



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



FELLIPE DE OLIVEIRA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O FATOR DE
TRANSCRIÇÃO KLF15 E SINALIZAÇÃO ATRÓFICA DO
MÚSCULO ESQUELÉTICO EM CAMUNDONGOS SLC2A4
(GLUT-4^{+/-})**

LIMEIRA

2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas



FELLIPE DE OLIVEIRA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O FATOR DE
TRANSCRIÇÃO KLF15 E SINALIZAÇÃO ATRÓFICA DO
MÚSCULO ESQUELÉTICO EM CAMUNDONGOS SLC2A4
(GLUT-4^{+/-})**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Aplicadas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do
título de Mestre em Ciências da
Nutrição e do Esporte e Metabolismo.*

Orientador: Prof. Dr. José Rodrigo Pauli.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Calais Gaspar

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO FELLIPE DE OLIVEIRA E ORIENTADA PELO
PROF. DR. JOSÉ RODRIGO PAULI.

LIMEIRA

2024

Oliveira, Fellipe de, 1995-
OI41e Efeitos do exercício físico sobre o fator de transcrição KLF15 e sinalização
atrófica do músculo esquelético em camundongos slc2a4 (GLUT4+/-) / Fellipe
de Oliveira. – Limeira, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: José Rodrigo Pauli.
Coorientador: Rafael Calais Gaspar.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Aplicadas.

1. Exercício físico. 2. Hiperglicemia. 3. Resistência à insulina. 4. Atrofia
muscular. I. Pauli, José Rodrigo, 1979-. II. Gaspar, Rafael Calais, 1992-. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV.
Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Effects of physical exercise on the KLF15 transcription factor and
atrophic signaling of skeletal muscle in sl2a4 (GLUT4+/-) mice

Palavras-chave em inglês:

Exercise

Hyperglycemia

Insulin resistance

Muscle atrophy

Área de concentração: Ciências do Esporte

Titulação: Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

José Rodrigo Pauli [Orientador]

Vitor Rosetto Muñoz

Alisson Luiz da Rocha

Data de defesa: 28-05-2024

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/0000-0002-6549-9194>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2997624543089714>

Folha de Aprovação

Autor: Fellipe de Oliveira

Título: Efeitos do exercício físico sobre o fator de transcrição KLF15 e sinalização atrófica do músculo esquelético em camundongos slc2a4 (GLUT4^{+/-})

Natureza: Dissertação

Área de Concentração: Ciências do Esporte

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira-SP, 28 de maio de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Rodrigo Pauli (orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Alisson Luiz da Rocha (membro)
Estácio Ribeirão Preto

Prof. Dr. Vitor Rosetto Muñoz (membro externo)
Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto

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.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão aos meus pais, Patricia Cristina Viscaíno e Wilson Roberto de Oliveira, pelo suporte incondicional e pela educação exemplar que me proporcionaram. Seu apoio constante e presença ao longo deste trajeto acadêmico foram fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço também ao meu irmão, Luccas de Oliveira, por sua amizade, companheirismo e apoio inabalável em todos os momentos da vida. Sua presença foi um verdadeiro suporte emocional durante os desafios enfrentados ao longo deste percurso acadêmico.

Ao meu orientador, José Rodrigo Pauli, sou imensamente grato pela oportunidade de integrar um laboratório de pesquisa renomado em uma das principais universidades do país. Sua orientação, dedicação e apoio foram cruciais para meu crescimento acadêmico e profissional. Sou grato por seu profissionalismo, humanidade e paciência, e reconheço o papel fundamental que desempenhou em minha jornada acadêmica.

Expresso também minha gratidão ao meu co-orientador, Rafael Calais Gaspar, pela amizade construída e pela indicação ao Laboratório de Biologia Molecular e Exercício Físico (LabMEx) da UNICAMP. Sua orientação e suporte foram essenciais para a realização do meu mestrado e para o enriquecimento da minha experiência profissional.

Aos meus colegas de laboratório LabMEx, especialmente a Luciana, Paula, Gabriel e Renan, agradeço pelo apoio, colaboração e amizade ao longo desta jornada. Nossa equipe se tornou uma fonte de inspiração e motivação mútua, e sou grato por todas as experiências compartilhadas e pela parceria em nossas pesquisas.

À banca examinadora, agradeço pela participação neste momento importante da minha formação acadêmica. Valorizo imensamente as orientações e sugestões fornecidas por professores e pesquisadores tão respeitados, e reconheço o impacto significativo que terão em minha trajetória futura.

Por fim, agradeço a todos os professores e funcionários da FCA, ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001.

RESUMO

A perda de massa muscular esquelética pode estar atrelada a alguns fatores, como desuso, doenças catabólicas, entre outros. Dentre os mecanismos propostos e relacionados a atrofia do músculo esquelético, têm ganhado destaque a participação da proteína *Krüppel-like factor 15* (KLF15). Foi visto que a hiperglicemia, um distúrbio central do diabetes, está envolvida no processo de atrofia do músculo esquelético induzindo o aumento do conteúdo de KLF15 no músculo esquelético. Além disso, foi visto que a superexpressão de KLF15 nas células musculares é acompanhado por aumento na expressão de genes relacionados à atrofia muscular (*Atrogin1*, *Murf1*, *Foxo3a*, *Prodh* e *Tdo2*), tornando-se importante investigar ações que possam regular a via de sinalização da proteína KLF15. Uma estratégia capaz de atuar positivamente sobre o músculo esquelético é o exercício físico. Sabidamente, o exercício físico exerce efeito expressivo na captação de glicose no músculo esquelético, contribuindo para redução da hiperglicemia do diabetes. Tal fato, deve-se aos efeitos do exercício físico em aumentar tanto a translocação quanto o conteúdo proteico do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4) que é responsável pelo transporte da maior parte da glicose da corrente sanguínea para dentro do músculo esquelético. Codificado pelo gene *Slc2a4*, o estímulo para a transcrição, tradução e translocação do citoplasma para a membrana do GLUT-4 estão relacionados aos estímulos de insulina e da contração muscular. Portanto, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar os efeitos do exercício físico resistido sobre o fator de transcrição KLF15 e a via sinalização atrofica no músculo esquelético de camundongos *Slc2a4^{+/-}*, que se tornam hiperglicêmicos, sendo um modelo para diabetes tipo II. Para isso, os camundongos foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais: Selvagem/controle (WT), *Slc2a4^{+/-}* sedentário (SED) e *Slc2a4^{+/-}* exercitado (EXE). Os animais do grupo exercitado realizaram um protocolo de seis sessões de exercício físico que consistiu de escalada em escada, com intensidade correspondente a 70% da máxima capacidade voluntária de carregamento. Após 16 horas da última sessão de exercício físico análises relacionadas ao peso corporal, glicemia de jejum e desempenho de força foram realizados com os diferentes grupos experimentais. Além disso, amostras do músculo gastrocnêmio foram utilizados para análise do conteúdo proteico de KLF15. Em adição, foram realizados ensaios para análise do conteúdo proteico relacionada a via de sinalização de atrofia no músculo esquelético. Os resultados encontrados, demonstram que os animais *Slc2a4^{+/-}* sedentários apresentaram aumento na glicemia de jejum e diminuição na sensibilidade à insulina quando comparado aos camundongos controles, ao contrário, o

protocolo de exercício físico resistido foi eficiente em reduzir a glicemia de jejum e melhorar a responsividade à insulina corporal. Verificou-se também, que os animais submetidos ao protocolo de exercício físico resistido tiveram um aumento na força de preensão (Hand Grip) e melhora no desempenho no teste de máxima carga voluntária de carregamento em relação ao grupo de animais controles e *Slc2a4^{+/-}*. O conteúdo de KLF15 no tecido muscular dos camundongos treinados (EXE) foi significativamente inferior se comparado aos demais grupos estudados. No entanto, não foi encontrado alterações para o conteúdo de WWP1 e proteínas associadas a via de atrofia no músculo esquelético (*Atrogin1*, *Murf1*, *Foxo3a*, *Prodh* e *Tdo2*) nos diferentes grupos de camundongos estudados. Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que o exercício físico resistido foi capaz de melhorar a homeostase glicêmica e diminuir o conteúdo de KLF-15 muscular, no entanto, isso não foi acompanhado por alterações no conteúdo de proteínas da via de atrofia do músculo esquelético em camundongos *Slc2a4^{+/-}*.

Palavras-chave: Treinamento físico; hiperglicemia; resistência à insulina; atrofia muscular; KLF15

ABSTRACT

The loss of skeletal muscle mass may be linked to some factors, such as disuse, catabolic diseases, among others. Among the proposed mechanisms related to skeletal muscle atrophy, the participation of the protein Krüppel-like factor 15 (KLF15) has gained prominence. It has been seen that hyperglycemia, a central disorder of diabetes, is involved in the process of skeletal muscle atrophy by inducing an increase in KLF15 content in skeletal muscle. Furthermore, it was seen that overexpression of KLF15 in muscle cells is accompanied by an increase in the expression of genes related to muscle atrophy (*Atrogin1*, *Murfl*, *Foxo3a*, *Prodh* and *Tdo2*), making it important to investigate actions that can regulate the signaling pathway of the KLF15 protein. A strategy capable of acting positively on skeletal muscle is physical exercise. It is known that physical exercise has a significant effect on glucose uptake in skeletal muscle, contributing to the reduction of hyperglycemia in diabetes. This fact is due to the effects of physical exercise in increasing both the translocation and the protein content of the glucose transporter type 4 (GLUT-4), which is responsible for transporting most of the glucose from the bloodstream into the skeletal muscle. Encoded by the *Slc2a4* gene, the stimulus for transcription, translation and translocation from the cytoplasm to the membrane of GLUT-4 are related to insulin and muscle contraction stimuli. Therefore, the main objective of the present study was to evaluate the effects of resistance physical exercise on the KLF15 transcription factor and the atrophic signaling pathway in the skeletal muscle of *Slc2a4*^{+/-} mice, which become hyperglycemic, being a model for type II diabetes. For this, the mice were distributed into the following experimental groups: Wild/control (WT), *Slc2a4*^{+/-} sedentary (SED) and *Slc2a4*^{+/-} exercised (EXE). The animals in the exercise group performed a protocol of six physical exercise sessions that consisted of climbing a ladder, with an intensity corresponding to 70% of the maximum voluntary carrying capacity. 16 hours after the last physical exercise session, analyzes related to body weight, fasting blood glucose and strength performance were carried out with the different experimental groups. Furthermore, samples from the gastrocnemius muscle were used to analyze the protein content of KLF15. In addition, assays were carried out to analyze the protein content related to the atrophy signaling pathway in skeletal muscle. The results found demonstrate that sedentary *Slc2a4*^{+/-} animals showed an increase in fasting glycemia and a decrease in insulin sensitivity when compared to control mice. On the contrary, the resistance physical exercise protocol was efficient in reducing fasting glycemia and improving responsiveness to body insulin. It was also found that the animals submitted to the resistance physical exercise protocol had an increase in grip strength (Hand Grip) and improved performance in the maximum voluntary load load test in relation to the group of control and *Slc2a4*^{+/-} animals. The content of KLF15 in the muscle tissue of trained mice (EXE) was significantly lower compared to the other groups studied. However, no changes were found in the content of WWP1 and proteins associated with the atrophy pathway in skeletal muscle (*Atrogin1*, *Murfl*, *Foxo3a*, *Prodh* and *Tdo2*) in the different groups of mice studied. In conclusion, the results of the present study demonstrate that resistance physical exercise was able to improve glycemic homeostasis and decrease muscle KLF-15 content, however, this was not accompanied by changes in the protein content of the muscle atrophy pathway. skeletal structure in *Slc2a4*^{+/-} mice.

Keywords: Physical training; hyperglycemia; insulin resistance; muscle atrophy; KLF15

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DE LITERATURA	12
CAPÍTULO 1: HIPERGLICEMIA E CAPTAÇÃO DE GLICOSE	13
CAPÍTULO 2: KLF15 E SUA PARTICIPAÇÃO NA PERDA DE MASSA MUSCULAR.....	15
CAPÍTULO 3: EXERCÍCIO FÍSICO E CAPTAÇÃO DE GLICOSE E HOMEOSTASE GLICÊMICA	16
CAPÍTULO 4: EXERCÍCIO FÍSICO E HIPERTROFIA MUSCULAR.....	19
JUSTIFICATIVA	21
OBJETIVOS	21
OBJETIVO GERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS	23
ANIMAIS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS ÉTICOS	23
GRUPO DE ANIMAIS E ETAPAS EXPERIMENTAIS	23
PROTOCOLO DE EXERCÍCIO RESISTIDO E DESCRIÇÃO DOS APARATOS	23
ADAPTAÇÃO AOS APARATOS.....	24
DETERMINAÇÃO DE MÁXIMA CARGA VOLUNTÁRIA DE CARREGAMENTO (<i>MAXIMUM VOLUNTARY CARRYING CAPACITY – MVCC</i>).....	24
TREINAMENTO RESISTIDO	25
TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA INTRAPERITONEAL (TTIIP)	25
TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRAPERITONEAL (TTGIP)	26
TESTE DE FORÇA DE PREENSÃO	26
EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	26
EXTRAÇÃO DOS TECIDOS, HOMOGENEIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS	26
IMMUNOBLOTTING	27
ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
RESULTADOS.....	28
DISCUSSÃO	38

CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	54

INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é um tecido abundante e de crucial importância para a homeostase glicêmica e metabolismo do organismo. A massa muscular esquelética compreende cerca de 40% da massa corporal total e representa ~30% do gasto energético do organismo (1,2). Dessa maneira, anormalidades estruturais e metabólicas do músculo esquelético estão frequentemente associadas a doenças metabólicas e cardiovasculares (3), conseqüentemente levando a um aumento da morbidade (4). Portanto, ações capazes de promover efeitos inibitórios sobre processos de atrofia muscular é um grande desafio para ciência atual.

A perda de massa muscular esquelética pode estar atrelada a alguns fatores, como desuso, doenças catabólicas, senescência, reduzida ação da gravidade, imobilização, uso de glicocorticoides, entre outros (5, 6). Além disso, dentre os mecanismos propostos e relacionados a atrofia do músculo esquelético, destaca-se a proteína *Krüppel-like factor 15* (KLF15) (7,8). A proteína Fator 15 semelhante a Krüppel (do inglês, *Krüppel-like factor 15*), é um fator de transcrição envolvido na coordenação de inúmeros processos biológicos (regulação do metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas) em diferentes tecidos (9).

Hirata e colaboradores demonstraram que a hiperglicemia está envolvida no processo de atrofia do músculo esquelético através da via de sinalização da KLF15 (10). Os autores verificaram que a hiperglicemia, um distúrbio central do diabetes, pode aumentar os níveis da proteína KLF15 e a atrofia no músculo esquelético de roedores (10), sugerindo que a perda de massa muscular no portador de diabetes pode estar relacionada com a proteína KLF15. A abundância de KLF15 induzida pela condição de glicemia elevada resulta na regulação negativa (*downregulation*) da ubiquitina ligase E3 WWP1 e conseqüentemente em menor degradação de KLF15 dependente de ubiquitina. Portanto, como resultado da hiperglicemia é visto redução dos níveis de WWP1 e aumento dos níveis de KLF15 no músculo esquelético.

Além disso, foi visto que a superexpressão de KLF15 nas células musculares aumenta a expressão do RNAm de genes relacionados à atrofia muscular (*Atrogin1*, *Murf1*, *Foxo3a*, *Prodh* e *Tdo2*), sendo, portanto, um importante fator de transcrição relacionado ao declínio da massa muscular (11). Previamente foi demonstrado que o aumento da expressão de genes das E3 ligases atrogina1/MAFBx (Muscle Atrophy Fbox) e MuRF1 (Muscle Ring Finger 1) em diferentes situações atroficas (diabetes, câncer e jejum) (12-13), os torna relevantes marcadores de atrofia. Opostamente, foi observado que a deleção de KLF15 especificamente no músculo esquelético (MKLF15KO) em camundongos tratados com estreptozotocina (STZ) e, portanto, que se tornaram hiperglicêmicos, protegeu os animais da atrofia muscular (10). Assim, a hiperglicemia parece estar associada com efeitos negativos sobre a massa

muscular em indivíduos diabéticos (14). A proposta do efeito induzido pela hiperglicemia sobre o eixo WWP1/KFL15 e atrofia muscular pode ser vista na figura 1.

