de lipídeos e no transporte de ácidos graxos, proporcionando um efeito secundário pelo HIIT (TALANIAN et al., 2006).

De acordo com a adaptação do indivíduo ao treinamento, é analisada a melhora no desempenho do esforço realizado, bem como a capacidade de tamponamento e a tolerância à acidose metabólica promovida pelo esforço físico de

alta intensidade (GIBALA et al.,2006). Além disso, verifica-se o aumento do pico do VO<sub>2</sub>máx, da potência máxima atingida, a diminuição da frequência cardíaca média e da ventilação em esforço, relacionado à menor oxidação de carboidratos e maior oxidação de gorduras durante o esforço físico (BURGOMASTER et al., 2008).

Alguns estudos apontam o aumento nos níveis de IL-6 (Interleucina 6) circulante, associando os efeitos antiinflamatórios promovidos pelo exercício físico, proporcionando a melhora da resistência à insulina (Leggate et al.,2010). Em relação às moléculas envolvidas na captação de glicose, sugere-se que o HIIT melhore essa captação no tecido muscular por aumento da expressão do GLUT-4 e PGC-1 $\alpha$ , além de aumentar a fosforilação (e conseqüente ativação) da AMPK, aumentando a beta-oxidação, maior biogênese mitocondrial, aumento na atividade cardiorrespiratória e melhora na sensibilidade à insulina na musculatura treinada (GIBALA et. al., 2010; TALANIAN et al.,2006; GIBALA et al.,2006; BURGOMASTER et al., 2008; LEGGATE et al.,2010; BURGOMASTER et al., 2006).

O HIIT aparenta ser uma metodologia de treino eficaz, pois proporciona uma sessão mais curta (acessível para pessoas com pouca disponibilidade de tempo) e mais dinâmica, além de poder ser utilizada em qualquer modalidade. Vale ressaltar que essa metodologia precisa de cautela, principalmente em sujeitos portadores de alguma enfermidade ou limitação, porém pode ser utilizada por indivíduos treinados, especialmente os que querem atingir um maior recrutamento de fibras tipo II, proporcionando ganhos metabólicos e neuromusculares.

Tem sido demonstrado que o exercício intervalado de alta intensidade pode aumentar a fosforilação da AMPK. Coffey e colaboradores (2005), demonstraram que esse método prolonga a sinalização da AMPK em seres humanos treinados, contudo ainda se faz necessário verificar os efeitos promovidos por esse método em um tempo maior de esforço. Especulamos que o exercício físico de corrida em esteira intervalado de alta intensidade seja capaz de promover maior ativação da AMPK, mTOR e Rock nas primeiras horas após o exercício físico (0-3 horas) no músculo EDL em comparação ao exercício contínuo de baixa intensidade. Então, tal regulação dessas proteínas pode contribuir para melhor resposta relacionada ao metabolismo energético e reconstrução do músculo esquelético. Em relação a Rock, não existem estudos correlacionando sua ativação mediada pelo treinamento intervalado de alta intensidade, estudos mostram que essa molécula possui relação com a fosforilação de AMPK.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar os efeitos do exercício físico agudo contínuo de baixa intensidade e intervalado de alta intensidade sobre a via de sinalização da AMPK, mTOR e Rock em fibras musculares de contração rápida em ratos.

### **2.2 Objetivo Específicos**

Etapa 1: Avaliar a sinalização da via da AMPK e da mTOR.

Avaliar os efeitos do exercício contínuo de baixa intensidade sobre a fosforilação das proteínas AMPK, ACC, mTOR e P70S6K, imediatamente e três horas após o término do protocolo.

Avaliar os efeitos do exercício intervalado de alta intensidade sobre a fosforilação das proteínas AMPK, ACC, mTOR e P70S6K, imediatamente e três horas após o término do protocolo.

Comparar a fosforilação de AMPK e mTOR nos dois métodos de treinamento (contínuo e intervalado de alta intensidade), imediatamente e três horas após o término dos protocolos.

Etapa 2: Avaliar a sinalização da via da Rock.

Avaliar os efeitos do exercício contínuo de baixa intensidade sobre o conteúdo proteico das proteínas Rock1, Rock2, RhoA e RhoE imediatamente e três horas após o término do protocolo.

Avaliar a atividade da Rock no exercício contínuo de baixa intensidade através da fosforilação da MYPT-1 imediatamente e três horas após o término do protocolo.

Avaliar os efeitos do exercício intervalado de alta intensidade sobre o conteúdo proteico das proteínas Rock1, Rock2, RhoA e RhoE imediatamente e três horas após o término do protocolo.

Avaliar a atividade da Rock no exercício intervalado de alta intensidade através da fosforilação da MYPT-1 imediatamente e três horas após o término do protocolo.

Avaliar os efeitos do exercício contínuo de baixa intensidade sobre a fosforilação das proteínas Akt, IRS1<sup>S632/635</sup> e IRS1<sup>Y612</sup>, imediatamente e três horas após o término do protocolo.

Avaliar os efeitos do exercício intervalado de alta intensidade sobre a fosforilação das proteínas Akt, IRS1<sup>S632/635</sup> e IRS1<sup>Y612</sup>, imediatamente e três horas após o término do protocolo.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Foram utilizados vinte e quatro ratos Wistar machos com seis semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Unicamp (CEMIB). Os experimentos foram realizados de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (lei nº 11.794, de outubro de 2008). O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animal (CEUA 4621-1/2017), do Instituto de Ciências Biológicas, UNICAMP – Campinas – SP.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno individuais (n=4 por caixa) sob circunstâncias adequadas tais como ciclo claro-escuro (12/12h), livre consumo de água e ração convencional, luz acionada às 06:00h e desligada às 18:00h. Com seis semanas de vida os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos: controle (CTL), exercício agudo contínuo (CONT) e exercício agudo de alta intensidade (INT). Os animais dos grupos exercitados foram eutanasiados imediatamente ao término (tempo 0) e após 3 horas da sessão de exercício físico (tempo 3 h). A figura 6 ilustra sumariamente o desenho experimental.

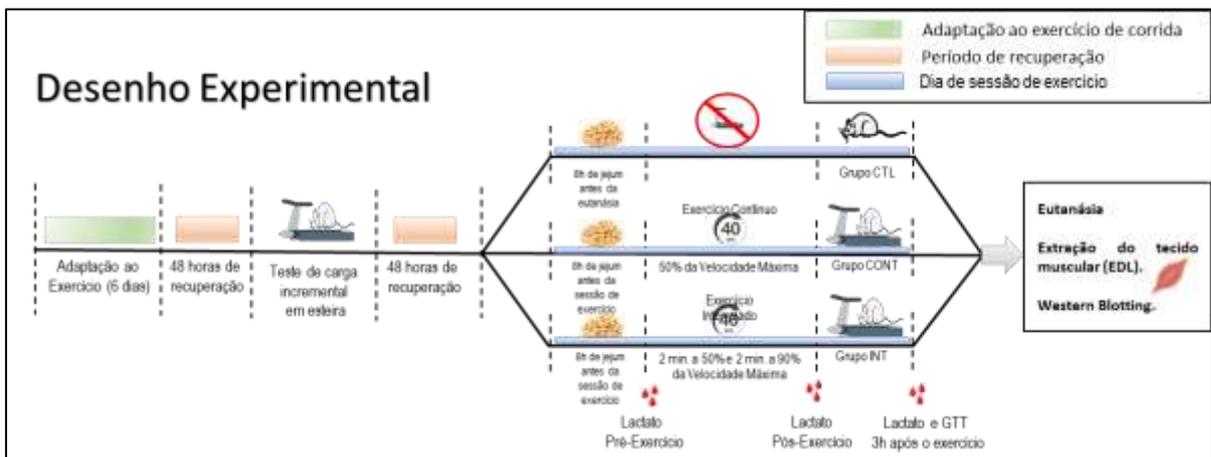


Figura 6 – Desenho experimental.

#### 3.2 Adaptação ao ergômetro e ao exercício físico de corrida

Previamente à sessão de exercício, os animais foram submetidos ao período de adaptação de seis dias em esteira motorizada (Projeto AVS, São Carlos, São Paulo, Brasil). No primeiro dia os animais permaneceram por 5 minutos na esteira

para adaptação ao ergômetro e o equipamento permaneceu desligado. No segundo dia, os animais foram colocados na esteira e realizaram o exercício de corrida na velocidade de 3 metros/min. No dia seguinte os ratos permaneceram por mais 5 minutos na velocidade de 3 metros/min. No terceiro dia foi mantido o volume e aumentada a intensidade para 6 metros/min. No quarto dia o volume foi aumentado para 10 minutos e foi mantida a intensidade de exercício do dia anterior. No quinto dia foi mantido o volume e a intensidade aumentou de maneira progressiva. No sexto dia também ocorreu aumento apenas da velocidade de corrida de maneira progressiva (adaptado de Moraska et al, 2000). A figura 7, ilustra o protocolo de adaptação ao exercício realizado no estudo.

### Adaptação ao Exercício

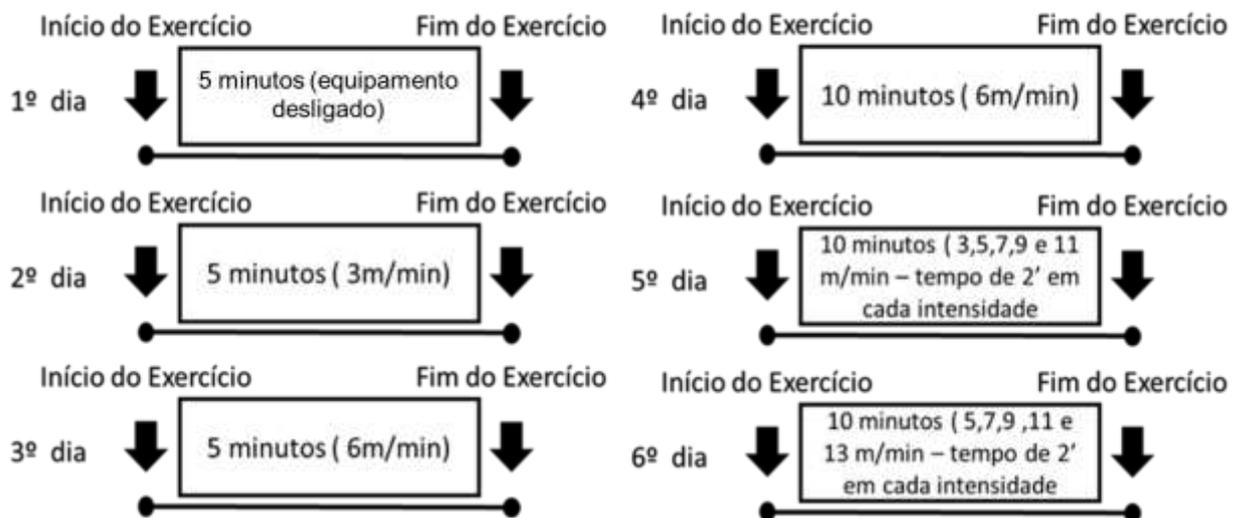


Figura 7 – Protocolo de adaptação ao exercício em esteira rolante.

### 3.3 Teste de Carga Incremental de corrida em esteira rolante

Os animais foram submetidos ao teste de carga incremental para determinar a velocidade máxima de corrida. O teste foi iniciado na velocidade 6 m/min, com 0% de inclinação e incrementos de 3m/min a cada 3 minutos até a exaustão voluntária dos animais. A exaustão foi definida quando o animal encostou 5 vezes no final da esteira durante o tempo de 1 minuto (FERREIRA et al., 2007). A maior velocidade de corrida atingida foi considerada como a velocidade máxima de corrida no teste e foi utilizada para o cálculo da intensidade de corrida dos animais nos diferentes protocolos de exercício (contínuo e intervalado).

### **3.4 Protocolo de Exercício Agudo de Corrida**

#### **3.4.1 Protocolo Contínuo em Esteira**

O protocolo de exercício contínuo consistiu em uma sessão única de corrida em esteira por 40 minutos. Os animais realizaram o exercício de corrida na velocidade correspondente a 50% da velocidade máxima de corrida obtida no teste de carga incremental.

#### **3.4.2 Protocolo Intervalado de Alta Intensidade em Esteira**

Assim como o exercício contínuo o protocolo intervalado constituiu de uma única sessão de 40 minutos, porém a intensidade do exercício era alterada a cada 2 minutos de corrida e as intensidades correspondiam a 50% e 90% da velocidade máxima de corrida obtida no teste de carga incremental. Ao final do protocolo os animais totalizaram 20 séries de alta intensidade durante a realização do exercício.

### **3.5 Análise da Lactacidemia**

Amostras de sangue foram coletadas da cauda dos ratos para realizar as análises da lactacidemia antes, imediatamente ao término e após 3 horas da sessão aguda de exercício. Para análise da concentração de lactato, foram coletados 25 µL de sangue em capilares heparinizados, prontamente desproteínizado em ácido tricloroacético (TCA) 4% e analisado no lactímetro Accutrend® (Roche).

### **3.6 Teste de tolerância à glicose (TTG)**

O TTG foi realizado após um período de jejum de 8h e 3h após a realização da sessão de exercício. As amostras de sangue foram coletadas da cauda dos animais e realizada em um tempo 0 e logo após os animais receberem uma injeção intraperitoneal de solução de glicose 2g/kg de massa corporal, seguido pela coleta de sangue nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos. Os valores de glicemia obtidos durante o teste foram determinados pelo glicosímetro Accu-Check Active (Roche®, Switzerland). A área sobre a curva foi calculada pelo método trapezoidal no software Microsoft Excel 2013 (Mattews et al, 1990). O valor obtido no tempo 0 do teste foi utilizado como valor de glicemia em jejum.

### 3.7 Extração tecidual e análise de Imunoblotting

Após o período experimental, os animais foram submetidos ao procedimento de extração, permaneceram em jejum prévio de 8 horas apenas com acesso livre a água no momento do procedimento. Previamente aos procedimentos cirúrgicos e de extração tecidual os animais foram anestesiados através da injeção intraperitoneal (i.p.) de cloridrato de cetamina (40-87 mg/kg; Ketalar; Parke-Davis®, Ann Arbor, MI) e xilazina (5-13 mg/kg; Rompun; Bayer®, Leverkusen). Após confirmada a anestesia pelo reflexo corneal, utilizando-se de balança analítica foi avaliada o peso da massa corporal e o comprimento dos animais (distância naso-anal), em seguida foi realizado o processo de decaptação. O músculo EDL foi extraído e colocado em nitrogênio líquido, e as amostras foram armazenadas no ultrafreezer (-80°C). As amostras de EDL foram lisadas (~50mg) em tampão de extração, homogenizadas utilizando o TissueLyser II (Qiagen®) e submetidas ao protocolo SDS-PAGE como descrito por Muñoz e colaboradores (Muñoz et al.,2018). Os anticorpos usados foram: anti-pAMPKThr172 [rabbit #2535], anti-AMPK [rabbit #50081), anti-pAccSer79 [rabbit #3661], anti-Acc [rabbit #3662], anti-pmTORSer2448 [rabbit #5536], anti-mTOR [rabbit #2972], anti-pP70S6KSer371 [rabbit #9208], anti-p70S6K [rabbit #9202], RhoA [Rabbit #2117], RhoE [Mouse #3664], pIRS1 S632/635 [2388s], anti-IRS1 [rabbit #2382] pAkt S473 [9271L], anti-Akt [rabbit #9272] e anti-GAPDH [rabbit #5174], todos da empresa Cell Signaling Technology®; os anticorpos Rock1 (sc5560) e Rock2 (sc-5561) provenientes da Santa Cruz Biotechnology®; anticorpos pMYPT1 T696 (ABS45) e Anti-MYPT1 [rabbit SAB4501948] provenientes da Sigma-Aldrich® e pIRS1 T612 (44816G) da Life Technology®. Para cada figura (Imagem), medimos o controle de blots (isto é, proteína total ou proteína endógena (GADPH)). Para cada figura relacionada com as proteínas experimentais, usamos 4 amostras para o grupo controle, 5 amostras para os animais do exercício contínuo e 5 amostras para os animais do grupo exercício intervalado. Para quantificar as imagens foi utilizado o software UN267 SCAN-IT gel 6.1.

### 3.8 Atividade da Rock

A atividade da Rock foi avaliada pela fosforilação de seu substrato o MYPT-1. Foi realizado um ensaio onde foi adicionado: tecido muscular (~200mg de proteína), ATP e MYPT1 (654-880) (Millipore®). Após 30min sob agitação a 30°C a reação foi neutralizada com a adição do Laemmli 4x. A seguir as amostras foram submetidas ao

protocolo convencional de western blotting (MOURA et al., 2013). A atividade da Rock foi mensurada de acordo com a expressão do phospho-MYPT-1 (CHUN et al., 2011).

### 3.9 Análise da Bioinformática

Previamente à realização dos experimentos foram verificadas as interações envolvendo as proteínas de interesse. Em um primeiro momento foram analisadas as proteínas envolvidas na via da AMPK e Rock, a seguir mTOR e Rock e para finalizar AMPK, Rock e mTOR, compilando-se os dados que envolvessem essas vias para verificar as principais proteínas envolvidas em suas respectivas sinalizações.

A análise inicial da Bioinformática foi realizada através do software Genemania (<https://genemania.org>), cujo sistema relaciona um conjunto de genes utilizando um banco de dados. As associações utilizadas foram interações físicas, preditas e vias de sinalizações compartilhadas. Como gene de entrada foi utilizada a primeira combinação entre as moléculas Prkaa1, Rock1, Rock2, Akt1 e Akt2 seguida pela análise da combinação de mTOR, Rock1, Rock2, Akt1 e Akt2 e *Rattus Norvegicus* como organismo analisado. Em seguida, foi realizada as mesmas combinações entre moléculas com o mesmo tecido de entrada para verificar a “interação física” entre as moléculas foi utilizada a cor vermelho, “previstas” cor laranja e “caminho” foi quantificado utilizando a cor azul. Os métodos de análise foram de no máximo 10 genes resultantes associados aos genes de entrada e no máximo 10 atributos resultantes. Apesar de não identificados, os genes foram agrupados no programa por função biológica (Biological Function) através do Gene Ontology. Após realizar as interações entre as moléculas, foram verificadas quais proteínas estavam envolvidas na captação de glicose e na hipertrofia do músculo esquelético.

