GUILHERME ALVES DE LIMA

O DIABETES ABOLE O AUMENTO DA EXPRESSÃO DO GENE DO GLUT4 SOB A ATIVIDADE CONTRÁTIL "IN VITRO" EM MÚSCULO SÓLEO DE RATOS WISTAR. PARTICIPAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA AMPK E CAMKII E DOS FATORES TRANSCRICIONAIS MEF2D, GEF, HIF-1α E TRα

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

Guilherme Alves de Lima

O DIABETES ABOLE O AUMENTO DA EXPRESSÃO DO GENE SLC2A4 INDUZIDO PELA CONTRAÇÃO MUSCULAR "IN VITRO": PARTICIPAÇÃO DAS CINASES AMPK E CAMKII E DOS FATORES TRANSCRICIONAIS MEF2D, GEF, HIF-1α E TRα

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana.

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado.

Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Lima, Guilherme Alves de.
O Diabetes abole o aumento da expressão do gene SLC2A4 induzido pela contração muscular "*in vitro*". Participação das cinases AMPK e CAMKII e dos fatores transcricionais MEF2D, GEF, HIF-1α e TRα. / Guilherme Alves de Lima. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Ubiratan Fabres Machado.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Expressão do gene SLC2A4 em músculo esquelético de animais diabéticos.

Versão do título para o inglês: Diabetes abolishes the "*in vitro*" muscle contraction-induced increase in SLC2A4 gene expression. Participation of AMPK and CAMKII kinases and MEF2D, GEF, HIF-1α and TRα transcriptional factors

Descritores: 1. Músculo esquelético 2. Diabetes Mellitus 3. Fatores de Transcrição 4. Transcrição gênica 5. Transdução de sinal celular 6. Transporte através da membrana I. Machado, Ubiratan Fabres II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0112/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Guilherme Alves de Lima.

Título da Tese: O Diabetes abole o aumento da expressão do gene SLC2A4 induzido pela contração muscular "*in vitro*". Participação das cinases AMPK e CAMKII e dos fatores transcricionais MEF2D, GEF, HIF-1α e TRα.

Orientador(a): Ubiratan Fabres Machado.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) **Aprovado(a)** ( ) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail:

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **039** nas fls. **44**do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Ubiratan Fabres Machado** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Regulação do gene do Glut4 no diabetes Mellitus induzida pela atividade contrátil em músculo sóleo. Papel dos fatores transcricionais MEF2A, MEF2D,HIF1a, TR, NF KAPPA B E GEF***" do qual participou(aram) o(s) alunos ***Guilherme Alves de Lima,*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **17.05.2007.**

São Paulo, 18 de maio de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária -Suplente
CEEA – ICB/USP

A todos que trabalham para instaurar uma nova visão de saúde, focada no bem-estar do indivíduo, e não na doença.

AGRADECIMENTOS

Uma trajetória de quatro anos e meio não poderia passar sem muitos agradecimentos.

A Deus, por ter me dado uma vida com muita sorte.

Aos meus pais, Armando e Irani, pelo investimento e principalmente pelo exemplo de trabalhadores que sempre foram, reforçando a importância do trabalho em minha vida desde muito cedo. Aos meus irmãos: Ricardo, Luciano e Armando, pela parceria e cumplicidade.

Aos meus orientadores: professor Ubiratan Machado, que me acolheu em um momento que eu sabia muito pouco, apostando no meu desenvolvimento como cientista, e pelos ensinamentos em várias esferas ao longo dos meus 7 anos de pós-graduação; ao professor Antonio Zorzano, que me aceitou na Universidade de Barcelona, me proporcionando um ano de total mudança na maneira de encarar a vida, e sobretudo de pensar em ciência; e a Dra Maristela Okamoto, que com muita paciência me ensinou boa parte do que eu sei em termos de trabalho na bancada.

Aos meus colegas de laboratório: Elaine, Rosana, Dani Furuya, Robinson, Ana Bárbara, Ana Cláudia, Dani Carioca, Raquel, Aline, Paulo, Patrícia e Milano, por ajudarem a construir um ambiente de trabalho prazeroso, e por compartilhar momentos de dificuldades e conquistas, além de me tolerarem em momentos de mau humor e estafa. Com certeza aprendi muito com todos. Também aos meus colegas da Universidade de Barcelona: Eduard, Juank "Romário", Maribel, Montse, David Sebastian, David Sala, Gonzalo "El Rey", Sonia, Natàlia, Eleonora, M. Àngels e especialmente ao Dr. Juan Pablo Muñoz, que me ensinaram bastante e ajudaram a fazer a minha vida mais feliz tão longe de casa.

Aos meus amigos: Tiago Langone, Thiago e Diego Olbi, Bruno, Mathé, Eduardo e Gabriel Kanazawa, Ricardo "Boca Rica", Eloise "Jabu", Douglas, Janaína, Flávio e Fernanda

Rivaroli, pela amizade incondicional, e por, nos momentos mais difíceis, me fazerem acreditar que eu estava trabalhando em direção a um bom caminho.

A minha namorada, Nara, que apareceu no momento final da minha tese (momento de mais stress), sendo parceira incondicional, compreensiva pelos finais de semana de muito trabalho, e grande incentivadora.

Aos professores e colegas de laboratórios vizinhos que sempre se colocaram à disposição em ajudar no desenvolvimento deste trabalho. Em especial, Professora Silvana Bordin, professor Gabriel Anhe, Professora Maria Tereza Nunes, professora Maria Lúcia Giannella, Dr. Camilo Lellis, os pós-graduandos Hidelbrando e Lucas.

A CAPES e a FAPESP por financiarem este trabalho.

"Se não tivermos tempo para cuidar da nossa saúde, teremos que arranjar tempo para cuidar de nossas doenças"

Jorge Steinhilber – Presidente do CONFEF

RESUMO

LIMA, G. A. O diabetes abole o aumento da expressão do gene SLC2A4 induzido pela contração muscular "in vitro": participação das cinases AMPK e CAMKII e dos fatores transcricionais MEF2D, GEF, HIF-1α E TRα. 86 f. [Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2011.

A proteína GLUT4, codificada pelo gene SLC2A4 (*solute carrier family 2A member 4*), tem um papel fundamental na homeostasia glicêmica. A contração muscular *per se* aumenta a expressão do SLC2A4 em músculo esquelético, entretanto não se sabe se este fenômeno está preservado em músculo de indivíduos diabéticos. **OBJETIVO:** Investigar se a contração muscular *per se* aumenta a expressão do gene SLC2A4 em músculo sóleo de ratos diabéticos; e avaliar possíveis mecanismos envolvidos. **MÉTODOS:** Foram investigados ratos não diabéticos (ND) e diabéticos tratados com insulina (DI) ou salina (DS) por 7 dias. Ao final dos tratamentos, os músculos sóleos foram removidos, incubados em tampão Krebs, e estimulados a contrair (estímulo elétrico supra-máximo a 100 Hz por 10 min), tendo o músculo contralateral como controle. Os mRNAs de GLUT4, AMPK (proteína cinase ativada por AMP), CAMKIIδ (proteína cinase ativada por cálcio-calmodulina), MEF2A/2D (fator de crescimento do miócito), TRα1 (receptor de hormônio tireoidiano) e HIF-1α (fator induzido por hipóxia) foram analisados por RT-PCR. As proteínas GLUT4, AMPK e pAMPK foram analisadas por Western blotting. A atividade de ligação dos fatores transcricionais MEF2D, GEF (fator de aumento de GLUT4), HIF-1α e TRα1 foi analisada por *gel shift*. Células C2C12 transfectadas com plasmídeos contendo a região promotora *enhancer* do gene SLC2A4, local de ligação para MEF2/HIF-1α/TRα1, ou com algum destes sítios mutados, foram tratadas com AICAR (ativador da AMPK) ou cafeína para análise da CAT (*chloramphenicol acetyltransferase*). **RESULTADOS:** Em animais ND, a contração aumentou o conteúdo de GLUT4 (mRNA e proteína ~90%); este efeito não foi observado nos animais diabéticos, mas foi restaurado com insulina. Em animais ND, a contração muscular aumentou ($P<0,05$) o conteúdo de CAMKII (mRNA 80%), TRα1 (mRNA 45%) AMPK (mRNA 65%); pAMPK (proteína, 80%) e MEF2A (mRNA 85%); no entanto, em animais DS, a contração não alterou os 3 últimos parâmetros. A contração aumentou a atividade de ligação dos fatores MEF2D (~63%), GEF (~120%) e TRα1 (~100%) em animais ND. Por outro lado, isto não foi observado em animais DS, mas sim nos tratados com insulina. Em animais ND, os inibidores de AMPK (*Compound C*) e de CAMKII (KN93) aboliram o aumento da expressão do GLUT4, e da atividade de ligação do MEF2D e do GEF, indicando a participação dessas cinases no efeito do DM. Em células C2C12 transfectadas com o GLUT4 *enhancer*, (1) o AICAR e a cafeína (estimuladores de AMPK e CAMKII) aumentaram a atividade CAT; e (2) a mutação em qualquer um dos 3 sítios de ligação MEF2/HIF-1α/TRα1 promoveu uma drástica redução na atividade CAT. **CONCLUSÃO:** Em músculo sóleo de ratos diabéticos a contração muscular não aumenta a expressão do gene SLC2A4, o que envolve redução na atividade dos fatores transcricionais MEF2D, GEF e TRα1. Em células C2C12, a AMPK e a CAMKII aumentam a transcrição do SLC2A4, o que depende da região de ligação do MEF2D/TRα1. No diabetes, a contração muscular não aumenta a atividade da AMPK, reforçando a participação do MEF2D e TRα1 na perda do efeito da contração sobre o gene SLC2A4.

Palavras chave: Contração muscular. Diabetes. GLUT4. AMPK. MEF2D. GEF.

ABSTRACT

LIMA, G. A. Diabetes abolishes the "in vitro" muscle contraction-induced increase in SLC2A4 gene expression. Participation of AMPK and CAMKII kinases and MEF2D, GEF, HIF-1α and TRα1 transcriptional factors. 86 f. [Ph.D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2011.

GLUT4 protein, encoded by SLC2A4 (solute carrier family 2A member 4) gene has a key role in glucose homeostasis. Muscle contraction per se increases the SLC2A4 expression in skeletal muscle, however it is unclear whether this phenomenon is preserved in muscle of diabetic subjects. **AIM:** To investigate whether the muscle contraction per se increases the SLC2A4 gene expression in soleus muscle of diabetic rats and to evaluate possible mechanisms involved. **METHODS:** We investigated non-diabetic (ND) and diabetic rats treated with insulin (DI) or saline (DS) for 7 days. At the end of treatment, soleus muscles were removed, incubated in Krebs buffer, and stimulated for contraction (supra-maximal electrical stimulation at 100Hz for 10 min), with the contralateral muscle as control. GLUT4, AMPK (AMP-activated protein kinase), CAMKIIδ (calcium-calmodulin kinase) MEF2A/2D (myocyte enhancer factor), TRα1 (thyroid hormone receptor) and HIF-1α (hypoxia inducible factor) mRNAs were analyzed by RT-PCR. GLUT4, AMPK and pAMPK proteins were analyzed by Western blotting. MEF2D, GEF (GLUT4 enhancer factor), HIF-1α and TRα1 binding activity were analyzed by shift electroforetic assays. C2C12 cells transfected with plasmids containing the enhancer region of SLC2A4 promoter, binding site for MEF2/HIF-1α/TR1α, or any of these sites mutated, were treated with AICAR (AMPK activator) or caffeine for CAT (chloramphenicol acetyltransferase) analysis. **RESULTS:** In ND animals, contraction increased GLUT4 (mRNA and protein 90%) expression, this effect was not observed in diabetic animals, but was restored with insulin treatment. In ND animals, muscle contraction increased ($P < 0.05$) CAMKII (80% mRNA), TRα1 (45% mRNA) AMPK (65% mRNA); pAMPK (protein, 80%) and MEF2A (85 mRNA %) expression, however, in DS animals, contraction did not change the last three parameters. Contraction increased the MEF2D (~ 63%), GEF (~ 120%) and TRα1 (~ 100%) binding activity in ND animals. On the other hand, this was not observed in DS animals, but ocurred in those treated with insulin. In ND animals, the AMPK and CAMKII inhibitors (Compound C and KN93 respectively) abolished the increased GLUT4 expression, and the binding activity of GEF and MEF2D, indicating the involvement of these kinases in the effect of DM. In C2C12 cells transfected with the GLUT4 enhancer, (1) AICAR and caffeine increased the CAT activity, and (2) the mutation in any of the three binding sites MEF2/HIF-1α/TRα1 promoted a drastic reduction in CAT activity. **CONCLUSION:** Muscle contraction does not increase the SLC2A4 gene expression in soleus muscle of diabetic rats, involving reduced MEF2D, GEF and TRα1 transcriptional activity. In C2C12 cells, AMPK and CAMKII increase SLC2A4 transcription, which depends on MEF2D/TRα1 binding region. In diabetes, the muscle contraction does not increase AMPK activity, supporting the participation of MEF2D and TRα1 in the loss of the contraction effect on SLC2A4 gene.

Keywords: Muscle contraction. Diabetes. GLUT4. AMPK. MEF2D. GEF.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....13
1.1 Captação de glicose.....14
1.2 Contração muscular.....15
1.3 Controle do diabetes tipo 2.....18
1.4 Expressão gênica de GLUT4.....19
1.5 Fatores transcricionais que afetam a expressão gênica do GLUT4.....20

2 OBJETIVOS.....24

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....25
3.1 Animais.....25
3.1.1 Tratamento dos animais diabéticos.....26
3.2 Estímulo da contração muscular "in vitro".....26
3.3 Cultivos celulares.....27
3.4 Gene Repórter.....28
3.4.1 Transfecções transitórias.....29
3.4.2 Tratamento com Aicar e Cafeína.....30
3.5 Avaliação da expressão de mRNAs.....32
3.5.1 Extração de RNA.....32
3.5.2 PCR em tempo real.....32
3.6 Avaliação das proteínas GLUT4 e AMPK.....34
3.6.1 Extração de proteínas de membrana.....34
3.6.2 Extração de proteínas totais.....35
3.6.3 Western Blotting.....35
3.6.4 Imuno detecção por Enhanced Chemioluminescence (ECL).....36
3.7 Quantificação da atividade de ligação dos fatores transcricionais.....37
3.7.1 Extração de proteínas nucleares.....37
3.7.2 Preparação e marcação dos oligonucleotídeos.....38
3.7.3 Ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA).....39
3.7.4 Supershift.....39
3.8 Análise estatística.....40

4 RESULTADOS.....41
4.1 Variáveis Metabólicas.....41
4.2 mRNA do GLUT4.....43
4.3 Proteína GLUT4.....46
4.4 Vias de sinalização que levam à ativação do gene do GLUT4.....47
4.5 Expressão e atividade de ligação de fatores transcricionais.....52

5 DISCUSSÃO.....63
5.1 Expressão do gene SLC2A4.....63
5.2 Vias de sinalização ativadas pela contração muscular e expressão do gene SLC2A4.....65
5.3 Expressão e atividade de fatores transcricionais relacionados ao gene SLC2A4.....68

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....74

REFERÊNCIAS.....76

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de desordens metabólicas que envolvem hiperglicemia, resultante de defeitos da secreção e/ou da ação da insulina. A hiperglicemia crônica causada pelo diabetes está associada à falência e disfunção de vários órgãos, especialmente da retina, dos rins, dos nervos, do coração e dos vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006). A Associação Americana de Diabetes define várias formas de DM: Tipo1 (DM1), que é causado pela destruição das células beta pancreáticas, e que se subdivide em: tipo 1A (que é causado por doença auto-imune); e tipo 1B (causado por outros processos); Tipo 2 (DM2), que está relacionado à resistência à insulina; diabetes gestacional, e diabetes causado por outros fatores (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

Hoje em dia, o DM afeta mais de 170 milhões de pessoas em todo o mundo, e estima-se que afetará cerca de 365 milhões de pessoas em 2030 (WILD et al., 2004). Nos países em desenvolvimento, há uma tendência de aumento na incidência de DM em todas as faixas etárias, especialmente nas mais jovens, cujo impacto negativo sobre a qualidade de vida e a carga da doenças no sistema de saúde é imensurável (KING; AUBERT; HERMAN, 1998).