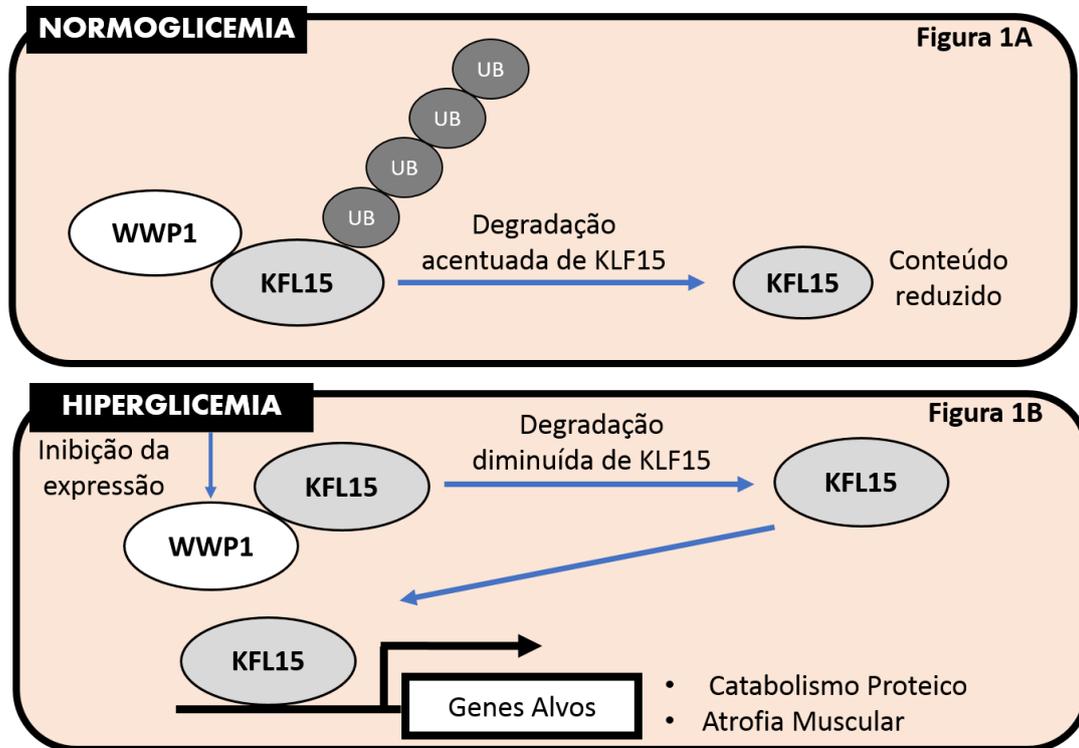


Figura 1. Hiperglicemia altera a sinalização WWP1/KFL15 e aumenta a expressão de genes atroficos no músculo esquelético. Figura 1A, em condição de normoglicemia a degradação (ubiquitinação) da proteína KLF15 é acentuada e, portanto, o seu conteúdo é reduzido no músculo esquelético. Figura 1B, em condição de hiperglicemia tem-se abundância de KLF15 e maior ativação do eixo WWP1/KFL15, aumentando o conteúdo de KLF15 e a transcrição de genes relacionados a atrofia muscular no músculo esquelético. WWP1, ubiquitina ligase E3 WWP1 (do inglês, *WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1*); KLF15, Fator 15 semelhante a *Krüppel* (do inglês, *Krüppel-like factor 15*). Figura adaptada de Hirata et al. 2019 (10).

REVISÃO DE LITERATURA

Mediante o que foi encontrado na literatura, há evidências do potencial efeito da hiperglicemia em induzir atrofia muscular através da KLF-15 no músculo esquelético. Portanto, nós especulamos que o exercício físico resistido possa ser uma intervenção capaz de reduzir a glicemia de camundongos *Slc2a4* (GLUT-4^{+/-}) e com isso consiga atenuar o processo de atrofia muscular.

CAPÍTULO 1: HIPERGLICEMIA E CAPTAÇÃO DE GLICOSE

A homeostase da glicose é mantida por um equilíbrio entre a produção hepática e a absorção e metabolismo celular de glicose. A quebra da homeostase e regulação descontrolada da glicose (hiperglicemia) são amplamente relacionadas ao Diabetes *Mellitus* (DM) (56). A Federação Internacional de Diabetes (IDF) estima que 536,6 milhões de pessoas vivem com diabetes e esse número deverá aumentar em 46% nos próximos anos, podendo chegar a 738,2 milhões de pessoas com DM em 2045 (57). O diabetes *mellitus* pode ser classificado didaticamente em duas formas. O Diabetes Tipo I (DM-1) é caracterizado pela destruição autoimune das células β pancreáticas, produzindo deficiência de insulina. O Diabetes Tipo II (DM-2), a forma mais prevalente de diabetes, é considerado uma doença heterogênea devido à multiplicidade de fatores e resulta na combinação de resistência à insulina e defeito na secreção das células β . (58). Embora hoje, seja reconhecido diferentes formas de manifestação da doença, ampliando muito as particularidades de cada tipo de diabetes, incluindo alguns tipos denominados de híbrido em que são vistos tanto uma ação autoimune quanto a presença de resistência à insulina relacionada ao excesso de adiposidade corporal.

No organismo, a captação da glicose se dá através de seus transportadores, uma grande família de treze proteínas que carregam os carboidratos para o interior das células (18). Presente em níveis consideráveis no músculo esquelético (97), o transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) é responsável pela captação de glicose disponível na corrente sanguínea para o meio intracelular após a ingestão alimentar em resposta ao estímulo de insulina ou durante a contração muscular. Codificado pelo gene *Slc2a4*, o GLUT-4 tem tanto sua produção quanto translocação, dependente da sinalização da insulina e da contração muscular (19).

Quando a concentração de glicose no sangue aumenta, a insulina é secretada pelas células β pancreáticas e liga-se ao receptor de insulina (IR). O IR é uma proteína heterotetramérica com atividade tirosinoquinase intrínseca. Uma vez ativada, a IR promove a fosforilação da tirosina de múltiplos substratos, incluindo os de receptores de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) (59, 65). A fosforilação da tirosina de IRS-1 e IRS-2 promove a ativação da enzima fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K). Em seguida há a fosforilação da quinase-1 dependente de fosfoinosítídeo (PDK-1) e esta fosforila a proteína quinase B/Akt no resíduo serina/treonina quinase, que tem uma participação fundamental na via de sinalização da insulina (65).

A Akt é responsável pela ativação do Substrato da Akt de 160 kDa (AS160). O AS160 atua na translocação do GLUT-4 aumentando a atividade de proteínas que estimulam a translocação das vesículas contendo GLUT-4 para a periferia da célula (67). Foi proposta uma via independente de PI 3-quinase que envolve as Moléculas Adaptadoras (APS) e a Proteína Associada a C-Cbl (CAP) que se

ligam ao receptor de insulina e recrutam c-Cbl, que por sua vez sinaliza para o fator de troca de nucleotídeo guanina C3G que ativa a proteína de ligação ao GTP TC10. No entanto, dados da literatura indicaram que esta via contribui muito pouco para a translocação do GLUT-4 mediada por insulina (68).

O GLUT-4 representa um dos transportadores de glicose mais estudados devido ao seu importante papel fisiológico, que é a etapa limitante da taxa de captação de glicose estimulada pela insulina no músculo esquelético e cardíaco e no tecido adiposo marrom e branco (18, 66). O GLUT-4 tem a capacidade de trafegar entre compartimentos intracelulares específicos e se translocar para a membrana plasmática em resposta ao estímulo de insulina e exercício físico, e assim a captação de glicose no músculo ocorre através de mecanismos de sinalização distintos, complexos e ainda não totalmente compreendidos (18).

Alguns estudos têm indicado que o comprometimento no transporte de glicose através do GLUT-4 pode acarretar uma diminuição significativa na captação de glicose, desencadeando alterações fisiológicas que podem levar ao desenvolvimento de diversas doenças metabólicas como o diabetes (27, 56, 59, 70, 71). A atividade alterada do GLUT-4 é sugerida como um dos fatores responsáveis pela diminuição da captação de glicose no músculo e tecido adiposo na obesidade e diabetes (56). Estudos recentes apontam redução considerável no conteúdo de GLUT4 no músculo esquelético de humanos diabéticos e obesos (20). Animais geneticamente modificados para o gene *Slc2a4*, com concentração reduzida dos transportadores de glicose 4 (GLUT-4^{+/-}), apresentam intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, sem apresentar alteração na massa adiposa total e podem desenvolver diabetes até os 6 meses de idade (21). Por outro lado, a hiperativação do gene *Slc2a4* no organismo (22) ou seletivamente (23), ou intervenções sobre o músculo esquelético normalizou a homeostase glicêmica e a sensibilidade à insulina.

Ensaio em modelos pré-clínicos de superexpressão e o nocaute do GLUT-4 vem contribuindo de forma significativa para uma compreensão mais ampla do papel do GLUT-4 em diferentes tecidos (70). É evidente na literatura que diferentes linhagens de camundongos têm diferenças genéticas que poderiam desempenhar um papel significativo nos resultados fisiológicos (71). O estudo de Fam et al (2012) apresenta resultados conflitantes aos citados anteriormente, apresentando que a deleção do GLUT-4 não afetou a captação de glicose no músculo de camundongos C57BL6/J e manifestou menor sensibilidade à insulina. Um outro estudo mostrou que camundongos nocaute heterozigotos desenvolveram grave resistência à insulina no músculo diante de níveis normais de glicose em jejum (72).

É sabido que a resistência à insulina é a principal característica clínica do DM2 e há fortes evidências na literatura que camundongos com a expressão modificada de GLUT-4, seja sistêmica ou específica no tecido muscular, influenciou a ação da insulina em todo o corpo e metabolismo da glicose

(18, 19, 20, 21, 22, 42, 55, 72). Não obstante, camundongos com superexpressão de GLUT-4 apresentaram efeitos positivos na ação da insulina e os níveis de glicemia foram reduzidos tanto em jejum quanto em estados pós-prandiais (72).

O DM2 é uma doença que apresenta riscos aumentados de incapacidade física e está associada a uma variedade de complicações vasculares (9, 73). Vários estudos já demonstraram que o DM2 está relacionado à perda de massa muscular, força e capacidade funcional, dado que a insuficiência da ação da insulina contribui diretamente a essa condição (9, 13, 73). O declínio progressivo na massa e força muscular é denominado como sarcopenia e se desenvolve como consequência de alguns fatores como inatividade muscular, doenças com desfechos catabólicos, idade avançada, microgravidade, imobilização, administração de glicocorticoides, entre outros (5, 6, 13). Mecanismos potenciais que ligam o DM2 à sarcopenia incluem resistência à insulina, citocinas inflamatórias, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e foi visto que a hiperglicemia, um distúrbio central do diabetes mellitus, também está implicada na patogênese da perda e função da massa muscular (5, 6, 9, 13, 73).

Os efeitos da hiperglicemia e/ou resistência à insulina na degradação proteica e vias de autofagia no músculo esquelético foram descritos por outros autores (16, 18, 52, 55-57), o que sugere fortes evidências da participação dessa condição na diminuição de capacidade funcional e declínio de massa do músculo esquelético (73). A hiperglicemia está diretamente relacionada à atrofia do músculo esquelético em modelos crônicos de diabetes (9, 21, 55). Verificou-se que a hiperglicemia regula positivamente a proteína KLF15 no músculo esquelético de animais diabéticos através da regulação negativa da ubiquitina ligase E3 WWP1, gene que tem como função a degradação de KLF15 (9). Essa via foi alvo de nosso estudo para esclarecer os efeitos deste fator de transcrição na sinalização atrofica do músculo esquelético em modelos hiperglicêmicos.

CAPÍTULO 2: KLF15 E SUA PARTICIPAÇÃO NA PERDA DE MASSA MUSCULAR

KLF15 é um fator de transcrição, que possui diversas funções biológicas em resposta ao estresse, proliferação e diferenciação celular e desenvolvimento embrionário (74). KLF15 foi identificado como um importante regulador de processos metabólicos, exercendo um papel essencial no metabolismo de todos os principais macronutrientes e é altamente expresso no fígado, coração e músculo esquelético (75). No músculo esquelético, KLF15 atua como regulador nas vias metabólicas adaptativas em resposta a mudanças no ambiente extracelular, estresse fisiológico e sinais hormonais (76). A superexpressão de KLF15 e seus efeitos no tecido muscular tem sido amplamente investigado e foi demonstrado que esse

fator de transcrição desempenha um papel protetor nos músculos esqueléticos afetados por algumas patologias, no entanto não preveniu a atrofia muscular ou retardou a progressão do declínio de massa muscular esquelética em camundongos (9, 74-76).

A expressão de KLF15 é regulada positivamente no fígado de camundongos diabéticos e há evidências que tenha participação na hiperglicemia. A abundância de mRNA de KLF15 é aumentada pelo uso de glicocorticoides. A Superexpressão de KLF15 em células musculares induz ao aumento de síntese de genes relacionados à atrofia muscular, apontando que KLF15 participa diretamente na atrofia muscular induzida por glicocorticoides. Esses achados impulsionaram pesquisadores a investigarem o papel de KLF15 na atrofia muscular associada ao diabetes (7, 10, 54, 55).

O estudo de Hirata *et al.* (2019) demonstrou que a exposição de miotubos C2C12 de camundongos à glicose aumentou a quantidade de KLF15, assim como foi visto no músculo esquelético de camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina (STZ). Não obstante, a exposição das células à glicose aumentou a expressão dos genes *Atrogin1* e *Murf1*, que estão diretamente relacionados à atrofia muscular.

Assim, a proteína KLF15 está relacionada com o metabolismo do músculo esquelético, especialmente com o processo de atrofia. Portanto, se torna importante investigar ações terapêuticas que possam regular a via de sinalização da proteína KLF15. Neste cenário, uma da estratégia capaz de atuar positivamente (atenuando a atrofia ou promovendo hipertrofia) sobre músculo esquelético é o exercício físico resistido (15). O efeito favorável do exercício físico sobre a musculatura esquelética pode ocorrer através da ativação de vias de sinalização tróficas e inibição de vias atroficas do músculo esquelético (7, 10, 15). Ademais, o exercício físico tem se mostrado ser uma ferramenta não farmacológica de efeito expressivo em reduzir a glicemia (16,17). No entanto, os efeitos do exercício físico sobre a proteína KLF15 e o impacto sobre a sinalização atrofica na condição de hiperglicemia não são conhecidos.

CAPÍTULO 3: EXERCÍCIO FÍSICO E CAPTAÇÃO DE GLICOSE E HOMEOSTASE GLICÊMICA

O exercício físico é uma ferramenta não farmacológica com potencial evidenciado para promover bem-estar e saúde, melhora na aptidão funcional e de efeitos favoráveis aos sistemas circulatório, respiratório, imunológico, entre outros, reduzindo os fatores de risco relacionados ao estilo de vida com predominância da inatividade física (2). Além disso, estudos sugerem a intervenção com exercícios físicos como tratamento para a sarcopenia, em especial o treinamento físico resistido, devido

a sua ação eficiente na atenuação da redução da massa magra e no aumento da síntese proteica e força muscular (10, 19, 20).

Um estímulo significativamente potente para a síntese e translocação de GLUT-4 no músculo esquelético é o exercício físico. Independentemente da presença de insulina, a contração muscular ativa diversos efetores que alteram as concentrações de RNAm de GLUT-4, sua tradução em novas proteínas e a translocação destes transportadores ao sarcolema e túbulos-T (24–27). O aumento na expressão e atividade de algumas proteínas envolvidas na via de captação de glicose pelo músculo esquelético em funcionamento parece exercer grande efeito na regulação da homeostase glicêmica e consequente melhoria na saúde metabólica do organismo (28-31).