GEPIA é um software interativo disponibilizado online que serve para analisar os dados de expressão RNA por sequenciamento obtidos através dos projetos TCGA e GTEx. Os dados de correlação de expressão entre os genes foram feitos utilizando correlação de Spearman e Pearson comparando Rock1 e AMPK, Rock 2 e AMPK, Rock1 e mTOR e Rock2 e mTOR em tecidos de músculo esquelético (base de dados GTEx).

STRING (<https://string-db.org>) é um banco de dados de interações proteína-proteína conhecidas e previstas. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) e se originam de previsões computacionais, da

transferência de dados entre organismos e de interações agregadas de outros bancos de dados (primários).

A análise foi feita utilizando os genes Rock, Prkaa1 e mTOR como genes de entrada em modelo *Rattus Norvegicus*. Em relação à análise foram verificadas as interações físicas e funcionais entre as moléculas de acordo com a força de evidências do dado. O nível de confiança mínima inserida no sistema foi de 0.7 (alto) com 10 interactores primários máximos para os genes alvo (Prkaa1, mTOR e Rock) e 10 interactores secundários máximos, as linhas sólidas representam o nível de confiança.

Em relação ao “*node color*”, cada isoforma de *splicing* representa todas as proteínas produzidas por um único locus gênico codificador de proteína. As proteínas que estão sinalizadas com cores e possuem “*colored nodes*” são moléculas que possuem interação principal nas respectivas sinalizações, enquanto as moléculas que estão na cor branco e possuem “*white nodes*”, são consideradas moléculas secundárias. As moléculas que estão marcadas na cor branco e possuem “*filled nodes*” são proteínas que possuem alguma estrutura 3D conhecida ou prevista, enquanto as moléculas na cor branco com “*empty nodes*” possuem suas estruturas 3D desconhecidas.

As fontes de dados são baseadas em *textmining*, *databases*, *experiments* e *neighbourhood*. Cada via possui um código específico e um valor de FDR respectivo à análise. mTOR signaling (MMU-165159, FDR= 1.43 e-18), Cell death signaling via NRAGE, NRIF and NADE (MMU-204998, FDR= 0.00028), PIP3 activates Akt signaling (MMU-1257604, FDR = 3.69 e-05) e Signaling by Rho GTPases (MMU-194315, FDR = 8.31 e-08).

Em adição a esses dados foi realizada uma análise de interação molecular onde é possível verificar quais proteínas já possuem interações que já são conhecidas e previstas pela literatura. As bordas indicam as proteínas que estão diretamente ligadas e fazem parte do mesmo complexo físico, a espessura da borda determina o “nível de confiança” da interação molecular. Para completar a análise, foi adicionado um filtro de cores para separar as sinalizações por grupamento, a confecção dos resultados foi o MCL onde o sistema confecciona o *layout* da imagem e as moléculas são agrupadas em relação às interações diretas.

### 3.10 Análise Estatística

Os dados foram apresentados com média  $\pm$  desvio padrão (DP). A distribuição gaussiana dos dados foi avaliada usando o teste W de Shapiro-Wilk e analisada pelo teste t de Student. As múltiplas comparações foram realizadas por ANOVA de duas vias com post-hoc de Tukey. A significância foi considerada quando  $p < 0,05$ . A análise estatística e os gráficos obtidos foram gerados pelo GraphPad Prism 8.0.1®

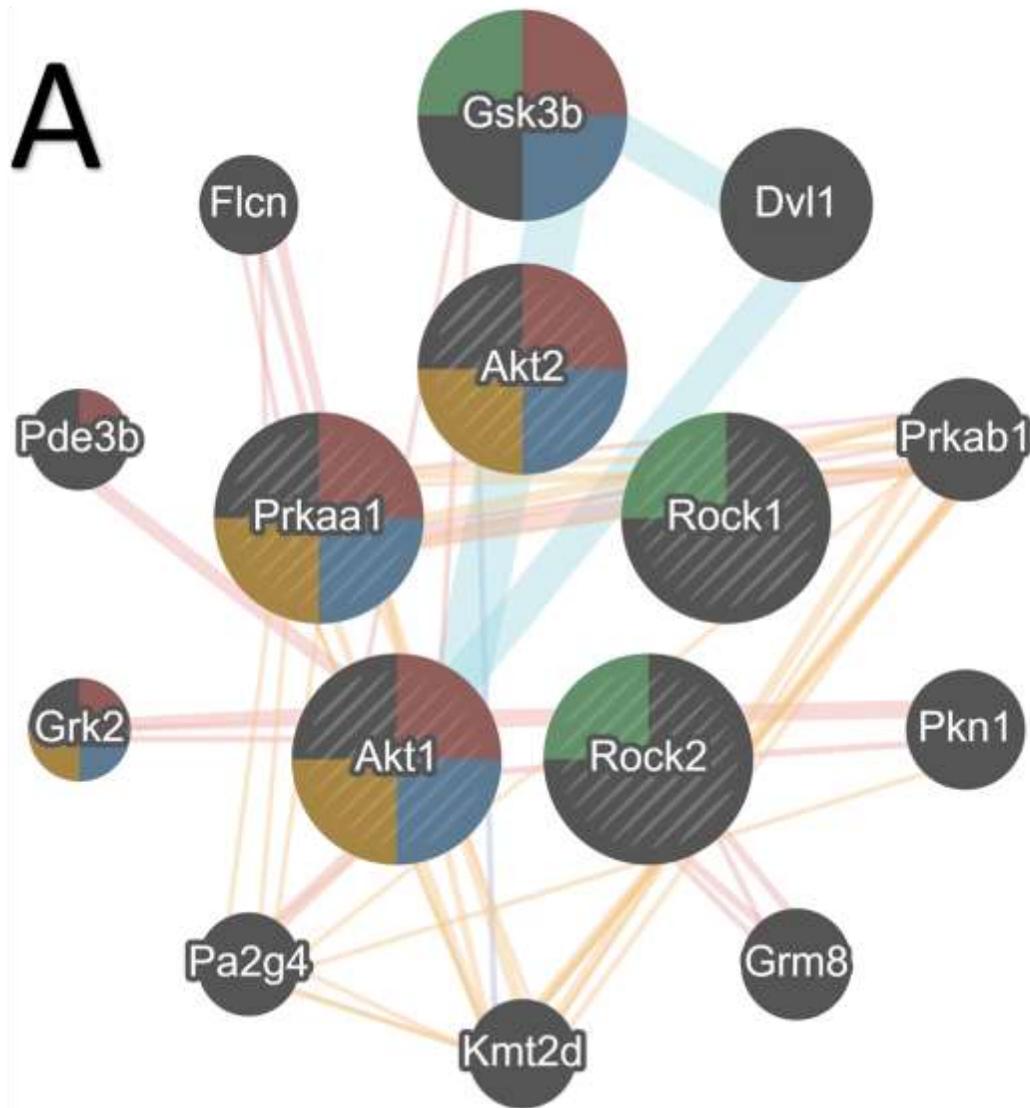
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise da Bioinformática por Genemania

A análise de bioinformática utilizando o software Genemania (<https://genemania.org>), revelou que ao relacionar os genes de interesse Prkaa1, Akt1, Akt2, Rock1 e Rock2 em *Rattus Norvegicus* como tecido analisado mostra uma interação física de 41,31% (rosa) e interações previstas de 35,48% (laranja) (Figura 7A). As principais interações envolvendo essas moléculas durante a prática de exercício físico está ligado ao aumento da demanda energética aumento a captação de glicose no tecido muscular.

Utilizando o mesmo tecido de entrada foi verificado as interações entre mTOR, Akt1, Akt2, Rock1 e Rock2. O sistema apresentou interação física de 41,31% (vermelho) e previstas de 35,48% (laranja). Analisando os dados brutos, conseguimos verificar que a Rock1 e Rock2 tem “domínios” de compartilhando entre as moléculas Akt1 e Akt2 (peso de 0.019973563) ou seja, essas moléculas estão correlacionadas nas vias de interesse. Verificamos também que a mTOR possui uma relação prevista média com a Akt, ou seja, essas moléculas estão sendo ativadas de forma sequencial em relação ao estímulo.

Em adição a esses resultados, foi realizado “um filtro” em relação as funções biológicas (captação de glicose e hipertrofia muscular) e as proteínas de interesse no músculo esquelético. Os dados brutos apresentam um nível de confiança alto em relação a resposta à insulina (0.09259492071963775) e um nível baixo em relação a hipertrofia (0.04314263873750933). Esses dados revelam que a sinalização da hipertrofia do tecido muscular pode ter uma “interferência” mais fácil do que a captação de glicose. Esse fato é decorrente devido à resistência à insulina ocorrer de forma degenerativa pela inatividade física ou quando outras patologias estão envolvidas. Já a hipertrofia muscular em resposta ao exercício físico pode ser influenciada de várias maneiras como: um alimento de alto índice glicêmico ou até pelas horas conturbadas do sono. Considerando esses fatores, entendemos que o ambiente influencia de maneira aguda interação molecular dos sinais de hipertrofia e crônica referente aos sinais de captação de glicose.

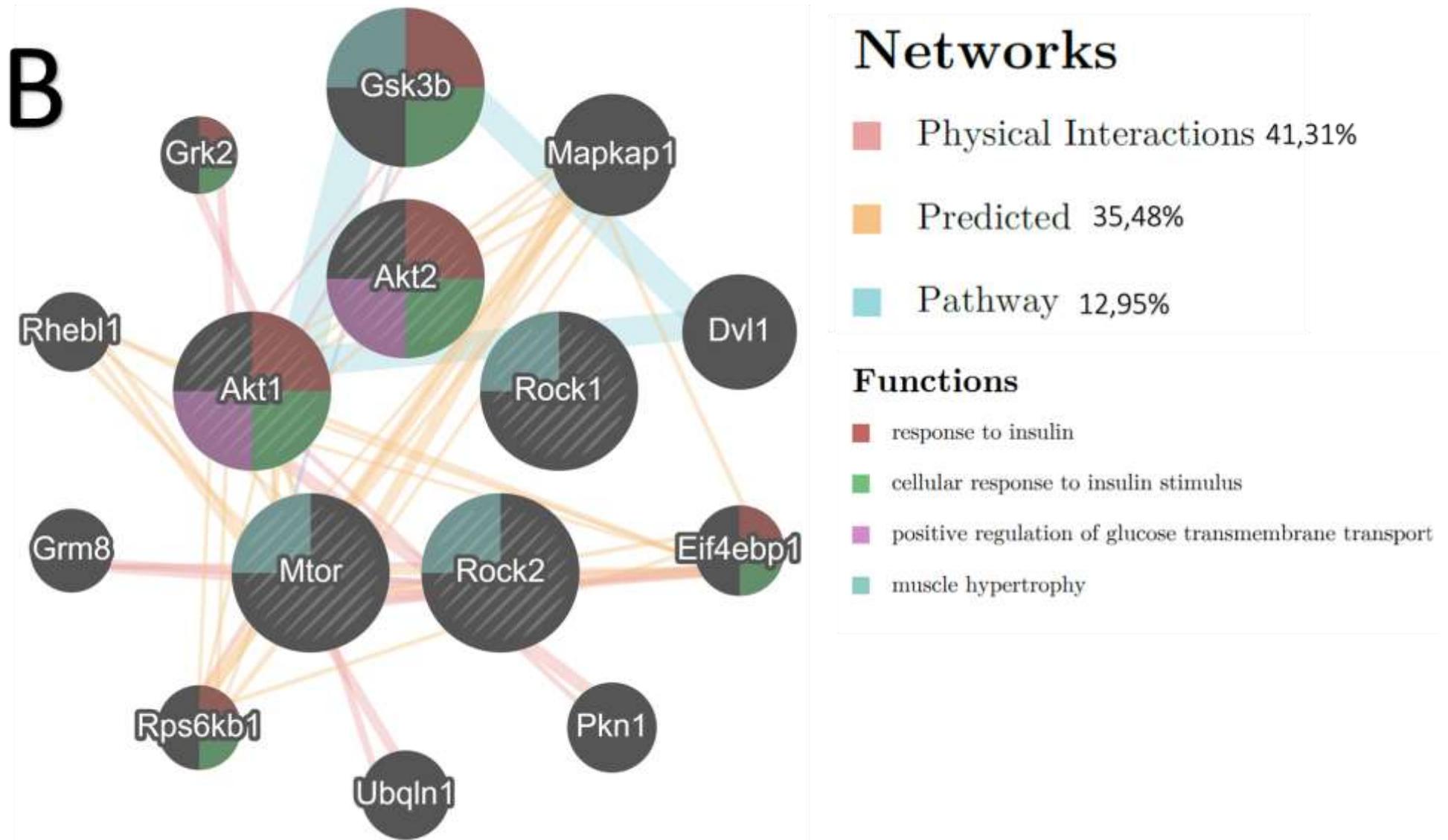


## Networks

- Physical Interactions 41,31%
- Predicted 35,48%
- Pathway 12,95%

## Functions

- response to insulin
- cellular response to insulin stimulus
- regulation of glucose transmembrane transport
- muscle hypertrophy

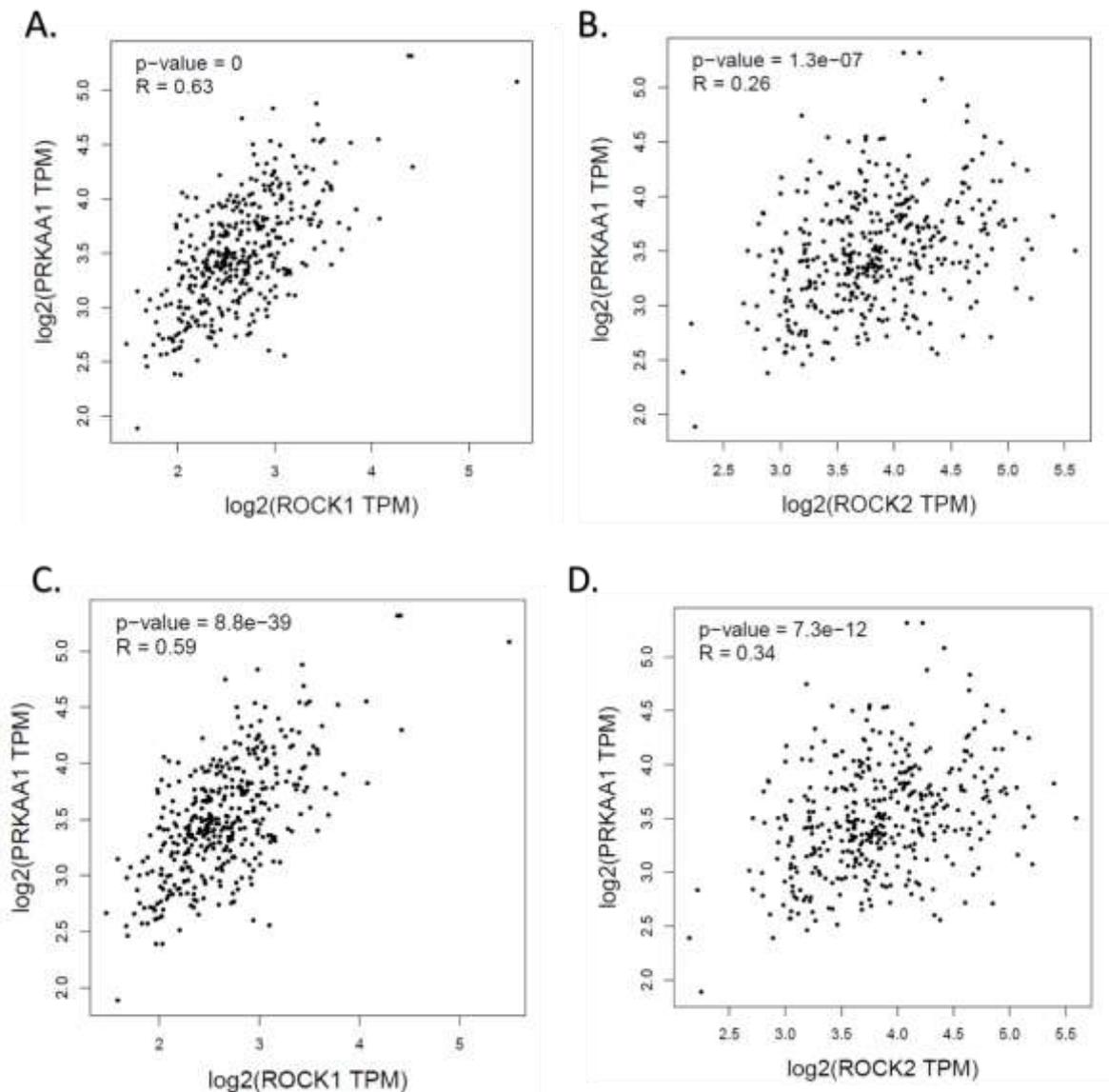


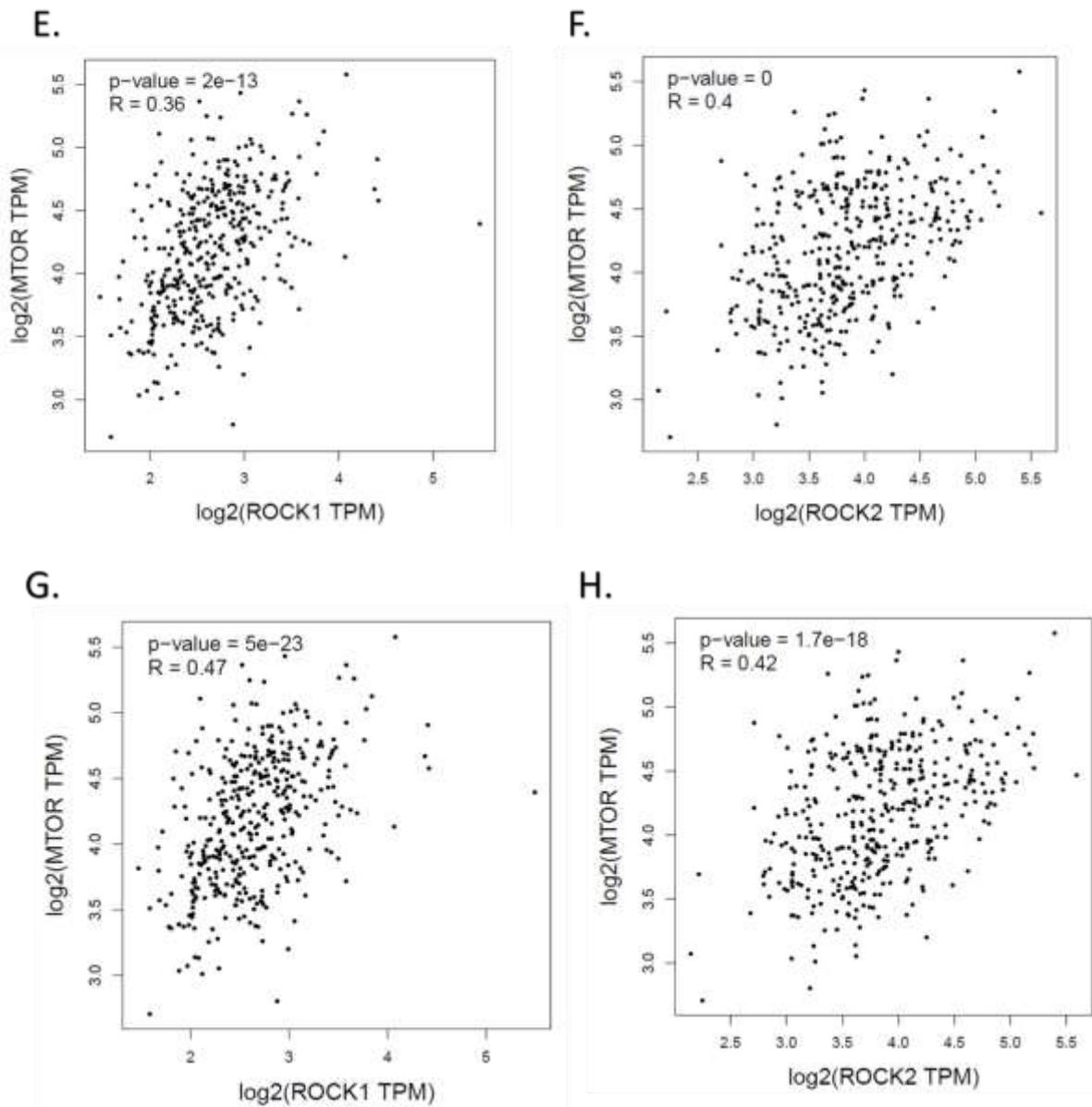
**Figura 8. Análise da Genemania.** Análise das interações moleculares entre Prkaa1, Akt1, Akt2, Rock1 e Rock2 (A) e mTOR, Akt1, Akt2, Rock1 e Rock2 (B) no tecido muscular. Verificação das moléculas envolvidas na captação de glicose e na hipertrofia do tecido muscular.