O estilo de vida moderno, com abundante oferta de nutrientes, redução na atividade física, e stress tem resultado no aumento da incidênciado DM2 (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001), sendo essa forma de Diabetes cerca de 90-95% dos casos de Diabetes Mellitus (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

A fisiopatologia do DM2 envolve defeitos em tecidos sensíveis à insulina, os quais prejudicam a captação de glicose, e, conseqüentemente, participam da perda do controle glicêmico. Geralmente, a resistência à insulina ocorre nos tecidos periféricos, e com o progresso da doença, pode sobrevir diminuição relativa ou absoluta da secreção de insulina pelas células Beta pancreáticas (BRAUNWALD et al., 2001).

Normalmente, a insulina liga-se ao seu receptor nas células-alvo, resultando em uma série de eventos intracelulares que aumentam a captação e o metabolismo da glicose. A resistência à insulina é a inabilidade dos tecidos periféricos em responder normalmente às concentrações plasmáticas de insulina. Deste modo, para tentar manter a euglicemia, o pâncreas aumenta a secreção de insulina. Em pacientes portadores de DM2, a resistência à insulina é o evento inicial, e pode se estender por 1 a 2 décadas. Após este período, a intolerância à glicose aumenta, apesar

da elevação das concentrações de insulina. Finalmente, as células beta entram em falência acarretando em uma drástica redução na secreção de insulina (BRAUNWALD et al., 2001).

1.1 Captação de glicose

A captação de glicose pelas células em geral ocorre por difusão facilitada através da membrana celular. As proteínas que medeiam esta captação pertencem à classe de transportadores de difusão facilitada que transferem a glicose a favor do gradiente de concentração. Estes transportadores são denominados GLUTs (glucose transporters) e são numerados pela ordem cronológica de sua caracterização (SATO et al., 1996).

O tecido muscular esquelético é o principal território envolvido na captação de glicose devido à sua abundância, e assim, é um importante sítio envolvido no controle da homeostasia glicêmica (ZORZANO; FANDOS; PALACÍN, 2000).

No músculo esquelético, o GLUT4 é o transportador de glicose mais importante e abundante. Esta proteína é codificada pelo gene SLC2A4 (*solute carrier family 2 member 4*). O GLUT4 apresenta-se em maior quantidade em fibras do tipo I e IIa, quando comparado com as fibras do tipo IIb (MARETTE et al., 1992). No estado quiescente, a maior quantidade de proteína GLUT4 permanece estocada em vesículas intracelulares, porém frente a um estímulo realizado pela insulina ou pela contração muscular, ele é rapidamente translocado para a membrana plasmática e para os túbulos T, aumentando drasticamente a captação de glicose (CORTRIGHT; DOHM, 1997). Por conta deste fenômeno, o GLUT4 é a única isoforma de transportador considerada sensível à insulina.

Nas últimas duas décadas, especulou-se que a translocação do GLUT4 poderia ser induzida pela contração muscular, por mecanismos distintos do da insulina, sugerindo a existência de vias diferentes para cada estímulo. Nesher et al. (1985), observaram que o transporte de glicose pelo estímulo contrátil pode ocorrer na total ausência de insulina. Broznick et al. (1994), constataram que o efeito máximo de captação de glicose se dá na contração muscular junto com insulina, indicando um efeito aditivo entre os dois mecanismos.

A insulina é um hormônio protéico que interage com o seu receptor de membrana que pertence à classe de receptores catalíticos com atividade tirosinoquinase. Quando ela se liga ao seu receptor, promove a auto-fosforilação em resíduos tirosina, que ativam os substratos do

receptor de insulina, IRS1 e IRS2, seguindo ativação da subunidade p38 (regulatória) da PI3K (Phosphatidylinusitol – 3 Cinase), e ativação da sua subunidade catalítica p111 (OKADA et al., 1994). Esta, por sua vez, interage com fosfolípides de membrana levando à ativação da PDK (Proteína Cinase dependente de 3 - Phosphatidylinusitol). A PDK ativa duas proteínas-chave na translocação de GLUT4: A PKB (proteína cinase B, também conhecida como AKT) (WANG et al., 1999) e a PKCζ (Proteina Cinase C atípica) (KANZAKI et al., 2004). A subunidade AS160 da PKB está diretamente relacionada com a translocação de GLUT4, sendo descrita como a principal via para translocação do transportador (DUGANI; CLIP., 2005). A PKCζ é descrita como ativadora de cinases que contribuem na translocação de vesículas com GLUT4 para a membrana (IMAMURA et al., 2003).

1.2 Contração muscular

Fisiologicamente, a contração muscular é um fenômeno desencadeado pelo neurotransmissor acetilColina (Ach). Frente a um impulso nervoso, gerado no pelo sistema nervoso central, a Ach é liberada pelo neurônio motor na junção neuromuscular e se liga ao seu receptor específico que está na membrana sarcoplasmática. O receptor da Ach é um receptor nicotínico, que é um canal iônico, e apresenta 5 sub unidades. Uma vez que a Ach se liga ao seu receptor, este promove o influxo de sódio, o que leva a uma despolarização da membrana e uma consequente abertura de canais de sódio voltagem-dependente, que promove um maior influxo deste íon na célula, gerando assim um potencial de ação na membrana plasmática. Este potencial de ação percorre os túbulos T, e chega às cisternas do retículo sarcoplasmático, que apresentam canais de cálcio voltagem-dependentes que então são abertos e liberam uma grande quantidade de cálcio no sarcoplasma. O aumento da concentração de cálcio no meio intracelular é a etapa limitante para que ocorra a contração muscular. Uma vez em concentrações elevadas no sarcoplasma, o cálcio interage com as proteínas contráteis, e com a produção de energia proveniente da hidrólise de ATP, promove a contração muscular.

O aumento da concentração de cálcio leva à ativação das proteínas CAMK (Proteína Cinase dependente de calcio - calmodulina). As CAMKs são proteínas que fosforilam substratos importantes para a transcrição gênica e também atuam na secreção de vesículas, na regulação de canais iônicos e na morfogênese celular (TOMBES et al., 2003). As proteínas CAMKII podem

ser codificadas por quatro genes diferentes, com expressões em locais diferentes (CHIN, 2004). As isoformas α e β são expressas em tecido neural e as isoformas γ e δ são expressas em todos os tecidos (BRAUN; SCHULMAN, 1995), incluindo o tecido muscular; desta meneira, a CAMKIIδ será focada neste estudo.

A cafeína é extensamente utilizada para promover o aumento da concentração de cálcio no sarcoplasma (OJUKA et al., 2002) (WRIGHT et al., 2004) (TERADA; MURAOKA; TABATA, 2003) , e desta maneira ativar as CAMK, a PKC e a calcioneurina. Por outro lado, o agente farmacológico KN93 é utilizado como inibidor específico da CAMK (WRIGHT et al., 2004). Baseado nestes efeitos, ambos serão utilizados no presente estudo.

O processo de contração muscular promove também a hidrólise de ATP em ADP + Pi para produzir energia, com isso diminui a concentração de ATP e aumenta a concentração de 5'AMP. Este fenômeno leva à ativação da proteína AMPK (Proteína cinase ativada por 5' AMP). Esta cinase é ativada pelo 5'AMP, não apenas por mecanismos alostéricos (CORTON; GILLESPIE; HARDIE, 1994), mas também pela fosforilação de uma cinase anterior, a AMPKK, que também é ativada pelo 5'AMP (HAWLEY et al., 1996). A AMPK é um complexo heterotrimétrico que apresenta três subunidades, uma catalítica (α) e outras duas não catalíticas (β e γ) (HARDIE; CARLING, 1997). Cada subunidade apresenta duas ou mais isoformas (KEMP et al., 1999). No músculo esquelético, o complexo é formado pelas isoformas α2, β1 e γ1 ou γ3 (MAHLAPUU et al., 2004). A subunidade β atua como um esqueleto que mantém as subunidades α e γ ligadas a ela, a subunidade γ tem sido proposta como ligante de 5'AMP. Mutações da subunidade γ podem acarretar problemas no metabolismo de glicogênio (ARAD et al., 2002; CHEUNG et al., 2000). A contração muscular promove a ativação da subunidade α2, que quando ativada, fosforila uma série de proteínas-alvo no citoplasma, além de migrar para o núcleo da célula, podendo assim estar envolvida com transcrição de genes-alvo (SALT et al., 1998).

A AMPK pode ser considerada um sensor metabólico primário da carga energética celular, desativando vias de consumo de ATP e ativando vias alternativas para sua regeneração, tendo em vista que a maioria dos efeitos da depleção energética celular são mediados provavelmente por sua via cinase de ativação (HARDIE, 2000).

Como a atividade contrátil reduz as concentrações de ATP, e aumenta a concentração de AMP (JESSEN; GOODYEAR, 2005), ela induz ativação da AMPK tanto "in vitro" (HAYASHI

et al., 1998) quanto em exercícios *in vivo* (RASMUSSEN; HANCOCK; WINDER, 1998). O agente farmacológico 5-Aminoimidazole-4-Carboxamida Ribonucleozídeo (AICAR), após ser absorvido pelas células musculares, é fosforilado para formar 5-Aminoidazole-4-Carboxamida Ribonucleotídeo (ZMP), um derivado monofosforilado que mimetiza os efeitos da AMP na ativação da via da AMPK (MERRIL et al., 1997), sendo utilizado em estudos de ativação da AMPK. Por outro lado, o *Compound C* é um fármaco inibidor da AMPK. Grandes concentrações de *Compoud C* ocupam os sítios de ligação da 5'AMP, levando a uma perda da resposta da AMPK, sendo assim, é um competidor deste substrato.

Além de promover a ativação das proteínas calcioneurina e PKC, não focadas neste estudo, a contração muscular promove a ativação da CAMK e AMPK, que medeiam boa parte das respostas moleculares e fisiológicas obtidas pelo exercício físico.

A contração pode ser realizada "in vitro" com a utilização de eletrodos nas extremidades do tecido muscular que, através de uma descarga elétrica, promove o potencial de ação que leva ao aumento da concentração do cálcio no intracelular. Modelos de contração por estímulo elétrico são muito utilizados para estudos "in vitro", porque neste caso, pode-se controlar totalmente o meio em que o tecido está imerso, e assim, é possível atribuir os resultados obtidos à contração muscular *per se*.

Wright et al. (2004), realizaram um estudo no qual o músculo sóleo de rato foi incubado com cafeína, que é um agente que promove a liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático, aumentando sua concentração citoplasmática. A concentração de cálcio não foi suficiente para promover contração muscular, e mesmo assim foi observado um aumento na captação de 2DG (2-Deoxy-D-glucose, um análogo da glicose). Nesta mesma situação, ao se adicionar cafeína + dantroleno, um agente farmacológico que inibe a saída de cálcio do retículo sarcoplasmático, não foi observado aumento da captação de 2DG. O aumento da captação também não foi observado quando se incubou Cafeína + KN93, uma substância que inibe a CAMKII. Resultados similares foram obtidos no músculo EDL (Extensor digitorum longus) (TERADA; MURAOKA; TABATA, 2003). Deste modo, fica bem claro o papel do cálcio na captação de glicose pela célula muscular. Além da ativação de CAMK, a sinalização por cálcio obtida na contração muscular leva à a ativação de outra proteína que também está diretamente relacionada com a translocação de GLUT4, a PKC convencional. (IHLEMANN; GALBO; PLOUG, 1999) (RICHTER et al., 1987).

Sabe-se que a AMPK ativa diretamente a subunidade AS-160 da PKB tanto em músculo *epitochlearis* de rato (BRUSS et al., 2005) quanto em músculo *vastus lateralis* de humanos submetidos a uma corrida prolongada (DESHMUKH et al., 2006). Sendo assim, a contração muscular promove a captação de glicose ativando uma proteína-chave no final da "via clássica" de translocação de GLUT4 estimulado pela Insulina. Estes resultados sugerem fortemente que a subunidade AS-160 da PKB seja um ponto de convergência entre as duas vias de sinalização mais importantes para translocação de GLUT4 e conseqüente captação de glicose.

Além da insulina e da contração muscular, eventos como a hipóxia (MU et al., 2001), óxido nítrico (HIGAKI et al., 2001), agentes farmacológicos (WALLBERG-HENRIKSSON et al., 1988) e a despolarização da membrana celular (THONG; BILAN; KLIP, 2007) podem levar à translocação de GLUT4 e captação de glicose.

1.3 Controle do diabetes mellitus tipo 2

O controle metabólico de indivíduos com DM2 em evolução consiste em um dos maiores desafios dos serviços de saúde pública Norte Americana e do Brasil (ASSUNÇÃO; SANTOS; COSTA, 2002). Portanto, o desenvolvimento de programas eficazes e viáveis aos serviços públicos de saúde para a prevenção primária do Diabetes tipo 2 em população de risco é necessário tanto para o controle de incidência da doença como também para a prevenção secundária de suas complicações metabólicas. As principais intervenções no tratamento do DM2 focalizam na obtenção do controle diário da hiperglicemia (MOLLER, 2001).

Animais de experimentação são extensamente utilizados para o estudo da fisiopatologia do Diabetes Mellitus. Os modelos mais comuns são animais tratados com drogas que destroem seletivamente as células β pancreáticas, como a aloxana e a strepzotocina. Há também modelos de diabetes espontâneo, como os ratos Zucker.

O exercício físico tem se mostrado uma importante ferramenta no tratamento do Diabetes do tipo 2, por melhorar a homeostasia de glicêmica aumentando a sensibilidade à insulina nos músculos esqueléticos (DE FRONZO et al., 1981). Vários estudos têm demonstrado que o exercício agudo e crônico aumentam a capacidade de captação de glicose, e que a atividade física regular melhora a habilidade da insulina em estimular os transportadores de glicose mesmo em repouso (HAYASHI; WOJTASZEWSKI; GOODYEAR, 1997).

Sabe-se que a magnitude da resposta de translocação do GLUT4, em valores absolutos, é diretamente proporcional a quantidade total de transportadores, o que se relaciona com o padrão da expressão do gene do GLUT4. Em camundongos diabéticos, que expressam pouco GLUT4, a translocação de vesículas estimulada por insulina resulta em pouca proteína na membrana plasmática, embora percentualmente (o que reflete número de vesículas translocadas) essa translocação esteja preservada (MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1994). Por outro lado, camundongos diabéticos que superexpressam GLUT4, apresentam aumento deste transportador na membrana plasmática, e consequentemente apresentam uma melhora do controle glicêmico. (GIBBS et al., 1993).

Essas observações indicam que maior ou menor expressão do gene do GLUT4 é um evento chave para a eficiência da captação de glicose, o que estimula investigações sobre os mecanismos reguladores da expressão do gene do GLUT4.

1.4 Expressão gênica do GLUT4

O aumento da capacidade da captação de glicose pelo músculo esquelético é resultado, em parte, do aumento do conteúdo de proteína GLUT4 na célula (REN et al., 1994). Esse processo depende do grau de expressão do gene SLC2A4, que codifica a proteína GLUT4 (*solute carrier 2A4*), e é controlado tanto por mecanismos pré-transcricionais quanto por mecanismos transcricionais.

A regulação da expressão do gene SLC2A4 altera-se por estímulos fisiológicos, fisiopatológicos e farmacológicos. O diabetes (GARVEY; HUECKSTEADT; BIRNBAUN, 1989), a desenervação muscular (BLOCK et al., 1991) e o jejum (SILVA et al., 2005) promovem uma diminuição na expressão do GLUT4, enquanto o aumento do GLUT4 é observado no treinamento físico (FRIEDMAN et al., 1990), todos regulando paralelamente a capacidade de captar glicose.