Nosso conhecimento atual sobre a homeostase glicêmica em condições normais - e especialmente de doença - está diretamente ligado à compreensão da fisiologia dos transportadores de glicose (18). O aumento da captação de glicose nas células responsivas à insulina e à atividade contrátil do músculo depende da presença do GLUT-4 na membrana celular, para que a entrada de glicose na célula muscular seja liberada por difusão facilitada e, durante o exercício, está suscetível à regulação fisiológica pela entrega de glicose, permeabilidade da membrana à glicose e metabolismo intracelular da glicose (17, 65).

O exercício físico promove um aumento do fluxo sanguíneo para os músculos ativos, estimulando a dilatação dos vasos sanguíneos responsáveis pela irrigação dos músculos e, assim, facilitando o fornecimento de glicose ao músculo esquelético em contração, aumentando a área de superfície disponível para o transporte de glicose (65, 66). Durante a contração do músculo esquelético não há alteração nos níveis de insulina circulante no fluxo sanguíneo podendo ocorrer até mesmo uma diminuição desses níveis. Dessa forma, a contração muscular juntamente ao estímulo de insulina circulante produz sinalizações para que o GLUT-4 possa migrar até a superfície do sarcolema e túbulos-t gerando um aumento na captação de glicose na célula (70).

De forma geral, a contração muscular é capaz de estimular alterações funcionais e estruturais de proteínas, promovendo um aumento na captação e metabolismo de glicose através da translocação do GLUT-4 para a superfície celular em resposta ao exercício (65, 70). O aumento dos níveis de GLUT-4 pode ocorrer tanto de forma aguda quanto crônica em resposta ao exercício físico (98). A resposta aguda está associada à translocação rápida de vesículas contendo GLUT-4 para a membrana celular, enquanto a resposta crônica envolve adaptações metabólicas e estruturais nos músculos esqueléticos (99).

O exercício resistido, caracterizado pelo uso de uma carga externa para promover contração do músculo, tem ganhado destaque devido aos seus impactos positivos na regulação do GLUT-4, que desempenha um papel crucial na homeostase glicêmica. Estudos têm demonstrado que o treinamento

resistido desencadeia uma série de eventos moleculares que resultam no aumento dos níveis de GLUT-4 nos músculos esqueléticos (100-103).

O estudo de Layne (2010) avaliou dezenove indivíduos, sendo esses 9 sedentários controle e 10 com risco cardiometabólico. Ambos os grupos foram submetidos a 8 semanas de treinamento resistido supervisionado, realizando exercícios corporais e com pesos uma vez ao dia e quatro a cinco vezes na semana, trabalhando um grupo muscular específico em cada sessão de treino. A expressão de GLUT-4 aumentou significativamente após o treinamento em ambos os grupos, assim como a ativação de mecanismos moleculares como a via mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e AMPK (*activated protein kinase*) foi maior e a composição corporal teve impactos positivos. Ha e colaboradores (2015) indicam que a ativação da AMPK estimula a translocação de vesículas de contendo GLUT-4, desencadeia processos catabólicos com liberação de energia para síntese e a promove a inibição de processos consumidores de ATP, resultando em um aumento da captação de glicose independente de insulina na célula.

Em outra investigação com humanos, o treinamento resistido aumentou o conteúdo proteico de GLUT-4, bem como o conteúdo de receptor de insulina, glicogênio sintase (GS) e atividade total de GS (102). Holten e colaboradores (2004) avaliaram um total de 10 indivíduos diabéticos tipo 2 e 7 homens saudáveis, submetendo ambos os grupos a um treinamento de força durante 6 semanas. O foco do programa de treinamento era fazer com que uma perna realizasse exercícios de força enquanto a outra permanecesse sedentária. As sessões ocorreram três vezes por semana e cada sessão de treino teve a duração de 30 minutos. Foi observado através de suas análises um aumento de 40% na densidade de GLUT-4 nos indivíduos diabéticos tipo 2.

Um outro estudo gerou camundongos deficientes em GLUT-4 para avaliar os impactos do exercício físico sobre o transportador de glicose (103). Os autores submeteram os animais com ablação de GLUT-4 e camundongos selvagens a um protocolo de natação, que consistia em seis intervalos de 30 minutos separados por períodos de 5 minutos para descanso, sendo estudados imediatamente após o último intervalo. O estudo mostrou que o treinamento de natação induziu a uma maior captação de glicose no músculo esquelético em todos os animais e trouxe evidências diretas que o GLUT-4 é mediador primário dessa captação através de suas análises.

Tanto o exercício físico aeróbio quanto o exercício resistido têm se mostrado capaz de reduzir a glicemia (32-35), no entanto, existem vias de sinalizações que são ativadas com maior predominância em cada tipo esforço. Saber se o exercício físico resistido, mediante a redução da glicemia, têm potencial de regulação da proteína KFL15 se torna relevante para prescrição de exercício com vista a atenuar o processo atrófico do músculo esquelético.

CAPÍTULO 4: EXERCÍCIO FÍSICO E HIPERTROFIA MUSCULAR

O exercício físico, especialmente o treinamento resistido, desempenha um papel crucial na hipertrofia muscular, que é o aumento do tamanho e volume das fibras musculares (77). A hipertrofia ocorre como uma resposta adaptativa do corpo ao estresse mecânico imposto pelo exercício, especialmente quando esse exercício é desafiador o suficiente para estimular o crescimento muscular (78).

A hipertrofia muscular é um fenômeno adaptativo fundamental resultante da sobrecarga mecânica imposta pelo exercício físico, em especial o treinamento resistido (78). O exercício físico desencadeia a ativação de vias de sinalização intracelular, como a via mTOR, desempenhando um papel crucial na síntese proteica e, conseqüentemente, na hipertrofia muscular (78, 79).

A sinalização celular tem um papel importante na regulação dos processos moleculares envolvidos na hipertrofia muscular (80). Quando o músculo é submetido a estímulos de treinamento resistido, ocorrem alterações na sinalização intracelular que desencadeiam adaptações estruturais e funcionais (80, 81).

Diversas vias e mecanismos estão associados ao processo de hipertrofia muscular. A via mTOR tem participação central nesse processo, desempenhando um papel essencial na regulação da síntese proteica e, dessa forma, no aumento do tamanho das fibras musculares (79). A via mTOR é sensível a uma variedade de estímulos, incluindo sinais ambientais e nutricionais para modular a resposta adaptativa do músculo (82). O treinamento resistido, a disponibilidade de aminoácidos, e fatores de crescimento, como o IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*), são conhecidos por desencadear a ativação da mTOR (83). A ativação da mTOR estimula a tradução de RNA mensageiro (*mRNA*) em proteínas musculares, promovendo o crescimento (79).

A regulação da mTOR é complexa e envolve interações com diferentes componentes celulares, como a proteína Rheb (Ras homolog enriched in brain), e vias de sinalização, como PI3K/AKT (Inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B) (82, 83). Essas interações são fundamentais para modular as respostas celulares coordenadas pela mTOR. Em termos mais simples, a ativação ou desativação da mTOR não é um processo direto e único, e sim um resultado de uma rede de sinais e interações moleculares (84).

A via mTOR também pode ser estimulada de maneira indireta pela via PI3K/AKT. A ativação da via PI3K/AKT está relacionada a vários processos biológicos, incluindo a resposta ao exercício físico e a regulação da hipertrofia muscular (79). A ativação dessa via é um evento inicial na sinalização que leva à ativação da via mTOR (85). Hormônios como a insulina e fatores de crescimento, incluindo o IGF-1, têm a capacidade de ativar essa via (85, 86).

A PI3K é uma enzima chave na ativação da via, sendo responsável pela fosforilação do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) (87). Isso leva à ativação da proteína quinase AKT, que desempenha um papel central na regulação do crescimento celular (79). Estudos têm demonstrado que a ativação de AKT está associada a um aumento significativo na síntese de proteínas musculares e na hipertrofia muscular (79, 87, 88). A AKT atua diretamente na regulação da via mTOR (79).

Envolvido na ativação da via PI3K/AKT, o IGF-1, um membro da família dos fatores de crescimento insulina-símiles produzido em resposta à estimulação da somatotropina (GH), tem sido amplamente reconhecido por desempenhar um papel central no processo de hipertrofia muscular (90). A ligação do IGF-1 aos seus receptores ativa a via de sinalização PI3K/AKT, desencadeando eventos que favorecem a síntese proteica, inibem a degradação de proteínas, ativação de vias anabólicas e que promovem a proliferação celular (90, 91). Além disso, o IGF-1 exerce influência significativa na regulação do fator de crescimento similar à insulina (IGFBP), modulando a disponibilidade do IGF-1 nos tecidos musculares (89, 90).

Hormônios como a insulina também têm participação na ativação da via PI3K/AKT (85, 86). Essa via é essencial para a transmissão de sinais insulínicos intracelulares, influenciando a captação de glicose, a síntese de glicogênio e a regulação do metabolismo lipídico (88, 86, 93). A insulina liga-se ao seu receptor na membrana celular, desencadeando a ativação da via PI3K e levando à ativação da proteína quinase AKT (93). A ativação de AKT desencadeia uma cascata de eventos que modulam a atividade de substratos celulares, influenciando na captação de glicose e facilitando a translocação de transportadores de glicose (GLUT) para a membrana celular (86, 93). Disfunções na via de sinalização PI3K/AKT estão associadas à resistência à insulina, um fenômeno precursor de condições metabólicas adversas, como diabetes tipo 2 (92, 94).

Estudos já demonstraram uma correlação positiva entre a hipertrofia muscular induzida pelo treinamento resistido e a melhora na sensibilidade à insulina (19, 26, 32). O treinamento resistido atua na ativação de vias de sinalização, incluindo PI3K/AKT (68, 95). O aumento da massa muscular atua positivamente sobre a captação de glicose, facilitando a regulação da homeostase glicêmica (19). Além disso, a liberação de mioquinas, como a irisina, que provém do músculo esquelético durante o exercício, pode exercer efeitos anti-inflamatórios benéficos (96).

A hipertrofia muscular contribui para a utilização de ácidos graxos como fonte de energia, impactando positivamente na composição corporal, que pode ter implicações significativas na prevenção e controle do diabetes tipo 2, tornando-se um potencial estímulo não farmacológico contra os efeitos adversos dessa condição metabólica (95, 96). A compreensão dos mecanismos moleculares

subjacentes a essa relação oferece o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, possibilitando uma abordagem mais eficaz nessa condição metabólica cada vez mais prevalente.

Portanto, pretendeu-se através do uso de camundongos geneticamente modificados com ablação de um dos genes *Slc2a4*^{+/-}, que se tornam hiperglicêmicos, avançar com o conhecimento a respeito dos mecanismos de ação inibitória do exercício físico sobre o processo de atrofia muscular na condição de hiperglicemia.

JUSTIFICATIVA

Na prática clínica observa-se que estratégias farmacológicas direcionadas a mitigar a atrofia muscular provaram ser muitas vezes insuficientes (36) ou com efeitos colaterais importantes (por exemplo, interferindo na secreção de hormônios da próstata e de hormônios androgênicos). Avaliações através de moduladores seletivos de receptores de andrógenos (SARMS) e terapias antimióstatina (por exemplo, anticorpos ou antagonistas de receptores) podem ser promissores, mas ainda precisa ser amplamente explorado os seus impactos ao músculo esquelético e saúde (37-40). No entanto, até o momento, o exercício de força (também denominado de exercício resistido ou de musculação), se apresenta como intervenção muito eficaz para aumentar a massa, força e qualidade (função) da musculatura esquelética, especialmente no envelhecimento (41). Ademais, considerando, que uma parcela significativa da população apresenta níveis elevados de glicose sanguínea, sendo este um fator relacionado com ativação de vias de sinalização atróficas do músculo, justifica a investigação do efeito do exercício físico resistido sobre essa condição metabólica (10, 19-20).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do exercício físico resistido sobre o fator transcricional KLF15 e a sinalização molecular relacionada a atrofia muscular em camundongos *Slc2a4*^{+/-}.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar nos diferentes grupos estudados as seguintes variáveis:

- Caracterização metabólica dos animais (adiposidade, glicemia de jejum e sensibilidade à insulina);
- Avaliar a tolerância a glicose e o conteúdo de GLUT4;
- Investigar o conteúdo de WWP1 no músculo esquelético dos camundongos;
- Avaliar o conteúdo de KLF15 no músculo esquelético dos animais;
- Investigar a via de sinalização relacionada ao processo de atrofia muscular através da avaliação do conteúdo proteico de WWP1, Foxo3a, MuRF1 e Atrogina-1 nos animais;

A figura 2, resume de maneira ilustrativa as etapas moleculares e objetivos do presente estudo.

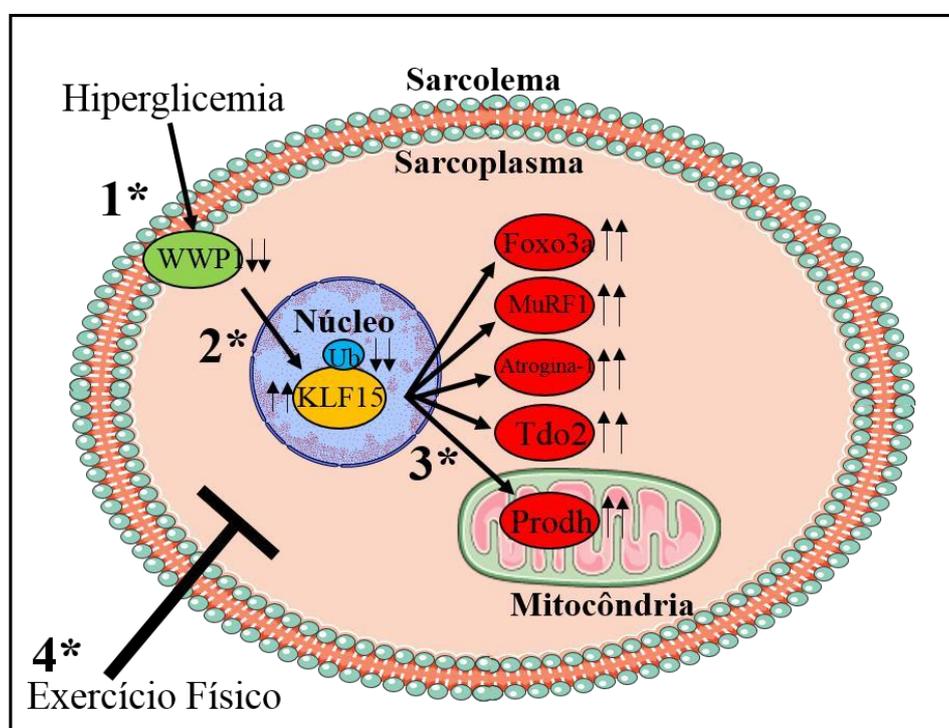


Figura 2. Ativação da via de sinalização atrofica no músculo esquelético induzido por hiperglicemia. As etapas de pesquisa foram apresentadas a seguir através de números (de 1 a 4) indicando os principais pontos da via de sinalização de atrofia no músculo esquelético envolvendo a proteína KLF15. **1*** A hiperglicemia proporciona uma diminuição da abundância de WWP1, inibindo sua expressão. **2*** Com a inibição de WWP1, a ligação de ligase ubiquitina E3 com o fator transcricional KLF15 diminui, desta forma a degradação de KLF15 torna-se inferior à sua síntese, acumulando-se no núcleo celular. **3*** Com o acúmulo de KLF15, sua expressão é aumentada proporcionando um aumento de proteínas que são envolvidas com a degradação de proteínas (Foxo3a, MuRF1 e Atrogina-1), assim como genes relacionados a atrofia muscular têm sua quantidade aumentada (*Tdo2* e *Prodnh*). **4*** O exercício físico seria capaz de aumentar os níveis de WWP1, reduzir o conteúdo de KLF15 e

diminuir a sinalização atrófica do músculo esquelético de camundongos *Slc2a4^{+/-}*? Figura criada pelo próprio autor.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Foram utilizados camundongos modificados geneticamente com a remoção de um dos genes *Slc2a4* flox/flox (fornecidos pela Cyagen, Santa Clara, EUA). Todos os procedimentos envolvendo animais seguiram as regulamentações brasileiras para pesquisa científica com animais (lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008). Antes de iniciar os experimentos, todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da UNICAMP, em Campinas, SP (protocolo CEUA/UNICAMP n° 5003-1/2018). A genotipagem foi realizada por uma empresa especializada em análises genéticas (Helixxa, Paulínia, SP). Após confirmar o genótipo desejado, os experimentos planejados no projeto foram iniciados.

Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno sob condições controladas de luz (12 horas claro/escuro) e tiveram acesso livre à água e ração convencional. Os camundongos foram divididos em diferentes grupos experimentais, conforme as etapas do estudo.

GRUPO DE ANIMAIS E ETAPAS EXPERIMENTAIS

O experimento os animais foram distribuídos em três grupos, como descritos a seguir: camundongos *Wild Type* ou selvagem (WT); camundongos *Slc2a4^{+/-}* sedentários (SED); e camundongos *Slc2a4^{+/-}* exercitados (EXE). A descrição do protocolo de exercício será apresentada a seguir. Nesta fase, foram realizadas as análises fisiológicas e de Immunoblotting de interesse. Sendo que, os animais foram eutanasiados 16 horas após a última sessão do exercício físico.

PROTOCOLO DE EXERCÍCIO RESISTIDO E DESCRIÇÃO DOS APARATOS

Um equipamento de escalada para roedores da marca AVS Projetos (localizada em São Carlos, SP) foi empregado, caracterizado por sua estrutura plástica, pés de ferro e degraus de aço inoxidável. A escada tinha 10 cm de largura e os degraus estavam espaçados por 1,5 cm, formando um ângulo de 80 graus em relação ao solo. Sua altura era de 50 cm. Durante o teste, os animais foram induzidos a realizar 12 ± 1 movimentos dinâmicos de escalada com as patas traseiras, conforme descrito por Frajacom e

colaboradores (42). No topo da escada, havia uma câmara de descanso de 30 cm², onde os animais podiam descansar entre as tentativas de escalada durante o período de adaptação. Para fixar a carga na cauda do animal, foi utilizado um tubo cônico de plástico, com aproximadamente 7,5 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro. Esse equipamento para exercício físico já havia sido previamente utilizado pelo grupo de pesquisa (43).

ADAPTAÇÃO AOS APARATOS

Os animais foram adaptados aos aparatos conforme descrito por Cassilhas e colaboradores (44), durante um período de adaptação de 4 dias. Antes da primeira tentativa de escalada, com o aparato de carga vazio em suas caudas, os animais foram colocados na câmara no topo da escada por 60 segundos. Na primeira tentativa, foram posicionados a 15 cm da entrada da câmara. Se necessário, um estímulo manual foi aplicado para iniciar o movimento, geralmente consistindo em um leve toque na região glútea dos animais com uma colher de sopa de plástico, especialmente durante a adaptação ao ergômetro. Na segunda tentativa, foram posicionados a 25 cm da câmara, e da terceira tentativa em diante, foram posicionados na base da escada, a 50 cm da câmara. Um período de descanso de 60 segundos foi estabelecido entre as tentativas. As tentativas continuaram até que os animais completassem 3 com sucesso, sem a necessidade de estímulo adicional. Não foram usados estímulos alimentares ou de choque durante o experimento.

DETERMINAÇÃO DE MÁXIMA CARGA VOLUNTÁRIA DE CARREGAMENTO (*MAXIMUM VOLUNTARY CARRYING CAPACITY – MVCC*)

Para determinar a carga adequada para o protocolo de exercício de força, foi realizado um teste incremental visando identificar a máxima carga individual com a qual cada animal conseguiria completar uma série de escalada de 50cm. Após quatro dias de adaptação aos equipamentos, os animais descansaram por um dia antes do teste. Durante o teste, os animais partiram da base da escada, e uma tentativa era considerada bem-sucedida quando os animais completavam os 50cm de escalada. A série inicial foi realizada com uma sobrecarga correspondente a 75% da massa corporal do animal, e a carga foi aumentada em incrementos de 3 gramas a cada tentativa até que o animal não conseguisse mais completar o percurso. Após cada tentativa bem-sucedida, o animal era retirado da escada e colocado em

uma gaiola individual para descansar por 5 minutos antes da próxima tentativa. A maior carga em que o animal teve sucesso foi considerada como a Carga Máxima Voluntária de Carregamento (MVCC), utilizada para determinar as cargas individuais no experimento.

TREINAMENTO RESISTIDO

Após 48 horas da determinação da *MVCC*, os animais iniciaram o protocolo de treinamento resistido. O treinamento físico teve início às 18:00 h, período este que coincide com o início do ciclo de vigília do animal. As sessões de exercício consistiram de 20 escaladas, com um intervalo de 60 segundos de descanso entre elas, com carga de 70% da *MVCC*. Após completar a escalada, o animal era retirado da escada e colocado em uma gaiola individual para período de descanso.

Inicialmente, os animais foram exercitados por 3 dias consecutivos (uma sessão por dia). 16 horas após a terceira sessão de exercício, foi realizado o Teste de Tolerância à Insulina e os animais não exercitaram neste dia. No dia seguinte, houve nova sessão de exercício, e 16 horas após o fim desta nova sessão foi realizado o Teste de Tolerância à Glicose. No dia seguinte ao Teste de Tolerância à Glicose, foram realizadas mais duas a sessões de exercício e, precedendo 16 horas após a última sessão, foi realizada a extração tecidual. Ao todo foram realizadas seis sessões de exercício.

O objetivo de realizar seis sessões de treinamento resistido é que previamente temos visto que isso não provoca alteração no peso corporal, permitindo descartar que as respostas a serem observadas sejam decorrentes de alteração na adiposidade do animal (17, 43).

TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA INTRAPERITONEAL (TTIIP)

Após um período de jejum de 6 horas, os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTIip). Isso envolveu a administração de uma injeção intraperitoneal de insulina recombinante humana (Humulin R) da Eli Lilly (Indianápolis, IN, USA) na concentração de 1,5 U/Kg de massa corporal. Amostras de sangue foram coletadas nos intervalos de 0, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a administração da insulina, retiradas da cauda dos animais para análise da glicemia. O tempo 0 representa o nível basal de glicose no sangue antes da injeção de insulina. A glicose sanguínea $t_{1/2}$ foi calculada usando a inclinação dos mínimos quadrados da concentração de glicose durante a fase de decaimento linear após a administração de insulina.

TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRAPERITONEAL (TTGIP)

O TTGip foi realizado com os animais em jejum de 6 horas. Foram determinadas as concentrações de glicose a partir de amostras de sangue coletadas da cauda nos tempos 0, 30, 60 e 120 min através de glicosímetro ONE TOUCH (Johnson & Johnson ®). Após a coleta de sangue no tempo 0, foi administrada uma solução de glicose a 25% (1,5 g/kg de peso corporal) por meio de injeção intraperitoneal. As áreas sob as curvas durante o teste foram determinadas pelo método trapezoidal, utilizando-se o software Excel 2015.

TESTE DE FORÇA DE PREENSÃO

O teste de força de preensão foi conduzido no equipamento Grip Strength System (Avs Projetos ®, São Carlos, São Paulo, Brasil). Foram realizadas três tentativas de preensão com as patas dianteiras sem que os valores fossem considerados. Cada tentativa consistiu em tensionar o animal pela cauda, de modo que ambas as patas (dianteiras ou traseiras) passassem por todos os arames da grade e o roedor se desprendesse da mesma. Posteriormente, foram realizadas seis tentativas válidas e os três maiores valores de tensão aplicados foram registrados em Newton (N) (42). A média dos três mais altos valores de força aplicados à barra de metal foi registrada como o pico tensão (N) e utilizada como parâmetro de desempenho (42,43)

EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Antes dos procedimentos cirúrgicos e de extração de tecidos, os camundongos foram administrados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de cloridrato de cetamina (100 mg/kg; Ketalar; Parke-Davis, Ann Arbor, MI) e xilazina 10 mg/kg; Rompun; Bayer, Leverkusen). Todos os animais foram mantidos em jejum por 6 horas antes dos procedimentos de extração dos tecidos.

EXTRAÇÃO DOS TECIDOS, HOMOGENEIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Amostras do músculo esquelético (gastrocnêmio, porção mista) foram coletadas dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados em

um tampão de extração conforme descrito anteriormente (17). Uma parte dessas amostras foi usada para determinar o conteúdo de proteínas totais utilizando o método do Ácido Bicinconínico (BCA) (Sigma-Aldrich). Enquanto outra parte foi submetida à técnica de immunoblotting (IB) com o uso de anticorpos específicos. Além disso, o tecido adiposo mesentérico, retroperitoneal e epididimal foi coletado e pesado utilizando uma balança analítica de precisão.

IMMUNOBLOTTING

Após a determinação do teor de proteína total, será adicionado ao sobrenadante o tampão Laemmli contendo 100 mM de ditiotreitol, e as amostras do tecido hepático serão aquecidas por 5-10 min (89). Então, as amostras com quantidades iguais de proteínas (50µg) serão aplicadas a um gel de poliacrilamida para separação por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. Coloração de Ponceau será aplicada para verificar a transferência da membrana. Os borrões serão bloqueados com 5% de leite em pó em temperatura ambiente por 1 h e, em seguida, incubado durante a noite a 4° C com os seguintes anticorpos primários: pACC (S79) #3661, ACC #3662, CD36 #14347S, CPT1 #12252S, pAkt (S473) #4060, Akt #4685, pGSK3β (S9) #9322, GSK3β #5676, FOXO1 #2880, pFOXO1 #9461, IRS1 #2382, pIRS-1 (S632/635) #2388, pIR (T1146) #3021, pAMPK (T172) #4188, AMPK #2532 e β-actina #3700, GAPDH #2118 da Cell Signaling Technology®; FAS #sc-48357 da Biolegend®; SREBP #BS-1402R da Bioss®; IR #sc-10711 da Santa Cruz Biotechnology®, e anticorpos rabbit e mouse (7074) como anticorpos secundários da Cell Signaling Technology®. As membranas serão então incubadas por 1 hora com os anticorpos secundários. As bandas específicas serão visualizadas por quimiluminescência intensificada e adquirida pelo C-DiGit™ Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, NE, EUA). As bandas serão quantificadas por suas áreas usando ótica densitometria usando o software UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific, Inc. Orem, UT, EUA).

ANÁLISE DE SÍNTESE DE PROTEÍNAS

Todos os animais foram injetados por via intraperitoneal com 40 nmol/g de peso corporal de puromicina (8 l/g de uma solução a 5 mM em PBS) 20 min antes da eutanásia dos animais e extração tecidual. Foi utilizado anticorpo (MABE34) da Merck (Darmstadt, Germany). O tecido muscular coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido. A administração de puromicina demonstrou ser um método confiável para medir a síntese de proteínas (18). Além disso, foi demonstrado que a incorporação de puromicina nas cadeias de peptídeos e, quando a puromicina é usada em baixas

concentrações, o acúmulo de peptídeos conjugados com puromicina reflete com precisão a taxa de síntese de proteínas (2, 4). Notavelmente, essa tecnologia alivia os problemas associados ao uso de materiais radioativos para medir mudanças na síntese de proteínas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm Erro Padrão da Média. As proteínas obtidas por immunoblotting foram comparadas diretamente pelas bandas proteicas nas autorradiografias, que foram quantificadas por densitometria utilizando o software Un-Scan-It Gel 6.1®. Para análise estatística, a normalidade dos dados foi verificada e, em seguida, aplicou-se o teste "t de Student" ou "Mann-Whitney" para comparações entre dois grupos. Quando havia mais de dois grupos, foi utilizado o teste de "Análise de Variância (ANOVA)" ou "Kruskal Wallis", seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$. As análises e a elaboração dos gráficos foram realizadas utilizando o programa "GraphPad Prism 6.0".

RESULTADOS

Exercício físico aumenta força de preensão e máxima carga voluntária de carregamento

Inicialmente, os animais realizaram o teste de força de preensão (handgrip) em dois momentos: antes do início do treinamento físico e ao final do programa de treinamento com exercícios resistidos. Foi possível observar, através dos resultados, que o protocolo de exercício resistido aumentou significativamente a força de agarre dos animais exercitados quando comparados a eles mesmos antes do protocolo de treinamento ($p < 0.05$). Além disso, os resultados também apresentaram diferença estatística entre os animais do grupo exercitado após o protocolo de exercício físico quando comparados aos animais do grupo sedentário antes do início do treinamento de nossa pesquisa ($p = 0.0016$).

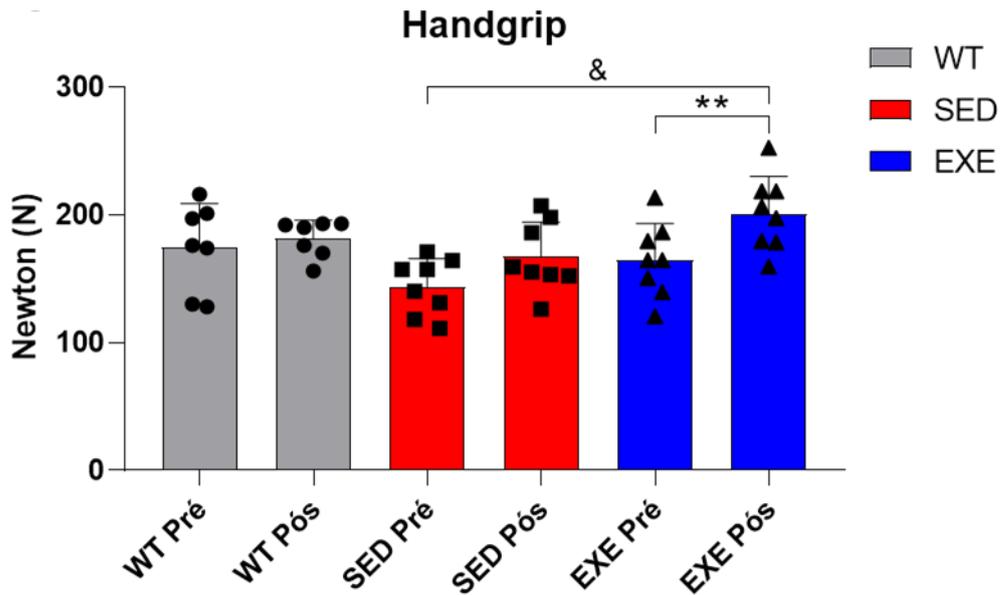


Figura 3. Exercício resistido aumenta a força de prensão de camundongos.

Foi realizado teste de prensão nos diferentes grupos experimentais (n=8) antes do início do treinamento (Pré) e após a última sessão (Pós). Dados foram representados como a média e desvio padrão da média. Os resultados foram obtidos através do Anova one-way. ** $p < 0.001$ vs Exe Pós. & $p < 0.05$ vs Sed Pré.

Também foi realizado o teste de Máxima Carga Voluntária de Carregamento (MVCC). O teste foi executado antes do início e ao final do protocolo de treinamento físico. Os resultados apontaram diferença significativa da máxima carga de carregamento voluntária dos animais do grupo exercício entre o teste realizado previamente ao protocolo de treinamento e ao feito posteriormente a esse protocolo ($p < 0.0001$), indicando que os animais estavam mais resistentes às cargas externas após terem passado pelo treinamento físico (Figura 4).

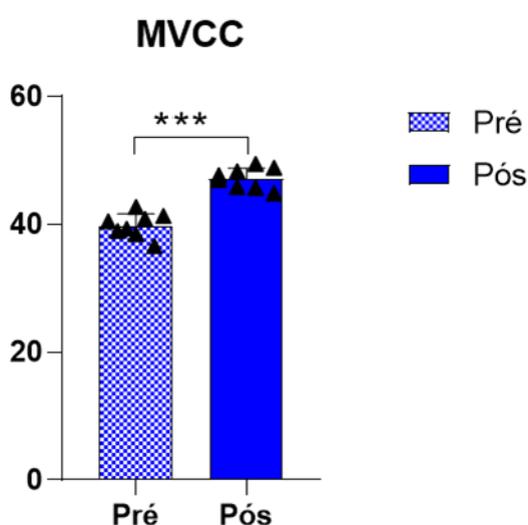


Figura 4. Exercício resistido aumenta a Máxima Carga Voluntária de Carregamento (MVCC).