## 4.2 Análise da Bioinformática por GEPIA

Posteriormente, utilizamos o GEPIA para verificar a correlação de expressão entre os genes. A Prkaa1 e a Rock1 tiveram uma correlação média (Figura 8A), porém a Prkaa1 e a Rock2 tiveram uma correlação fraca nos resultados obtidos por Pearson (Figura 8B).

Em relação a correção por Spearman, os dados apresentam que a Prkaa1 e a Rock1 possuem uma correlação moderada (Figura 8C) e a Prkaa1 com a Rock2 uma correlação fraca (Figura 8D). A correlação entre mTOR e Rock1 e também mTOR e Rock2 foram consideradas fracas (Figura 8E – H) em relação as duas análises.





**Figura 9. Análise da GEPIA.** Correção Prkaa1 e Rock1 (A); Prkaa1 e Rock2 (B) por Pearson; Prkaa1 e Rock1 (C); Prkaa1 e Rock2 (D) por Spearman; mTOR e Rock1 (E); mTOR e Rock2 (F) por Pearson; mTOR e Rock1 (G) e mTOR e Rock2 (H) por Spearman.

Em relação a análise pelo GEPIA, verificamos a correlação entre as proteínas de interesse, esses resultados refinam os dados obtidos no Genemania demonstrando a relação entre as proteínas de interesse.

#### 4.3 Análise da Bioinformática por STRING

Concluindo a análise da Bioinformática, utilizamos o STRING (<https://string-db.org>) para verificar as interações diretas e indiretas das proteínas de interesse. Essa análise permitiu averiguar quais proteínas participavam de uma ou mais funções

moleculares. Na figura 9, verificamos que a média coeficiente do grupamento foi de 0,759, isso significa que suas proteínas têm mais interações entre si do que seria esperado para um conjunto aleatório de proteínas do mesmo tamanho e distribuição de grau retiradas do genoma. Tal enriquecimento indica que as proteínas estão pelo menos parcialmente conectadas biologicamente, como um grupo.

Em relação a funções específicas verificamos que em resposta a contração muscular os dados mostram uma força estatística de 1.55 ou seja praticamente 5 moléculas respondem diretamente aos estímulos de contração muscular. Em relação as respostas biológicas consideradas positivas em relação a contração muscular a força estatística aumenta para 2.26 ou seja 8 moléculas corroboram no aumento nos níveis de massa muscular.

Em relação aos processos biológicos ligados a manutenção do tecido muscular, foi verificado que 6 moléculas estão ligadas diretamente a esse processo (1.26 da força estatística). Além da verificação em relação a contração muscular, foi verificado a resposta relacionado a captação de glicose, os dados apontam que 3 moléculas contribuem para as respostas diretas ligadas a captação de glicose (força estatística de 1.18). A figura a seguir ilustra as informações geradas pelo String.

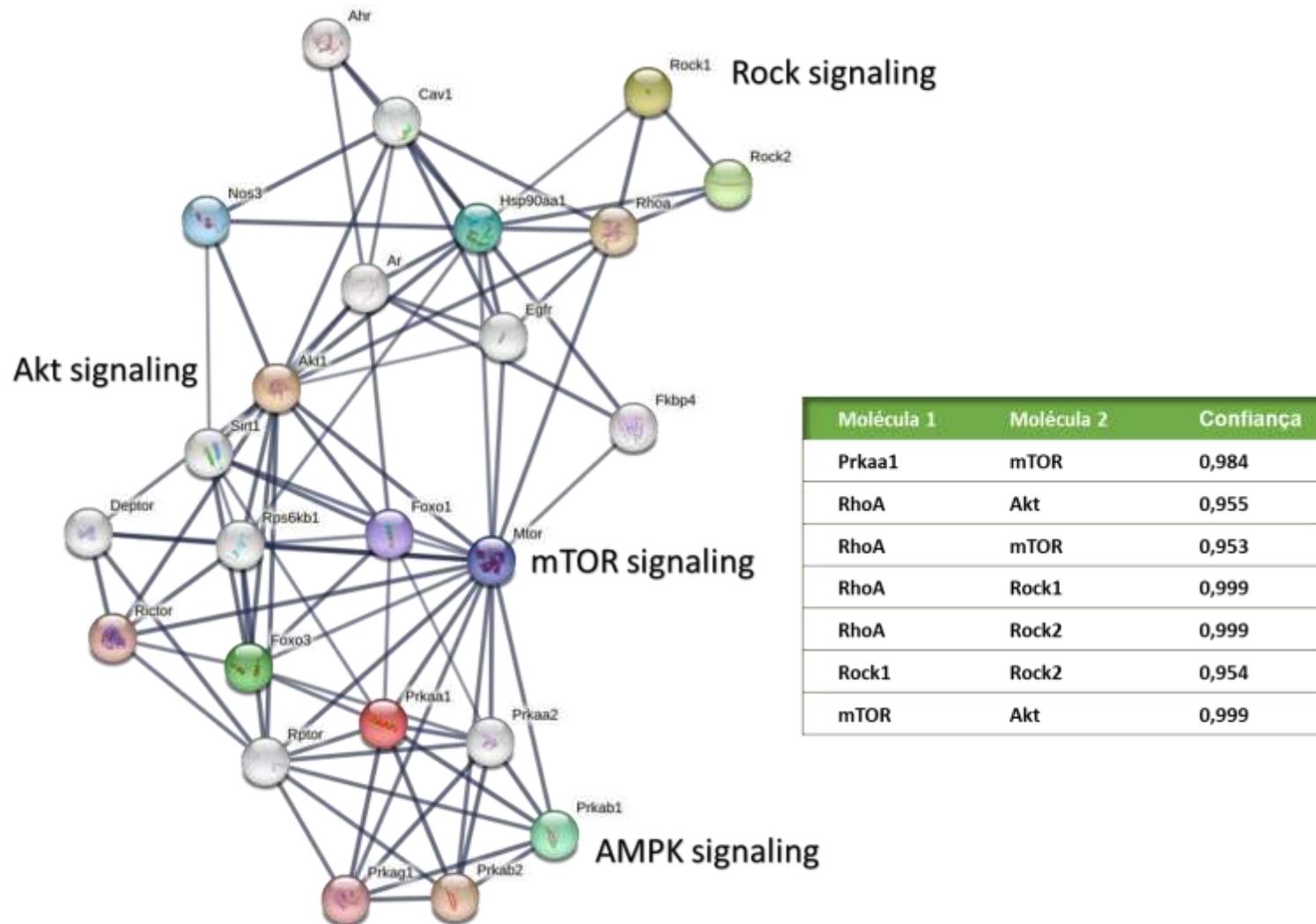


Figura 9. Análise da STRING. Análise das interações biomoleculares entre as moléculas de interesse.

Essa análise permitiu verificar as análises previstas entre as moléculas e suas principais funções. A média do coeficiente dessa análise em relação aos agrupamentos foi de 0.715. As espessuras das bordas indicam a confiança da interação molecular, isso significa que as proteínas diretamente ligadas fazem parte do mesmo complexo físico; comumente em grandes complexos, isso pode não significar que eles estão se ligando diretamente um ao outro.

Essa análise demonstrou que a proteína Akt e mTOR tem uma alta confiança de relação entre os principais caminhos moleculares diretos ou indiretos, a Akt regula muitos processos, incluindo metabolismo, proliferação, sobrevivência celular, crescimento e angiogênese, mediada pela fosforilação de serina e/ou treonina. A Akt é responsável pela regulação da captação de glicose mediando a translocação de GLUT- 4 induzida por insulina.

A proteína mTOR como um regulador central do metabolismo celular, crescimento e sobrevivência em resposta a hormônios, fatores de crescimento, nutrientes, energia e sinais de estresse regula direta ou indiretamente a fosforilação de pelo menos 800 proteínas. Funciona como parte de 2 complexos de sinalização estrutural e funcionalmente distintos mTORC1 e mTORC2 (complexo mTOR 1 e 2). O mTORC1 ativado regula positivamente a síntese de proteínas fosforilando os principais reguladores da tradução do mRNA e da síntese de ribossomos.

O Prkaa1 subunidade alfa-1 catalítica da proteína quinase ativada por 5'-AMP; subunidade catalítica da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), uma proteína quinase sensora de energia que desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo energético celular. Em resposta à redução dos níveis intracelulares de ATP, a AMPK ativa as vias produtoras de energia e inibe os processos que consomem energia: inibe a biossíntese de proteínas, carboidratos e lipídios, bem como o crescimento e a proliferação celular. A AMPK atua via fosforilação direta de enzimas metabólicas e por efeitos de longo prazo via fosforilação de reguladores da transcrição.

A Rock é um regulador do citoesqueleto de actina e da polaridade celular. Envolvido na captação de glicose, regulação da contração do músculo liso, organização do citoesqueleto de actina, fibra de estresse e formação de adesão focal, retração de neuritos e adesão celular. Em relação aos “node color”, podemos destacar que a Rock1 ainda não está totalmente esclarecida já a Rock2 ainda está com menos *empty nodes* em seu interior isso mostra que essa molécula ainda possui algumas

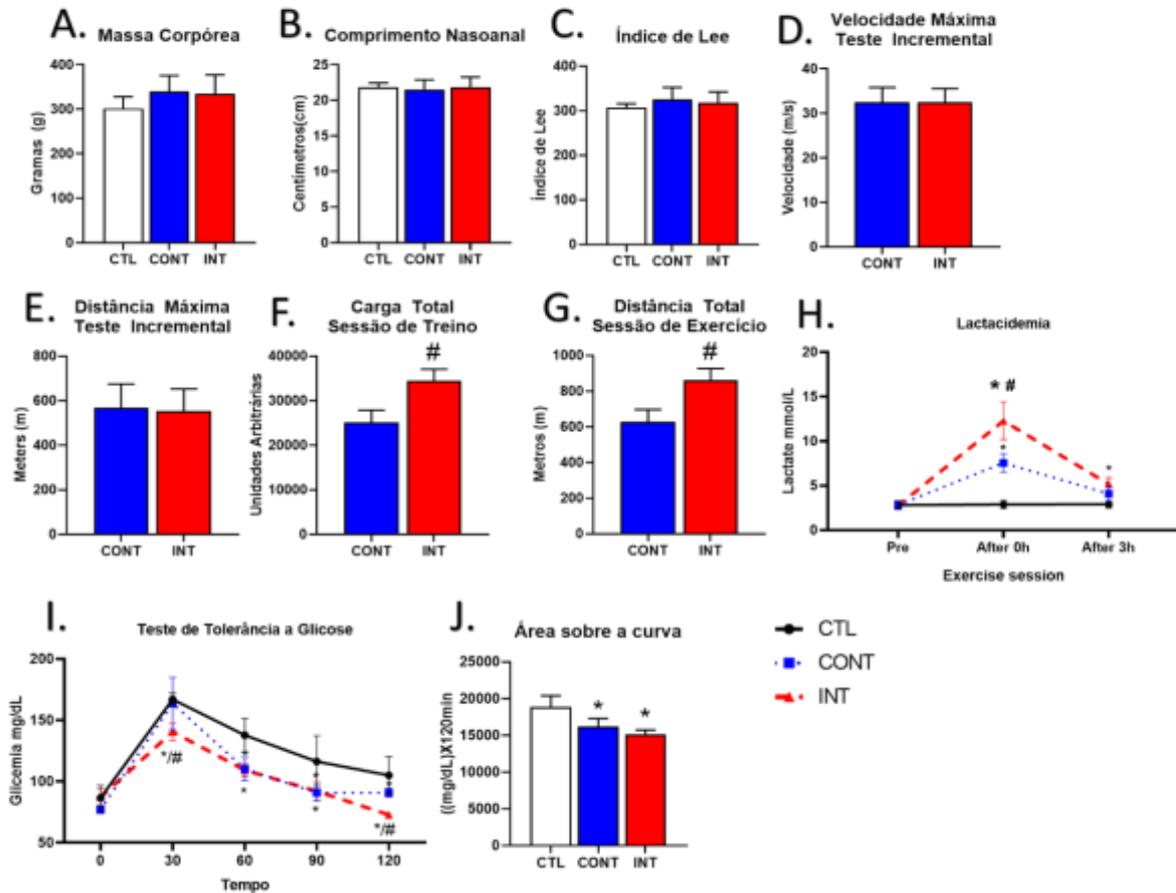
estruturas em 3D que são desconhecidas. Em adição a essa análise verificamos o nível de confiança entre as moléculas de interesse, a relação AMPK e mTOR possui um alto nível de confiança porém AMPK e Rock está em um nível médio de confiança ou seja essa interação precisa ser mais elucidada pela ciência.

Em conclusão com as análises de bioinformática, selecionando as proteínas de interesse (AMPK, mTOR e Rock), essa escolha foi pautada nas funções ligadas a captação de glicose e a hipertrofia muscular em resposta ao exercício físico.

#### **4.4 Exercício agudo de corrida de alta intensidade induz estresse metabólico mais significativo em ratos.**

O peso corporal, comprimento e índice de Lee dos animais dos grupos CTL, CON e INT não apresentaram diferença significativa entre os grupos de estudo (Fig. 11 A-C). Da mesma forma, a velocidade e a distância do teste de carga incremental não apresentaram diferença significativa entre os grupos CON e INT (fig. 11 D e E). No entanto, os dados obtidos durante a sessão de exercício agudo mostraram uma diferença no volume da sessão e na distância entre os grupos CON e INT (fig. 11 F e G). Além disso, a análise da lactacidemia (fig. 11 H) mostrou aumento dessas variáveis fisiológicas após o término da sessão de exercícios em relação ao grupo controle; no entanto, apenas os ratos INT mostraram um aumento significativo. Além disso, a análise realizada 3 horas após o término da sessão de exercício mostrou que os valores de lactato do grupo INT ainda eram maiores que os do grupo CTL. Posteriormente, três horas após a sessão de exercício foi realizado o teste de tolerância à glicose. Observou-se diferença entre os animais que realizaram o esforço físico em relação ao grupo CTL (Fig 11 I e J).

## Análise dos Parâmetros Fisiológicos e de Desempenho



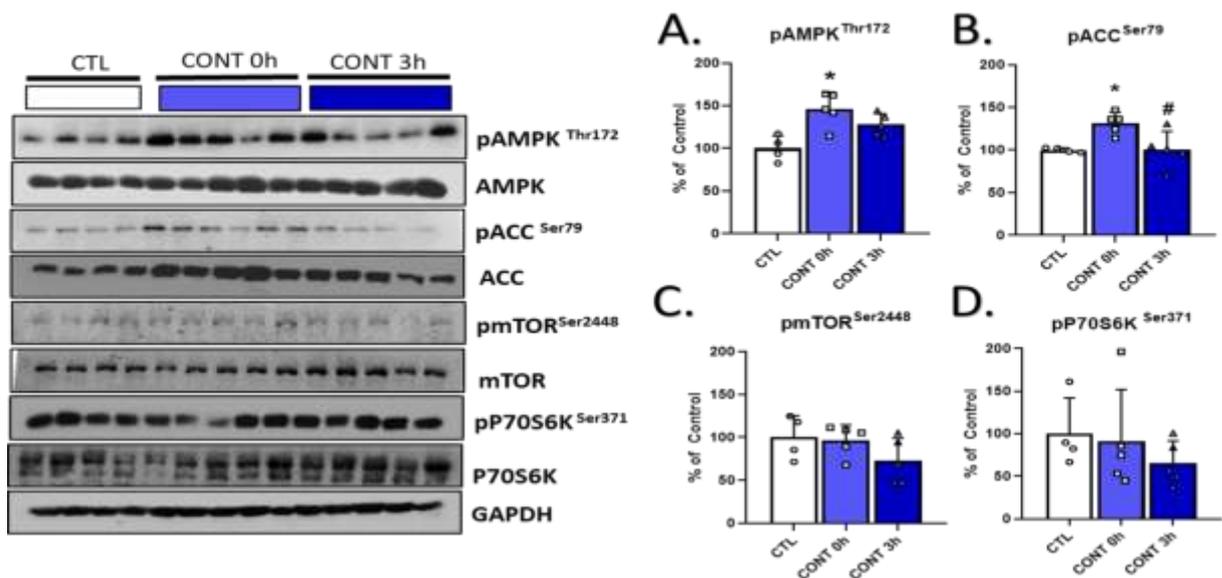
**Figura 11. Parâmetros fisiológicos e de desempenho de ratos.** Medida da massa corporal (A), comprimento focinho-ânus (B) e índice de Lee (C). Análise da velocidade máxima de corrida em esteira (D), distância máxima (E) no teste incremental, a carga total da sessão aguda de exercício (volume vs. intensidade) (F), distância total na sessão aguda de exercício (G), lactacidemia (H) e Teste de Tolerância a glicose (I) com a análise da área sobre a curva (J). Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo experimental (CTL, n = 4, CONT, n = 10 e INT, n = 10). \* p < 0,05 vs. CTL e # p < 0,05 vs. CONT A-C, H, teste de Tukey e teste t de Student F-G.