A ativação das vias da AMPK e da MAPK (Proteina cinase ativadora da mitogênese) ocorre no exercício (YU et al., 2003). A AMPK, capaz de estimaular o transporte de glicose,agudamente, já foi relacionada no exercício crônico ao aumento da expressão do GLUT4 (FRYER et al., 2002; HO et al., 2003). A atividade contrátil proporciona um aumento na concentração de cálcio intracelular, que por sua vez, também atuaria aumentando a expressão do

GLUT4 (OJUKA et al., 2002). Neste estudo, os autores trataram células L6 (linha celular de músculo de rato) com cafeína, e observaram o aumento da expressão de GLUT4. Depois, trataram as células com cafeína + dantreleno (droga que inibe a saída de Cálcio do Retículo Sarcoplasmático), ou com cafeína + KN93, e observaram um bloqueio parcial com o primeiro tratamento, e um bloqueio total com o segundo, mostrando que a CAMKII está diretamente envolvida na expressão de GLUT4. Tratamento crônico com AICAR leva a um aumento no nível de proteína GLUT4 em ratos. (HOLMES; KURTH-KRACZEC; WINDER, 1999).

Deste modo, sabe-se que a AMPK e a CAMKII estão envolvidas na ativação da expressão do gene SLC2A4, mas pouco se sabe sobre como esta regulação ocorre em nível transcricional.

1.5 Fatores transcricionais que atuam na expressão do GLUT4

A região promotora do gene SLC2A4 apresenta sítios específicos (elementos responsivos) que ancoram proteínas (fatores de transcrição) que atuam como ativadores ou repressores da transcrição gênica.

Um fatore de transcrição apresenta domínios que se ligam ao DNA (no elemento responsivo) e outros que podem recrutar co-ativadores ou co-repressores, os quais contribuem na estimulação ou repressão do gene-alvo pela RNA-Poimerase tipoII. Portanto, o controle da expressão gênica é modulado pela interação de uma série de fatores de transcrição, além de sua capacidade de ativarem co-ativadores ou co-inibidores (BRIAVANOU; DARNELL, 2002).

O fator transcricional MEF2 (Fator de crescimento do miócito) tem papel central na transmissão de sinais extracelulares ao genoma, regulando programas genéticos que promovem a proliferação, diferenciação, morfogênese, sobrevivência e apoptose da célula muscular. Existem 4 isoformas de MEF2: O MEF2A, MEF2B, MEF2C e o MEF2D. O MEF2B é expresso em quantidades significativas no músculo apenas no período do desenvolvimento embrionário (MOLKETIN et al., 1996). O MEF2C não dimeriza nem com o MEF2A, nem com o MEF2D, e não se liga ao sítio de ligação do MEF2. Deste modo, as isoformas MEF2A e MEF2D são as mais importantes quando falamos em exercício e ativação de GLUT4 em músculo esquelético. Estas isoformas atuam como homo ou heterodímeros, sendo que na expressão do GLUT4, a ligação é formada por heterodímeros (MORA; PESSIN, 2000).

Em seu estado basal, o MEF2 se encontra associado a uma histona deacetilase de classe II (HDACII), que é um repressor transcricional que apresenta isoformas 4, 5, 7 e 9 (MC KINSEY et al., 2000). A dissociação da HDAC do MEF2 ocorre quando há a fosforilação das HDAC (LU et al., 2000). Em cardiomiócitos, a CAMK IV ativada fosforila a HDAC5 em seus resíduos serina 259 e 498, promovendo a sua dissociação do MEF2, e a exporta do núcleo (MC KINSEY; ZHANG; OLSON, 2000).

A porção N-Terminal do MEF2 contém o *motif* MADS-box conservado e um *motif* adjacente chamado "MEF2 domain". Esses 2 são responsáveis pela dimerização, ligação ao DNA e ativação de Co-fatores (BLACK; OLSON, 1998) (MC KINSEY; ZHANG; OLSON, 2000). As proteína MEF2 se ligam em homo ou heterodímeros na região promotora do gene-alvo (POTTHOFF; OLSON, 2007) e também interagem com outros fatores transcricionais (MORA; PESSIN, 2000).

Nos vertebrados, as proteínas MEF2 são extensamente expressas em músculo esquelético, mas também em linfócitos, células neurais, musculo liso, endotélio e osso, (ARNOLD et al., 2007; EDMONDSON et al., 1994), e algumas fontes afirmam que ele é expresso em todos os tecidos (MARTIN; SCHWARZ; OLSON, 1993; YU et al., 1992; POTTHOFF; OLSON, 2007).

As proteínas MEF2 são o ponto final de multiplas vias de sinalização. A fosforilação do domínio de ativação transcricional do MEF2 pelas MAPK (ERK5) aumenta a atividade transcricional deste (YANG et al., 1998).

O Sítio de ligação para MEF2 (também conhecido como elemento rico em AT) é um elemento responsivo que em camundongos é localizado entre os pares de bases 466-457 do gene SLC2A 4 (LIU et al., 1994) e ancora os fatores MEF 2A, 2B, 2C e 2D, e o MyoD , que atuam como ativadores da trascrição do GLUT4 (MORENO et al., 2003). Bem perto desta região encontra-se um elemento responsivo de outro ativador, o KLF15 (*Kruppel-like Factor 15*) (GRAY et al., 2002).

O HIF-1α (Fator induzido por hipóxia) é uma proteína heterodimérica que é formada pelas subunidades HIF-1α e HIF-1β, e essas duas subunidades contem o domínio bHLH (*basic Helix-loop-Helix*), que se liga à região E-Box, presente no promotor de vários genes (HOFFMAN et al., 1991). Em condição de normóxia, a proteína HIF-1α é rapidamente degradada pela via proteossomal e da ubiquitina, sendo praticamente inexistente na célula (HUANG et al., 1998.). Entretanto, quando a concentração de O2 diminui, ocorre uma inibição desse processo, levando

ao aumento da concentração de HIF-1α no sarcoplasma (LEE et al., 2003), que pode então ser ativado. O HIF-1α já foi descrito como ativador da transcrição dos genes do GLUT1 e do GLUT3, e como inibidor da transcrição do gene do GLUT2 (EBERT et al., 1996). Royer e colaboradores (2000), verificaram o aumento do GLUT4 na hipóxia, e nós ja demonstramos fortes evidências que ele esteja envolvido na ativação do gene SLC2A4 (LIMA et al., 2009).

Os TRs (receptores de hormônio tireoidiano) são proteínas codificadas por dois genes distintos, do TRα e do TRβ, e que apresentam múltiplas isoformas (α1, α2, β1, β2, β3). As isoformas α1, α2 e β1 estão presentes em todos os tecidos. No tecido muscular esquelético as isoformas α1 e β1 são mais abundantes (WILLIAMS, 1995). Normalmente, mesmo na ausência de hormônios, os TRs estão ligados ao seu elemento responsivo na forma de monômeros, homodímeros e principalmente na forma de heterodímeros (com preferência pela dimerização com o receptor de retinóides RXR) (BARRA et al., 2004).

O TRE (elemento responsivo ao TR) encontrado no gene do GLUT4 apresenta uma seqüência diferente da seqüência consenso (AGGTCA), e que apresenta uma baixa afinidade de ligação aos TRs, parecendo ligar apenas heterodímeros TR-RXR (TORRANCE et al., 1997).

Um conjunto de 3 elementos responsivos (sítio de ligação do MEF2, E-Box e TRE) forma uma grande região de 82 pares de bases denominada GLUT4 *enhancer*. No gene SLC2A4 de ratos, o GLUT4 *enhancer* está localizado entre os pares de base -502/-420. Sabe-se que a co-ativação de MEF2A, MyoD (liga no E-Box) e TRα1 é capaz de ativar a expressão do gene do GLUT4 atuando nesta região *enhancer* (SANTALUCIA et al., 2001).

O Domínio I, é uma região localizada entre as bases 742-712 do gene SLC2A4 em humanos. Esta região apresenta elementos responsivos que recebem a ligação dos fatores transcricionais NF1 (Fator Nuclear 1) e *OLF1/Early B Cell Factor* (Marcador proteico de genes olfatórios), os quais agem como inibidores da transcrição (COOKE; LANE, 1999), (DOWELL; COOKE, 2002). Neste domínio também está localizado o elemento responsivo que recebe o GEF (Fator de aumento do GLUT4) que é descrito como ativador da transcrição do GLUT4 (KINIGHT et al., 2003).

O NF-κB (Fator nuclear kappa B) é um fator transcricional inibidor do gene do GLUT4 (RUAN et al., 2002), além de ser conhecido como um mediador da resposta inflamatória (BARNES; KARIN, 1997).

Em estudos realizados em nosso laboratório com ratos Wistar submetidos a um jejum de 24hs, o estímulo contrátil "in vitro" do músculo sóleo promoveu aumento do mRNA e da proteína GLUT4, assim como da ligação (ativação) dos fatores transcricionais MEF2A, MEF2D, e HIF-1α em seus elementos responsivos presentes na região promotora do GLUT4 (SILVA et al., 2005; LIMA et al., 2009).

Estes estudos *"in vitro"* permitiram que o resultado fosse atribuído apenas à contração muscular, uma vez que não havia insulina nem variação de concentração de glicose no meio de incubação. Assim, esta resposta destaca o importante papel que a contração muscular desepenha, *per se*, na manutenção da homeostase metabólica da célula muscular. Por outro lado, sabe-se que o exercício físico aumenta a utilização de glicose em indivíduos portadores de diabetes, entretanto, não se sabe se estas regulações estão preservadas no estado diabético.

2 OBJETIVOS

Gerais:

1 - Investigar a expressão do gene do GLUT4 em músculo sóleo de animais não diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com insulina, submetidos a estímulo contrátil "in vitro".

2 - Identificar vias de sinalização ativadas pela atividade contrátil "in vitro" que levam à ativação de elementos responsivos no gene SLC2A4.

3 - Identificar possíveis problemas relacionados com a queda de expressão do GLUT4 encontrados no estado diabético .

Específicos:

a) Avaliar, o efeito da atividade contrátil supra-máxima aguda (10 min) sobre a expressão do mRNA e da proteína GLUT4 em músculo solear de ratos Wistar não diabéticos, diabéticos descompensados e diabéticos tratados com insulina;

b) Identificar elementos responsivos do gene SLC2A4 ativados pelas vias da AMPK e CAMKII;

c) Investigar a atividade das vias de sinalização da contração muscular (AMPK e CAMKII) em músculo sóleo de animais diabéticos;

d) Investigar possíveis alterações de expressão e/ou de atividade de ligação das proteínas MEF2, GEF, HIF-1α, TRα e NF-κB no promotor do gene SLC2A4 em músculo sóleo de animais diabéticos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar obtidos junto ao Biotério de Criação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e acondicionados no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O protocolo experimentoa foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal do instituto de ciências biomédicas da Universidade de são Paulo, e foi registrado sob o número 039, nas folhas 44 do livro 2, na data de 17/05/2007.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Não Diabéticos (ND); Diabéticos tratados com Solução Salina (DS) e Diabéticos tratados com Insulina (DI). O diabetes foi induzido por meio da injeção endovenosa (veia peniana) de Aloxana (38 mg/Kg de peso corpóreo) em animais com 3 meses de idade, previamente sedados com éter etílico. Os animais foram submetidos a jejum prévio de 12 horas para aumentar a efetividade da droga e após 2 horas, com o animal já totalmente recuperado da sedação, foi oferecida água com sacarose (por 12 horas) e ração a vontade, evitando dessa maneira uma hipoglicemia fatal devido a degranulação tóxica das células-β do pâncreas. Os animais DS (tidos como controle dos tratados com Insulina) receberam injeção endovenosa de solução salina (veículo - NaCl 0,9%).

10 dias após a injeção de Aloxana, os animais foram submetidos ao teste de Glicemia de ponta de calda com o glicosímetro Precision Q.I.D, MSEC (MSEC, San Diego, CA., USA) e 13 dias após injeção da Aloxana, os animais foram internados em gaiolas metabólicas. Foram colhidas amostras de urina por 24 hs para avaliação do volume urinário e da glicosúria. Nesse momento ocorreu uma triagem dos animais que ficaram ou não Diabéticos. A glicosúria de 24 horas foi determinada pelo método de glicose-oxidase, e o cálculo levou em conta o volume urinário de 24 horas. Os parâmetros volume urinário e glicosúria de 24 horas foram medidos novamente 1 dia antes do experimento (20 dias após a injeção de Aloxana). Esses parâmetros são para homogeneizar os animais diabéticos, deixando-os nas mesmas condições.

3.1.1 Tratamento dos animais diabéticos

O grupo de animais tratado com Aloxana, para indução do Diabetes, foi avaliado conforme descrito acima no décimo terceiro dia, e os animais diabéticos receberam o tratamento com insulina NPH (Biobras, Belo Horizonte, M.G., Brasil), duas vezes por dia, totalizando a dose de 6 U/dia durante 7 dias. Deste modo, 20 dias após a injeção de Aloxana, os animais foram sacrificados. No dia do sacrifício a insulinemoa dos animais foram mensuradas por radioimunoensaio.

A figura 1 mostra de maneira clara o cronograma de tratamento dos animais.

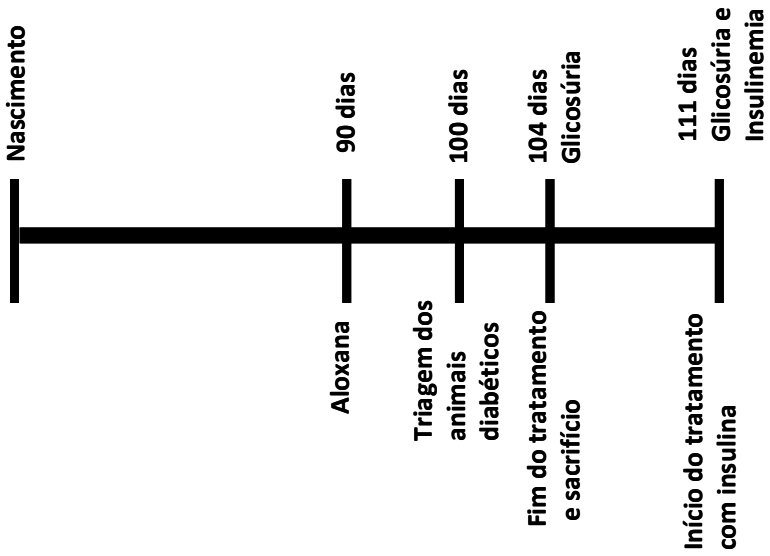

FIGURA 1: Cronograma de tratamento dos animais.

3.2 Estímulo da contração muscular "in vitro" e incubações

A estimulação elétrica para induzir contração muscular foi realizada no músculo sóleo gentilmente dissecado. Ambos os tendões musculares foram fixados em suportes metálicos para obter a mesma condição isométrica. Os músculos foram colocados em 100 ml de tampão Krebs-Henseleit oxigenado, pH 7,4, contendo 1% de albumina bovina e 8 mM de D-glucose, e foram continuamente oxigenados com 95% O_2-5% CO_2, a 37 ^oC. Os músculos direito e esquerdo foram mantidos na mesma cuba, e eletrodos foram colocados nas terminações de ambos os músculos, mas apenas os eletrodos do músculo direito foram conectados ao estimulador elétrico. Após 40

min de incubação o músculo direito foi estimulado com estímulo supra-máximo ou estímulo moderado.

Para o estímulo supra-máximo, foram realizadas dez contrações tetânicas produzidas por estimulação com pulsos de 0,2 ms a 100 Hz, por 10 segundos, com uma contração por minuto a 10 V, durante 10 min, com 50 segundos de intervalo entre cada pulso. Este protocolo é descrito como capaz de induzir o efeito máximo da contração muscular sobre o transporte de glicose (HENRIKSEN et al., 1991).

Já para o estímulo moderado, foram realizadas pulsos da 1 ms a 70 Hz disparados a cada 2,5 segundos por 10 minutos (WOJTASZEWSKI et al., 1996).

Após os 10 min de estimulação, os músculos permaneceram no sistema de incubação por mais 10 minutos para análise da pAMPK; 30 minutos para análise do mRNA do GLUT4 e atividade de ligação de fatores transcricionais; ou por mais 2 horas para análise do conteúdo de proteína GLUT4, e então foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

Após extraídos dos animais, os músculos sóleos foram incubados em tampão KHB puro, aonde permaneceram por 30 minutos. Passado este período, os tampões foram trocados por outro tampão KHB com concentrações de *Compound C* à 50µM ou de KN93 à 10µM, e então permaneceram por mais 10 minutos até que se iniciasse os estímulos para as contrações. Os tecidos permaneceram nos meios de incubação com as drogas por mais 30 minutos após do final dos estímulos, e então congelados em nitrgênio líquido para análises posteriores. Vale ressaltar que a droga KN93 é fotossensível, então, no momento da incubação com esta droga nós tomamos os cuidados necessários, protegendo o recipiente de incubação da luz.