O teste de MVCC foi realizado antes do início do treinamento físico (Pré) e após a última sessão (Pós). Os dados foram representados como média e desvio padrão da média. *** $p < 0.0001$ vs Pós.

Exercício físico atenuou o ganho de peso corporal

Os camundongos foram semanalmente pesados antes e durante o protocolo de treinamento físico a fim de verificar possíveis mudanças do peso corporal durante o experimento. Foi verificado através das pesagens que o exercício físico atenuou o ganho de peso corporal dos animais (Figura 5A). Foi observado anteriormente que o genótipo dos animais *Slc2a4^{+/-}* não apresenta mudanças na massa corporal total ao longo de tempo (20). No entanto, na primeira semana antes do início do treinamento, os animais do grupo exercitado apresentaram um peso superior ao grupo controle e o grupo sedentário e, após as 6 sessões de treinamento, o peso corporal destes animais já estava semelhante ao grupo sedentário e abaixo do grupo controle, o que se pode discutir mais a frente ao analisarmos o peso dos tecidos corporais. Apesar disso, não houve diferença significativa na massa corporal dos animais. Na comparação do peso inicial com o peso final (delta peso) é possível verificar essa diminuição no ganho de peso dos animais que foram submetidos ao protocolo de treinamento em relação ao grupo controle onde houve uma diferença significativa (Figura 5B, $p < 0.05$).

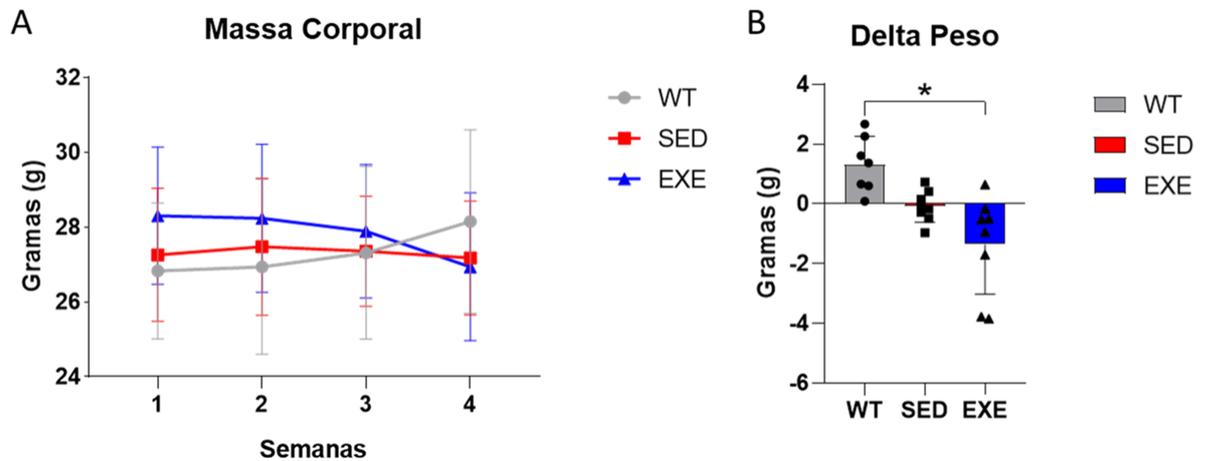


Figura 5. Massa corporal em camundongos com ablação de GLUT-4 treinados.

A) Massa corporal dos animais. B) Delta Peso. Dados representados como a média e desvio padrão da média. Os resultados foram obtidos através da realização do teste de Anova one-way entre os diferentes os diferentes grupos experimentais (n=8): Wild-type (WT), *Slc2a4*^{+/-} sedentários (SED) e *Slc2a4*^{+/-} exercitados (EXE). * p < 0.05 vs Exe.

Na Figura 6, podemos verificar que não houve diferença em relação a massa corporal total e comprimento dos animais entre os grupos exercício e controle através do Índice de Lee (comprimento vs circunferência). A avaliação foi realizada no mesmo dia da eutanásia dos animais para comparar se haviam diferenças corporais dos animais estudados e a análise estatística não apresentou diferença.

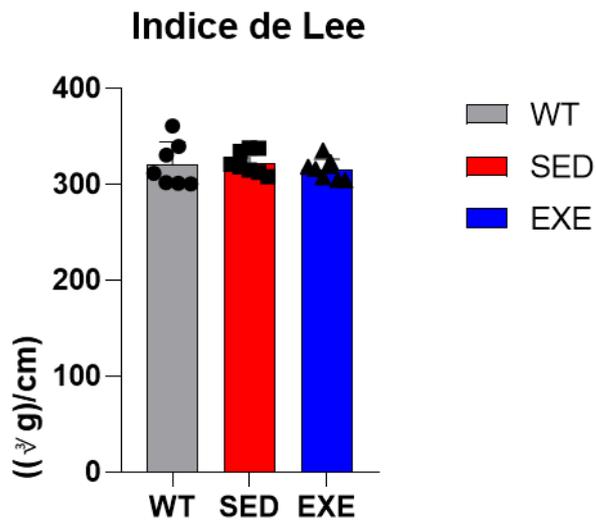


Figura 6. Índice de Lee dos camundongos.

Foi realizado o índice de Lee nos diferentes grupos experimentais (n=8) após o protocolo de treinamento físico. Dados representados como a média e desvio padrão da média. Os resultados foram obtidos através da realização do teste de Anova one-way entre os diferentes os diferentes grupos experimentais: Wild-type (WT), *Slc2a4*^{+/-} sedentários (SED) e *Slc2a4*^{+/-} exercitados (EXE).

Na Figura 7 é possível verificar o peso de alguns tecidos (fígado, músculo gastrocnêmio, tecidos adiposos epididimal, inguinal, tecido adiposo marrom, retroperitoneal e mesentérico) que foram extraídos e pesados na eutanásia dos animais. Em nenhuma análise foi observada uma diferença significativa entre os grupos.

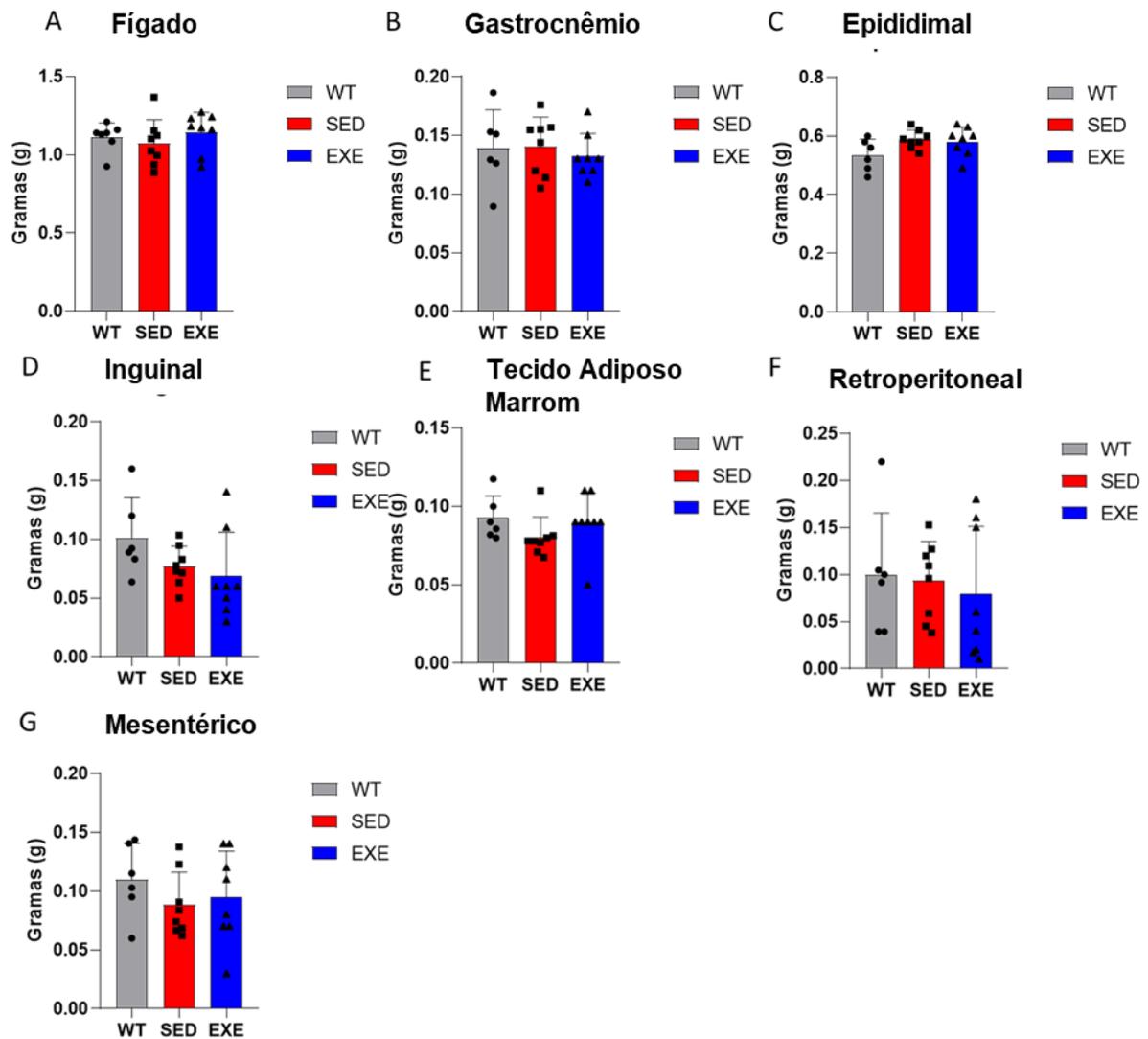


Figura 7. Peso de diferentes tecidos estudados dos animais.

Dados representados como a média e desvio padrão da média. Os resultados foram obtidos através da realização do teste de Anova one-way entre os diferentes os diferentes grupos experimentais (n=8): Wild-type (WT), *Slc2a4*^{+/-} sedentários (SED) e *Slc2a4*^{+/-} exercitados (EXE).

Exercício físico reduz glicemia de jejum e aumenta tolerância a glicose

Através do Teste de Tolerância à Glicose por via intraperitoneal (TTGip), verificamos que houve diferença significativa entre o grupo de animais *Slc2a4*^{+/-} sedentários (n=8) quando comparado ao grupo de animais *Slc2a4*^{+/-} exercitados (n=8) (Figura 8A, $p < 0.0001$) e o grupo Wild Type (n=7) (Figura 8A, $p < 0.0001$) com 30 minutos após o estímulo de glicose através de injeção intraperitoneal, quando o nível de glicemia sanguínea dos animais sedentários foi superior em relação aos outros grupos. Também houve

essa diferença após 60 minutos da aplicação da injeção intraperitoneal de glicose entre os grupos sedentário e exercício ($p=0.0003$) e sedentário e controle ($p=0.0369$) (Figura 8A). Após 120 minutos, mais uma vez medimos os níveis de glicemia dos animais e não foi apresentada diferença significativa entre os grupos (Figura 8A).

Por meio do TTGip, o exercício físico foi capaz de atenuar a intolerância a glicose quando comparados aos animais *Slc2a4^{+/-}* sedentários (Figura 8B, $p=0.0300$). Também houve diferença estatística quando comparados os animais do grupo sedentário com o grupo controle (Figura 8B, $p=0.0103$), apontando que o grupo sedentário apresentou intolerância a glicose significativamente maior que o grupo controle.

Foi possível observar que os animais *Slc2a4^{+/-}* apresentaram uma diferença significativa na glicemia de jejum quando comparados ao grupo controle, apontando hiperglicemia (Figura 8C, $p<0.0001$). Também foi possível verificar através das análises que o grupo de animais que realizou o protocolo de exercício físico teve uma diminuição significativa da glicemia de jejum quando comparado ao grupo de animais sedentários (Figura 8C, $p=0.0002$) e quando comparados ao grupo controle (Figura 8C, $p<0.0001$), o que pode indicar que o protocolo de treinamento foi capaz de reduzir os níveis de glicemia de jejum dos animais submetidos ao treinamento.

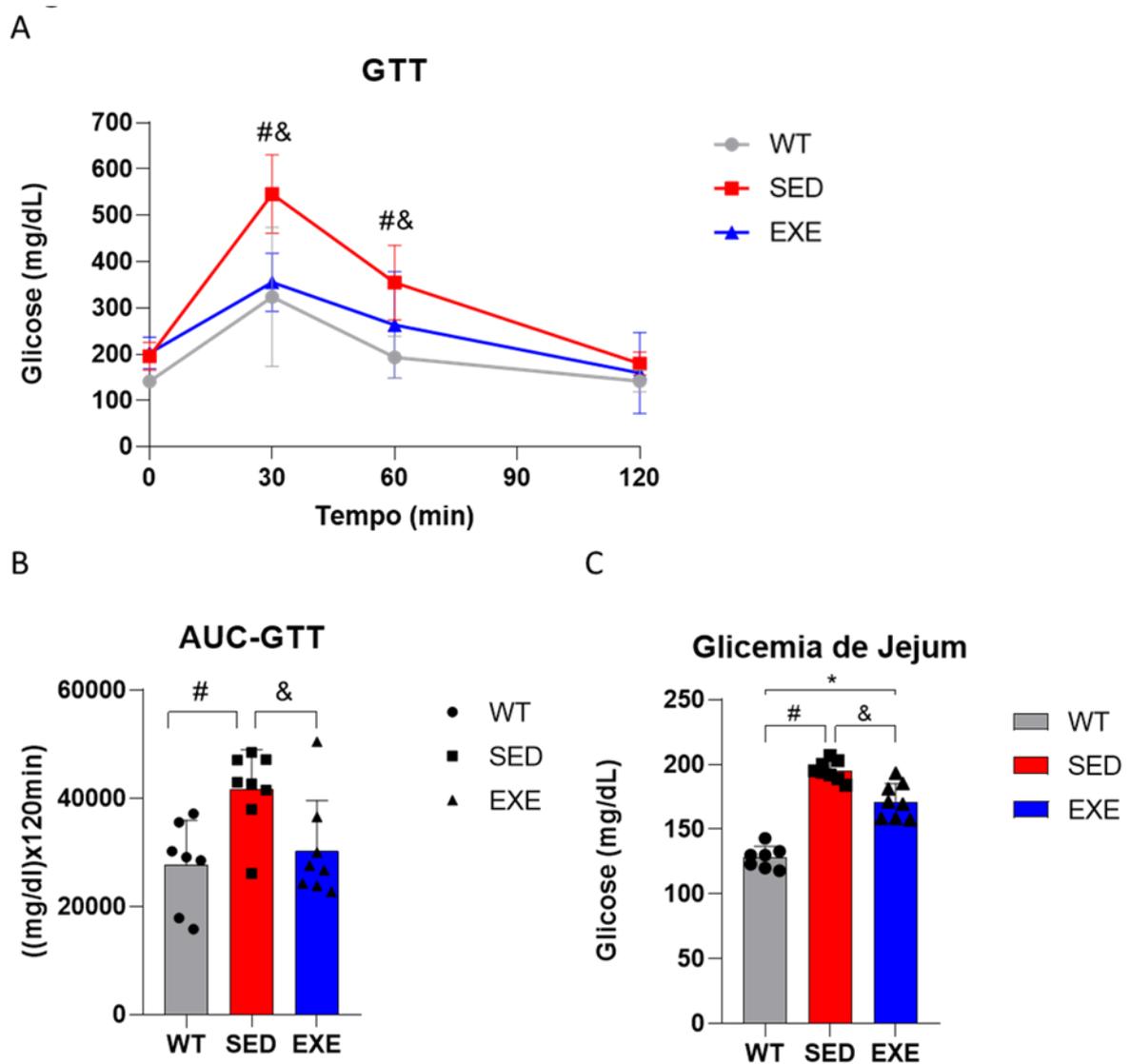


Figura 8. Homeostase da glicose nos animais estudados.