### 4.5 O exercício agudo de corrida contínua de baixa intensidade aumentou a fosforilação da AMPK imediatamente após o exercício no músculo EDL de ratos

Em seguida, foi analisado o efeito agudo do exercício de baixa intensidade sobre as atividades das proteínas AMPK, ACC, mTOR e P70 no músculo EDL. Um aumento de AMPK foi encontrado imediatamente após (0h) a sessão de exercício

agudo em ratos CONT vs. ratos CTL (Fig. 12A). Em relação à fosforilação do ACC, foi observado um aumento no músculo EDL em ratos exercitados (CONT) imediatamente (0 hora) e 3 horas após a sessão aguda de exercício em comparação com o grupo controle (Fig. 12B). Não houve alterações das proteínas mTOR (Fig. 12C) e P70S6K (Fig. 12D) entre os grupos.

### Efeito do Exercício Contínuo nas vias AMPK e mTOR

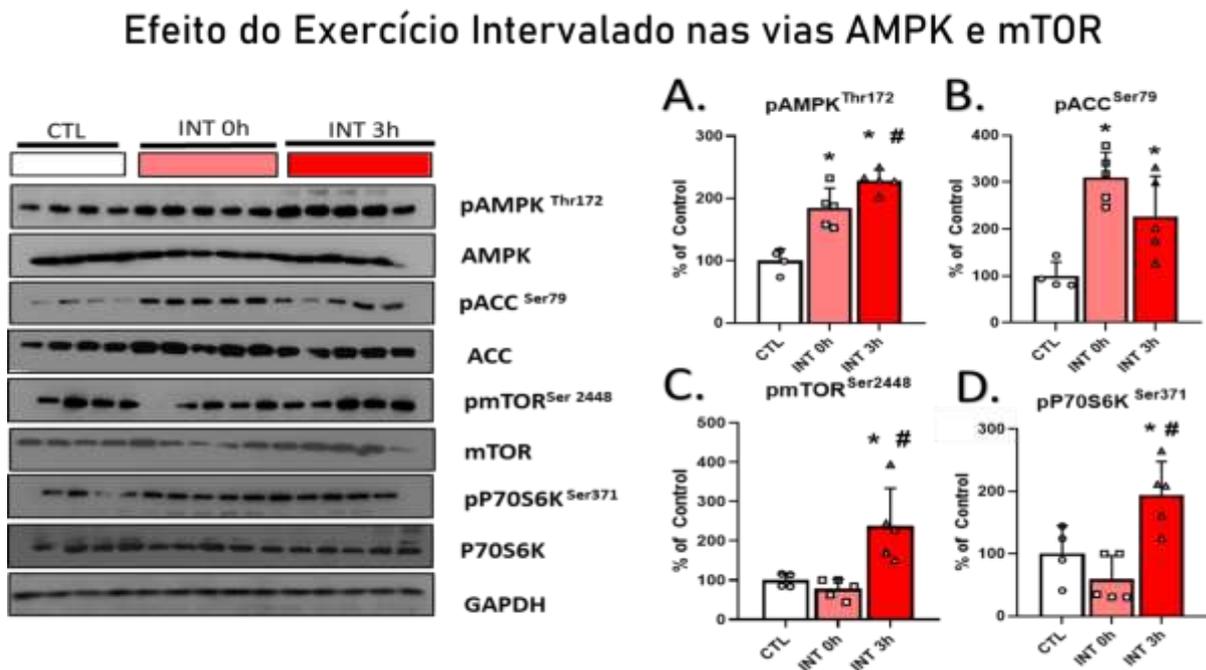


**Figura 12. Efeitos do exercício agudo contínuo de baixa intensidade na via de sinalização AMPK e mTOR no músculo EDL de ratos Wistar** A - Fosforilação da AMPK (Thr172) normalizada para o conteúdo total da AMPK, B – Fosforilação de ACC (Ser79) normalizada para conteúdo total de ACC, C - fosforilação de mTOR (Ser2448) normalizada para o conteúdo total de mTOR, D - Fosforilação de P70S6K (Ser371) normalizada para conteúdo total de P70S6K. Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  DP dos animais submetidos ao protocolo de exercício. Os ratos foram distribuídos da seguinte forma: grupo CTL (n=4), grupo CONT 0h (n=5) e grupo CONT 3h (n=5). \* $p < 0,05$  vs CTL, #  $p < 0,05$  vs CONT 0h, seguido pelo teste de Tukey.

#### 4.6 Exercício agudo de corrida intervalado de alta intensidade aumentou a fosforilação da AMPK e mTOR no músculo EDL.

Posteriormente, foram avaliadas as fosforilações de AMPK e mTOR no músculo EDL de ratos submetidos a uma sessão aguda de exercício de corrida de alta intensidade. Uma diferença estatística foi observada nas fosforilações de AMPK

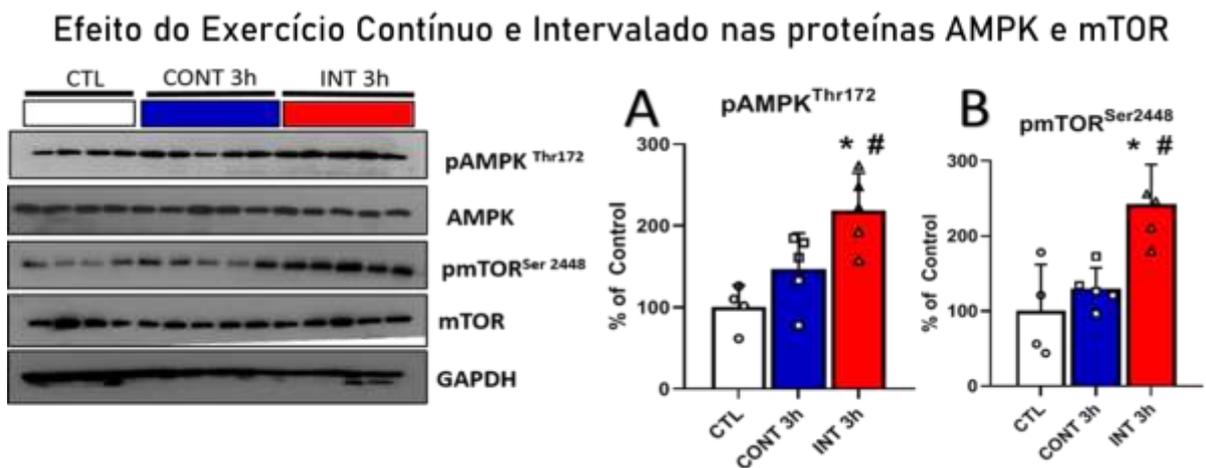
(Fig. 13A) e ACC (Fig. 13B) imediatamente após o final da sessão de exercício, com um aumento mais significativo nas fosforilações de AMPK e ACC no músculo EDL 0h e 3 horas após final do exercício de corrida em esteira em ratos INT quando comparados ao grupo controle. As fosforilações de mTOR (Fig. 13C) e P70S6K (Fig. 13D) foram maiores no músculo EDL 3 horas após o final da sessão aguda de corrida em esteira em ratos INT quando comparados ao grupo controle.



**Figura 13. Efeitos do exercício intervalado agudo de baixa e alta intensidade na via de sinalização AMPK e mTOR no músculo EDL de ratos Wistar.** A - Fosforilação da AMPK (Thr172) normalizada para o conteúdo total da AMPK, B – Fosforilação de ACC (Ser79) normalizada para conteúdo total de ACC, C - fosforilação de mTOR (Ser2448) normalizada para o conteúdo total de mTOR, D - Fosforilação de P70S6K (Ser371) normalizada para conteúdo total de P70S6K. Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  DP dos animais submetidos ao protocolo de exercício. Os ratos foram distribuídos da seguinte forma: grupo CTL (n=4), grupo INT 0h (n=5) e grupo INT 3h (n=5). Teste de Tukey seguido por \* $p < 0,05$  vs CTL, # $p < 0,05$  vs INT 0h

#### 4.7 O exercício intervalado agudo de alta intensidade induziu aumento significativo nas fosforilações de AMPK e mTOR no músculo EDL de ratos Wistar jovens

Uma análise comparativa entre ratos submetidos a uma sessão de exercício mostrou que a fosforilação de AMPK (Fig. 14A) e mTOR (Fig. 14B) no músculo EDL foram significativamente maiores em ratos submetidos a exercício agudo de corrida intervalada de alta intensidade (INT) do que em ratos submetidos a exercício contínuo de baixa intensidade (CONT) e ratos CTL. Esses resultados indicam que o exercício de corrida de alta intensidade induz um aumento significativo nos níveis de fosforilação de AMPK e mTOR no músculo esquelético com predominância de fibras de contração rápida (EDL). Além disso, esse aumento ainda foi observado 3 horas após o término do protocolo de exercício de corrida em esteira em ratos INT em comparação com ratos CONT e CTL.



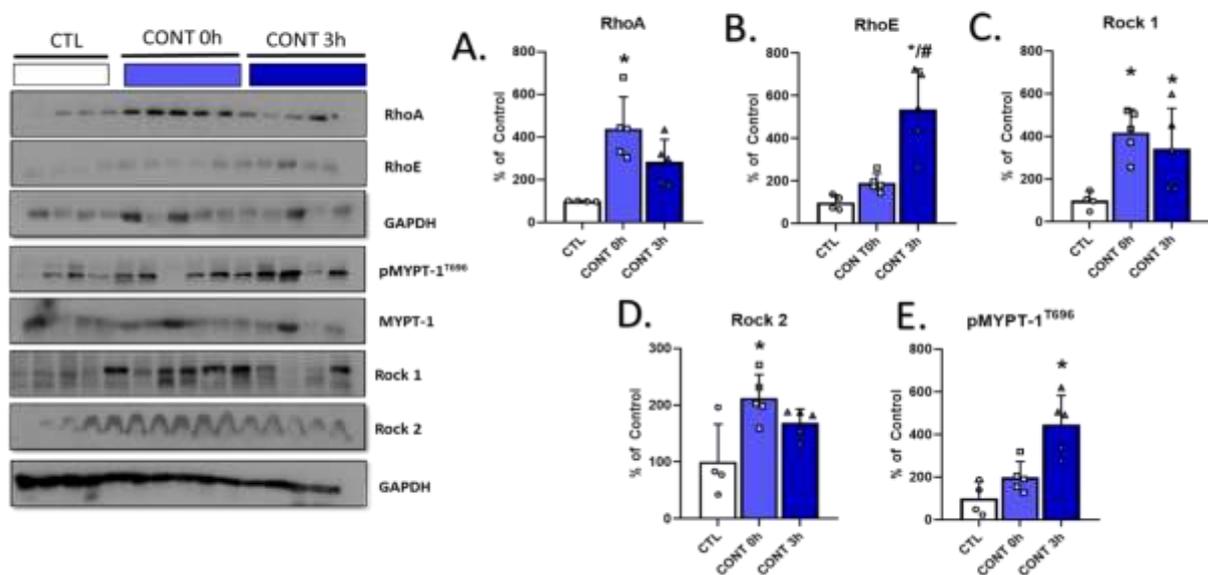
**Figura 14. Fosforilação da AMPK e mTOR 3h após a sessão aguda de exercício físico.** A - Fosforilação da AMPK (Thr172) normalizada para o conteúdo total da AMPK, B - Fosforilação de mTOR (Ser2448) normalizada para o conteúdo total de mTOR, D. Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  DP dos animais submetidos ao protocolo de exercício. Os ratos foram distribuídos da seguinte forma: grupo CTL (n=4), grupo CONT 3h (n=5) e grupo INT 3h (n=5). Teste de Tukey seguido de \* $p < 0,05$  vs CTL, # $p < 0,05$  vs CONT 3h.

#### 4.8 Exercício agudo de corrida contínuo de baixa intensidade aumentou o conteúdo proteico de Rock1 e Rock 2 no músculo EDL

Posteriormente, foram analisadas as proteínas relacionadas a via da Rho-quinase. Assim, foi verificada diferença estatística ao conteúdo de RhoA (Fig. 15A) logo após o término do exercício e a RhoE com diferença 3 horas após o término da sessão tanto no grupo CTL quando no grupo CONT 0h (Fig. 15B). Em relação à Rock1

(Fig 15C), teve diferença imediatamente após (0h) e 3h após a sessão aguda de exercício. Em relação à Rock2 (Fig. 15D) foi verificado aumento no músculo EDL nos ratos exercitados (CONT) imediatamente após a sessão em relação ao grupo de ratos CTL. Com relação à fosforilação de seu substrato o MYPT-1 (Fig. 15E), foi verificado aumento no músculo EDL nos ratos exercitados 3h após a realização da sessão aguda de exercício.

### Efeito do Exercício Contínuo sobre a via da Rock

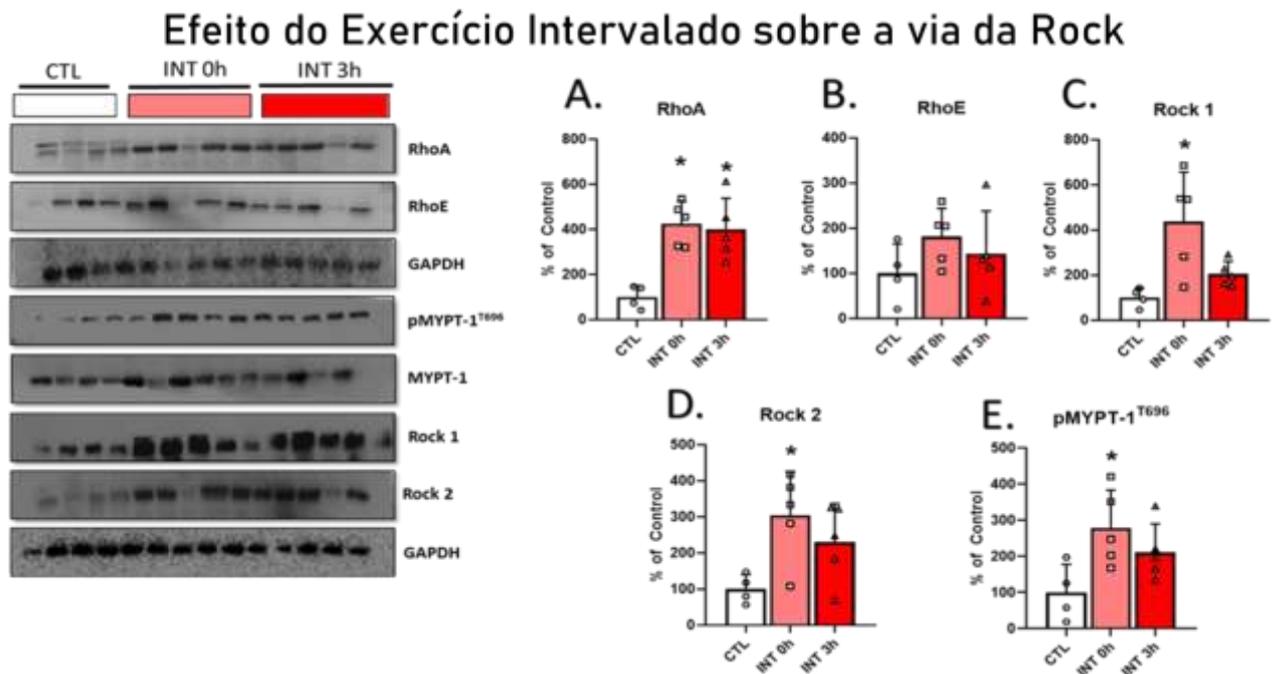


**Figura 15. Efeitos do exercício agudo contínuo de baixa intensidade sobre a via de sinalização da Rho-quinase no músculo EDL de ratos Wistar** A – conteúdo de RhoA, B – conteúdo de RhoE, C – conteúdo de Rock1 e D – conteúdo de Rock2. As proteínas foram normalizadas pelo controle endógeno (GAPDH) das respectivas membranas. E - fosforilação de seu substrato o MYPT-1 normalizado pelo conteúdo total. As barras representam a média  $\pm$  DP de animais que foram submetidos ao exercício. Os ratos foram distribuídos nos grupos CTL (n=4), grupo CON 0h (n=5) e grupo CON 3h (n=5). \* p<0,05 versus grupo CTL, # p<0,05 versus CON 0h.

#### 4.9 Exercício agudo de corrida intervalado de alta intensidade aumentou o conteúdo proteico de Rock 1 e Rock 2 no músculo EDL.

A próxima etapa foi avaliar a fosforilação das proteínas da via Rho-quinase no músculo EDL dos animais que foram submetidos a sessão aguda de exercício de corrida de alta intensidade. Foi verificada diferença significativa no aumento de fosforilação RhoA (Fig. 16A), foi observado aumento imediatamente após (0h) e 3h

após a sessão aguda de exercício nos ratos do grupo INT em relação aos ratos do grupo CTL. Não houve diferença em relação à fosforilação da RhoE (Fig.16B). Em relação ao conteúdo proteico da Rock1 (Fig. 16C) e na Rock 2 (Fig. 16D), imediatamente após o término da sessão de exercício. Em relação à fosforilação de seu substrato o MYPT-1 (Fig. 16E), foi verificado aumento no músculo EDL nos ratos exercitados imediatamente após a realização da sessão aguda de exercício de alta intensidade.