3.3 Cultivos celulares

O cultivo celular é um modelo muito eficiente para se estudar expressão Gênica a partir da técnica Gene Reporter, pois as células são mantidas em condições facilmente repruduzíveis, o que permite uma transfecção eficiente de plasmídeos. Além disso, cultivos celulares permitem que trabalhemos com economia de drogas e reagentes. Não são modelos ótimos para estudo de metabolismo em geral, pois só há um tipo de tecido.

A linha celular muscular de camundongo C2C12 foi criada por Blau et al. (1985), a partir de uma linha celular estabelecida por Yaffe e Saxel (1977). Esta linha celular apresenta

uma alta taxa de proliferação e de diferenciação. Após 4 dias de diferenciação, os miotubos ja estão bem alongados e iniciam a contração espontâneamente. Estas células se proliferam em meio de cultivo DMEN/FBS 10% e diferenciam sob ação do meio DMEN/HS 5%.

Depois de plaqueadas, as células foram colocadas em estufas para que aderissem à placa e comecem a proliferar. Após 48-72 horas elas atingem a confluência de 80 a 90%. Neste momento deve-se dividir as células em mais placas, para que elas continuem proliferando. É muito importante que a confluência não seja maior do que 90%, pois isso prejudica o processo de diferenciação.

Foram colocadas 500.000 células C2C12 por poço, em placas de 6 poços ou 300.000 células/poço em placas de 12 poços.

3.4 Gene Repórter

Plasmídeos são moléculas circulares duplas de DNA capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico. No gene repórter, fragmentos da região promotora de um gene são clonados e inseridos nos plasmídeos. Quando esta região promotora é ativada por fatores transcricionais presentes na célula, promovem a codificação de um mRNA. A região codificadora do DNA do plasmídeo, promove a síntese de mRNAS que darão origem a proteínas sinalizadoras, que pode ser a *Chloramphenicol acetyltransferase* (CAT) ou a *Luciferase*. Estas duas proteínas podem sem mensuradas por meio de um ensaio de ELISA ou por Luminômetro respectivamente. Os plasmídeos contêm ainda locais que lhes conferem resistência a antibióticos, que lhes protege dos mesmos. Os plasmídeos utilizados noste trabalho são resistentes à ampicilina.

Quanto maior for a ativação de fatores transcricionais, mais regiões promotoras serão impactadas, e mais proteínas sinalizadoras serão formadas, e assim, podemos avaliar qual intervenção experimental é mais eficiente em ativar as regiões promotoras de interesse.

Os plasmídeos utilizados neste trabalho apresentam a região codificadora de CAT, portanto os resultados finais foram obtidos através do ensaio ELISA. As regiões promotoras dos plasmídeos utilizados neste trabalho foram sintetizadas pelo serviço de apoio técnico do Parque científico de Barcelona, e estão representados na figura 2.

A)

B)

FIGURA 2: Acima (A), a representação do plasmídeo contendo a região GLUT4 *enhancer*, com as caixas E-Box, MEF2 e TRE em vermelho, azul e verde respectivamente. Abaixo (B) a representação dos plasmídeos contendo as mesmas caixas citadas acima mutadas. Os plasmídeos mutantes apresentam o mesmo número de pares de bases que o GLUT4 *enhancer* (-520/-402TKCAT), porém, com alguns pares de bases trocados, que é o que define a mutação.

3.4.1 Transfecções transitórias

Transfecção transitória implica em insertar um plasmídeo em uma célula utilizando agentes farmacológicos. Existem alguns reagentes que são ultilizados para realizar este processo. O reagente utilizado neste trabalho foi o PEI (*Polyethylenimine*) da SIGMA (SIGMA-Aldrich., São Paulo, S.P., Brasil).

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços , em uma densidade de 500.000 células/poço. A transfecção foi feita 24 horas após o plaqueamento, com a utilização da mistura em um eppendorf de 2ml:

-1,5 ml de NACL a 150 mM

-72 µl de PEI a 1ug/ul

-24 µg de plasmídeo de interesse

-2,4 µg de plasmídeo que expressa renilla (neste caso com o promotor irrelevante, TK)

Os componentes foram misturados por inversão (cerca de 20 vezes) e posteriormente incubados em temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período 250 µl desta solução mais 1750 µl de DMEN s/FBS (pois o FBS prejudica o processo de transfecção) foram colocados em cada poço, aonde permaneceram na estufa a 37 °C por 5 horas. Posteriormente, o meio foi trocado para DMEN/FBS10% e as células permaneceram na estufa por 18 hs.

Após este período, iniciou-se o processo de diferenciação, com DMEN/HS5%. Os plasmídeos expressam de maneira efetiva por até 4 dias depois da transfecção, depois deste período vão diminuindo a expressão gradativamente.

Três dias de diferenciação ja é tempo suficiente para observarmos miotubos formados. Neste momento, as células foram submetidas aos tratamentos.

3.4.2 Tratamento com AICAR e Cafeína

O Tratamento foi feito tanto em células transfectadas (para valiar a atividade CAT), quanto em células não transfectadas (para avaliar o mRNA por Real Time PCR).

Em uma placa de 6 poços, 2 foram mantidos como controle, 2 foram tratados com Cafeína a 3 mM e 2 foram tratados com AICAR (Sigma) a 1 mM. Deste modo, temos n=1 de cada grupo feito em duplicatas. As drogas foram diluídas em meio de diferenciação (DMEN/HS5%) e permaneceram em contato com as células por 3 horas, após este período, o meio foi retirado, as células foram tratadas com PBS1X por 3 vezes e um novo meio de diferenciação sem as drogas foi adicionado. As células permaneceram em cultivo por mais 3 horas e então foram retiradas para extração de mRNA através do KIT Qiagem (Qiagen, Barcelona, España). ou para quantificação da atividade CAT através do KIT CAT-ELISA da Roche (Hoffmann-La Roche Ltd, New York, N.Y., USA) de acordo com as indicações do fabricante.

3.5 Avaliação da expressão de mRNA

3.5.1 Extração de RNA.

O músculo sóleo foi homogenizado em Polytron com Trizol (Invitrogen life Technologies, Gaithersburg, Maryland, USA) para isolamento do RNA total, obedecendo-se ao padrão (0,1 g de tecido/1 ml de Trizol).

Após o descongelamento, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio/1 ml de Trizol. Os tubos foram, então, agitados vigorosamente por 15 segundos, incubados durante 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugados a 10.000 g, durante 15 minutos, a 4 °C. Foi adicionado 0,5 ml de isopropanol à fase superior transferida para novo tubo, e posteriormente incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Logo após, foi feita uma centrifugação a 10.000 g, durante 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com etanol 70 % (1 ml/1 ml de Trizol), e submetido a uma centrifugação a 10.000 g, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi seco em temperatura ambiente durante 10 minutos. A cada tubo foi adicionado 50 µl de água DEPC (Dietil Pirocarbonato) para solubilização do precipitado em banho-maria a 65 °C, durante 15 minutos. Posteriormente foram estocadas em freezer -70 ˚C.

Para a avaliação da concentração de RNA, a 1 µl da amostra total foi adicionado 79 µl de água DEP, este material foi submetido à leitura da absorbância em espectrofotômetro (Gene Quant, Amershan Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) em 260 nm. A partir dessa leitura foi feito o cálculo da concentração de ácido nucléico da amostra. Uma unidade de densidade óptica (DO) corresponde a aproximadamente 40 µg/ml de fita simples e a relação DO 260/DO 280, sempre > 1,65, permite estimar a pureza do ácido nucléico da amostra.

3.5.2 PCR em tempo real

Para esta técnica, é necessário produzir um DNA complementar (cDNA). Para isto, uma amostra de 1 µg de cada RNA foi submetida a reação de transcrição reversa com *primers*

randômicos. Foi adicionado em cada amostra o tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de $MgCl_2$), DTT (10 mM), mistura de dNTPs (0,5 mM cada), primers randômicos (150 ng), inibidor de RNase (40 U) e a enzima SuperScript II (200 U; Invitrogen, EUA), em volume final de 20 µl. As reações foram incubadas por 50 min à 42 ^{o}C, seguida de aquecimento à 70 ^{o}C por 15 min para desnaturação da enzima.

Para cada reação foram utilizados 5 ng de cDNA e de 10 a 30 pM de primers. A leitura da amplificação foi feita pelo softwere S.D.S. 2.3, e os parâmetros foram: 50° por 2 minutos; 95 °C por 10 min; 95 °C por 15 segundos; 60 °C por 1 min. Todas as leituras foram feitas em triplicatas.

Para os estudos de Real Time PCR realizados à partir das amostras extraídas de células C2C12, foram desenhados iniciadores (*primers*) utilizando como parâmetro o gene de camundongo.

A tabela 1 mostra as sequências dos iniciadores utilizados para amplificar os cDNAs de camundongos (células C2C12).

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores para amplificar cDNAs das células C2C12 (camundongo).

GENE	**SEQUÊNCIA**
GAPDH	For: 5'- GGCCATCCACAGTCTTCTGG- 3' Rev: 5' – ACCACAGTCCATGCCATCACTGCCA – 3'
MEF2A	For: 5'- TTGAGCACTACAGACCTCACG – 3' Rev: 5'- TGCACCAGTATTTCCAATCAA – 3'
GLUT4	For: 5'- CTTCTTTAGATTGGCCCTGG – 3' Rev: 5'- AGGTGAAGATGAAGAAGCCAAGC – 3'

Para estudos realizados em músculo sóleos de ratos Wistar, foram utilizados os iniciadores listados na tabela 2.

Tabela 2 - Sequências dos iniciadores para amplificar cDNAs de músculo de ratos Wistar.

GENE	SEQUÊNCIA
GLUT4 (Taqman) Fornecida pela empresa Applied Biosystems.	For: 5' - GGC TGT GCC ATC TTG ATG AC - 3' Rev: 5' - CACGAT GGA CAC ATA ACT CAT GGA T - 3' Sonda: 5' FAM AAC CCG CTC CAG CAG C MGB3'
α2 AMPK	For: 5'- GCT GTG GAT CGC CAA ATT AT – 3' Rev: 5'- GCA TCA GCA GAG TGG CAA TA – 3'
CAMKIIδ	For: 5'- GGA AAT GGA ATG CCA AAG ACA ATG – 3' Rev:5'- CTG TTG ACA ATT AGA AGA CCC AAATG – 3'
MEF2A	For: 5'- CAA ATG GAG CTG GAA ATG GT – 3' Rev: 5'- TCC GAC TGT TCA TTC CAA CA – 3'
MEF2D	For: 5'- GGT GAC ATC ATC CCT TAC GG -3' Rev: 5'- AGG CCC TGG CTG AGT AAA CT -3'
p300	For: 5'-GGGACTAACCAATGGTGGTG-3' Rev: 5'- ATTGGGAGAAGTCAAGCCTG-3'
TR α1	For: 5'-TTTACCAAGATCATCACCCC-3' Rev: 5'- TTGACATTAACAGCACAG – 3'
HIF-1α	For: 5'-CGA AGA ACT CTC AGC CAC – 3' Rev: 5'- AGC TCG TGT CCT CAG ATT CC-3'
GAPDH	For: 5'- GAA CAT CAT CCC TGC ATC C – 3' Rev: 5'- CCT GCT TCA CCA CCT TCT T – 3'

Antes dos ensaios, cada primer foi testado para garantir uma eficiência de amplificação de no mínimo 95% e uma curva de dissociação de apenas um pico.

Os valores finais foram calculados através do delta delta CT (ΔΔ CT), aonde os controles foram tidos como 100%.

3.6 Avaliação das proteínas GLUT4 e AMPK

3.6.1 – Extração de proteínas de membrana

As amostras foram homogeneizadas em Polytron PT 3000 KINEMATICA (BRINKMAN) a 20.000 rpm durante 30 s em tampão de homogenização (Tris HCl 10 mM; EDTA l,0mM; sacarose 250mM) numa proporção de 1:6 (peso: volume). Posteriormente, foram centrifugadas a 1000 *g* por 10 minutos, a 4ºC. O precipitado foi ressuspenso e centrifugado a 1000 *g* por 10 minutos, a 4ºC e os dois sobrenadantes foram somados e submetidos a uma centrifugação a 41.000 *g*, por 75 minutos a 4ºC. O *pellet* foi ressuspenso em tampão de homogenização e então sonicado até a dissolução total do *pellet.*

3.6.2 Extração de proteínas totais

Este procedimento foi realizado para análise posterior da proteína pAMPK e AMPK. Como a AMPK é fosforilada em um sítio Treonina (fosforilação relativamente estável), as amostras congeladas antes de processadas.

As amostras foram homogenizadas em Polytron PT 3000 a 30.000 rpm em um tampão de extração com inibidores de fosfatase (1,5 ml para cada 100mg de tecido). O tampão de extração foi constituído de: 2,5 ml de Tris (1 M, pH 7,5); 1,25 ml de EDTA; 2,5 ml de SDS 10%; 0,105 g de Fluoreto de Sódio; 0,112 g de Pirofosfato de Sódio e 0,047 g de Ortovanadato de Sódio. Volume final de 25 ml.

A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford.

Preparou-se uma curva-padrão com albumina bovina de 0,05 a 1,0 mg/ml, com base na qual foram calculados os conteúdos de proteína de cada amostra. Em cada poço da placa de leitura de proteína foi adicionado 6µl de cada padrão ou de amostra (préviamente diluída 10 vezes) e 294 µl de solução de Bradford (1/5). Cada ponto da curva e dosagem de cada amostra foi feita em triplicata. Posteriormente, a placa foi protegida da luz e ficou em temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram analisadas no espectrofotômetro com um comprimento de onda de 595 nm. Foram utilizadas 40g de Proteínas de cada amostra para a eletroforese.

3.6.3 - Western Blotting

Foi Utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos.

a - gel de empacotamento (*stacking gel*) = 6%T; 2,7%C

b - gel de separação (*resolving gel*) = 10%T; 2,7%C

A constituição dos géis de poliacrilamida está detalhada na tabela 3.

Tabela 3 - Constituição dos géis de poliacrilamida para eletroforese

GEL DE EMPACOTAMENTO	GEL DE SEPARAÇÃO
ACRILAMIDA 5,8%	ACRILAMIDA 9,7%
BISACRILAMIDA 0,16%	BISACRILAMIDA 0,3%
Tris HCl 150 mM pH6,8	Tris HCl 375 mM pH 8,9
EDTA 2,5 mM	EDTA 2 mM
SDS 0,1%	SDS 0,125%
TEMED 0,05%	TEMED 0,05%
PERSULFATO DE AMÔNIO 0,06%	PERSULFATO DE AMÔNIO 0,05%

Antes da aplicação no gel, as amostras foram acrescidas de Laemmli (glicerol 15%, Tris 0,05, *bromofenol blue* 0,05%, SDS 9%) com 6% de 2-mercaptoetanol, 1:1, conforme o volume total, e fervidas por 3 min.

Iniciou-se a eletroforese (em tampão Tris HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, pH 8,3) com a corrida no gel de empacotamento sob voltagem constante (75 mV), até que ocorresse o empacotamento das amostras, o que pôde ser observado na transição dos géis. Posteriormente, aplicou-se corrente constante de 60 mA para a corrida no gel de separação por aproximadamente 5 horas.

Em cada corrida, foi sempre utilizado um padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (marcadores), o que possibilita a localização da proteína em estudo.

Após a separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida, foi realizada sua transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham, Buckinghahmshire, UK.), sob corrente constante de 40 mA, durante 16 horas, a 4 ºC, em tampão Tris HCl 12,5 mM, glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3.

A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel pós-transferência com azul brilhante de Coomassie.