A) Teste de Tolerância à Glicose dos animais. B) Área sobre a curva do Teste de Tolerância à Glicose dos animais. C) Glicemia de Jejum dos animais. Dados representados como a média e desvio padrão da média. Os resultados foram obtidos através da realização de Anova one-way entre os diferentes grupos experimentais (n=8). A) Tempo 30 = # WT vs SED = $p < 0.0001$ e & SED vs EXE = $p < 0.0001$. Tempo 60 = # WT vs SED = $p < 0.05$ e & SED vs EXE = $p < 0.05$. B) # WT vs SED = $p < 0.05$ e & SED vs EXE = $p < 0.05$. C) # WT vs SED = $p < 0.0001$, & SED vs EXE = $p < 0.0001$ e * WT vs EXE = $p < 0.05$.

Exercício Físico aumenta a sensibilidade à Insulina corporal

Através do Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal (TTIip) verificamos que houve diferença significativa entre os animais *Slc2a4*^{+/-} sedentários (SED) e os animais *Slc2a4*^{+/-} exercitados

(EXE). Essa diferença foi apontada após 10 minutos da aplicação da injeção intraperitoneal de insulina (Figura 9A, $p=0.0181$), indicando que o exercício físico melhorou a tolerância à insulina dos animais que foram submetidos ao treinamento. Além disso, os animais *Slc2a4*^{+/-} sedentários (SED) e exercitados (EXE) apresentavam uma baixa tolerância à insulina em comparação aos animais Wild Type, os resultados apontaram uma diferença estatística entre os grupos após 10 minutos da aplicação da injeção intraperitoneal (Figura 9A, $p<0.0001$) e após 15 minutos (Figura 9A, $p=0.0050$). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos nos demais tempos verificados (Figura 9A).

Na análise de Área sobre a Curva do TTIip (AUC-ITT), foi visto que o grupo de animais *Slc2a4*^{+/-} sedentários (SED) durante o experimento apresentaram diferenças significativas em comparação ao grupo controle ($p=0.0035$) e ao grupo exercitado ($p=0.0247$) (Figura 9B). O grupo de animais *Slc2a4*^{+/-} exercitados (EXE) que foi submetido ao protocolo de treinamento físico não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle (Figura 9B), indicando mais uma vez que o treinamento foi capaz de aumentar a sensibilidade à insulina chegando a níveis próximos de animais Wild Type sem o genótipo de ablação de GLUT-4 no tecido muscular.

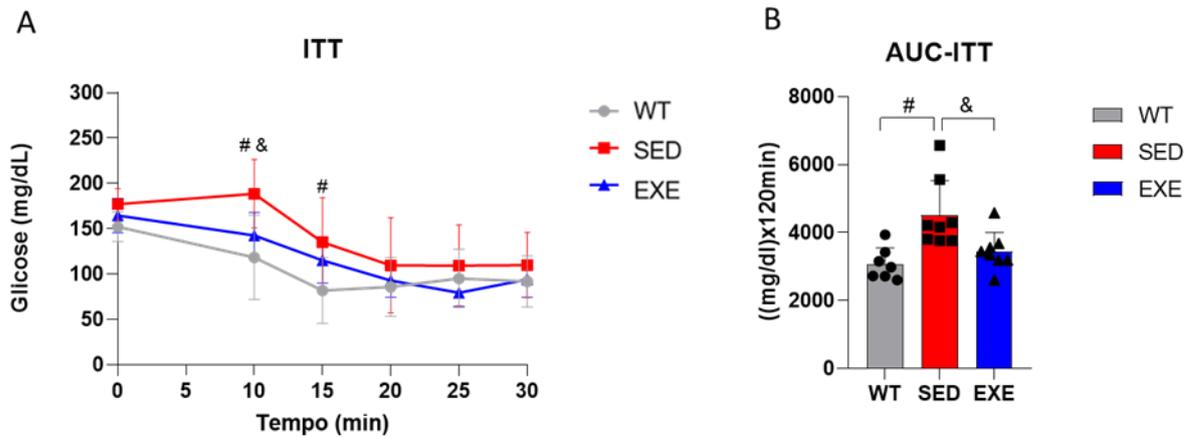


Figura 9. Responsividade à insulina corporal dos animais.

A) Teste de Tolerância à Insulina dos animais. B) Área sobre a Curva do Teste de Tolerância à Insulina dos animais. Dados representados como a média e desvio padrão da média. Os resultados foram obtidos através da realização de Anova one-way entre os diferentes os diferentes grupos experimentais ($n=8$). A) Tempo 10 = # WT vs SED = $p < 0.0001$ e & SED vs EXE = $p < 0.05$. Tempo 15 = # WT vs SED = $p < 0.05$. B) # WT vs SED = $p < 0.05$ e & SED vs EXE = $p < 0.05$.

Exercício Físico modula o conteúdo de proteínas relacionada a via de sinalização de atrofia do músculo esquelético

Através das análises de Immunoblotting verificamos que nosso protocolo de treinamento físico foi capaz de modular a proteína KLF-15, que tem importante relação como o processo de atrofiamento do músculo esquelético. Os resultados apontam que o conteúdo proteico de KLF15 foi inferior nos animais *Slc2a4*^{+/-} exercitados (EXE) em relação aos animais *Slc2a4*^{+/-} sedentários (SED) (Figura 10A, $p=0.0380$). Ao mesmo tempo, a quantidade de conteúdo de WWP1, responsável pela degradação de KLF15, por sua vez, não apresentou um aumento significativo em seu conteúdo. (Figura 10B). Em relação ao conteúdo das demais proteínas relacionadas à atrofia muscular não foram verificadas diferenças estatísticas (Figuras 10C, 10D, 10E e 10F).

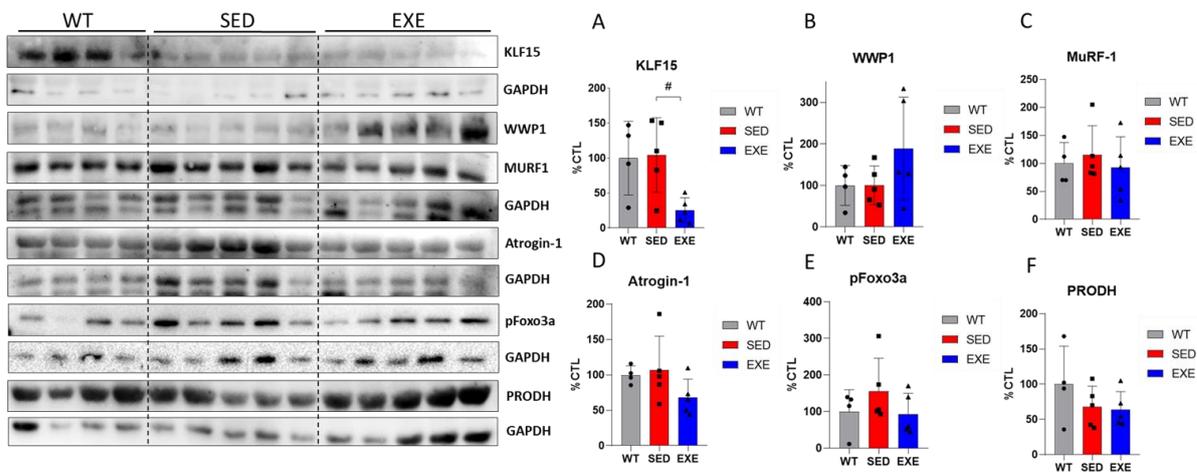


Figura 10. Conteúdo de KLF-15 e via de atrofia no músculo esquelético dos camundongos. Foi realizado o Immunoblotting para quantificação de proteínas dos tecidos extraídos dos animais. A, KLF-15; B, WWP1; C, MURF-1; D, ATROGIN; E, Pfoxo3A; F, PRODH. Como controle endógeno foi utilizado o GAPDH. Resultados representam a razão entre a proteína de interesse pelo seu controle endógeno. Dados representados como a média e desvio padrão da média. Os resultados foram obtidos através da realização de Anova one-way entre os diferentes os diferentes grupos experimentais (n=8). A) KLF15 # vs SED = $p < 0.05$.

Por fim, foi realizado a injeção intraperitoneal de puromicina, a fim de verificar a síntese proteica nos diferentes grupos experimentais. Os resultados obtidos não evidenciaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 11B).

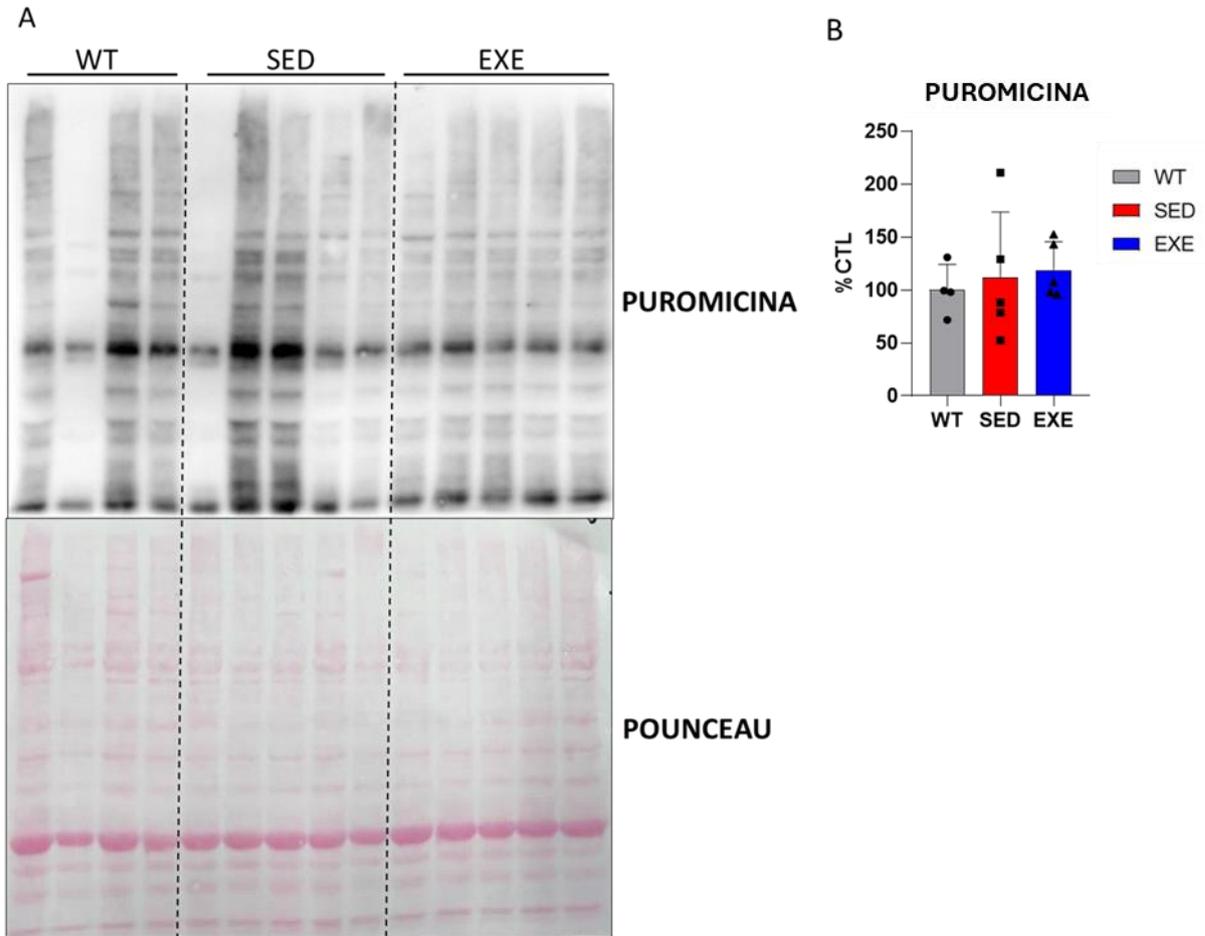


Figura 12. Análise da Puromicina no músculo esquelético dos camundongos. Foi realizado o Immunoblotting para quantificação de proteínas dos tecidos extraídos dos animais. Dados representados como a média e desvio padrão da média. Os resultados foram obtidos através da realização de Anova one-way entre os diferentes os diferentes grupos experimentais (n=8).

DISCUSSÃO

O músculo esquelético é fundamental para a regulação da homeostase glicêmica, sendo responsável pela captação e metabolismo da glicose durante o repouso e o exercício físico (98, 106). A captação de glicose pelo músculo esquelético é mediada principalmente pelo GLUT-4, expresso na membrana plasmática das células musculares (107). A ativação de vias de sinalização, como a via da insulina, estimula a translocação de GLUT-4 para a membrana celular, aumentando assim a captação de glicose (98). Defeitos na sensibilidade à insulina do músculo esquelético são evidenciados em indivíduos que desenvolvem distúrbios metabólicos como o DM2 muito antes do seu diagnóstico, acarretando prejuízos importantes à saúde metabólica (106, 108).

A modulação dos níveis circulantes de insulina promove efeitos positivos na prevenção de distúrbios metabólicos ao melhorar a função do músculo na regulação da glicemia (98, 106). Estratégias baseadas em exercício físico, incluindo o treinamento resistido, podem representar uma abordagem eficaz na melhoria da sensibilidade à insulina e o aumento da expressão de GLUT-4, o que contribui para uma melhor regulação da glicemia (98, 106, 108).

O treinamento resistido é uma modalidade de exercício que envolve a contração muscular contra uma resistência externa e reconhecido por seus efeitos positivos no aumento de força e função muscular, hipertrofia muscular e melhoria da saúde metabólica (19, 109, 110). Estudos demonstraram que o treinamento resistido reduz os níveis de glicose no sangue, melhora a sensibilidade à insulina e promove adaptações musculares que ajudam a controlar a glicemia (19, 32-35, 106). Nesse cenário, a investigação de protocolos de treinamento resistido em condições de hiperinsulinemia e hiperglicemia pode fornecer novas estratégias de tratamentos não farmacológicos para indivíduos com distúrbios metabólicos. Nesse estudo, o protocolo de treinamento resistido de curto prazo controlou os níveis elevados de glicose, levando a uma melhora na sensibilidade à insulina e na tolerância à glicose, bem como gerou impactos positivos sobre a força e função muscular e preservação da massa muscular dos animais.

O protocolo de exercício resistido de curto prazo gerou um aumento significativo na força de preensão (handgrip) dos animais *Slc2a4^{+/-}* exercitados após o período de treinamento físico em comparação ao período pré-treinamento. Além disso, houve melhora no desempenho no teste de Máxima Carga Voluntária de Carregamento (MVCC) nos camundongos exercitados após o protocolo de treinamento comparado ao período prévio ao protocolo de exercício (Figura 4). Os resultados sugerem que o treinamento físico foi capaz de gerar adaptações moleculares que induziram uma melhora nos testes de força realizados no estudo. Estudos anteriores em camundongos demonstraram que o treinamento resistido pode induzir aumentos significativos na força muscular (111, 112). Os mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento da força muscular induzido pelo exercício resistido são complexos e envolvem uma série de vias de sinalização intracelular (78-81), como a via da mTOR, responsável pelo aumento da síntese proteica (79), e a via do NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), envolvido na regulação da resposta inflamatória e na adaptação muscular ao estresse mecânico (112).

O estudo de Muñoz, V.R., Botezelli, J.D., Gaspar, R.C. *et al.* (2023) corrobora com os achados de nossa pesquisa. Os resultados do estudo mostraram que o treinamento resistido de curto prazo induziu a um melhor desempenho no teste de força de preensão (handgrip) e capacidade de carga voluntária máxima (MVCC) após o protocolo de exercício físico em comparação ao teste pré-protocolo, utilizando um modelo animal e protocolo de treinamento resistido semelhante ao presente estudo.

O camundongo *Slc2a4*^{+/-} apresenta aumento na glicemia e insulinemia basal, no entanto, sem apresentar alterações no peso ou composição corporal (adiposidade). Ademais, estes animais desenvolvem tais características entre 180-240 dias de vida, o que isola efeitos do desenvolvimento corpóreo e flutuações hormonais presentes em animais mais jovens (20). Os resultados obtidos do presente estudo confirmam esse fenótipo. Os animais foram submetidos a avaliações semanais de peso corporal antes e durante o protocolo de treinamento físico. Os resultados indicam que os animais submetidos ao exercício resistido apresentaram uma redução no ganho de peso ao longo do tempo. Além disso, ao comparar o peso inicial e final dos animais treinados, foi observada uma diferença significativa no delta de peso em comparação com o grupo controle (WT), conforme demonstrado na Figura 5B.