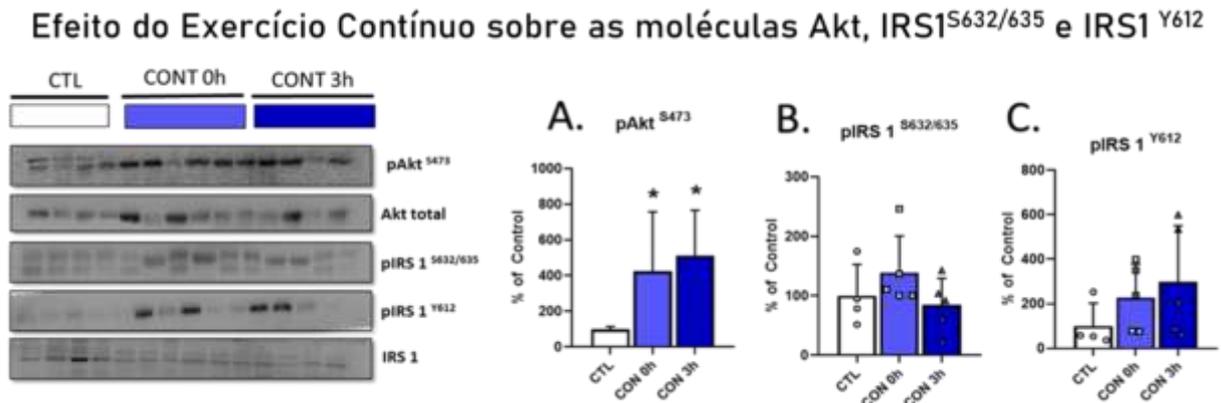


**Figura 16. Efeitos do exercício agudo contínuo de alta intensidade sobre a via de sinalização da Rho-quinase no músculo EDL de ratos Wistar.** A – conteúdo de RhoA, B – conteúdo de RhoE, C – conteúdo de Rock1 e D – conteúdo de Rock2. As proteínas foram normalizadas pelo controle endógeno (GAPDH) das respectivas membranas. E - fosforilação de seu substrato o MYPT-1 normalizado pelo conteúdo total. As barras representam a média  $\pm$  DP de animais que foram submetidos ao exercício. Os ratos foram distribuídos nos grupos CTL (n=4), grupo INT 0h (n=5) e grupo INT 3h (n=5). \* p<0,05 versus grupo CTL, # p<0,05 versus INT 0h.

#### 4.10 Exercício agudo de corrida contínuo de baixa intensidade aumentou a fosforilação da Akt no músculo EDL

Em seguida, avaliamos o efeito agudo do exercício de baixa intensidade sobre as proteínas Akt, IRS1<sup>632/635</sup> e IRS1<sup>Y612</sup> no músculo EDL. Foi verificada diferença significativa na fosforilação da Akt no músculo EDL, com um aumento observado imediatamente após (0h) e 3 horas após a sessão aguda de exercício nos ratos do

grupo CON em relação aos ratos do grupo CTL (Fig. 17A). Não foram observadas alterações para IRS1 em nenhum dos períodos de avaliação (Fig. 17B e 17C).

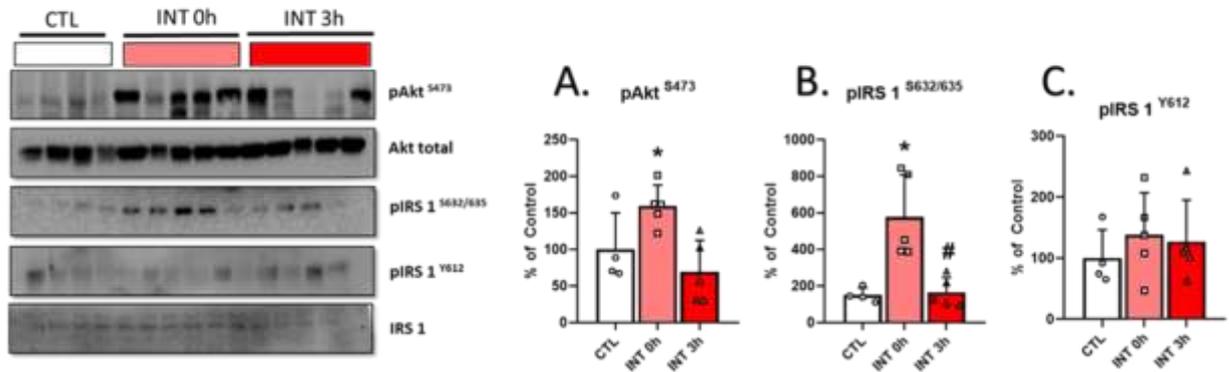


**Figura 17. Efeitos do exercício agudo contínuo de baixa intensidade sobre a sinalização da Akt, IRS1<sup>632/635</sup> e IRS1<sup>Y612</sup> no músculo EDL de ratos Wistar.** A - Fosforilação da Akt normalizada para o conteúdo total de Akt, B – Fosforilação de IRS1 (Ser632/635) normalizada para conteúdo total de IRS1, C - fosforilação de IRS1 (Y612) normalizada para o conteúdo total de IRS1. As barras representam a média  $\pm$  DP de animais que foram submetidos ao exercício. Os ratos foram distribuídos nos grupos CTL (n=4), grupo CON 0h (n=5) e grupo CON 3h (n=5). \*  $p < 0,05$  versus grupo CTL, #  $p < 0,05$  versus CON 0h.

#### 4.11 Exercício agudo de corrida intervalado de alta intensidade aumentou a fosforilação da Akt e IRS1 no músculo EDL.

Posteriormente, analisamos as proteínas Akt, IRS1<sup>632/635</sup> e IRS1<sup>Y612</sup> no músculo EDL de animais que foram submetidos a sessão aguda de exercício de alta intensidade. Com relação a Akt e a IRS1<sup>S632/635</sup> foi verificado aumento no músculo EDL nos ratos exercitados (INT) imediatamente após a sessão em relação ao grupo de ratos CTL (Fig. 18A e 18B). Não houve diferença significativa para IRS1<sup>Y612</sup> (Fig. 18C).

### Efeito do Exercício Intervalado sobre as moléculas Akt, IRS1<sup>S632/635</sup> e IRS1<sup>Y612</sup>

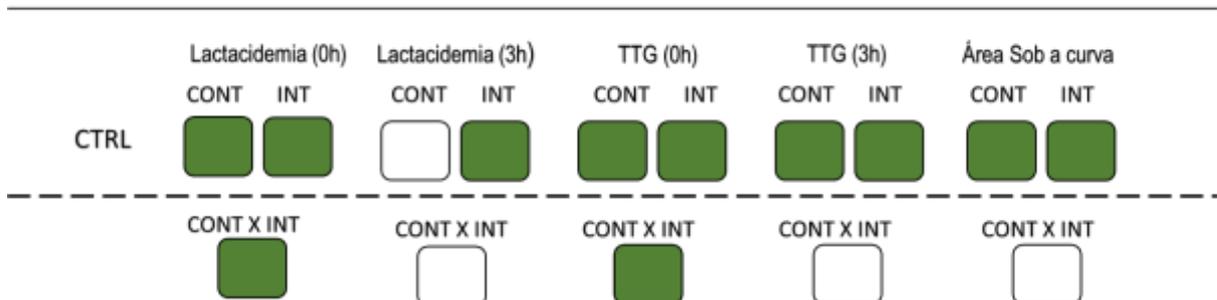


**Figura 18. Efeitos do exercício agudo intervalado de alta intensidade sobre a sinalização da Akt, IRS1<sup>632/635</sup> e IRS1<sup>Y612</sup> no músculo EDL de ratos Wistar** A - Fosforilação da Akt normalizada para o conteúdo total de Akt, B – Fosforilação de IRS1 (Ser632/635) normalizada para conteúdo total de IRS1, C - fosforilação de IRS1 (Y612) normalizada para o conteúdo total de IRS1. As barras representam a média  $\pm$  DP de animais que foram submetidos ao exercício. Os ratos foram distribuídos nos grupos CTL (n=4), grupo INT 0h (n=5) e grupo INT 3h (n=5). \*  $p < 0,05$  versus grupo CTL, #  $p < 0,05$  versus INT 0h.

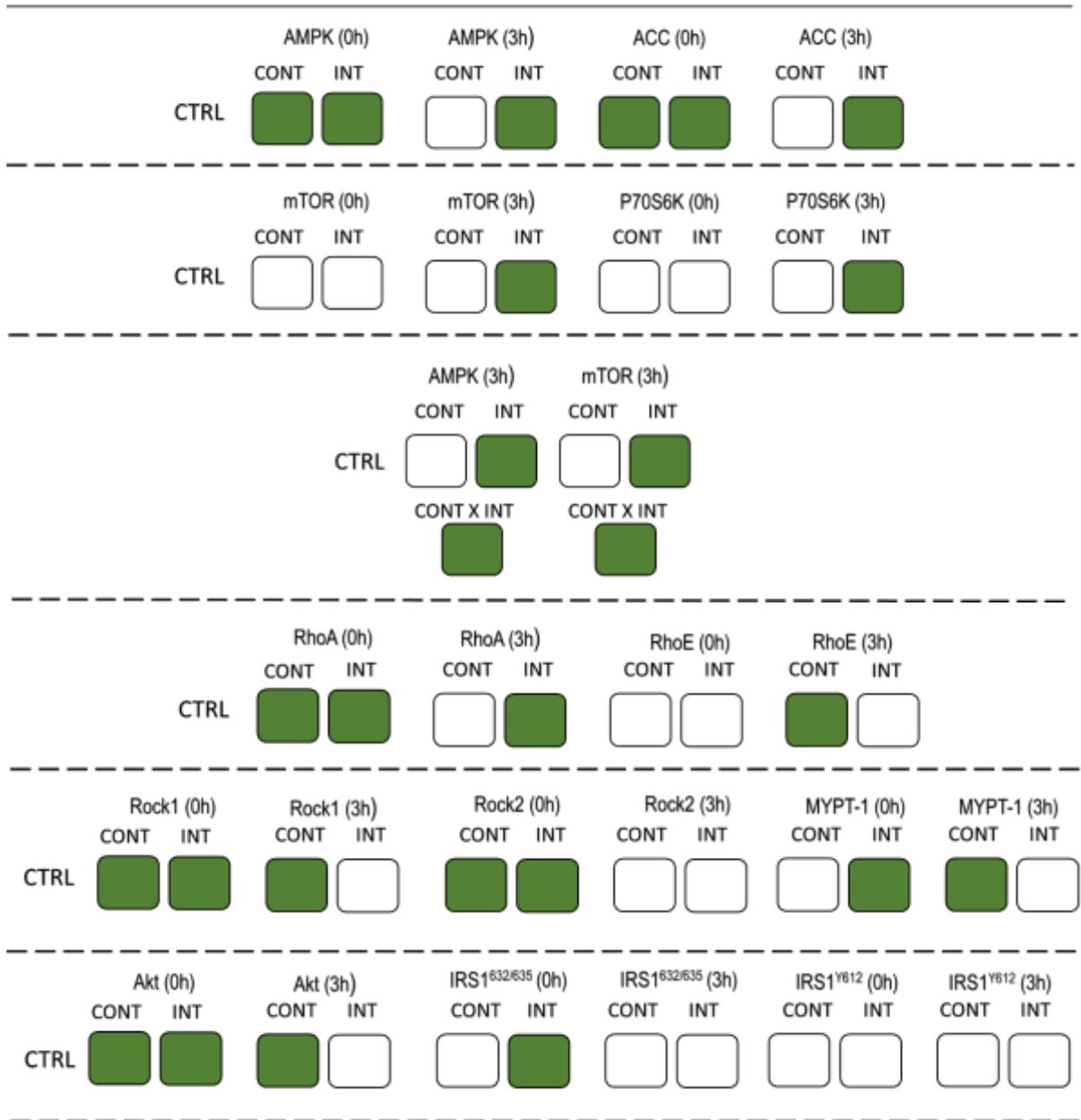
#### 4.12 Resumo dos resultados

A figura abaixo apresenta um panorama referentes aos resultados apresentados nessa pesquisa.

### RESULTADOS - FISIOLÓGICO



## RESULTADOS - MOLECULAR



**Figura 19. Resumo dos resultados apresentados.** As caixas brancas indicam que não houve diferença estatística, as caixas em verde indicam diferença significativa entre as análises.

## 5 DISCUSSÃO

Há um consenso na literatura que a contração muscular estimula uma cascata de sinalização intracelular envolvida com a captação de glicose independentemente da presença de insulina. Por isso, um dos fatores determinantes para esse efeito biológico acontecer é a intensidade do exercício físico (PAULI et al. 2009; LITTLE et al. 2011; GIABALA et al. 2012;).

Nesse contexto, trabalhos têm sido desenvolvidos por diversos pesquisadores para investigar os mecanismos moleculares envolvidos nessas alterações metabólicas quando ocorre o aumento do esforço físico (BURGOMASTER et al. 2008; EGAN et al. 2010; EDGE et al. 2013). Entender e relacionar essa ativação com a modulação das variáveis de treino é de suma importância já que a individualidade biológica é um dos pontos a se considerar para a organização de um programa de exercício físicos (ACCATTATTO et al., 2017; CONTREPOIS et al., 2020; MOITINHO-SILVA et al., 2021).

Já é conhecido o papel do exercício físico na regulação da sinalização da insulina no músculo esquelético e que a degradação de ATP pode promover a ativação de proteínas independentes dessa sinalização durante e após o esforço físico e isso contribuir para a captação de glicose (SYLOW et al., 2016). Recentemente novos mecanismos moleculares em resposta ao exercício físico no processo de captação de glicose vêm ganhando destaque, a Rho-quinase influencia o controle glicêmico por fosforilação de IRS1 em resíduos S632/635, aumentando a fosforilação de Akt no músculo esquelético (FURUKAWA et al., 2005). Esses mecanismos subjacentes ainda não estão totalmente esclarecidos quando ocorre alterações na prescrição das várias de treino.

Nosso estudo demonstrou que, em ratos submetidos a exercícios intervalados de alta intensidade, os níveis de fosforilação de AMPK e mTOR foram significativamente maiores no músculo EDL 3h após o término do exercício agudo em esteira. Além disso, o exercício de corrida em esteira de alta intensidade manteve efetivamente os níveis de fosforilação de ACC e P70S6K 3h após o término da sessão de exercício, fato que não foi observado em ratos submetidos a exercícios contínuos de baixa intensidade. Esses achados destacam a importância de investigar a resposta intracelular de proteínas induzidas ao estresse metabólico em fibras de contração rápida.

De acordo com a análise da lactacidemia, o exercício intervalado de alta intensidade induziu um maior aumento na concentração de lactato sanguíneo quando comparado ao exercício contínuo de baixa intensidade, levando ao aumento do estresse metabólico. Tal aumento na lactacidemia resultou parcialmente do maior recrutamento de fibras do tipo II durante o exercício agudo de corrida em esteira com intervalo de alta intensidade do que o exercício contínuo de baixa intensidade. O efeito do estresse metabólico na AMPK e mTOR nas fibras de contração rápida horas após o término do exercício ainda não foi totalmente compreendido. No entanto, o lactato é um dos indicadores mais comuns da intensidade do exercício, o que influencia a ativação da AMPK em fibras de contração rápida (EGAN et al., 2010; KRISTENSEN et al., 2015). Além disso, um estudo anterior analisando diferentes tipos de fibras em resposta ao exercício físico mostrou que o aumento da fosforilação da AMPK em fibras do tipo II foi 33% maior quando comparada às fibras do tipo I em humanos (LEE-YOUNG et al., 2009).

Em relação ao teste de tolerância a glicose realizado três horas após o término do esforço físico, os animais dos grupos CONT e INT tiveram uma área sob a curva mais baixa em relação ao grupo CTL (Figura 10 B). Entre a infusão (0') e o primeiro momento (30') o grupo INT teve um aumento de 140 mg/dL, enquanto os grupos CTL e CONT tiveram um aumento de 175 mg/dL e no último momento (120') os valores do grupo INT eram de 75 mg/dL já os grupos CTL e CONT eram de 100 mg/dL (Figura 10 A), o que enfatiza a eficácia da intensidade do exercício agudo para a melhora da homeostase glicêmica. Em 2009, Koshinaka e colaboradores relataram que não encontraram aumento na captação de glicose em animais que realizaram uma sessão aguda de treinamento intervalado de alta intensidade. Nesse mesmo ano Dutra e colaboradores (2009), analisaram as respostas glicêmicas ao exercício intermitente realizado em esteira em diferentes intensidades e mostraram que a intensidade a 90% do  $VO_{2máx}$  proporcionou uma redução na curva glicêmica após o término do esforço. Apesar de nossos animais realizarem uma sessão de exercício, entendemos que a intensidade do protocolo promove maior degradação de glicose após o exercício quando comparado aos níveis de repouso.

A AMPK é uma proteína essencial envolvida na regulação do metabolismo energético em resposta ao exercício físico. Um estudo observou que camundongos AMPK Knockout (KO) no músculo esquelético apresentaram menor atividade locomotora na corrida voluntária em roda e redução da capacidade aeróbia avaliada

em exercício de corrida em esteira (O'NEILL et al., 2011). Da mesma forma, outros estudos que analisaram roedores com deficiência de AMPK no músculo esquelético também encontraram redução no desempenho durante a prática de exercícios (MAARBJERG et al., 2009; BECK JORGENSEN et al., 2009). Em roedores sem deficiência de AMPK, o exercício físico aumenta a fosforilação da AMPK, e essa resposta está diretamente relacionada à intensidade do exercício (WOJTASZEWSKI et al., 2000; EGAN et al., 2010).