3.6.4 Imunodetecção por Enhanced Chemioluminescence (ECL.)

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi submetida ao procedimento de imunodetecção de proteínas específicas, seguido de quantificação por quimioluminescência, conforme as etapas a seguir:

a) bloqueio em PBS pH 7,2 (NaCl 0,8%; $Na_2HPO_4.(12H_2O)$ 0,115%; KCl 0,02%; KH_2PO_4 0,02%), acrescido de leite em pó desnatado (8%), durante 60 min, à temperatura ambiente, sob agitação constante;

b) incubação na mesma solução contendo o anticorpo diluído: anti-GLUT4, 1/300, durante 3 horas, a 37 ºC; Anti- pAMPK e anti AMPK, 1/1000 (diluído em solução basal com BSA a 3%); Anti-Porina, 1/5000. Anti-GAPDH, 1/5000.

(c) lavagens com 10 ml de PBS-T (PBS 1X + Tween 20, 0,1%), à temperatura ambiente; para retirar o excesso de anticorpo primário;

d) incubação de 1 hora, em temperatura ambiente, em PBS/BSA 1% contendo anticorpo secundário (anti-Ig de coelho para GLUT4; anti-Ig de camundongo para AMPK, GAPDH e Porina), ligado à HRP (*horseradish peroxidase*), da Amershan (Amersham International Buckinghamshire, UK). (Ac NIF-824);

e) lavagens em PBS-T para remoção do excesso de Ac/HRP;

f) reação de quimioluminescência: adição da mistura (1:1) dos reagentes de detecção A e B (ECL. Western Blotting Analysis System, RPN 2108) e incubação por 1 a 2 minutos, sob agitação, constante.

A membrana foi imediatamente exposta a filme de RX *Hyperfilm* da Amersham, a temperatura ambiente, durante 1 a 15 minutos. O filme foi revelado com solução reveladora e

reforçadora GBX e solução fixadora e reforçadora GBX da Kodak (Kodak Brasileira, São Paulo, S.P., Brasil).

A intensidade dos *blots* foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o software Image Master 1D Prime da Biotech (Pharmacia Biotech, Uppsala, S.W., USA) e o resultado numérico foi expresso em unidades arbitrárias (UA).

3.7 Quantificação da atividade de ligação dos Fatores Transcricionais

3.7.1 Extração de proteínas nucleares

A extração de proteínas nucleares do músculo sóleo, foi realizada com base no método descrito por Andrews e Faller (1991). O músculo sóleo, após o procedimento de incubação, foi lavado em PBS 1X e congelado em nitrogênio líquido. Após o congelamento as amostras foram trituradas em um suporte de cerâmica com nitrogênio líquido, e colocadas em tubos eppendorf de 1,5 ml, onde acrescentou-se 1ml de PBS 1X gelado, seguindo-se de uma centrifugação a 1.000 g por 10 min a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e 500 µl de tampão A (tampão de lise) gelado (HEPES-KOH – pH 7,9, 10 mM; MgCl2 1,5 mM; KCl 10 mM; PMSF 0,2 mM e DTT 0,5 mM) foi adicionado em cada tubo.

Em seguida, as amostras foram mantidas em repouso no gelo por 10 min, sendo, a seguir misturadas e centrifugadas a 12.000 g por 10 s, a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante ressuspenso em 100 µl de tampão B (tampão de extração) gelado (HEPES-KOH – pH 7,9, 20 mM; glicerol 25%; NaCl 420 mM; MgCl2 1,5 mM; ETDA 0,5 mM; DTT 0,2 mM e PMSF 0,2 mM), seguindo-se a incubação no gelo por 20 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 2 min a 12.000 g a 4 °C para remover os debris celulares e o sobrenadante, contendo as proteínas nucleares, foram aliquotados em *eppendorffs* e armazenados a -70 °C. Vale salientar a importância das amostras terem permanecido no gelo durante todo o experimento, assim como a baixa temperatura dos tampões, que foram preparados até um dia antes do uso. O armazenamento em alíquotas no -70 °C é de extrema necessidade, uma vez que a amostra foi uma vez descongelada e pôde ser degradada por proteases, deste modo sendo inapropriada para reutilização.

A quantificação de proteínas nucleares foi realizada pelo método de Bradford, já descrito anteriormente.

3.7.2 - Preparação e marcação dos oligonucleotídeos

Na tabela 4 estão descritos os oligonucleotídeos utilizados no Ensaio de Mobilidade eletroforética. Estão descritas as sequências que foram aneladas com o seu complemento.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados.

Oligonucleotídeo	**Sequência**
E-Box (HIF-1α)	5'- GGG ACC TGA CAT TTG GCG GA - 3'.
Sítio de ligação para o MEF2	5'- CGT GGG AGC TAA AAA TAG CCA T - 3'
Elemento responsivo ao TR	5' - CAC TCC GGG TTA CTT CGG GGC ATA CAC ACA - 3'
Sítio de Ligação do NF-κB	5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG T – 3'
Domínio1	5' - CTT GTC CCT CGG ACC GGC TCC AGG AAC CAA - 3'

Com excessão do Domínio 1, todos os oligonucleotídeos foram desenhados levando em consideração a região promotora do gene SLC2A4 de ratos. O Domínio 1 só foi descrito na região promotora do gene SLC2A4 de humanos.

Para a reação foram utilizados 250 ng dos oligonucleotídeos de dupla fita, 2 µl do tampão da enzima (10X), 2 µl da enzima fosfatase de camarão (Boehringer Mannhein) e água bidestilada autoclavada, até completar o volume final de 20 µl. Seguiu-se com incubação a 37 °C por 30 min e inativação da reação a 65 °C por 15 min. O produto foi, então, purificado por meio do *Kit QI Aquick Nucleotide Removal* (Qiagen) e em seguida marcado radioativamente.

As sondas foram marcadas com p^{32} - γ ATP, em um tubo contendo 50 ng do olignucleotídeo tratado com fosfatase, 2 µl do tampão da enzima (10X), 1 µl da enzima T4 poli quinase da Promega (Promega, Belmont, Wisconsin, USA), 3 µl do radioativo e água bidestilada autoclavada suficiente para completar o volume para 20 µl. Após incubação a 37 °C por 1,5 h,

foi adicionado 80 µl de STE (TE + NaCl 100 mM), seguindo-se com a purificação em coluna de Sephadex, por centrifugação a 1.600 rpm, por 4 min. Uma alíquota do produto (1 µl) foi utilizada para contagem em contador β.

3.7.3 Ensaio de mobilidade Eletroforética (Eletrophoretic mobility shift assay - EMSA)

Em alíquotas contendo 10 µg de proteínas nucleares foram adicionadas: 6µl de tampão de ligação (HEPES – pH7,6, 60 mM; 10% glicerol; KCl150 mM; ETDA 0,6 mM e DDT3mM), 1,5 µg de Poli di-dC (SIGMA), 1µl de sonda marcada radioativamente (100.000 cpm) e água bidestilada autoclavada para completar o volume para 15 µl. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 20 min, para permitir a ligação de proteínas nucleares às sondas.

Para a competição, foi adicionada uma quantidade de oligonucleotídeos não marcados com o material radioativo, de 70 vezes mais do que a de oligonucleotídeos marcados. A adição dos não marcados foi feita 30 minutos antes do marcado, e as amostras permaneceram em temperatura ambiente. Com esta estratégia, as proteínas se ligam no oligo não marcado, e não se ligariam no oligo marcado, o que resulta em desaparecimento total ou parcial da banda específica. Este procedimento é utilizado para reconhecer a banda de interesse.

Foi utilizado um gel de corrida de poliacrilamida a 4% não desnaturante (sem gel de empacotamento) que foi submetido a uma pré-corrida a 90 V por 60 min a 4 °C em tampão TBE 0,5X. Ao final dessa pré-corrida, o tampão TBE 0,5X foi trocado por um novo, as amostras foram aplicadas no gel e posteriormente iniciou-se a eletroforese, em uma voltagem de 90V, para que as mostras penetrassem completamente no gel. Em seguida a voltagem foi aumentada para 150 V, por 60 min, e finalmente para 250 V, para que o corante atingisse o final do gel.

Ao final da eletroforese o gel foi transferido cuidadosamente para uma folha de papel Whatman, secado a vácuo por 45 min a 80 °C e exposto a um filme RX em cassete a -70 °C por 48 horas.

3.7.4 Supershift

O ensaio *supershift* foi realizado utilizando anticorpos específicos, que foram adicionados ao *eppendorf* já com as amostras de proteínas nucleares e a mistura de reação 40

min antes de adicionarmos os oligonucleotídeos marcados com p^{32} - γATP. Neste período as amostras ficaram em temperatura ambiente. Realizando o ensaio desta maneira (adicionando o anticorpo antes do oligonucleotídeo), o anticorpo se liga à proteína e dificulta a ligação da mesma ao oligonucleotídeo, o que resulta em um enfraquecimento total ou parcial da banda obtida pelas amostras sem o anticorpo.

Foi adicionado 3 µg de anticorpo às amostras. Os anticorpos utilizados foram fornecidos pela Santacruz (Santacruz biolechnology inc. Santa Cruz, CA., USA). MEF2D (H-11: SC-271153X); HIF-1α (H-206: SC-10790X) e TRα (T17: SC-10819X).

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste "t" de Student, quando envolvidos dois grupos. Quando a comparação foi de estimulado versus controle, foi utilizado o teste "t" pareado, nos demais, foi usado o teste "t" não pareado.

Para resultados envolvendo 3 ou mais grupos independentes foi utilizada ANOVA de uma via, com pós-Teste Newman Kells. Para resultados envolvendo 4 ou mais grupos separados em duplas (ex: contração versus controle de animais não diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com insulina), foi utilizada ANOVA duas vias, com pós-teste Bonferroni.

4 RESULTADOS

4.1 Variáveis Metabólicas

Os resultados a seguir correspondem às variáveis metabólicas dos animais que tiveram seus músculos sóleos removidos para a realização da contração muscular e posterior análise do conteúdo do mRNA ou da proteína do GLUT4. O dia 0 corresponde ao momento logo antes do início dos tratamentos com insulina (DI) ou salina (DS). Neste momento os animais completavam 14 dias de estado diabético. O dia 7 se refere ao final do tratamento, quando os animais foram sacrificados com 21 dias de diabetes. Os resultados de insulinemia foram analisados apenas no final do tratamento.

A Figura 3 mostra os resultados do volume urinário de 24 horas antes e depois do tratamento com insulina.

FIGURA 3: Volume urinário nos animais: Não Diabéticos (ND); Diabéticos tratados com Salina (DS); e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Os números 0 e 7 indicam respectivamente as 24 horas anteriores e posteriores ao período de uma semana de tratamento dos animais DS e DI. ANOVA de duas vias: Tratamento, Tempo e Interação significativos (P<0,001). Pós teste Bonferroni: *P<0,001 vs ND nos respectivos tempos, &P<0,001 vs DS no respectivo tempo. n=12 em cada grupo.

A Figura 4 mostra os resultados do conteúdo de glicose excretada na urina em 24 horas.

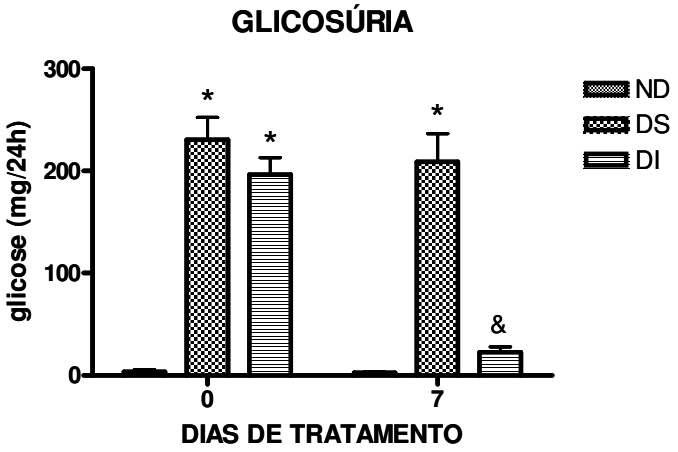

FIGURA 4: Glicosúria nos animais: Não Diabéticos (ND); Diabéticos tratados com Salina (DS); e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Os números 0 e 7 indicam respectivamente as 24 horas anteriores e posteriores ao período de uma semana de tratamento dos animais DS e DI. ANOVA de duas vias: Tratamento, Tempo e Interação significativos (P<0,001). Pós teste Bonferroni: *P<0,001 vs ND nos respectivos tempos, &P<0,001vs DS no respectivo tempo. n=12 em cada grupo.

A Figura 5 mostra a glicemia dos animais antes e depois do tratamento com insulina.

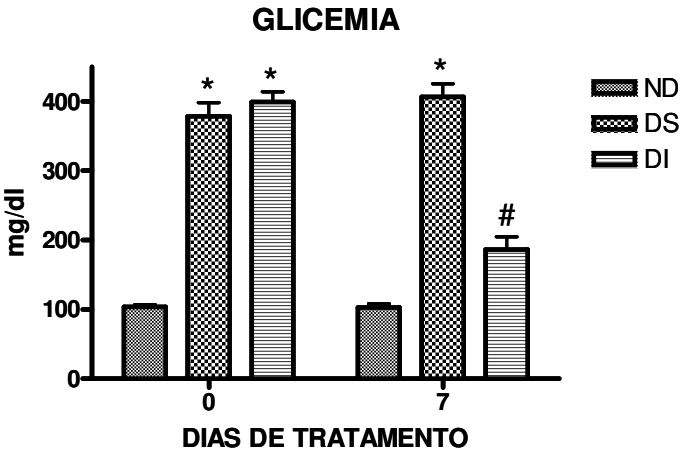

FIGURA 5: Resultados da glicemia dos animais: Não Diabéticos (ND); Diabéticos tratados com Salina (DS); e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Os números 0 e 7 indicam respectivamente antes e depois do período de uma semana de tratamento dos animais DS e DI. ANOVA de duas vias: Tratamento, Tempo e Interação significativos (P<0,001). Pós Teste Bonferroni: *P<0,001 vs. ND no respectivo tempo; #P<0,001 vs. ND e DS no respectivo tempo. n=12 em cada grupo.

A Figura 6 mostra os resultados de insulinemia no momento do sacrifício.

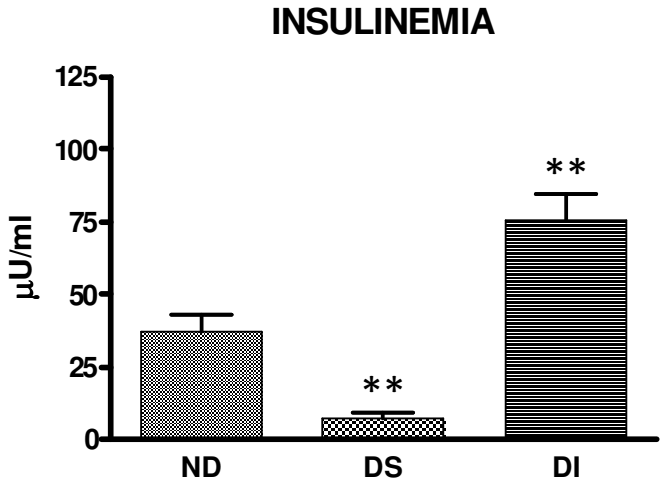

FIGURA 6: Insulinemia dos animais: Não Diabéticos (ND); Diabéticos tratados com Salina (DS); e Diabéticos tratados com Insulina (DI). ANOVA de uma via **P<0,01 ND e DS. n=8 em cada grupo.

Os parâmetros metabólicos demonstram o estado dos animais no momento da extração dos músculos. Verifica-se que foi instalado um quadro de diabetes grave, e que o tratamento com insulina foi eficiente em compensar parcialmente o diabetes, às custas de uma insulinemia que ficou cerca de 3 vezes maior do que os valores dos ND.

4.2 mRNA DO GLUT4

A figura 7 mostra o resultado do efeito do Diabetes Mellitus e da atividade contrátil na expressão do mRNA do GLUT4 em músculo sóleo.