Avaliamos a relação entre o comprimento corporal e a circunferência abdominal dos camundongos utilizando o índice de Lee. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de animais. Além disso, não foram encontradas disparidades estatisticamente significantes na massa dos tecidos coletados durante a eutanásia entre os grupos de camundongos. Esses achados indicam que a intervenção com exercício físico foi avaliada independentemente de variações no peso corporal e na idade dos animais.

Por se tratar de um modelo em que há redução no conteúdo de GLUT-4 no músculo esquelético, isso nos permite avaliar diretamente os efeitos a curto prazo do exercício resistido sobre a glicemia dos camundongos. Após medir a glicemia de jejum dos camundongos Wild-type (WT) e dos camundongos *Slc2a4*^{+/-}, confirmamos que os animais geneticamente modificados com ablação do gene GLUT4 apresentavam hiperglicemia. Após a confirmação do fenótipo, dividimos os camundongos *Slc2a4*^{+/-} em dois grupos, sendo eles: exercitados (EXE), que foram submetidos ao treinamento físico de curta duração; e sedentários (SED), que não realizaram o protocolo de exercício físico.

Em nossos resultados observamos que o grupo submetido ao exercício apresentou níveis de glicemia de jejum superiores em comparação ao grupo controle (WT), conforme ilustrado na Figura 8C. Essa observação pode ser atribuída, inicialmente, à redução do conteúdo de GLUT-4 no músculo esquelético dos camundongos exercitados, o que pode comprometer o transporte de glicose para dentro das células musculares, resultando em níveis elevados de glicose na corrente sanguínea. Além disso, o curto período de exercício físico pode não ter sido suficientemente longo para induzir adaptações metabólicas capazes de normalizar a glicemia de jejum ao nível observado no grupo controle. No entanto, verificamos que o protocolo de treinamento físico resistido produziu efeitos significativos a curto prazo na redução da glicemia de jejum nos animais exercitados em comparação aos animais sedentários. Embora o protocolo de treinamento não tenha sido suficiente para normalizar os níveis de glicemia de jejum ao nível dos animais controle, evidenciou-se uma capacidade de modular a atividade

glicêmica e reduzir os níveis de glicemia em jejum, superando a condição metabólica dos animais *Slc2a4^{+/-}*.

Ainda sobre nossos resultados fisiológicos, foi visto que o protocolo de treinamento físico pode ter colaborado com o aumento da tolerância à glicose e aumento da sensibilidade à insulina dos camundongos submetidos ao treinamento resistido, conforme ilustrado nas Figuras 8A e 9A. O exercício físico possui potenciais efeitos positivos na homeostase glicêmica e em melhorias na sensibilidade à insulina. No estudo de Pereira et al (2019), animais obesos foram submetidos a um treinamento de força muito semelhante ao da nossa pesquisa e apresentaram melhora na condição glicêmica e da sensibilidade à insulina, o que corrobora com nossa investigação.

Estes resultados podem ser explicados pela regulação do gene GLUT-4 pelo exercício físico. A captação de glicose no músculo esquelético é essencial para manter a homeostase da glicose no sangue e acredita-se que a diminuição no transporte seja um importante elemento da causa da hiperglicemia. Diversos estudos já demonstraram que o treinamento físico aumenta a quantidade total de GLUT-4 no músculo esquelético em roedores (55, 60, 62, 63) e humanos (26, 59, 61, 104). Esses dados sugerem que os camundongos exercitados podem ter aumentado o conteúdo de GLUT-4 no músculo esquelético e assim melhorado a captação de glicose no sangue em resposta ao exercício.

O estudo de GallagherPhilip et. al. (2013) investigou os efeitos de uma única sessão de exercício resistido na expressão de GLUT-4 específica para tipos de fibras musculares e na expressão do receptor de IGF-1 em indivíduos saudáveis. Os participantes foram submetidos a uma sessão de exercício resistido que consistia em 3 séries (2 séries de 10 repetições e 1 série até a falha, entre 8 a 12 repetições) de extensão de joelho e amostras de músculo foram coletadas antes e após o exercício para análise. Os resultados mostraram que houve um aumento significativo na expressão de GLUT4 nas fibras musculares de contração lenta (tipo I) após o exercício resistido. No entanto, não foram observadas mudanças na expressão de GLUT4 nas fibras de contração rápida (tipo II). Além disso, não houve alterações significativas na expressão do receptor de IGF-1 após o exercício resistido. Esses achados sugerem que uma única sessão aguda de exercício resistido pode aumentar a expressão de GLUT4 em fibras musculares de contração lenta, potencialmente melhorando a captação de glicose nesses tipos de fibras.

Corroborando com esse estudo, Kido et. al. (2016) investigou os efeitos do exercício resistido agudo na expressão do IGF-1 e na translocação do GLUT4 em músculos esqueléticos de roedores. Os pesquisadores realizaram uma única sessão de exercício resistido que consistia em estimulação por eletrodos no músculo tríceps sural e estimulação isométrica com 5 séries de 10 contrações de 3 segundos no músculo gastrocnêmio. Este protocolo de exercício é amplamente utilizado como modelo de exercício resistido em animais (Ogasawara et al. 2013a, b, 2014; Tsutaki et al. 2013; Kido et al. 2015).

Os resultados demonstraram um aumento significativo na expressão de IGF-1 e na translocação de GLUT4 para a membrana celular em resposta ao exercício resistido. Especificamente, a expressão de IGF-1 aumentou imediatamente após o exercício, enquanto a translocação de GLUT4 para a membrana celular ocorreu após um curto período de tempo, sugerindo uma resposta aguda ao exercício.

Recentemente, Muñoz, V.R., Botezelli, J.D., Gaspar, R.C. et al. (2023) investigaram os efeitos do exercício de resistência e de força de curto prazo na regulação molecular do músculo esquelético em camundongos com hiperinsulinemia e hiperglicemia, especificamente camundongos com uma mutação no gene *Slc2a4*. O protocolo de treinamento físico de resistência foi realizado em uma esteira durante 7 dias e o treinamento de força em uma escada de escalada para roedores, consistindo em cada animal realizar 20 subidas com 70% da sua máxima carga voluntária de carregamento durante 7 dias. Os resultados do estudo mostraram que o exercício de resistência e de força de curto prazo induziu mudanças significativas na expressão de genes relacionados ao metabolismo e à função muscular nos camundongos. Além disso, o exercício teve efeitos diferentes na expressão de genes em camundongos com hiperinsulinemia e hiperglicemia em comparação com os controles saudáveis. Ambos os modelos de exercício de curto prazo melhoraram eficientemente a homeostase glicêmica e superaram os desafios metabólicos dos camundongos *Slc2a4*^{+/-}, revelando-se uma forma de mitigar os impactos da hiperglicemia e hiperinsulinemia que precedem o aparecimento da diabetes.

Assim, podemos seguir para outro ponto importante da nossa investigação, a atrofia muscular esquelética promovida pela hiperglicemia. O estudo de Hirata et al (2019), sugere que o atrofiamento da massa muscular esquelética pode estar relacionado a hiperglicemia pela via KLF15/WWP1. Camundongos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) apresentaram hiperglicemia acentuada acompanhada de hipoinsulinemia, bem como uma perda de massa corporal e massa muscular esquelética e um curto período. Ademais, a abundância de KLF15 e genes relacionados à atrofia muscular como *Atrogin-1*, *Murfl*, *Foxo3a*, *Prodh* e *Tdo2* aumentou significativamente no músculo esquelético dos camundongos tratados com STZ.

Nossas análises moleculares utilizando Immunoblotting revelaram que o conteúdo de KLF15 no músculo esquelético dos camundongos exercitados estava significativamente reduzido em comparação com os grupos sedentário e Wild Type (WT), conforme ilustrado na Figura 11A. No entanto, observamos que não houve diferença na quantidade de WWP1 no músculo esquelético dos camundongos exercitados em relação aos outros dois grupos de animais, assim como os demais genes associados a atrofia do músculo esquelético, como demonstrado na Figura 11B. Nossos achados indicam que o protocolo de exercício físico empregado em nosso estudo foi eficaz na regulação da glicemia, resultando em redução da expressão de KLF15 no músculo esquelético dos camundongos. No entanto,

ao analisarmos as proteínas associadas à atrofia muscular, não observamos diferenças significativas entre os grupos investigados.

Cabe destacar que no estudo de Hirata et al (2019), o modelo experimental de diabetes inclui a administração estreptozotocina, que conhecidamente induz lesões e morte da célula beta com elevação expressiva da glicemia. Nosso modelo experimental foi conduzido com camundongos *Slc2a4^{+/-}* que apresentam 50% de redução da expressão de GLUT-4, com aumento da glicemia que não é tão acentuada se comparada ao modelo de administração estreptozotocina. Portanto, talvez essa seja uma condição de hiperglicemia que não é suficiente ainda ou demore um tempo maior para induzir impactos negativos sobre a massa muscular, conduzindo a atrofia do músculo. No entanto, vale destacar que o exercício físico resistido adotado em nosso estudo foi capaz de diminuir os níveis de KLF15, o que pode ter um efeito protetor a longo prazo sobre a massa muscular dos camundongos.

Em relação as demais proteínas da via de atrofia que não foram alteradas no presente estudo, aqui novamente, pode-se considerar que nosso modelo experimental não foi suficiente para induzir alterações na glicemia e, portanto, na sinalização dessas proteínas no músculo esquelético. Aqui temos que mencionar uma limitação do nosso estudo, já que não conseguimos realizar a análise histológica e da secção transversa do músculo esquelético o que permitiria avaliar diretamente se houve algum impacto sobre a musculatura esquelética, especialmente de atrofia. Outro ponto que merece destaque, é que nosso estudo foi realizado com um protocolo de treinamento físico resistido de curto período e, portanto, insuficiente para indução de efeitos hipertróficos significativos.

Em relação à análise de síntese proteica, realizada através da injeção intraperitoneal de puromicina antes da extração tecidual, não foi encontrado uma diferença significativa entre os animais treinados e não treinados (Figura 12), bem como o peso total dos tecidos extraídos na eutanásia não apresentaram diferença entre os grupos (Figura 7). Isso sugere dois possíveis cenários. O primeiro é que a duração do protocolo de treinamento físico, embora possa ter relação aos resultados obtidos no controle glicêmico, sensibilidade insulínica e modulação do conteúdo proteico relacionados a atrofia muscular promovida por hiperglicemia, não foi o suficiente para estimular alguma sinalização de hipertrofia muscular e diminuição de adiposidade em resposta ao treinamento. Outro possível cenário é que o treinamento de força realizado na pesquisa, embora não tenha promovido um aumento significativo na síntese de proteínas e redução dos tecidos adiposos, possa ter estabilizado uma condição atrófica na massa muscular esquelética dos animais, tendo em vista que a glicemia dos camundongos exercitados foi reduzida e as principais proteínas com ligação à atrofia muscular tiveram suas atividades reguladas em um curto período.

De qualquer forma, os resultados obtidos na pesquisa são promissores e sugerem uma maior investigação sobre os efeitos do treinamento resistido no controle da homeostase glicêmica em modelos

de diabetes tipo II a fim de atenuar um possível processo de perda de massa muscular induzida pela hiperglicemia.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que o exercício físico resistido de curto prazo foi eficaz na melhoria da homeostase glicêmica e na redução do conteúdo de KLF15 no músculo esquelético de camundongos *Slc2a4*^{+/-}. No entanto, não observamos alterações significativas no conteúdo de proteínas associadas à via de atrofia muscular. Esses achados sugerem que o exercício resistido pode ter efeitos positivos na regulação da glicemia e na modulação da expressão de fatores de transcrição relacionados, como KLF15, mas não parece afetar diretamente as proteínas envolvidas na atrofia muscular em camundongos com a deficiência do gene *Slc2a4*. Essas descobertas destacam a importância do exercício físico resistido como uma estratégia terapêutica para melhorar a saúde metabólica, apesar de sua influência limitada sobre a via de atrofia muscular em condições específicas em camundongos *Slc2a4*^{+/-}.

REFERÊNCIAS

1. Reid, K.F. & Fielding, R.A. Skeletal muscle power: a critical determinant of physical functioning in older adults. *Exerc Sport Sci Rev*; 2012. 40, 4–12.
2. Hoppeler H. & Fluck M. Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. *J. Exp. Biol.* 2002; 205:2143–2152.
3. Tournadre A. et. al. Sarcopenia. *Joint Bone Spine.* 2019;86:309–314.
4. Newman A.B. et. al. Strength, but not muscle mass, is associated with mortality in the health, aging and body composition study cohort. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2006;61:72–77.
5. Dhillon R.J. & Hasni S. Pathogenesis and Management of Sarcopenia. *Clin. Geriatr. Med.* 2017;33:17–26.
6. Burd N.A. et. al. Anabolic resistance of muscle protein synthesis with aging. *Exerc Sport Sci Rev.* 2013;41(3):169-73.
7. Zhuang Z.H. et. al. Research progress on the roles of Krüppel-like factors in muscle tissues. 2018;20;40(9):733-748.
8. Mccnonnel B. B. & Yang V. W. Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol. Rev.* 2010; 90.1337-1381.
9. Hirata Y. et al. Hyperglycemia induces skeletal muscle atrophy via a WWP1/KLF15 axis. *JCI Insight.* 2019;4(4):e124952.
10. Shimizu N. et al. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab.* 2011;13(2):170–182.
11. Lecker S.H. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 2004;18: 39-51.
12. Bodine S.C. et. al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 2001;294(5547):1704-1708.
13. Yoon J.W. et. al. Hyperglycemia is associated with impaired muscle quality in older men with diabetes: The Korean Longitudinal Study on Health and Aging. *Diabetes Metab J.* 2016;40(2):140–146.
14. Hoffman E.P. & Nader G.A. Balancing muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Med.* 2004;10(6):584-5.
15. Muñoz V.R, et. al. Rho-kinase activity is upregulated in the skeletal muscle of aged exercised rats. *Exp Gerontol.* 2019;17:110746.

16. Muñoz V.R. et. al. Exercise increases Rho-kinase activity and insulin signaling in skeletal muscle. *J Cell Physiol.* 2018;233(6):4791-4800.
17. Augustin R. IUBMB Life. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. 2010;62(5):315-33.
18. Gaster M. et. al. GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes.* 2001;50(6):1324–9.
19. Holten M.K. et. al. Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004;53(2):294-305.
20. Stenbit A.E. et. al. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med.* 1997;3(10):1096–101.
21. Tsao T.S. et. al. Prevention of insulin resistance and diabetes in mice heterozygous for GLUT4 ablation by transgenic complementation of GLUT4 in skeletal muscle. *Diabetes.* 1999;48(4):775-82.
22. Carvalho E. et. al. Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289(4):E551-61.
23. Neshler R. et. al. Karl IE, Kipnis DM. Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol.* 1985;249(3 Pt 1):C226-32.
24. Zorzano A. et. al. Additive effects of prior exercise and insulin on glucose and AIB uptake by rat muscle. *Am J Physiol.* 1986;251(1 Pt 1):E21-6.
25. Ren J.M. et. al. Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14396– 401.
26. Stanford K.I. & Goodyear L.J. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. *Adv Physiol Educ.* 2014;38(4):308–14.
27. Jessen N, & Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2005;99(1):330–7.
28. Jørgensen S.B. et. al. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J Physiol.* 2006;574(Pt 1):17–31.
29. Holmes B. & Dohm G.L. Regulation of GLUT4 gene expression during exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(7):1202–6.
30. Rose A.J. & Hargreaves M. Exercise increases Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II activity in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2003;553(Pt 1):303–9.