Henríquez-Olguín e colaboradores (2019), submeteram camundongos a um exercício agudo de corrida intervalada de alta intensidade. Eles encontraram aumento da fosforilação de AMPK 1h após o exercício e pACC imediatamente após o término do exercício no músculo quadríceps. Um estudo anterior conduzido por nosso laboratório encontrou um aumento na fosforilação da AMPK no músculo quadríceps de camundongos C57BL / 6J após sessões agudas de corrida em esteira em uma intensidade moderada (CRISOL et al., 2018). Os níveis de fosforilação da AMPK aumentaram durante e na primeira hora após o exercício físico, e a ativação da AMPK está ligada a fatores como volume e intensidade do exercício, ingestão de alimentos e nível de aptidão física (COFFEY et al., 2006; COMBES et al., 2015; MACINNIS & GIBALA, 2017). Em nosso estudo, os níveis de fosforilação da AMPK aumentaram em ambos os protocolos de exercícios logo no final da sessão (0 horas). No entanto, o aumento nos níveis de fosforilação da AMPK 3 horas após o exercício ocorreu apenas em ratos submetidos a exercícios intervalados de alta intensidade. O aumento da fosforilação da AMPK imediatamente após o exercício, mesmo em ratos que realizaram exercícios de baixa intensidade, pode ser parcialmente explicado pelas altas concentrações de lactacidemia em ratos logo após o término da sessão de exercício. No entanto, o exercício de alta intensidade induziu um estresse metabólico mais significativo, capaz de desencadear um aumento da AMPK, que permaneceu elevada por até 3 horas após a sessão de exercício agudo.

Ao analisar o efeito do exercício em humanos saudáveis, Chen e colaboradores (2003), observaram que o ciclismo de 1 hora em diferentes intensidades (40, 60 e 80% do VO<sub>2</sub>) induziu um aumento na AMPK a 60% e 80% do VO<sub>2</sub> e aumentou a ACC em todas as intensidades no músculo vasto lateral logo após o fim do exercício. Birk e Wojtaszewski (2006), analisaram a ativação de AMPK e ACC no músculo vasto lateral de homens saudáveis submetidos a três diferentes protocolos de exercício em cicloergômetro nas seguintes intensidades: grupo 1 - 20 min a 80%

do VO<sub>2</sub>pico, grupo 2 - 20 s a 110% do VO<sub>2</sub>pico e grupo 3 - 30 s. Eles encontraram um aumento na fosforilação de ACC em todos os grupos, mas apenas uma elevação significativa na fosforilação de AMPK foi observada no grupo 1. Assim, a proteína ACC, a jusante da AMPK, desempenha um papel vital na oxidação de gordura. Em 2015, Combes et al. submeteram homens saudáveis a exercício em cicloergômetro contínuo (70% do VO<sub>2</sub>máx por 30 minutos) e os compararam a estímulos intermitentes (30 séries / 1 min em intensidade máxima, alternados com recuperação de 1 minuto). Eles descobriram que o exercício intervalado promoveu um maior aumento na fosforilação da AMPK no músculo vasto lateral. Juntos, esses estudos em roedores e humanos mostram que a intensidade é uma variável essencial para a fosforilação da AMPK; no entanto, o tempo de exercício e a aptidão física influenciam diretamente na ativação desta proteína (GIBALA et al., 2009; KRISTENSEN et al., 2015; METCALFE et al., 2015).

Nosso estudo mostrou que o exercício agudo de alta intensidade induz um aumento significativo na fosforilação de mTOR no músculo EDL 3 horas após o final da sessão de exercício agudo. Ogasawara et al. (2014), usaram ratos Sprague-Dawley para comparar um protocolo agudo de corrida em esteira com intensidade equivalente ao limiar de lactato (60 min / 25 m / min) a um protocolo baseado em estímulos elétricos (SS-104J; Nihon Konden). Eles descobriram que o protocolo da esteira não poderia aumentar os níveis de proteína mTOR e P70S6K logo após o exercício. Em 2013, Souza et al. submeteram ratos Wistar a uma sessão aguda de corrida em esteira de 60 minutos a 60% do VO<sub>2</sub> e não encontraram aumento da fosforilação de mTOR e P70S6K logo após o término da sessão e 2 horas após o término do exercício. Nestes dois estudos mencionados acima, o exercício físico não conseguiu aumentar a ativação de mTOR e p70S6k imediatamente após o exercício. Em geral, a proteína mTOR apresenta aumento da fosforilação poucas horas após o exercício, por ser uma via de sinalização com função antagônica à AMPK. Então, após o exercício, os níveis de AMPK começam a diminuir enquanto a via de sinalização mTOR aumenta. Este sistema faz todo o sentido, uma vez que a AMPK está envolvida no metabolismo energético e desempenha um papel vital durante e nas primeiras horas após o exercício. Ao mesmo tempo, o mTOR é um regulador essencial da reconstrução e hipertrofia do músculo esquelético, que é um processo mais lento que ocorre algumas horas após o exercício (ATHERTON et al., 2005; CASUSO et al., 2017; EDMAN et al., 2019). Curiosamente, demonstramos que o exercício agudo de

alta intensidade aumentou a AMPK e o mTOR, que permaneceram elevados 3 horas após o exercício.

France e colaboradores (2020), recentemente compararam ratos Wistar obesos induzidos por dieta rica em gordura, submetidos a um protocolo de exercícios contínuos e exercícios intervalados de alta intensidade por 4 dias. Eles encontraram um aumento na fosforilação de mTOR nos músculos esqueléticos (quadríceps e músculos gastrocnêmios) 24 horas após a última sessão de exercício. Nosso estudo observou um aumento na fosforilação de mTOR apenas em ratos submetidos ao protocolo de exercícios agudos de alta intensidade 3 horas após o término da sessão de exercícios. Ao analisar músculos humanos, vários autores observaram que a intensidade do exercício e o nível de aptidão física são variáveis que influenciam a via do mTOR (DREYER et al., 2010, GOSELIN et al., 2012). Nesse sentido, Fernandez-Gonzalo e colaboradores (2013), analisaram indivíduos treinados versus sedentários submetidos a um protocolo de exercício resistido comparado ao exercício combinado. Após uma biópsia do músculo vasto lateral, observaram um aumento significativo na ativação de P70S6K no grupo que realizou exercício combinado em comparação ao exercício de resistência. Além disso, indivíduos treinados apresentaram resposta mais significativa em relação ao grupo sedentário.

Com base nos achados e evidências da literatura, exercícios agudos de corrida de alta intensidade podem regular mais eficazmente as vias AMPK e mTOR em fibras musculares de contração rápida em animais e humanos (ATHERTON et al., 2004; CAMERA et al., 2010; GOSELIN et al., 2012; FERNANDEZ-GONZALO et al., 2013; SOUZA et al., 2013; COMBES et al., 2015; KRISTENSEN et al., 2015). No entanto, algumas lacunas ainda precisam ser preenchidas. É relevante investigar os efeitos do exercício intervalado de alta intensidade em diferentes fibras musculares, tempo-resposta após o exercício e diferentes níveis de aptidão física e tempo de treinamento. Tais investigações contribuirão para uma melhor compreensão e aplicação do exercício em diferentes contextos de saúde e desempenho.

Além da sinalização independente de insulina, o exercício exerce importante ação sobre a via de transdução do sinal da insulina, sendo esse efeito essencial para manutenção de um bom controle glicêmico, haja vista, que os efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da insulina perduram por 24-48 horas. No entanto, ainda há lacunas importantes para serem preenchidas sobre os efeitos

do exercício físico contínuo e intervalado sobre moléculas que regulam positivamente o sinal da insulina no músculo esquelético.

Descobertas recentes relatam a importância da Rho-quinase no aumento da captação de glicose através da sua ação sobre a fosforilação do substrato-1 do receptor de insulina no músculo esquelético. Foi evidenciada uma relação entre a Rock com a sinalização da via da insulina no estudo por Furukawa em 2005. Esse estudo analisou que a proteína Rock poderia atuar sobre o controle glicêmico através da fosforilação da proteína Akt nos tecidos muscular e adiposo. Essa ativação da Akt é decorrente de uma sinalização anterior, ou seja, a Rock interage na fosforilação do IRS-1 (resíduo de ser632/935), potencializando a captação de glicose. Em 2009, Lee e colaboradores confirmaram essa comunicação quando apresentaram que ratos Knockout Rock1 tiveram aumento na resistência à insulina e hiperinsulinemia. Em 2014, Noda e colaboradores relataram uma relação entre a AMPK e a Rock. Nossa análise de Bioinformática aponta essa associação entre as sinalizações de AMPK e Rock. Contudo, o aumento do conteúdo proteico da Rock em resposta ao exercício de alta intensidade ainda não é totalmente esclarecido. Portanto, compreender a utilização da intensidade do esforço e verificar a resposta da via da Rock pode ser importante para analisar os caminhos adjacentes da captação da glicose em resposta ao exercício no músculo esquelético.

Em nosso estudo, verificamos que o protocolo de corrida de baixa intensidade e o intervalado de alta intensidade foram capazes de aumentar o conteúdo proteico da Rock1 e Rock2 logo após o término do exercício. Quando comparamos os animais exercitados com o grupo CTL, verificamos que o exercício contínuo de baixa intensidade foi capaz de aumentar a atividade da Rock (pMYPT-1<sup>T696</sup>), três horas após o término da sessão, porém o exercício intervalado de alta intensidade aumentou essa sinalização logo após o término da sessão e manteve ativo durante as três horas após o término do esforço físico. Em relação à proteína Akt, nossos resultados apontam que os dois protocolos aumentaram sua fosforilação, contudo o exercício agudo de baixa intensidade conseguiu prolongar a sua sinalização durante três horas após o término do esforço. Em 2014, um estudo conduzido pelo nosso laboratório demonstrou que o exercício físico agudo de baixa intensidade ou de intensidade moderada promoveu a sinalização da Akt em animais submetidos ao exercício de natação (MARINHO,2014). Sobre a relação AMPK e Rock, nossos dados apresentam que o exercício físico contínuo de baixa intensidade e o intervalado de alta intensidade

foram capazes de ativar ambas moléculas logo após o término do esforço físico, contudo o exercício físico de alta intensidade manteve a fosforilação da AMPK 3h após o término do protocolo o que não ocorreu com a Rock.

O estudo pioneiro que analisou o efeito do exercício físico sobre a via da Rho-quinase foi realizado em 2018 por Muñoz e colaboradores. Esse importante estudo utilizou ratos em um protocolo de curta duração utilizando o exercício de natação, cujos resultados demonstraram que a Rock1 e Rock2 eram ativas em animais jovens que foram submetidos ao exercício físico. No ano seguinte, esse mesmo grupo analisou o efeito do exercício de corrida em resposta à modulação da Rho-quinase e para isso submeteram ratos idosos em um protocolo de esteira com uma intensidade de 75% do  $VO_{2máx}$ . Os resultados apresentados verificaram aumento no conteúdo proteico da Rock em resposta ao aumento de intensidade do exercício.

Em nosso estudo sugerimos que a intensidade do exercício pode ser uma variável de suma importância para ativação da Rock, pois o exercício de alta intensidade além de aumentar o conteúdo proteico de Rock1 e Rock2, favoreceu a fosforilação do pIRS1<sup>S632/635</sup>. Contudo seria de suma importância a análise desse método em resposta ao exercício crônico. Esses dados estão de acordo com Furukawa e colaboradores (2005), que apresentaram que a interação entre a Rock e o pIRS1<sup>S632/635</sup> promovia uma melhora subsequente na captação de glicose. Recentemente, nosso grupo analisou o efeito do exercício na sinalização de insulina de camundongos obesos que foram submetidos ao exercício em esteira. Os resultados apontam que o exercício físico foi capaz de aumentar o conteúdo proteico de Rock2 e isso é importante pelo fato que o envelhecimento e a obesidade podem prejudicar a sinalização da Rho-quinase (MUÑOZ et al.,2021). Em adição aos trabalhos publicados pelo nosso grupo, os resultados contemplados nessa dissertação especulam que as alterações nas variáveis de treino podem influenciar na atividade da Rock. As análises dessas moléculas podem ampliar o conhecimento das diferentes estratégias da prescrição do exercício físico sobre o metabolismo da Rock no tecido muscular de fibras rápidas. No entanto, se faz necessário investigar mais a fundo os efeitos dos diferentes métodos de prescrição do exercício físico sobre a via da Rock e relacionados com a fosforilação da AMPK.

## 6 Conclusão

Em conclusão, o exercício físico agudo intervalado de corrida de alta intensidade foi mais eficiente em relação ao exercício contínuo de baixa intensidade em induzir aumento na fosforilação tanto de AMPK quanto de mTOR, efeito verificado em músculo EDL com predominância de fibras de contração rápida nas primeiras horas após a cessação do esforço físico em ratos Wistar jovens. Em relação às proteínas da via da Rock, o exercício de baixa e alta intensidade foram capazes de ativar as moléculas relacionadas a essa via, contudo apenas o exercício intervalado de alta intensidade foi capaz de aumentar a fosforilação em serina 632/635 do IRS-1 no músculo esquelético de contração rápida em ratos. O aumento do conteúdo proteico da Rock pode contribuir para as recuperações do glicogênio muscular.

## REFERÊNCIAS

Accattato, F., Greco, M., Pullano, S. A., Carè, I., Fiorillo, A. S., Pujia, A., Montalcini, T., Foti, D. P., Brunetti, A., & Gulletta, E. (2017). Effects of acute physical exercise on oxidative stress and inflammatory status in young, sedentary obese subjects. *PloS one*, 12(6), e0178900.

Apro W, Blomstrand E. Influence of supplementation with branchedchain amino acids in combination with resistance exercise on p70S6 kinase phosphorylation in resting and exercising human skeletal muscle. *Acta Physiol.* (2010) 200:237–48

Atherton, P. J., Higginson, J. M., Singh, J., & Wackerhage, H. (2004). Concentrations of signal transduction proteins exercise and insulin responses in rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *Molecular and cellular biochemistry*, 261(1-2), 111–116.

Awad SF, Al-Mawali A, Al-Lawati JA, Morsi M, Critchley JA, Abu-Raddad LJ. Forecasting the type 2 diabetes mellitus epidemic and the role of key risk factors in Oman up to 2050: Mathematical modeling analyses. *J Diabetes Investig.* 2021 Jul;12(7):1162-1174. doi: 10.1111/jdi.13452. Epub 2020 Nov 27. PMID: 33112504; PMCID: PMC8264408.

Bartlett JD, Hwa JC, Jeong TS, Louhelainen J, Cochran AJ, Gibala MJ, Gregson W, Close GL, Drust B & Morton JP (2012). Matched work high-intensity interval and continuous running induce similar increases in PGC-1 $\alpha$ mRNA, AMPK, p38, and p53 phosphorylation in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 112, 1135–1143.

Battista F, Ermolao A, van Baak MA, Beaulieu K, Blundell JE, Busetto L, Carraça EV, Encantado J, Dicker D, Farpour-Lambert N, Pramono A, Bellicha A, Oppert JM. Effect of exercise on cardiometabolic health of adults with overweight or obesity: Focus on blood pressure, insulin resistance, and intrahepatic fat-A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2021 Jul;22 Suppl 4(Suppl 4):e13269.

Beck Jorgensen S, O'Neill HM, Hewitt K, Kemp BE, Steinberg GR (2009). Reduced AMP-activated protein kinase activity in mouse skeletal muscle does not exacerbate the development of insulin resistance with obesity. *Diabetologia.* 52:2395–2404.

Begum N et al. Active Rho kinase (ROK-alpha ) associates with insulin receptor substrate-1 and inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002;277:6214–22.

Birk JB, Wojtaszewski JF. Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2006; 577: 1021-1032

Blazek AD, Nam J, Gupta R, Pradhan M, Perera P, Weisleder NL, Hewett TE, Chaudhari AM, Lee BS, Leblebicioglu B, Butterfield TA, Agarwal S. Exercise-driven metabolic pathways in healthy cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016 Jul;24(7):1210-22.

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3:1014–1019

Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS (2002) AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* 277:23977–23980.

BOOTH, F.W.; ZWETSLOOT, K.A. Basic concepts about genes, inactivity and aging. *Scandinavian Journal of Medicine and Sciences in Sports, Copenhagen, v.20, n.1, p.1-4, 2011.*

Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(1):a009191. Published 2014 Jan 1.

Camera DM, Edge J, Short MJ, Hawley JA, Coffey VG (2010) Early time course of Akt phosphorylation after endurance and resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 42(10):1843–1852

Camporez JP, Jornayvaz FR, Petersen MC, et al. Cellular mechanisms by which FGF21 improves insulin sensitivity in male mice. *Endocrinology.* 2013;154(9):3099-3109.

Cartee GD. Mechanisms for greater insulin-stimulated glucose uptake in normal and insulin-resistant skeletal muscle after acute exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015 Dec 15;309(12):E949-59.

Chauveau A, Kaufmann M. Expériences pour la détermination du coefficient de l'activité nutritive et respiratoire des muscles en repos et en travail. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1887;104(1):1126-32. 9. Burn JH, Dale HH. On the location of action of insulin. *J Physiol.* 1924;59(6):164-92.

Chavanelle V, Boisseau N, Otero YF, et al. Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on glycaemic control and skeletal muscle mitochondrial function in db/db mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):204. Published 2017 Mar 16. doi:10.1038/s41598-017-00276-8

Chawla R, Madhu SV, Makkar BM, Ghosh S, Saboo B, Kalra S; RSSDI-ESI Consensus Group. RSSDI-ESI Clinical Practice Recommendations for the Management of Type 2 Diabetes Mellitus 2020. *Indian J Endocrinol Metab.* 2020 Jan-Feb;24(1):1-122. doi: 10.4103/ijem.IJEM\_225\_20. Erratum in: *Indian J Endocrinol Metab.* 2020 Jul-Aug;24(4):376. PMID: 32699774; PMCID: PMC7328526.

Chen X-P, McConell GK, Michell BJ, Snow RJ, Canny BJ & Kemp BE (2000). AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E1202–E1206.

Chen, Z. P., Stephens, T. J., Murthy, S., Canny, B. J., Hargreaves, M., Witters, L. A., Kemp, B. E., & McConell, G. K. (2003). Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes*, 52(9), 2205–2212.

Christophe J, Mayer J. Effect of exercise on glucose uptake in rats and men. *J Appl Physiol.* 1958;13(2):269-272.

Coffey VG, Jemiolo B, Edge J, Garnham AP, Trappe SW, Hawley JA (2009a) Effect of consecutive repeated sprint and resistance exercise bouts on acute adaptive responses in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R1441–R1451.

Coffey, V. G., Zhong, Z., Shield, A., Canny, B. J., Chibalin, A. V., Zierath, J. R., & Hawley, J. A. (2006). Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(1), 190–192.