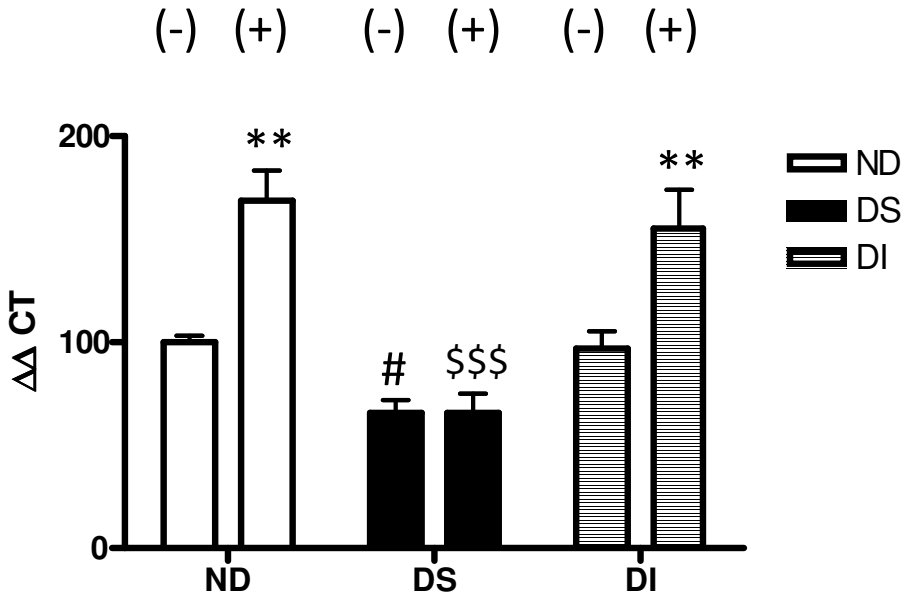

FIGURA 7: Expressão do mRNA do GLUT4 em músculos sóleos de animais: Não Diabéticos (ND), Diabéticos tratados com solução Salina (DS) e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. ANOVA de duas vias: Tratamento (P<0,001), contração (P<0,001), e interação (P<0,05) significativos. Pós teste Bonferroni: $$$P<0,001 vs ND e DI na respectiva condição. Teste "t" de Student: **P<0.01 vs respectivos (-) e #P<0,05 vs ND e DI na respectiva condição. n=6 em todos os grupos.

Estes resultados demonstram que o Diabetes Mellitus promoveu uma diminuição na expressão do mRNA do GLUT4, e que o tratamento com insulina restaurou o conteúdo do mRNA aos níveis de não diabéticos. Ainda, observa-se que a atividade contrátil promoveu um aumento na expressão de GLUT4 em músculo sóleo de animais não diabéticos e diabéticos tratados com insulina; porém não foi capaz de induzir o mesmo aumento em músculo de em animais diabéticos não tratados. Estes resultados são referentes à contração muscular supra-máxima (100 Hz), com a permanência dos tecidos no meio de incubação por mais 30 minutos após o fim dos estímulos.

Na tentativa de verificar o aumento da expressão do mRNA do GLUT4 nos animais DS, mais duas baterias de experimentos foram realizadas. Em uma, os tecidos permaneceram no meio de incubação por 1h após o estímulo contrátil, e na outra, a freqüência utilizada para a contração muscular foi de 70 Hz por 10 minutos com pulsos a cada 2,5 s, caracterizando um estímulo moderado.

A figura 8 mostra que nenhuma dessas tentativas foi eficiente em aumentar o mRNA do GLUT4 em músculo de animais diabéticos não tratados com insulina.

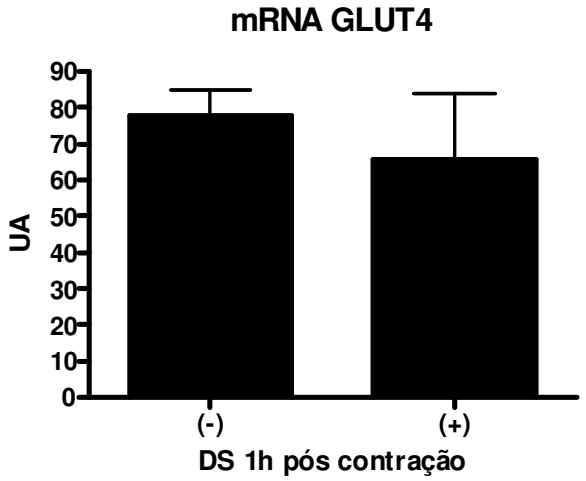

FIGURA 8: Expressão do mRNA do GLUT4 em músculo sóleo de animais Diabéticos tratados com solução Salina (DS) que permaneceram na incubação por 1 hora após os estímulos. Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. Sem diferença significativa (teste "t"de Student). n=4 em cada grupo.

A figura 9 mostra o resultado da contração muscular moderada (70 Hz).

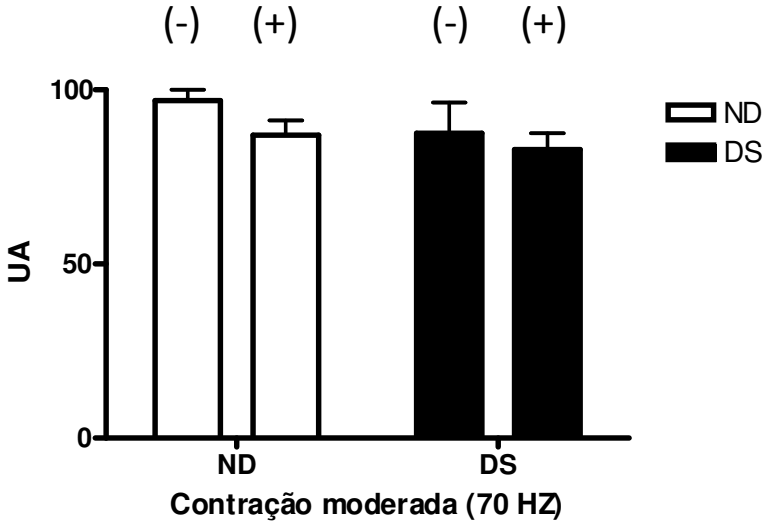

FIGURA 9: Expressão do mRNA do GLUT4 em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND) e Diabéticos tratados com solução Salina (DS). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. Não houve diferença significativa (ANOVA de duas vias). n=4 em todos os grupos.

4.3 Proteína GLUT4

A figura 10 mostra o resultado do efeito da atividade contrátil no conteúdo da proteína GLUT4.

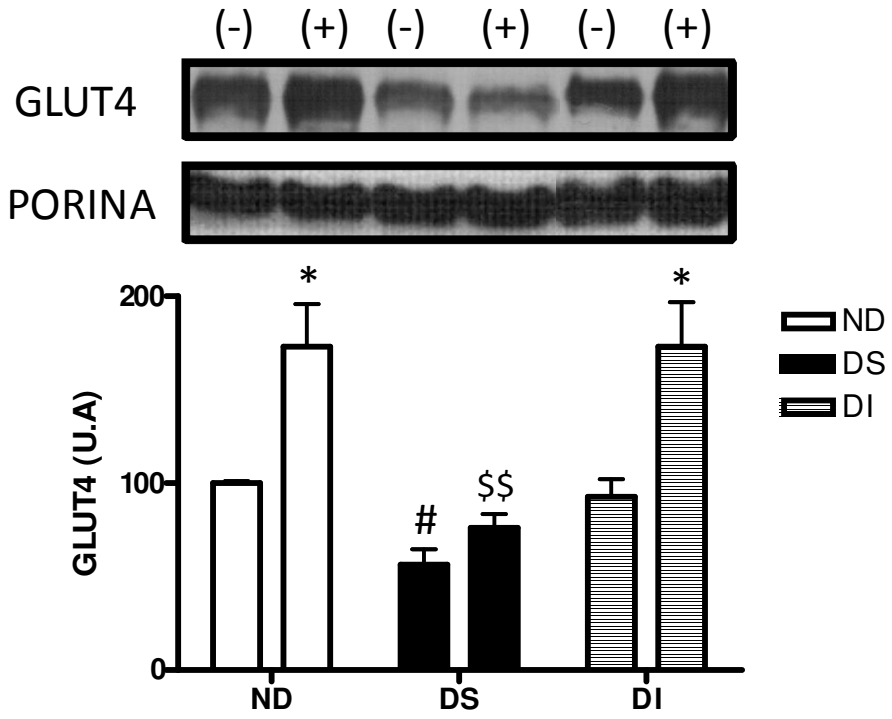

FIGURA 10: Expressão da Proteína GLUT4 em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND), Diabéticos tratados com solução Salina (DS) e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Acima estão os Blots representativos. Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. ANOVA de duas vias: Diferença significativa no Tratamento e na Contração (ambos P<0,01). Pós Teste Bonferroni: $$P<0,01 vs ND e DI na respectiva condição. Teste "t" de Student: #P<0,05 vs ND e DI na respectiva condição, *P<0.05 vs ND(-) e DI(-). n=6 em todos os grupos.

Observou-se que assim como o mRNA, a proteína GLUT4 aumentou em resposta à atividade contrátil nos animais ND e DI, o que não ocorreu nos animais DS, que apresentam diminuição do conteúdo de GLUT4 no estado basal. O tempo de permanência dos músculos no meio de incubação após o estímulo elétrico foi de 2 horas.

4.4 Vias de sinalização que levam à ativação do gene SLC2A4

A partir deste momento iniciamos a investigação das vias de sinalização ativadas pela atividade contrátil, que levam à ativação de fatores transcricionais responsáveis pela expressão do gene SLC2A4.

Iniciamos estudos com células em cultura (C2C12), utilizando ativadores das vias da AMPK e da CAMKII, respectivamente AICAR e cafeína (Figura 11).

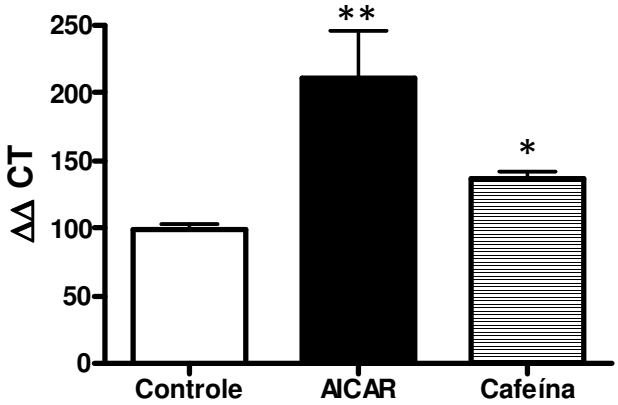

FIGURA 11: Resultados da expressão do mRNA do GLUT4 em células C2C12 tratadas com AICAR a 1 mM e Cafeína a 3 mM. ANOVA de uma via com pós teste Newman Keuls: *P<0,05 e **P<0,01 vs Controle (C). n=5 em todos os grupos.

Este resultado mostra a ativação das vias da AMPK (em maior magnitude) e da CAMKII levam ao aumento da expressão do mRNA de GLUT4. Uma vez que identificamos este aumento, partimos para estudos no promotor do gene SLC2A4 a fim de identificar a região que ambas atuam.

Os resultados da figura 12 mostram os ensaios realizados em células C2C12 transfectadas com plasmídeos que apresentam a região *enhancer* (ENH) do gene do GLUT4, ou que apresentam essa região com um dos 3 elementos responsivos (sítio de ligação do MEF2, E-Box e TRE) mutados (mostrados em detalhe na figura 2, na seção "Materiais e Métodos"). Após a transfecção, as células foram diferenciadas em miotubos e tratadas com AICAR (ativador da AMPK) ou cafeína (ativadora da CAMKII) e então foi quantificada a atividade CAT, que indica o grau de ativação da transcrição do gene SLC2A4.

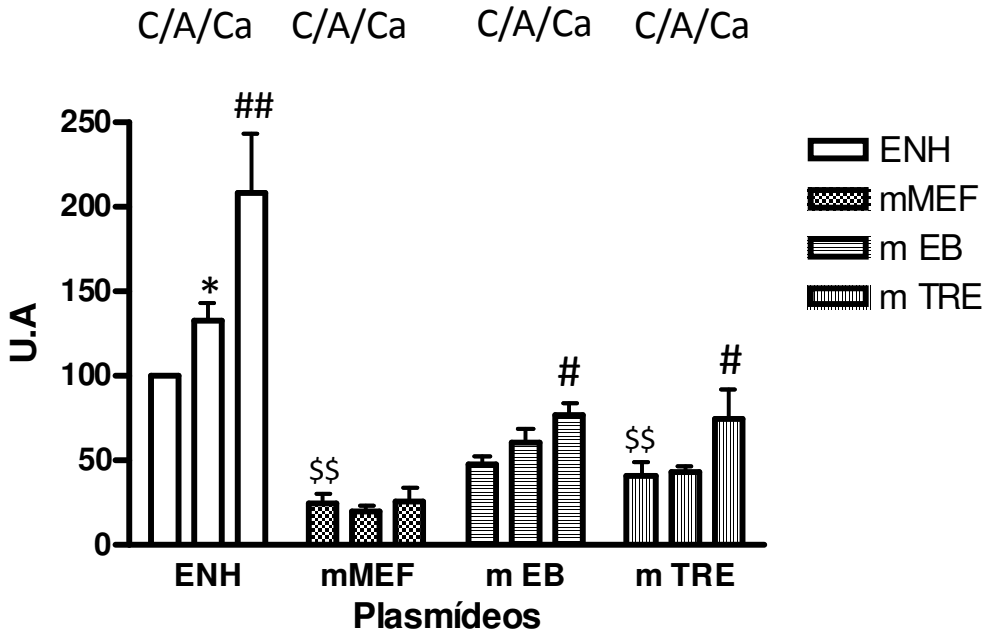

FIGURA 12: Resultados dos tratamentos em células C2C12 transfectadas com diferentes plasmídeos: ENH= GLUT4 *enhancer*; mMEF= GLUT4 *enhancer* com o domínio MEF2 mutado. mEB= GLUT4 *enhancer* com o domínio E-Box mutado e mTRE= GLUT4 *enhancer* com o domínio TRE mutado. Os sinais C/A/Ca acima, representam células Controle, tratadas com AICAR 1 mM e tratadas com cafeína 3 mM respectivamente. ANOVA de duas vias: Interação (P<0,05), Tratamento (P<0,001) e Plasmídeos (P<0,01) com diferença significativa. Pós teste Bonferroni: $$P<0,01 vs C ENH. ANOVA de uma via comparando C, A e Ca em células transfectadas com o mesmo plasmídeo #P<0,05 vs C; ##P<0,01 vs C. Teste "t" de Student: *P<0,05 vs C ENH. n=4 em todos os grupos.

Observou-se que as mutações nos domínios MEF e TRE levam a uma queda drástica na atividade CAT, e que o tratamento com cafeína promove a ativação do promotor do GLUT4, mesmo com as caixas E-Box e TRE mutadas. Além de reduzir drásticamente a atividade CAT basal, a mutação do domínio MEF2 leva à perda da resposta ao tratamento com AICAR e cafeína, indicando que os fatores MEF2 são essenciais na expressão do GLUT4 sob o estímulo contrátil.

Os resultados evidenciam que o AICAR aumentou o mRNA do GLUT4 em cerca de 100% quando o promotor está inteiro (Figura 11), efeito este que reduz para metade quando isolamos parte do promotor (Figura 12). Isto sugere que a AMPK deve estar agindo na região *enhancer* e também em outro sítio do promotor do GLUT4, como por exemplo no Domínio 1, para estimular expressão do SLC2A4.

O próximo passo foi identificar possíveis mecanismos afetados pelo diabetes, relacionados à perda da capacidade do músculo em aumentar a expressão de GLUT4 sob

estímulo contrátil. Nesta etapa, limitamo-nos a estudar apenas os grupos não diabéticos e diabéticos. Porém utilizamos também inibidores da AMPK e da CAMKII.

Os resultados da figura 13 mostram o efeito da inibição da AMPK (pelo *Compound C*) e da CAMKII (pelo KN93) na expressão do mRNA do GLUT4 induzida por atividade contrátil em músculo de animais não diabéticos.