31. Botezelli J.D. et. al. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. *Diabetol Metab Syndr*. 2011; 19;3:35.
32. Botezelli J.D. et. al. Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. *Sci Rep*. 2016;6:31106.
33. Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol*. 1984;56(4):831–8.
34. Cauza E. et. al. The Relative Benefits of Endurance and Strength Training on the Metabolic Factors and Muscle Function of People With Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005;86(8):1527–33.
35. Borst, S.E. 2004. Interventions for sarcopenia and muscle weakness in older people. *Age Ageing*. 2004; 33, 548–555.
36. Attie, K.M. et. al. A single ascending-dose study of muscle regulator ACE-031 in healthy volunteers. *Muscle Nerve*; 2013;47, 416–423.
37. Dobs, A.S. et. al. Effects of enobosarm on muscle wasting and physical function in patients with cancer: a double-blind, randomised controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2013;14, 335–345.
38. Dalton, J.T. et. al. The selective androgen receptor modulator GTx-024 (enobosarm) improves lean body mass and physical function in healthy elderly men and postmenopausal women: results of a double-blind, placebo-controlled phase II trial. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011;2, 153–161.
39. Narayanan, R. et. al. Selective androgen receptor modulators in preclinical and clinical development. *Nucl Recept Signal*. 2008;6, e010.
40. Fiatarone, M. & O’Neill, E. Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med*. 1994; 330, 1769–1775.
41. Frajacom F.T. et. al. Aerobic Training Activates Interleukin 10 for Colon Anticarcinogenic Effects. *Med Sci Sports Exerc*. 2015;47(9):1806-13.
42. Pereira R.M. et. al. Short-term strength training reduces gluconeogenesis and NAFLD in obese mice. *J Endocrinol*. 2019;1;241(1):59-70.
43. Cassilhas R.C. et. al. Animal model for progressive resistance exercise: a detailed description of model and its implications for basic research in exercise. *Motriz: Revista de Educação Física*. 2013;19 178–184.
44. Hornberger T.A & Farrar R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian Journal of Applied Physiology*. 2004; 29 16–31.

45. Speretta G.F. et. al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. *Life Sciences*, 2016;146 154–162.
46. da Rocha A.L. et. al. Downhill Running Excessive Training Inhibits Hypertrophy in Mice Skeletal Muscles with Different Fiber Type Composition. *J Cell Physiol*. 2016;231(5):1045-56.
47. Goodman C. A. et. al. Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique. *FASEB J*. 2011; 25: 1028 –1039.
48. Schmidt E. K. et. al. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat. Methods*; 2009; 6, 275–277.
49. Nathans D. Puromycin inhibition of protein synthesis: incorporation of puromycin into peptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1964; 51, 585–592.
50. Mehran A.E. et. al. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab*. 2012;16(6):723-37.
51. Mekary R.A. et. al. Weight training, aerobic physical activities, and long-term waist circumference change in men. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(2):461-7.
52. Botezelli J.D. et. al. Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. *Sci Rep*. 2016; 4;6:31106.
53. Gray S, Wang B, Orihuela Y, Hong EG, Fisch S, Haldar S, Cline GW, Kim JK, Peroni OD, Kahn BB, Jain MK. Regulation of gluconeogenesis by Krüppel-like factor 15. *Cell Metab*. 2007 Apr;5(4):305-12. doi: 10.1016/j.cmet.2007.03.002. PMID: 17403374; PMCID: PMC1892530.
54. Jeyaraj D, Scheer FA, Ripperger JA, Haldar SM, Lu Y, Prosdocimo DA, Eapen SJ, Eapen BL, Cui Y, Mahabeleshwar GH, Lee HG, Smith MA, Casadesus G, Mintz EM, Sun H, Wang Y, Ramsey KM, Bass J, Shea SA, Albrecht U, Jain MK. Klf15 orchestrates circadian nitrogen homeostasis. *Cell Metab*. 2012 Mar 7;15(3):311-23. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.020. PMID: 22405069; PMCID: PMC3299986.
55. Stenbit, A., Tsao, TS., Li, J. et al. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* 3, 1096–1101 (1997). <https://doi.org/10.1038/nm1097-1096>
56. Hong Sun, Pouya Saeedi, Suvi Karuranga, Moritz Pinkepank, et al. IDF diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 Diabetes Research and Clinical Practice (2021), 10.1016/J.DIABRES.2021.109119
57. Rolo, A. P.; Palmeira, C. M. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol 212, issue 2, 15 April 2006, pages 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.01.003>

58. Ueda-Wakagi M, Nagayasu H, Yamashita Y, Ashida H. Green Tea Ameliorates Hyperglycemia by Promoting the Translocation of Glucose Transporter 4 in the Skeletal Muscle of Diabetic Rodents. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(10):2436. <https://doi.org/10.3390/ijms20102436>
59. Dela, F., T. Ploug, A. Handberg, et al. Physical training increases muscle GLUT4 protein and mRNA in patients with NIDDM. *Diabetes* 43:862–865, 1994.
60. Friedman, J. E., W. M. Sherman, M. J. Reed, C. W. Elton, and G. L. Dohm. Exercise training increases glucose transporter protein GLUT-4 in skeletal muscle of obese Zucker (fa/fa) rats. *FEBS Lett*. 268:13–16, 1990.
61. Houmard, J. A., M. H. Shinebarger, P. L. Dolan, et al. Exercise training increases GLUT-4 protein concentration in previously sedentary middle-aged men. *Am. J. Physiol*. 264:E896–E901, 1993.
62. Rodnick, K. J., E. J. Henriksen, D. E. James, and J. O. Holloszy. Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles. *Am. J. Physiol*. 262:C9–C14, 1992.
63. Rodnick, K. J., J. O. Holloszy, C. E. Mondon, and D. E. James. Effects of exercise training on insulin-regulatable glucose-transporter protein levels in rat skeletal muscle. *Diabetes* 39:1425–1429, 1990.
64. Flores-Opazo, Marcelo; McGee, Sean L.; Hargreaves, Mark. Exercise and GLUT4. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 48(3):p 110-118, July 2020. | DOI: 10.1249/JES.0000000000000224Huang, S. and Czech, M. P. (2007) The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab*. 5, 237–252.
65. Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., Doege, H., James, D. E., Lodish, H. F., Moley, K. H., Moley, J. F., Mueckler, M., Rogers, S., Schurmann, A., Seino, S., and Thorens, B. (2002) Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 282, E974–E976.
66. Leney, S. E. and Tavaré, J. M. (2009) The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets. *J. Endocrinol*. 203, 1–18.
67. Semiz S, Park JG, Nicoloro SM, Furcinitti P, Zhang C, Chawla A, Leszyk J & Czech MP 2003 Conventional kinesin KIF5B mediates insulin-stimulated GLUT4 movements on microtubules. *EMBO Journal* 22 2387–2399.
68. Pereira, R. M., Moura, L. P. de ., Muñoz, V. R., Silva, A. S. R. da ., Gaspar, R. S., Ropelle, E. R., & Pauli, J. R.. (2017). Molecular mechanisms of glucose uptake in skeletal muscle at rest and in response to exercise. *Motriz: Revista De Educação Física*, 23(spe), e101609. <https://doi.org/10.1590/S1980-6574201700SI0004>

69. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders 1. *Nature*. 2006;444(1476-4687):860-7.
70. Fam, BC; Rose, LJ; Sgambellone, R; Ruan, Z; Proietto, J; Andrikopoulos, S. Normal muscle glucose uptake in mice deficient in muscle GLUT4. *Journal of Endocrinology*. 214, 313-321. 0022-0795/12/0214-313. Society for Endocrinology, 2012.
71. Wang TN, Hu XG, Chen GX. Uses of knockout, knockdown, and transgenic models in the studies of glucose transporter 4. *World J Meta-Anal* 2022; 10(1): 1-11 [DOI: 10.13105/wjma.v10.i1.1]
72. Margarita Beckerman et al. ,GLUT4-overexpressing engineered muscle constructs as a therapeutic platform to normalize glycemia in diabetic mice.*Sci. Adv.*7,eabg3947(2021).DOI:10.1126/sciadv.abg3947
73. Wang T, Feng X, Zhou J, Gong H, Xia S, Wei Q, Hu X, Tao R, Li L, Qian F, Yu L. Type 2 diabetes mellitus is associated with increased risks of sarcopenia and pre-sarcopenia in Chinese elderly. *Sci Rep*. 2016 Dec 13;6:38937. doi: 10.1038/srep38937. PMID: 27958337; PMCID: PMC5153616.
74. Liu L., Koike H., Ono T., Hayashi S., Kudo F., Kaneda A., et al. (2021). Identification of a KLF5-dependent program and drug development for skeletal muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118 (35), e2102895118. doi:10.1073/pnas.2102895118
75. Ilkayeva, Y. Lu, K.S. Keerthy, C.E. Booth, C.B. Newgard, M.K. Jain. Muscle Krüppel-like factor 15 regulates lipid flux and systemic metabolic homeostasis. *J. Clin. Invest.*, 131 (2021), 10.1172/JCI139496
76. R. Massopust, D. Juros, D. Shapiro, M. Lopes, S.M. Haldar, T. Taetzsch, et al. KLF15 overexpression in myocytes fails to ameliorate ALS-related pathology or extend the lifespan of SOD1G93A mice. *Neurobiol Dis*, 162 (2021), Article 105583
77. Schoenfeld, B. J. (2010). The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 24(10), 2857-2872.
78. Wackerhage, H., Schoenfeld, B. J., Hamilton, D. L., Lehti, M., & Hulmi, J. J. (2019). Stimuli and sensors that initiate skeletal muscle hypertrophy following resistance exercise. *Journal of Applied Physiology*, 126(1), 30-43.
79. Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., ... & Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology*, 3(11), 1014-1019.
80. Glass, D. J. (2003). Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nature Cell Biology*, 5(2), 87-90.

81. Baar, K., & Esser, K. (1999). Phosphorylation of p70S6k correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 276(1), C120-C127.
82. Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293.
83. Ma, X. M., & Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(5), 307-318.
84. Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 21-35.
85. Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169(3), 381–405. doi:10.1016/j.cell.2017.04.001
86. Yuan, T. L., & Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497–5510. doi:10.1038/onc.2008.245
87. Glass, D. J. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(10), 1974-1984.
88. Hornberger, T. A., & Chien, S. (2006). Mechanical stimuli and nutrients regulate rapamycin-sensitive signaling through distinct mechanisms in skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*, 173(2), 305-316.
89. Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., ... & Goldberg, A. L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117(3), 399-412.
90. Adams, G. R., & Haddad, F. (1996). The relationships among IGF-1, DNA content, and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy. *The Journal of Applied Physiology*, 81(6), 2509-2516.
91. Spangenburg, E. E., & Booth, F. W. (2003). Multiple signaling pathways mediate LIF-induced skeletal muscle satellite cell proliferation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 284(2), C340-C347.
92. Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., & Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), 85-96.
93. Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799-806.
94. White, M. F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(3), E413-E422.

95. Hawley, J. A. (2004). Exercise as a therapeutic intervention for the prevention and treatment of insulin resistance. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 20(5), 383-393.
96. Ruchat, S. M., & Bouchard, C. (2013). Exercise Impact on Skeletal Muscle is Critical for Understanding the Metabolic Health Benefits of Exercise. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(6), a029758.
97. Khawandanah J. Double or hybrid diabetes: A systematic review on disease prevalence, characteristics and risk factors. *Nutr Diabetes*. 2019 Nov 4;9(1):33.
98. Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev*. 2013; 93(3):993-1017.
99. Zisman A, Peroni OD, Abel ED, et al. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med*. 2000; 6(8):924-8.
100. Layne, Andrew Steven, "Resistance Training Increases the Expression of AMPK, mTOR, and GLUT4 in Previously Sedentary Subjects and Subjects with the Metabolic Syndrome." (2010). *Electronic Theses and Dissertations*. Paper 1673. <https://dc.etsu.edu/etd/1673>
101. Ha J, Guan KL, Kim J. AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism. *Mol Aspects Med*. 2015;(46):46-62.
102. Mads K. Holten, Morten Zacho, Michael Gaster, Carsten Juel, Jørgen F.P. Wojtaszewski, Flemming Dela; Strength Training Increases Insulin-Mediated Glucose Uptake, GLUT4 Content, and Insulin Signaling in Skeletal Muscle in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 1 February 2004; 53 (2): 294–305. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2.294>
103. RYDER, J.W., KAWANO, Y., GALUSKA, D., FAHLMAN, R., WALLBERG-HENRIKSSON, H., CHARRON, M.J. and ZIERATH, J.R. (1999), Postexercise glucose uptake and glycogen synthesis in skeletal muscle from GLUT4-deficient mice. *The FASEB Journal*, 13: 2246-2256. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.15.2246>
104. GallagherPhilip M., TouchberryChad D., TesonKelli, McCabeEverlee, TehelMichelle, and WackerMichael J.. 2013. Effects of an acute bout of resistance exercise on fiber-type specific GLUT4 and IGF-1R expression. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 38(5): 581-586. <https://doi.org/10.1139/apnm-2012-0301>
105. Kido, K., Ato, S., Yokokawa, T., Makanae, Y., Sato, K., & Fujita, S. (2016). Acute resistance exercise-induced igf1 expression and subsequent glut4 translocation. *Physiological Reports*, 4(16), e12907. <https://doi.org/10.14814/phy2.12907>

106. Muñoz, V.R., Botezelli, J.D., Gaspar, R.C. et al. Effects of short-term endurance and strength exercise in the molecular regulation of skeletal muscle in hyperinsulinemic and hyperglycemic Slc2a4+/- mice. *Cell. Mol. Life Sci.* 80, 122 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04771-2>
107. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes.* 1981 Dec;30(12):1000-7. doi: 10.2337/diab.30.12.1000. PMID: 7030826.
108. Rothman DL, Magnusson I, Cline G, Gerard D, Kahn CR, Shulman RG et al (1995) Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci* 92(4):983–987. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.983>
109. Gordon BA, Benson AC, Bird SR, Fraser SF. Resistance training improves metabolic health in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Res Clin Pract.* 2009;83(2):157-175.
110. Bacchi E, Negri C, Zanolin ME, et al. Metabolic effects of aerobic training and resistance training in type 2 diabetic subjects: a randomized controlled trial (the RAED2 study). *Diabetes Care.* 2012;35(4):676-682.
111. Tamaki T, Uchiyama S, Nakano S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 1992;24(8):881-886. DOI: 10.1249/00005768-199208000-00005.
112. Ogasawara R, Yasuda T, Ishii N, Abe T. Comparison of muscle hypertrophy following 6-month of continuous and periodic strength training. *European Journal of Applied Physiology.* 2013;113(4):975-985. DOI: 10.1007/s00421

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Efeitos do exercício de endurance e de força na fisiologia e metabolismo de camundongos SLC2a4+/-**, registrada com o nº **5003-1/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. José Rodrigo Pauli, Vitor Rosetto Muñoz e Rafael Calais Gaspar**, 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 **17 de janeiro de 2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	15/12/2018-01/05/2024
Vigência da autorização para manipulação animal:	17/12/2018-01/05/2024
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6J SLC2A4+/-
No. de animais:	48
Idade/Peso:	04 meses / 30 g
Sexo:	40 machos / 08 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J S
No. de animais:	10
Idade/Peso:	04 meses / 30 g
Sexo:	machos
Origem:	Biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas, FCA/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas, FCA/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, 24 de janeiro de 2019.

Prof. Dr. Wagner José Fávares
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/UNICAMP

Certificamos que **FELLIPE DE OLIVEIRA** concluiu o curso online **Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório**, oferecido pelo **Instituto de Biologia da UNICAMP** e pela **Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP**.

Este certificado tem validade de 02 (dois) anos a partir da data de emissão.

Campinas, 23 setembro 2021.

A handwritten signature in blue ink that reads "Wagner José Fávaro".

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Professor Assistente Doutor
Presidente da CEUA/UNICAMP



Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp



CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado Efeitos do exercício de endurance e de força na fisiologia e metabolismo de camundongos SLC2a4+, (protocolo CEUA/UNICAMP nº 5003-1/2018), de responsabilidade do Prof. Dr. José Rodrigo Pauli, teve aprovada a inclusão dos novos executores: Vitor Rosetto Muñoz, Rafael Calais Gaspar, Renan Fudoli Lins Vieira e Felipe de Oliveira.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 24/01/2019.

Campinas, 30 de novembro de 2021.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente da CEUA/UNICAMP

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSÉ FÁVARO, PRESIDENTE CEUA/UNICAMP**, em 03/12/2021, às 07:03 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSÂNGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA DA CEUA/UNICAMP**, em 02/12/2021, às 14:29 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
A743405B C48F4FC1 B2A94160 42F98A32