Combes A, Dekerle J, Webborn N, Watt P, Bougault V, Daussin FN. Exercise-induced metabolic fluctuations influence AMPK, p38-MAPK and CaMKII phosphorylation in human skeletal muscle. *Physiol Rep*. 2015; 3: e12462

Contrepois, K., Wu, S., Moneghetti, K. J., Hornburg, D., Ahadi, S., Tsai, M. S., Metwally, A. A., Wei, E., Lee-McMullen, B., Quijada, J. V., Chen, S., Christle, J. W., Ellenberger, M., Balliu, B., Taylor, S., Durrant, M. G., Knowles, D. A., Choudhry, H., Ashland, M., Bahmani, A., ... Snyder, M. P. (2020). Molecular Choreography of Acute Exercise. *Cell*, 181(5), 1112–1130.e16.

Coyle EF, Hagberg JM, Hurley BF, Martin WH, Ehsani AA, Holloszy JO. Carbohydrate feeding during prolonged strenuous exercise can delay fatigue. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1983;55(1 Pt 1):230-235.

Crisol, B. M., Lenhare, L., Gaspar, R. S., Gaspar, R. C., Muñoz, V. R., da Silva, A., Cintra, D. E., de Moura, L. P., Pauli, J. R., & Ropelle, E. R. (2018). The role of physical exercise on Sestrin1 and 2 accumulations in the skeletal muscle of mice. *Life sciences*, 194, 98–103.

Damas F, Libardi CA, Ugrinowitsch C (2018). The development of skeletal muscle hypertrophy through resistance training: the role of muscle damage and muscle protein synthesis. *European Journal of Applied Physiology* 118:485–500

Dan HC, Ebbs A, Pasparakis M, Van DT, Basseres DS & Baldwin AS (2014). Akt-dependent activation of mTORC1 complex involves phosphorylation of mTOR (mammalian target of rapamycin) by I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK  $\alpha$ ). *J Biol Chem* 289, 25227–25240.

Dreyer HC, Drummond MJ, Pennings B, Fujita S, Glynn EL, Chinkes DL, Dhanani S, Volpi E, Rasmussen BB (2008). Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E392–E400.

Dreyer HC, Fujita S, Glynn EL, Drummond MJ, Volpi E, Rasmussen BB (2010) Resistance exercise increases leg muscle protein synthesis and mTOR signalling independent of sex. *Acta Physiol (Oxf)* 199(1):71–81

Dungan CM, Gordon BS, Williamson DL. Acute treadmill exercise discriminately improves the skeletal muscle insulin-stimulated growth signaling responses in mice lacking REDD1. *Physiol Rep*. 2019 Feb;7(4):e14011.

Dutra, RB; Silveira, DS; Peixoto, T; Navarro, F. Alterações na concentração de glicose no sangue durante exercício intermitente realizado em esteira a 70%, 80% e 90% do vo2 máximo estimado. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício*, v.3, n.17, p.456- 462, 2009.

Edge J, Eynon N, McKenna MJ, Goodman CA, Harris RC & Bishop DJ (2013). Altering the rest interval during high-intensity interval training does not affect muscle or performance adaptations. *Exp Physiol* 98.2 pp 481–490

Egan B, Carson BP, Garcia-Roves PM, Chibalin AV, Sarsfield FM, Barron N, McCaffrey N, Moyna NM, Zierath JR and O’Gorman DJ (2010) Exercise intensitydependent regulation of peroxisome proliferatoractivated receptor c coactivator-1a mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *J Physiol* 588, 1779–1790.

Farah S. A Rho-associated Protein Kinase, ROKalpha , Binds Insulin Receptor Substrate-1 and Modulates Insulin Signaling. *J Biol Chem* 1998;273:4740–6.

Febbraio MA, Hiscock N, Sacchetti M, Fischer CP, Pedersen BK. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes*. 2004;53(7):1643-1648

Fernandez-Gonzalo R, Lundberg TR, & Tesch PA. (2013). Acute molecular responses in untrained and trained muscle subjected to aerobic and resistance exercise training versus resistance training alone. *Acta Physiologica*, 209(4), 283–294.

Ferrari F, Bock PM, Motta MT, Helal L. Biochemical and Molecular Mechanisms of Glucose Uptake Stimulated by Physical Exercise in Insulin Resistance State: Role of Inflammation. *Arq Bras Cardiol*. 2019 Dec;113(6):1139-1148.

Ferreira JC, Rolim NPL, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E & Brum PC(2007). Maximal lactate steady state in running mice. Effect of exercise training. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34 760-765.

França GO, Frantz EDC, Magliano DC, Bargut TCL, Sepúlveda-Fragoso V, Silveiras RR, Daliry A, Nascimento AR, Borges JP (2020). Effects of short-term high-intensity interval and continuous exercise training on body composition and cardiac function in obese sarcopenic rats. *Life Sciences* 256 (2020) 117920.

Frank S, Jbaily A, Hinshaw L, Basu R, Basu A, Szeri AJ. Modeling the acute effects of exercise on insulin kinetics in type 1 diabetes. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2018 Dec;45(6):829-845.

Fritzen AM, Madsen AB, Kleinert M, Treebak JT, Lundsgaard AM, Jensen TE, Richter EA, Wojtaszewski J, Kiens B, Frøsig C. Regulation of autophagy in human skeletal muscle: effects of exercise, exercise training and insulin stimulation. *J Physiol.* 2016 Feb 1;594(3):745-61. doi: 10.1113/JP271405. Epub 2016 Jan 15. PMID: 26614120; PMCID: PMC5341711.

Frøsig C, Pehmøller C, Birk JB, Richter EA &Wojtaszewski JF (2010). Exercise-induced TBC1D1 Ser237 phosphorylation and 14-3-3 protein binding capacity in human skeletal muscle. *J Physiol* 588, 4539–4548.

Fujii N, Hayashi T, Hirshman MF, Smith JT, Habinowski SA, Kaijser L, Mu J, Ljungqvist O, BirnbaumMJ, Witters LA, Thorell A & Goodyear LJ (2000). Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 1150–1155

Fujita S, Abe T, Drummond MJ, Cadenas JG, Dreyer HC, Sato Y, Volpi E, Rasmussen BB (2007) Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. *J Appl Physiol* 103:903–910

Fuller SE, Huang TY, Simon J, Batdorf HM, Essajee NM, Scott MC, Waskom CM, Brown JM, Burke SJ, Collier JJ, Noland RC. Low-intensity exercise induces acute shifts in liver and skeletal muscle substrate metabolism but not chronic adaptations in tissue oxidative capacity. *J Appl Physiol* (1985). 2019 Jul 1;127(1):143-156.

Fyfe JJ, Bishop DJ, Zacharewicz E, Russell AP and Stepto NK (2016) Concurrent exercise incorporating high-intensity interval or continuous training modulates mTORC1 signaling and microRNA expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 310, R1297–R1311

Garcia, D., Shaw, R.J., 2017. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. *Mol. Cell* 66, 789–800.

Gibala M. J., McGee S. L., Garnham A. P., Howlett K. F., Snow R. J., Hargreaves M. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1 $\alpha$  in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2009;106(3):929–934

Glosse P, Föller M. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK)-Dependent Regulation of Renal Transport. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 6;19(11):3481.

Goldstein MS, Mullick V, Huddlestun B, Levine R. Action of muscular work on transfer of sugars across cell barriers; comparison with action of insulin. *Am J Physiol*. 1953;173(2):212-216.

González-Chávez SA, Pacheco-Tena C, Quiñonez-Flores CM, Espino-Solis GP, Burrola-De Anda JI, Muñoz-Morales PM. Positive transcriptional response on inflammation and joint remodelling influenced by physical exercise in proteoglycan-induced arthritis: An animal study. *Bone Joint Res*. 2020 May 16;9(1):36-48.

Gosselin L. E., Kozlowski K. F., Devinney-Boymel L., & Hambridge C (2012). Metabolic response of different high-intensity aerobic interval exercise protocols. *Journal of Strength and Conditioning Research*;26(10):2866–2871

Gualano B, Tinucci T. Sedentarismo, exercício físico e doenças crônicas. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*, São Paulo, v. 25, dez.2011

HALLAL, Pedro Rodrigues Curi; ANDERSEN, Lars Bo; BULL, Fiona; GUTHOLD, Regina; HASKELL, William; EKELUND, Ulf. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *The lancet*, v. 380, n. 9838, p. 247-257, 2012.

Hamilton DL, Philp A (2013) Can AMPK mediated suppression of mTORC1 explain the concurrent training effect? *Cell Mol ExercPhysiol* 2:1–27.

Harber MP, Konopka AR, Jemiolo B, Trappe SW, Trappe TA, Reidy PT (2010). Muscle protein synthesis and gene expression during recovery from aerobic exercise in the fasted and fed states. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R1254–R1262

Hardie DG, Ross FA & Hawley SA (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 251–262.

Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007 vol. 8, no. 10, pp. 774–785.

Henneman E, Somjen G & Carpenter DO (1965). Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 28, 560–580.

Henríquez-Olguín, C., Renani, L. B., Arab-Ceschia, L., Raun, S. H., Bhatia, A., Li, Z., Knudsen, J. R., Holmdahl, R., & Jensen, T. E. (2019). Adaptations to high-intensity interval training in skeletal muscle require NADPH oxidase 2. *Redox biology*, 24, 101188.

Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Feb;19(2):121-135.

Hoffman NJ, Parker BL, Chaudhuri R, Fisher-Wellman KH, Kleinert M, Humphrey SJ, Yang P, Holliday M, Trefely S, Fazakerley DJ, Stöckli J, Burchfield JG, Jensen TE, Jothi R, Kiens B, Wojtaszewski JF, Richter EA, James DE. Global Phosphoproteomic Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals a Network of Exercise-Regulated Kinases and AMPK Substrates. *Cell Metab*. 2015 Nov 3;22(5):922-35.

Host HH, Hansen PA, Nolte LA, Chen MM, Holloszy JO. Rapid reversal of adaptive increases in muscle GLUT-4 and glucose transport capacity after training cessation. *J Appl Physiol* (1985). 1998;84(3):798-802.

Huh, J. Y., Mougios, V., Kabasakalis, A., Fatouros, I., Siopi, A., Douroudos, I. I., Filippaios, A., Panagiotou, G., Park, K. H., & Mantzoros, C. S. (2014). Exercise-induced irisin secretion is independent of age or fitness level and increased irisin may

directly modulate muscle metabolism through AMPK activation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 99(11), E2154–E2161.

Hulmi JJ, Tannerstedt J, Selanne H, Kainulainen H, Kovanen V, Mero AA (2009) Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. *J Appl Physiol* 106:1720–1729

Huynh MK, Kinyua AW, Yang DJ, Kim KW. Hypothalamic AMPK as a Regulator of Energy Homeostasis. *Neural Plast.* 2016;2016:2754078.

Irimia, J. M., Tagliabracci, V. S., Meyer, C. M., Segvich, D. M., DePaoli-Roach, A. A., & Roach, P. J. (2015). Muscle glycogen remodeling and glycogen phosphate metabolism following exhaustive exercise of wild type and laforin knockout mice. *The Journal of biological chemistry*, 290(37), 22686–22698.

Janzen NR, Whitfield J, & Hoffman NJ (2018). Interactive Roles for AMPK and Glycogen from Cellular Energy Sensing to Exercise Metabolism. *Int J Mol Sci* 19.

Jessen N, An D, Lihn AS, Nygren J, Hirshman MF, Thorell A & Goodyear LJ (2011). Exercise increases TBC1D1 phosphorylation in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301, E164–E171.

Jones TW, Eddens L, Kupusarevic J, Simoes DCM, Furber MJW, van Someren KA, Howatson G. Aerobic exercise intensity does not affect the anabolic signaling following resistance exercise in endurance athletes. *Sci Rep.* 2021 May 24;11(1):10785. doi: 10.1038/s41598-021-90274-8. PMID: 34031501; PMCID: PMC8144549.

Kakigi R, Naito H, Ogura Y, Kobayashi H, Saga N, Noriko IS, Yoshihara T, Katamoto S (2011). Heat stress enhances mTOR signaling after resistance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol Sci* 61:131-140

Kalwat MA, Cobb MH. Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the  $\beta$  cell. *Pharmacol Ther.* 2017 Nov;179:17-30.

Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T. Activation of AMP kinase and inhibition of Rho kinase induce the mineralization of osteoblastic MC3T3-

E1 cells through endothelial NOS and BMP-2 expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(1):E139-E146.

Kikuchi N, Yoshida S, Okuyama M, Nakazato K (2016) The effect of high-intensity interval cycling sprints subsequent to arm-curl exercise on upper-body muscle strength and hypertrophy. *J Strength Cond Res* 30:2318–2323.

Kjøbsted R, Hingst JR, Fentz J, Foretz M, Sanz MN, Pehmøller C, Shum M, Marette A, Mounier R, Treebak JT, Wojtaszewski JFP, Viollet B, Lantier L. AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *FASEB J.* 2018 Apr;32(4):1741-1777.

Kjøbsted R., Hingst J. R., Fentz J., Foretz M., Sanz M. N., Pehmøller C., et al. (2018). AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *FASEB J.* 32 1741–1777. 10.1096/fj.201700442R

Koh JH, Hancock CR, Han DH, Holloszy JO, Nair KS, Dasari S. AMPK and PPAR $\beta$  positive feedback loop regulates endurance exercise training-mediated GLUT4 expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019 May 1;316(5):E931-E939.

Koshinaka K, Kawasaki E, Hokari F, Kawanaka K. Effect of acute high-intensity intermittent swimming on post-exercise insulin responsiveness in epitrochlearis muscle of fed rats. *Metabolism.* 2009;58(2):246-253.

Kristensen DE, Albers PH, Prats C, Baba O, Birk JB, Wojtaszewski JFP. Human muscle fibre type-specific regulation of AMPK and downstream targets by exercise. *J Physiol.* 2015; 593: 2053±69.

Kurosaka M, Naito H, Ogura Y, Machida S, Katamoto S (2012) Satellite cell pool enhancement in rat plantaris muscle by endurance training depends on intensity rather than duration. *Acta Physiol (Oxf)* 205:159–166.

Lawrence RD. The Effect of Exercise on Insulin Action in Diabetes. *Br Med J.* 1926;1(3406):648-650.

Lee-Young RS, Canny BJ, Myers DE & McConell GK (2009). AMPK activation is fiber type specific in human skeletal muscle: effects of exercise and short-term exercise training. *J Appl Physiol* (1985) 107, 283–289.

Léger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Dériaz O, Crettenand A, Gobelet C, Rohmer P, Konzelmann M, Luthi F, Russell AP. Akt signalling through GSK-3 $\beta$ , mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol*. 2006 Nov 1;576(Pt 3):923-33.

Leto, D., Saltiel, A. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 383–396 (2012)

Lloyd BA, Hake HS, Ishiwata T, Farmer CE, Loetz EC, Fleshner M, Bland ST, Greenwood BN. Exercise increases mTOR signaling in brain regions involved in cognition and emotional behavior. *Behav Brain Res*. 2017 Apr 14;323:56-67. doi: 10.1016/j.bbr.2017.01.033. Epub 2017 Jan 24. PMID: 28130174; PMCID: PMC5359005.

Lundberg, T. R., Fernandez-Gonzalo, R., Gustafsson, T., & Tesch, P. A. (2013). Aerobic exercise does not compromise muscle hypertrophy response to short-term resistance training. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 114(1), 81–89.

Maarbjerg SJ, Jørgensen SB, Rose AJ, Jeppesen J, Jensen TE, Treebak JT, Birk JB, Schjerling P, Wojtaszewski JF and Richter EA (2009) Genetic impairment of AMPK $\alpha$ 2 signaling does not reduce muscle glucose uptake during treadmill exercise in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E924–E934

Macedo CSG, Garavello JJ, OKU EC, MYAGUSUKU FH, AGNOLL PD, NOCETTI PM. Benefícios do exercício físico para a qualidade de vida. *Revista Brasileira de Atividade Física e saúde*. 2012 V8, n2; p19-27.

MacInnis M & Gibala MJ. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *J Physiol* 595.9 (2017) 2915-2930.

MALTA, D. C., STOPA, S. R., ISER B. P.M., BERNAL, R. T. I., CLARO, R. M., NARDI, A. C. F., DOS REIS, A. C., MONTEIRO, C.A. Fatores de risco e proteção para doenças

crônicas por inquérito telefônico nas capitais brasileiras, Vigitel 2014. Revista Brasileira de Epidemiologia. Dez 2015, V.18 Supl 2: 238-255

Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261–1274.

Marinho R, Moura LP, Rodrigues BA, Pauli LSS, Silva ASR, Ropelle ECC, Souza CT, et al. Efeitos de diferentes intensidades de exercício físico sobre a sensibilidade à insulina e atividade da proteína quinase B/Akt no músculo esquelético de camundongos obesos. *einstein* (São Paulo). 2014;12(1):82-9

Marton, O., Koltai, E., Takeda, M., Koch, L. G., Britton, S. L., Davies, K. J., Boldogh, I., & Radak, Z. (2015). Mitochondrial biogenesis-associated factors underlie the magnitude of response to aerobic endurance training in rats. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 467(4), 779–788. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1554-7>

Mascher H, Andersson H, Nilsson PA, Ekblom B, Blomstrand E. Changes in signalling pathways regulating protein synthesis in human muscle in the recovery period after endurance exercise. *Acta Physiol (Oxf)* 191: 67–75, 2007.

McKeegan K, Mason SA, Trewin AJ, Keske MA, Wadley GD, Della Gatta PA, Nikolaidis MG, Parker L. Reactive oxygen species in exercise and insulin resistance: Working towards personalized antioxidant treatment. *Redox Biol.* 2021 Aug;44:102005.

McRae G, Payne A, Zelt JGE, Scribbans TD, Jung ME, Little JP & Gurd BJ (2012). Extremely low volume, whole-body aerobic–resistance training improves aerobic fitness and muscular endurance in females. *Appl Physiol Nutr Metab* 37, 1124–1131.

Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG & Winder WW (1997). AICA ribose increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *AM J Physiol Endocrinol Metab.* 273:E1107-12

Metcalfe RS, Koumanov F, Ruffino J, Stokes KA, Holman GD, Thompson D, & Vollaard NBV (2015). Physiological and molecular responses to an acute bout of reduced-exertion highintensity interval training (REHIT). *European journal of applied physiology*, 115(11), 2321-2334

Moitinho-Silva, L., Wegener, M., May, S., Schrunner, F., Akhtar, A., Boysen, T. J., Schaeffer, E., Hansen, C., Schmidt, T., Rühlemann, M. C., Hübenthal, M., Rausch, P., Kondakci, M. T., Maetzler, W., Weidinger, S., Laudes, M., Süß, P., Schulte, D., Junker, R., Sommer, F., ... Franke, A. (2021). Short-term physical exercise impacts on the human holobiont obtained by a randomised intervention study. *BMC microbiology*, 21(1).

Moraska A, Deak T, Spencer RL, Roth D & Fleshner M (2000). Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: R1321–R1329.

Muñoz VR, Gaspar RC, Esteca MV, Baptista IL, Vieira RFL, da Silva ASR, de Moura LP, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR. Physical exercise increases ROCK activity in the skeletal muscle of middle-aged rats. *Mech Ageing Dev.* 2020 Mar;186:111213.

Muñoz VR, Gaspar RC, Kuga GK, da Rocha AL, Crisol BM, Botezelli JD, Baptista IL, Mekary RA, da Silva ASR, Cintra DE, de Moura LP, Ropelle ER, Pauli JR., 2018. Exercise increases Rho-kinase activity and insulin signaling in skeletal muscle. *J. Cell. Physiol.* 233, 4791–4800.

Muñoz VR, Gaspar RC, Severino MB, Macêdo APA, Simabuco FM, Ropelle ER, Cintra DE, da Silva ASR, Kim YB, Pauli JR. Exercise Counterbalances Rho/ROCK2 Signaling Impairment in the Skeletal Muscle and Ameliorates Insulin Sensitivity in Obese Mice. *Front Immunol.* 2021 Jun 21;12:702025.

Noda, K., Nakajima, S., Godo, S., Saito, H., Ikeda, S., Shimizu, T., Enkhjargal, B., Fukumoto, Y., Tsukita, S., Yamada, T., Katagiri, H., & Shimokawa, H. (2014). Rho-kinase inhibition ameliorates metabolic disorders through activation of AMPK pathway in mice. *PloS one*, 9(11), e110446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110446>.

O'Neill HM (2013). AMPK and exercise: glucose uptake and insulin sensitivity. *Diabetes Metab J* 37, 1–21.

O'Neill HM, Maarbjerg SJ, Crane JD, Jeppesen J, Jørgensen SB, Schertzer JD, Shyroka O, Kiens B, van Denderen BJ, Tarnopolsky MA, Kemp BE, Richter EA, and Steinberg GR (2011) AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null

mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 16092–16097]

Ogasawara R, Sato K, Matsutani K, Nakazato K, Fujita S (2014b). The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. Vol. 306. Num. 10. p.1155-1162.

Parkington JD, Siebert AP, LeBrasseur NK, Fielding RA (2003) Differential activation of mTOR signaling by contractile activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R1086–R1090

Pauli JR, Cintra DE, Souza CT, Ropelle ER. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético [New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009 Jun;53(4):399-408. Portuguese.

Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Souza CT de. Effects of Physical Exercise in the Ampk $\alpha$  Expression and Activity in High-fat Diet Induced Obese Rats. *Rev Bras Med do Esporte*. 2009;15(2):98–103.

Pehmøller C, Treebak JT, Birk JB, Chen S, Mackintosh C, Hardie DG, Richter EA & Wojtaszewski JF (2009). Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E665–E675.

Podlogar T, Leo P, Spragg J. Using  $\dot{V}O_{2max}$  as a marker of training status in athletes—can we do better? *J Appl Physiol* (1985). 2022 Jul 1;133(1):144-147.

Pugh JK, Faulkner SH, Jackson AP, King JA, Nimmo MA (2015) Acute molecular responses to concurrent resistance and high intensity interval exercise in untrained skeletal muscle. *Physiol Rep* 3:e12364.

Rana S, Blowers EC, Natarajan A. Small molecule adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK) modulators and human diseases. *J Med Chem*. 2015 Jan 8;58(1):2-29. doi: 10.1021/jm401994c. Epub 2014 Aug 28. PMID: 25122135; PMCID: PMC4864506.

Ren JM, Semenkovich CF, Gulve EA, Gao J, Holloszy JO. Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J Biol Chem*. 1994;269(20):14396-14401.

Richter EA, Ruderman NB (2009) AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J* 418:261e275.

Rose AJ, Bisiani B, Vistisen B, Kiens B & Richter EA (2009). Skeletal muscle eEF2 and 4EBP1 phosphorylation during endurance exercise is dependent on intensity and muscle fiber type. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R326–R333.

Ryan BJ, Schleh MW, Ahn C, Ludzki AC, Gillen JB, Varshney P, Van Pelt DW, Pitchford LM, Chenevert TL, Gioscia-Ryan RA, Howton SM, Rode T, Hummel SL, Burant CF, Little JP, Horowitz JF. Moderate-Intensity Exercise and High-Intensity Interval Training Affect Insulin Sensitivity Similarly in Obese Adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Aug 1;105(8):e2941–59.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.

Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012;148(5):852-871.

Scheffer DDL, Latini A. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 Oct 1;1866(10):165823.

Shrestha MM, Lim CY, Bi X, Robinson RC, Han W. Tmod3 Phosphorylation Mediates AMPK-Dependent GLUT4 Plasma Membrane Insertion in Myoblasts. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Apr 20;12:653557.

Sohail MU, Yassine HM, Sohail A, Thani AAA. Impact of Physical Exercise on Gut Microbiome, Inflammation, and the Pathobiology of Metabolic Disorders. *Rev Diabet Stud*. 2019;15:35-48.

Song Z, Moore DR, Hodson N, Ward C, Dent JR, O'Leary MF, Shaw AM, Hamilton DL, Sarkar S, Gangloff YG, Hornberger TA, Spriet LL, Heigenhauser GJ, Philp A.

Resistance exercise initiates mechanistic target of rapamycin (mTOR) translocation and protein complex co-localisation in human skeletal muscle. *Sci Rep.* 2017 Jul 10;7(1):5028.

Souza, E.O.de, Tricoli, V., Bueno Junior, C., Pereira, M.G., Brum, P.C., Oliveira, E.M., Roschel, H., Aoki, M.S., & Urginowitsch, C.. (2013). The acute effects of strength, endurance and concurrent exercises on the Akt/mTOR/p70S6K1 and AMPK signaling pathway responses in rat skeletal muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(4), 343-347. Epub April 19, 2013

Stenbit AE, Tsao TS, Li J, Burcelin R, Geenen DL, Factor SM, Houseknecht K, Katz EB, Charron MJ. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med.* 1997 Oct;3(10):1096-101.

Szwed A, Kim E, Jacinto E. Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. *Physiol Rev.* 2021;101(3):1371-1426.

Trebbak JT, Birk JB, Rose AJ, Kiens B, Richter EA & Wojtaszewski JF (2007). AS160 phosphorylation is associated with activation of  $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ - but not  $\alpha 2\beta 2\gamma 3$ -AMPK trimeric complex in skeletal muscle during exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E715–E722.

Trebbak JT, Pehmøller C, Kristensen JM, Kjøbsted R, Birk JB, Schjerling P, Richter EA, Goodyear LJ & Wojtaszewski JF (2014). Acute exercise and physiological insulin induce distinct phosphorylation signatures on TBC1D1 and TBC1D4 proteins in human skeletal muscle. *J Physiol* 592, 351–375.

Umpierre D, ribeiro PA, Kramer CK, Leitão CB, Zucatti AT, Azevedo mJ, et al. Physical activity advice only or structured exercise training and association with HbA1c levels in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAmA.* 2011 may 4;305(17):1790-9.

Valenzuela PL, Mateo-March M, Muriel X, Zabala M, Lucia A, Barranco-Gil D, Millet GP, Brocherie F, Burtscher J, Burtscher M, Ryan BJ, Gioscia-Ryan RA, Perrey S, Rodrigo-Carranza V, González-Mohíno F, González-Ravé JM, Santos-Concejero J, Denadai BS, Greco CC, Casado A, Foster C, Mazzolari R, Baldrighi GN, Pastorio E, Malatesta D, Patoz A, Borrani F, Ives SJ, DeBlauw JA, Dantas de Lucas R, Borszcz

FK, Fernandes Nascimento EM, Antonacci Guglielmo LG, Turnes T, Jaspers RT, van der Zwaard S, Lepers R, Louis J, Meireles A, de Souza HLR, de Oliveira GT, dos Santos MP, Arriel RA, Marocolo M, Hunter B, Meyler S, Muniz-Pumares D, Ferreira RM, Sogard AS, Carter SJ, Mickleborough TD, Saborosa GP, de Oliveira Freitas RD, Alves dos Santos PS, de Souza Ferreira JP, de Assis Manoel F, da Silva SF, Triska C, Karsten B, Sanders D, Lipksi ES, Spindler DJ, Hesselink MKC, Zacca R, Goethel MF, Pyne DB, Wood BM, Allen PE, Gabelhausen JL, Keller AM, Lige MT, Oumsang AS, Smart GL, Paris HL, Dewolf AH, Toffoli G, Martinez-Gonzalez B, Marcora SM, Terson de Paleville D, Fernandes RJ, Soares SM, Abraldes JA, Matta G, Bossi AH, McCarthy DG, Bostad W, Gibala J, Vagula M. Commentaries on Viewpoint: Using  $\dot{V}O_{2max}$  as a marker of training status in athletes - can we do better? *J Appl Physiol* (1985). 2022 Jul 1;133(1):148-164.

Wang Q, Zhou W. Roles and molecular mechanisms of physical exercise in cancer prevention and treatment. *J Sport Health Sci*. 2021 Mar;10(2):201-210.

Way KL, Hackett DA, Baker MK, Johnson NA. The Effect of regular exercise on Insulin sensitivity in Type 2 Diabetes mellitus: A systematic review and meta-Analysis. *Diabetes metab J*. 2016; 40(4):253-71.

Winder WW & Hardie DG (1996). Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 270, E299–E304.

Wojtaszewski JF, Nielsen P, Hansen BF, Richter EA & Kiens B (2000). Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. *J Physiol* 528, 221–226.

World Health Organization (WHO). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: World Health Organization, 2009.

Wu S, Zou MH. AMPK, Mitochondrial Function, and Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 15;21(14):4987.

Yuan L, Tang P, Li HJ, Hu N, Zhong XY, Lin M, Sun YQ, Lu M, Lu X. Serum from Jiao-Tai-Wan treated rats increases glucose consumption by 3T3-L1 adipocytes through AMPK pathway signaling. *Biosci Rep*. 2019 Apr 5;39(4):BSR20181286.

Zeng Z, Liang J, Wu L, Zhang H, Lv J, Chen N. Exercise-Induced Autophagy Suppresses Sarcopenia Through Akt/mTOR and Akt/FoxO3a Signal Pathways and AMPK-Mediated Mitochondrial Quality Control. *Front Physiol.* 2020;11:583478. Published 2020 Nov 2.

Zhao F, Siu JJ, Huang W, Askwith C, Cao L. Insulin Modulates Excitatory Synaptic Transmission and Synaptic Plasticity in the Mouse Hippocampus. *Neuroscience.* 2019 Jul 15;411:237-254.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:21–35.

## 8 - APÊNDICE

### Lista de Publicação

1. SANTOS, S. G.; BREDA, L.; TOSIM, A. Análise metabólica em atletas de elite do goalball: uma relação entre percepção subjetiva de esforço (pse) e lactato. PULSAR (JUNDIAÍ). , v.14, p.17 - , 2022.
2. CEZARONI, MELINA GADAGNOTTO; BREDA, LEONARDO; KUGA, GABRIEL KEINE; GASPAR, RAFAEL CALAIS; MUÑOZ, VITOR ROSETTO; CAMPOS, THAÍS DANTIS PEREIRA DE; CANCEGLIERI, RAPHAEL DOS SANTOS; PAULI, JOSÉ RODRIGO; CANCEGLIERI, PAULO HENRIQUE. Analysis of body weight of adults by different indirect methods. Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano., v.22, p.1 - 8, 2020.
3. Alves, B. P.; Pereira, R. M.; BREDA, L.; Canciglieri, R. S.; CANCEGLIERI, P. H. Comparação do perfil antropométrico de adolescentes das redes pública e privada da cidade de Araras/SP e região. ADOLESCÊNCIA & SAÚDE. , v.17, p.41 - 55, 2020.
4. SOSSAI, M. I.; CONCEIÇÃO, L. R.; CANCEGLIERI, P. H.; BREDA, L. Efeito do exercício físico nos processos de envelhecimento em mulheres. Health and Diversity (Online)., v.4, p.59-64 - , 2020.
5. GASPAR, RAFAEL CALAIS; MUÑOZ, VITOR ROSETTO; KUGA, GABRIEL KEINE; NAKANDAKARI, SUSANA CASTELO BRANCO RAMOS; CRISOL, BARBARA MOREIRA; LENHARE, LUCIENE; BREDA, LEONARDO; BOTEZELLI, JOSÉ DIEGO; SANT'ANA, MARCELLA RAMOS; DA SILVA, ADELINO S.R.; CINTRA, DENNYS ESPER; DE MOURA, LEANDRO PEREIRA; ROPELLE, EDUARDO ROCHETE; PAULI, JOSÉ RODRIGO. Acute physical exercise increases APPL1/PI3K signaling in the hypothalamus of lean mice. EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE. Fator de Impacto(2021 JCR): 3,6980, v.jun, p.1 - 18, 2019.
6. MINUZZI, LUCIELE; KUGA, GABRIEL; BREDA, LEONARDO; GASPAR, RAFAEL; MUÑOZ, VITOR; PEREIRA, RODRIGO; BOTEZELLI, JOSÉ; DA SILVA, ADELINO; CINTRA, DENNYS; DE MOURA, LEANDRO; ROPELLE, EDUARDO; PAULI, JOSÉ

Short-term Resistance Training Increases APPL1 Content in the Liver and the Insulin Sensitivity of Mice Fed a Long-term High-fat Diet. EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES. Fator de Impacto(2021 JCR): 2,4260, v.16, p.1 - 8, 2019.

7. TARDELLI, LIDIELI PAZIN; BREDA, LEONARDO; MARQUES, LUCAS FLORES; GOMES CARVALHO LIMA, NATÁLIA CRISTINA; FURTADO DE CAMARGO, THAIS; SCHERER, BRUNA RAFAELA; MOREIRA, NATÁLIA FERNANDES; DIAS, JANAÍNA FRANCIELI; DALIA, RODRIGO AUGUSTO; THOMAZINI, BRUNA FONTANA; COREZOLLA DO AMARAL, MARIA ESMERIA; ALVES, ARMINDO ANTONIO. High lipid and low carbohydrate content diet, immediately after weaning, causes hepatic injury, systemic oxidative stress and diminishment of lipids in white adipose tissue.. Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism. , v.13, p.48 - 56, 2018.

8. Kuga GK; Gaspar RC; Muñoz VR; Nakandakari SC; BREDA, L.; Sandoval BM; Caetano FH; Leme JA; Pauli JR; Gomes RJ. Physical training reverses changes in hepatic mitochondrial diameter of Alloxan-induced diabetic rats. EINSTEIN (SAO PAULO). Fator de Impacto (2021 JCR): 0,0000, v.16, p.1 - 8, 2018.

9. CANCEGLIERI, PAULO HENRIQUE; KUGA, GABRIEL KEINE; MUÑOZ, VITOR ROSETTO; GASPAR, RAFAEL CALAIS; DA ROCHA, ALISSON LUIZ; BREDA, LEONARDO; ANARUMA, CHADI PELLEGRINI; MINUZZI, LUCIELE GUERRA; DA SILVA, ADELINO SANCHEZ RAMOS; CINTRA, DENNYS ESPER; DE MOURA, LEANDRO PEREIRA; ROPELLE, EDUARDO ROCHETE; PAULI, JOSÉ RODRIGO The reversal effect of physical exercise on aging-related increases in APPL2 content in skeletal muscle. LIFE SCIENCES. Fator de Impacto(2021 JCR): 6,7800, v.210, p.209 - 213, 2018.

10. Gomes, A. E. G.; BREDA, L.; CANCEGLIERI, P. H. Análise da composição corporal em função do treinamento concorrente em mulheres ativas. Revista brasileira de prescrição e fisiologia do exercício., v.11, p.461-468 , 2017.

11. PAIXAO, A. C.; CARVALHO, E. M.; BREDA, L.; CANCEGLIERI, P. H. Comportamento da glicemia em resposta a um protocolo de exercício resistido excêntrico em pacientes diabetes tipo 1: Um estudo de caso.. REVISTA BRASILEIRA DE PRESCRIÇÃO E FISILOGIA DO EXERCÍCIO. , v.11, p.932 - , 2017.

12. ALMEIDA, D. K. S.; BREDA, L.; NASCIMENTO, C. M. C. Efeitos do treinamento proprioceptivo sobre o controle postural de idosos.. REVISTA KAIRÓS GERONTOLOGIA. , v.19, p.413 - 424, 2016.

13. VICENTE, R. de M.; CANGILIERI, P. H.; BREDA, L.; TONELLO, M. G. M.; JUNIOR, A. P. Nível de Aptidão Física de Adolescente do Futsal. Coleção Pesquisa em Educação Física. , v.14, p.107 - 114, 2015.

## 9 - ANEXO

Aprovação do comitê de ética.




---

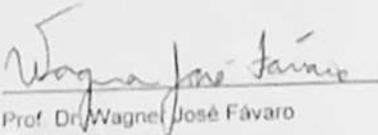
**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada Captação de glicose mediada pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no músculo esquelético em resposta ao exercício físico contínuo e intervalado de alta intensidade em roedores, registrada com o nº 4621-1/2017, sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Rodrigo Pauli e Leonardo Breda, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 07 de agosto de 2017.

Finalidade:	( ) Ensino	( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2017-31/12/2019	
Vigência da autorização para manipulação animal:	10/08/2017-31/12/2019	
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)	
No. de animais:	120	
Idade / Peso:	04 semanas / 04g	
Sexo:	machos	
Origem:	CEMIB/UNICAMP	

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 10 de agosto de 2017.



Prof. Dr. Wagner José Fávaro  
Presidente



Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Preste atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este processo, até 22 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, sob a responsabilidade dos pesquisadores. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido implicará que novos procedimentos sejam submetidos.