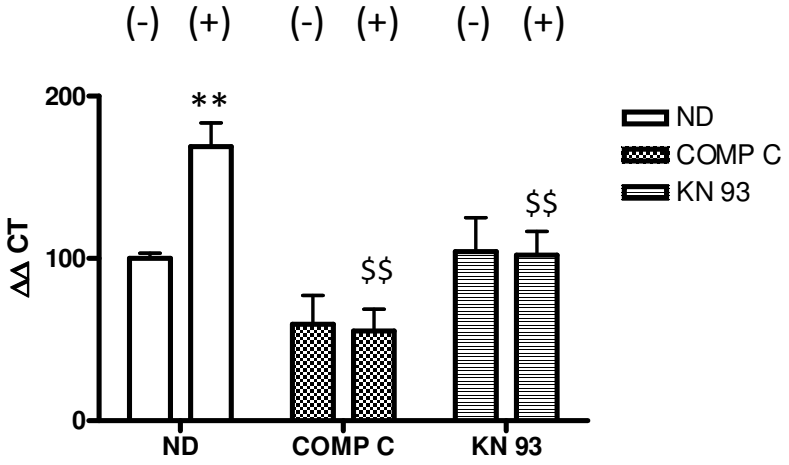

FIGURA 13: Expressão do mRNA do GLUT4 em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND), incubados em tampão puro, em tampão com *Compound C* (Comp C) a 50 µM ou em tampão com KN93 (KN93) a 10 µM. As incubações com as drogas se iniciaram 10 minutos antes da contração e duraram até o final do experimento. Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. ANOVA de duas vias: Diferença significativa na Interação (P<0,05) e no Tratamento (P<0,001). Pós Teste Bonferroni: $$P<0,01 vs ND na respectiva condição. Teste "t" de Student: **P<0.05 vs respectivo (-). n=5 em todos os grupos.

Estes resultados deixam claro que o aumento da expressão do mRNA do GLUT4 induzido pela contração muscular em animais ND está diretamente ligado à ativação da AMPK e da CAMKII. A inibição de qualquer uma destas cinases é suficiente para comprometer a resposta positiva, e suger um efeito aditivo.

A figura 14 mostra resultados da expressão do mRNA da subunidade δ da CAMKII em músculo sóleo de animais normais ou diabéticos, estimulados ou não a contrair.

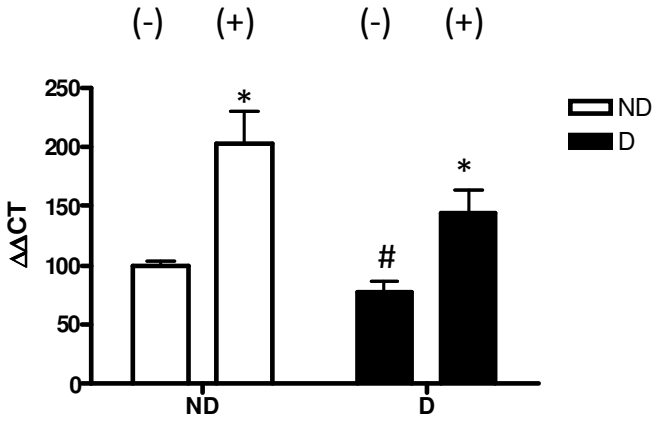

FIGURA 14: Expressão do mRNA de CAMKIIδ em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND) e Diabéticos (D). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. ANOVA de duas vias: Tratamento (P<0,001) e contração (P<0,05). Teste "t" de Student: #P<0.05 vs ND (-). e *P<0,05 vs respectivos (-). n=5 em todos os grupos.

Detectou-se uma pequena, mas significativa, redução na expressão de CAMKIIδ no estado diabético, mas a atividade contrátil aumentou a expressão desta isoforma em ambas as condições (ND e D).

A figura 15 mostra resultados da expressão do mRNA da subunidade α2 da AMPK em músculo sóleo de animais normais ou diabéticos, estimulados ou não a contrair.

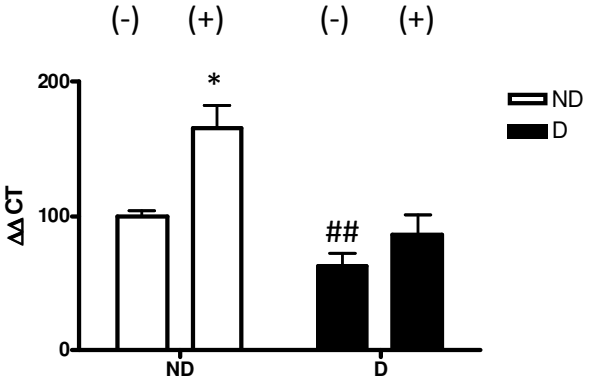

FIGURA 15: Expressão do mRNA da α2 AMPK em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND) e Diabéticos (D). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. ANOVA de duas vias: Tratamento (P<0,001) e contração (P<0,01) significativos. Teste "t" de Student: ##P<0.01 e *P<0,05 vs ND (-). n=6 em todos os grupos.

Houve uma redução na expressão do mRNA da AMPKα2 no diabetes, e um aumento na expressão da AMPKα2 sob estímulo contrátil em músculo de animais normais, mas não de animais diabéticos.

A figura 16 mostra o conteúdo e atividade da enzima AMPK em músculo sóleo de animais ND e D estimulados a contrair.

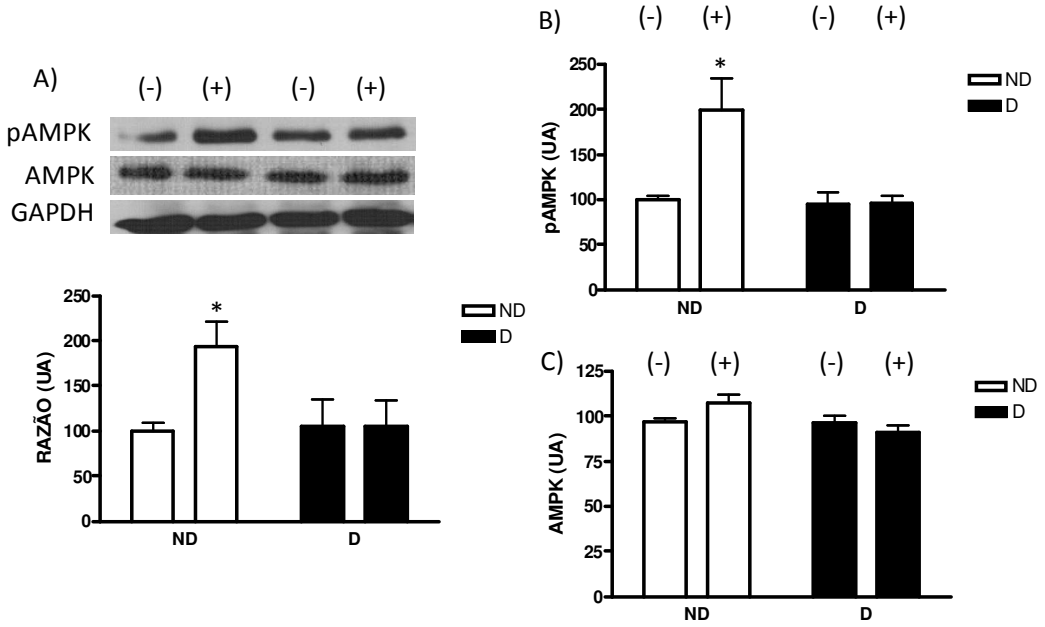

FIGURA 16: Expressão da Proteína AMPKα2 em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND) e Diabéticos (D). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. **A)** Acima estão os Blots representativos da pAMPKα2 (AMPK fosforilada), da AMPKα2 total e do marcador endógeno GAPDH. Razão pAMPK/AMPK: Teste "t" de Student: *P<0,05 vs ND (-). **B)** pAMPK: Teste "t" de Student: *P<0,05 vs ND (-). **C)** AMPK. Sem diferença significativa entre os grupos. A análise por ANOVA de duas vias não apontou diferença estatística na interação, no tratamento e nem na contração em nenhum dos 3 resultados. n=5 em todos os grupos.

Estes resultados nos mostram que a contração muscular promove o aumento da fosforilação da AMPKα2 apenas em músculo sóleo de animais ND. Diferente dos resultados obtidos com o mRNA da AMPKα2, não há redução do conteúdo protéico no estado diabético. O fato de não termos observado o aumento da expressão da proteína α2AMPK sob a atividade contrátil no grupo ND ja era esperado, pois o tempo de permanência na incubação após a contração foi de 10 minutos (tempo ideal para se avaliar a fosforilação), o que é pouco para que ocorram os processos de transcrição e a tradução gênica.

4.5 Expressão e atividade de ligação de fatores transcricionais

A seguir apresentamos os resultados da expressão (mRNA) e da atividade de ligação de alguns fatores transcricionais no promotor do GLUT4, em músculos sóleo.

Vale salientar que no ensaio *supershift* não se fez análise estatística, pois apenas confirmamos se a isoforma de interesse do fator transcricional participava do aumento ou da diminuição da ligação no sítio estudado. Logo, os gráficos referentes a este tipo de ensaio não apresentam análises estatísticas, e dizem respeito apenas à imagem que aparece na figura. Os gráficos foram adicionados para uma melhor visualização do fenômeno.

A figura 17 mostra o resultado da expressão de MEF2A em células C2C12 tratadas com AICAR 1 mM ou com Cafeína a 3mM.

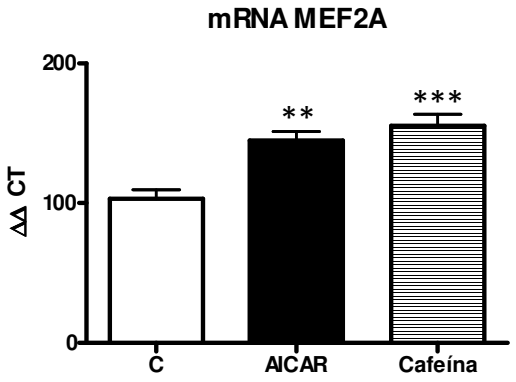

FIGURA 17: Resultados da expressão do mRNA do MEF2A em células C2C12 tratadas com AICAR a 1 mM ou Cafeína a 3 mM. ANOVA de uma via com pós teste Newman Keuls: **P<0,01; ***P<0,001, vs Controle. n=5 em todos os grupos.

Tanto o AICAR quanto a cafeína promoveram aumento da expressão do fator transcricional MEF2A.

A figura 18 mostra os resultados da expressão do mRNA de MEF2A e MEF2D em músculo sóleo de animais não diabéticos, diabéticos, e não diabéticos incubados com o inibidor de AMPK (*Compound C*) ou com o inibidor de CAMKII (KN93).

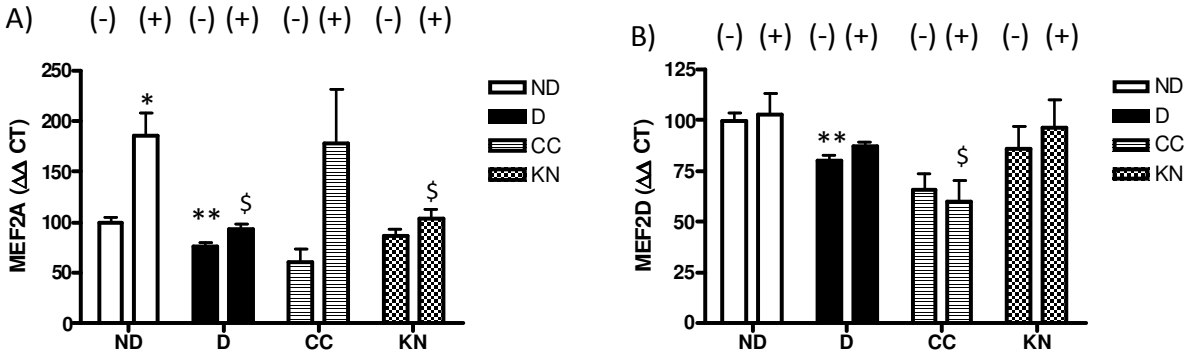

FIGURA 18: Expressão do mRNA de MEF2A e MEF2D em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND), Diabéticos (D), Não Diabéticos incubados com *Compound C* (CC) e Não Diabéticos incubados com KN93 (KN). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. **A)** mRNA de MEF2A. ANOVA de duas vias: contração (P<0,001) e tratamento (P<0,05) significativos. Pós teste Bonferroni: $P<0,05 vs ND(+) e CC(+). Teste "t" de Student: *P<0,05 vs ND(-) e **P<0,01 vs ND(-). **B)** mRNA de MEF2D: ANOVA de duas vias: Tratamento (P<0,01) significativo. Pós teste Bonferroni $P<0,05 vs ND(+) e KN(+). Teste "t" de Student: **P<0,01 vs ND(+). n=5 no grupo ND e n=4 nos demais grupos.

Verificou-se que tanto o MEF2A quanto o MEF2D são menos expressos em músculo sóleo de animais diabéticos. A contração muscular aumenta a expressão de MEF2A no grupo ND, já nos grupos D e KN isso não ocorre. Mesmo que não significativo, há um forte indício de que o inibidor de AMPK (*compound C*) não afeta o aumento da expressão de MEF2A pela atividade contrátil. Por outro lado, a expressão do MEF2D não se altera com a contração muscular em nenhuma condição experimental.

A figura 19 mostra os resultados da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do MEF2.

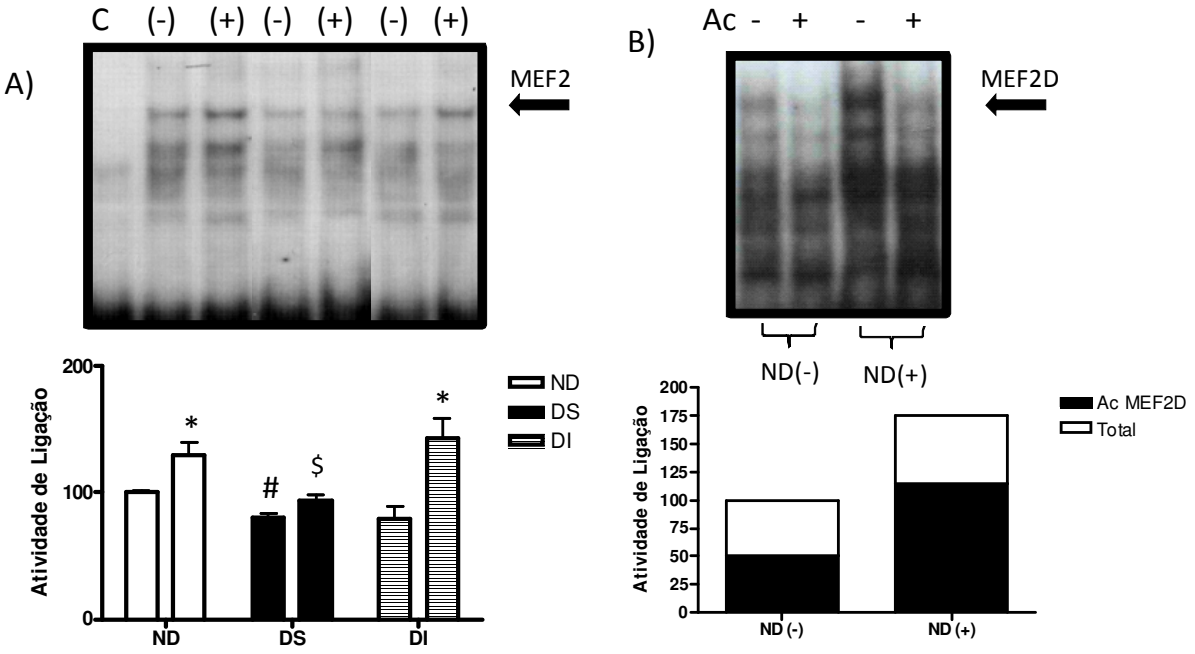

FIGURA 19: **A)** Atividade de ligação de proteínas nucleares sítio de ligação de MEF2 em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND), Diabéticos tratados com solução Salina (DS) e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. A letra C indica a competição com a sonda fria. ANOVA de duas vias: Diferença significativa na interação, no tratamento e na contração (em todos P<0,05). Pós teste Bonferroni: $P<0,05 vs ND e DI na respectiva condição. Teste "t" de Student: *P<0.05 vs ND(-); #P<0,05 vs ND (-). N=5 em todos os grupos. **B)** Ensaio *supershift* no grupo ND. Acima a legenda indicando a ausência "-" ou presença "+" de anticorpo anti MEF2D em contato com as amostras antes da eletroforese. Abaixo, gráfico representativo, aonde a caixa preta representa a participação da isoforma MEF2D, e a soma das caixas preta e branca representa a ligação de todas as isoformas neste sítio.

Estes resultados mostram que há um aumento de ligação de fatores transcricionais no sítio de ligação para MEF2 após estímulo contrátil em músculo de em animais ND e DI, o que não ocorre em músculo de animais DS. Além disso, há uma redução de ligação destes fatores no estado DS (-) em relação ao ND (-). Estes resultados estão de acordo com os mostrados na figura 18, que indicam que no estado diabético há uma diminuição da expressão dos mRNAs de MEF2A e MEF2D, que se reflete em menor ligação ao seu sítio específico.

A figura 19B mostra por meio de competição com anticorpo específico (ensaio *supershift*) que a isoforma MEF2D é responsável por parte da ligação observada no sítio de ligação ao MEF2. O desaparecimento parcial da banda na presença do anticorpo sugere que além do MEF2D pode haver a ligação de outros fatores, como o MEF2A, que pode atuar como homodímero.

A figura 20 mostra os resultados da atividade de ligação das proteínas MEF2 sob a atividade contrátil em músculo de animais ND, incubados na presença ou não dos inibidores de AMPK (*Compound* C) e CAMKII (KN93).

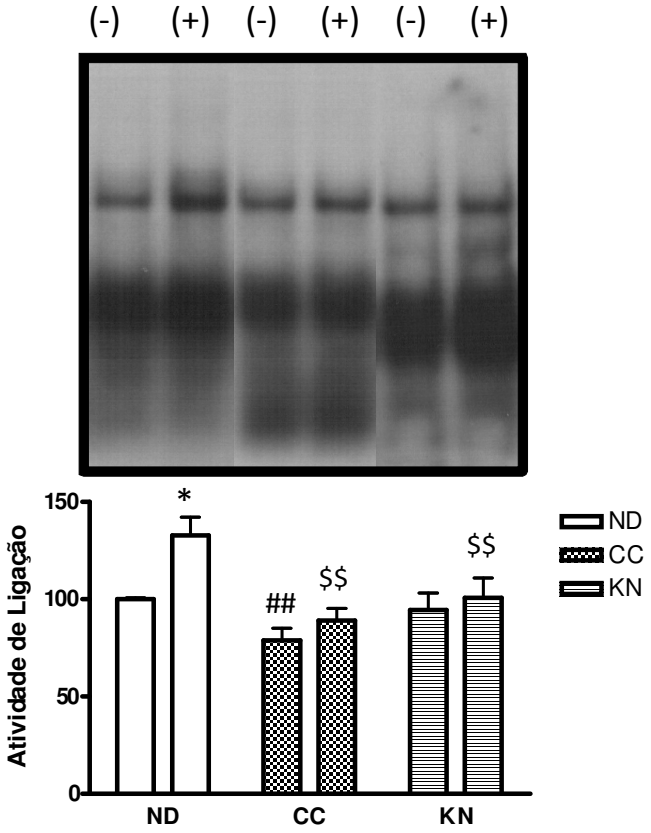

FIGURA 20: Atividade de Ligação de proteínas nucleares no sítio de ligação de MEF2 em músculo sóleo de animais Não Diabéticos (ND). As letras CC e KN representam a presença dos inibidores *Compound C* e KN93 respectivamente no tampão de incubação no momento da contração de músculos sóleos de animais ND. Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. ANOVA de duas vias: Diferença significativa no tratamento (P<0,001) e na contração (P<0,05). Pós teste Bonferroni: $$P<0,01 vs ND (+). Teste "t" de Student: *P<0.05 vs ND(-); ##P<0,01 vs ND (-). N=6 no grupo ND n=4 nos demais grupos.

O resultado da figura 20 mostra que na presença de qualquer um dos dois inibidores, há uma perda do aumento de ligação do MEF2 induzido pela contração muscular, mostrando que tanto a AMPK quanto a CAMKII são essenciais para este fenômeno.

A figura 21 mostra os resultados da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio Domínio 1, no qual se liga o fator transcricional GEF (Fator de aumento do GLUT4), em músculo de animais ND, DS e DI (Fig. 21A), e o efeito dos inibidores de AMPK (*Compound C*) e CAMKII (KN93), na resposta à da contração muscular em músculo de animais ND (Fig. 21B).

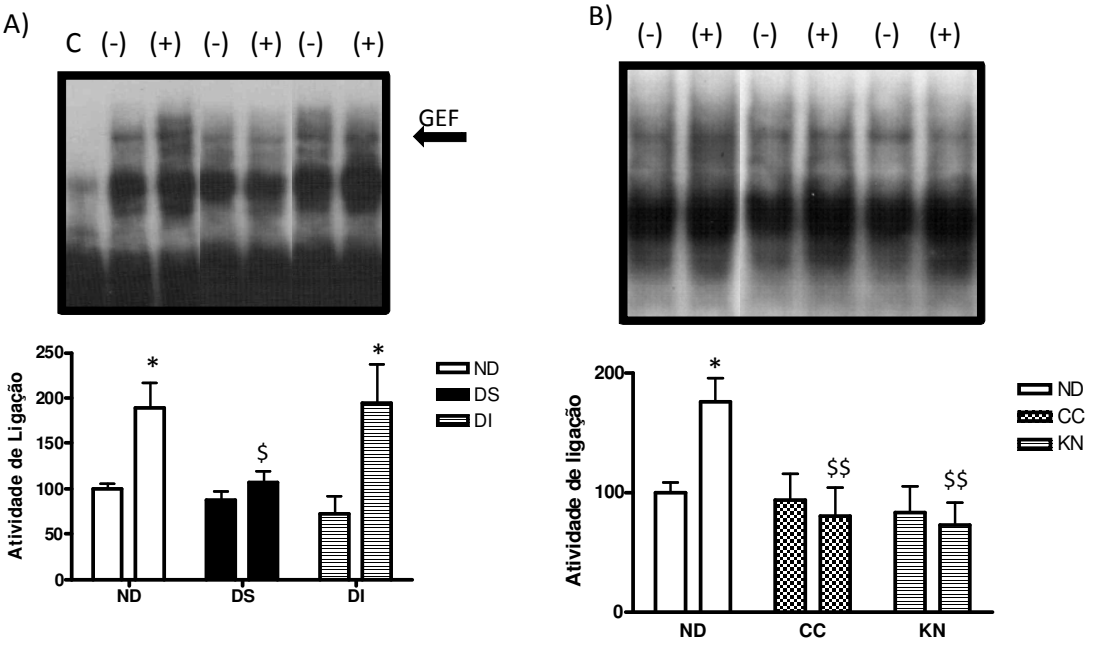

FIGURA 21: **A)** Atividade de Ligação de proteínas nucleares ao sítio Domínio 1 em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND), Diabéticos tratados com solução Salina (DS) e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. A letra C indica a competição com a sonda fria. ANOVA de duas vias: Diferença significativa na Contração (P<0,001). Pós teste Bonferroni: $P<0,05 vs ND e DI na respectiva condição. Teste "t" de Student: *P<0,05 vs respectivos (-). **B)** Atividade de Ligação de proteínas nucleares no Domínio1 em músculo sóleo de animais Não Diabéticos (ND). As letras CC e KN representam a presença dos inibidores *Compound C* e KN93 respectivamente no tampão de incubação no momento da contração de músculos sóleos de animais ND. N=5 na figura A e n=4 na figura B.

Os resultados da figura 21 mostram que a contração muscular aumenta a ligação de fatores transcricionais no Domínio 1 em músculo de animais ND e DI, o que não ocorre nos animais DS. Além disso, na presença de qualquer um dos dois inibidores, induz a perda total do efeito da contração muscular, mostrando que tanto a AMPK quanto a CAMKII são essenciais para este fenômeno.

A atividade de ligação do GEF se comporta da mesma maneira que a do MEF2. Estes 2 fatores transcricionais estão relacionados com o aumento da expressão do GLUT4, e os resultados indicam que o diabetes prejudica atividade de ligação de ambos em músculo sóleo submetido à contração muscular, efeito este que pode estar relacionado a um prejuízo na atividade das vias da AMPK e da CAMKII.

A figura 22 mostra a expressão do mRNA do fator induzido por hipóxia (HIF-1α) em músculos de animais ND, DS e DI estimulados ou não a contrair.

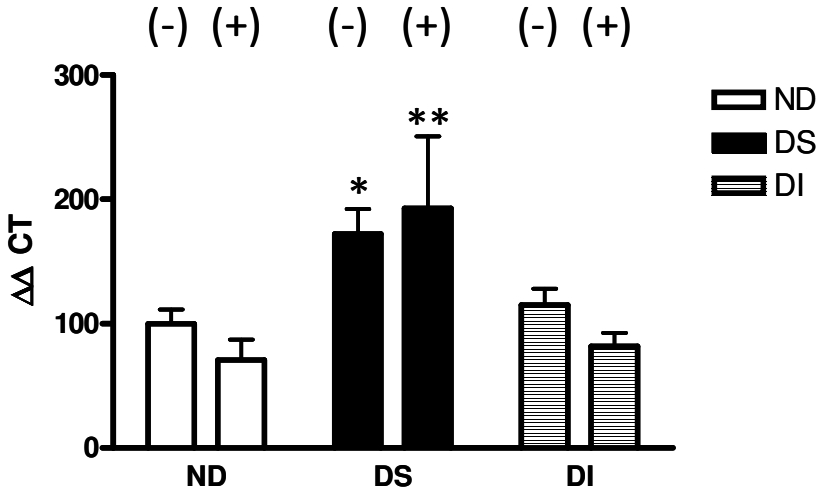

FIGURA 22: Expressão do mRNA do HIF-1α em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND), Diabéticos tratados com solução Salina (DS) e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. ANOVA de duas vias: Tratamento significativo (P<0,05). Pós teste Bonferroni: $P<0,05 vs ND e DI na respectiva condição. Teste "t" de Student: **P<0.01 vs ND(-). n=6 em todos os grupos.

O resultado da figura 22 mostra o aumento da expressão do mRNA do HIF-1α em músculo de DS, o que pode indicar menor oxigenação dos tecidos no estado diabético.

A figura 23 mostra a atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio E-Box, ao qual se ligam as proteínas da família basic Helix Loop Helix (bHLH), que inclui o HIF-1α.

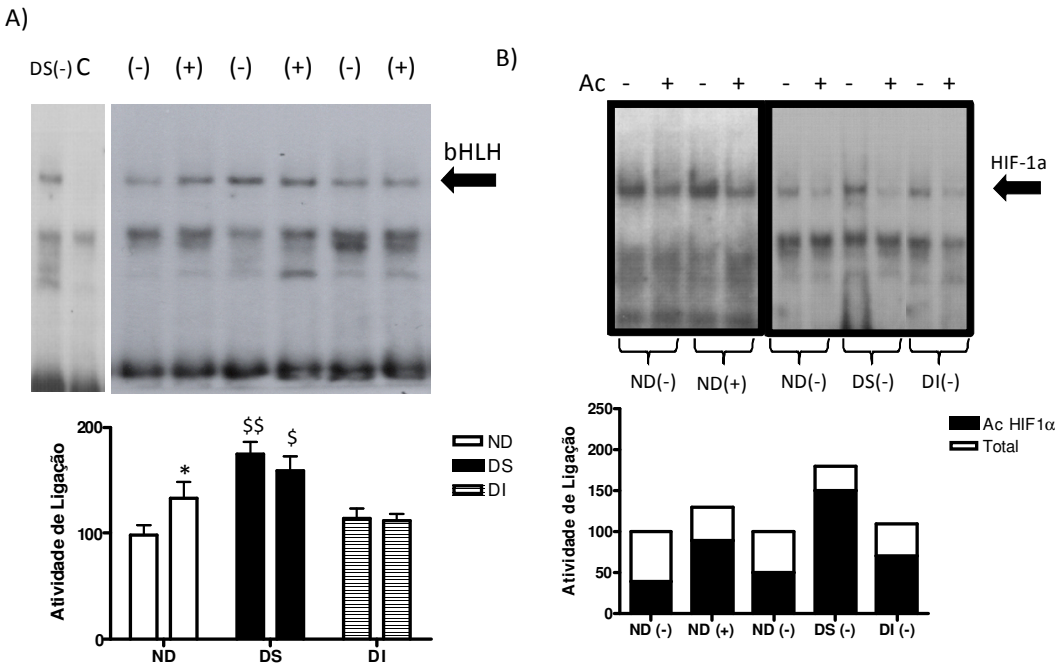

FIGURA 23: **A)** Atividade de ligação de proteínas bHLH no sítio E-Box em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND), Diabéticos tratados com solução Salina (DS) e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. A letra C indica a competição com a sonda fria. ANOVA de duas vias: Diferença significativa no tratamento (P<0,001). Pós teste Bonferroni: $P<0,05 e $$P<0,01 vs ND e DI nas respectivas condições Teste "t" de Student: *P<0.05 vs ND(-). N=5 em todos os grupos. **B)**: Ensaio *supershift* feito em músculo de animais ND, DS e DI**.** Acima a legenda indicando a ausência "-" ou presença "+" de anticorpo anti HIF-1α em contato com as amostras antes da eletroforese. Abaixo o gráfico representativo, aonde a caixa preta representa a participação da isoforma MEF2D, e a soma das caixas preta e branca representa a ligação de todas as isoformas neste sítio.

Os resultados da figura 23 mostram que a contração muscular aumenta a atividade de ligação do HIF-1α no E-Box apenas em músculos sóleos de animais, o que é confirmado pelo ensaio *supershift*. O HIF-1α foi descrito como ativador da expressão do GLUT4, por este ponto de vista, os resultados da figura 23 podem ser controversos, pois no diabetes, há diminuição da expressão do GLUT4.

Diante da questão da ligação do HIF-1α ter aumentado no estado diabético, decidimos investigar a expressão do co-ativador do HIF-1α, o p300 no diabetes.

A figura 24 mostra a expressão do mRNA do co-ativador p300 sob a atividade contrátil em animais não diabéticos (ND) e diabéticos (DS).

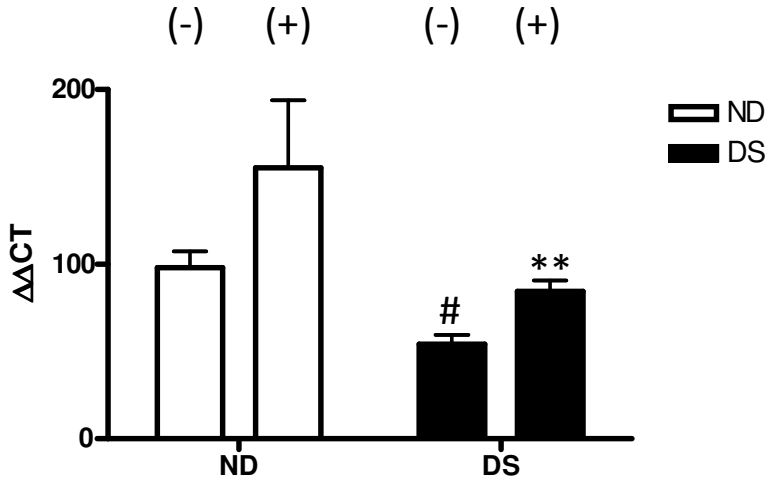

FIGURA 24: Expressão do mRNA do p300 em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND) e Diabéticos tratados com solução Salina (DS). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. ANOVA de duas vias: Tratamento significativo (P<0,05). Teste "t" de Student: **P<0.01 vs DS(-) e #P<0,05 vs ND(-). n=3 em todos os grupos.

O resultado da figura 24 mostra que há uma diminuição da expressão do mRNA do p300 no estado diabético, e que a atividade contrátil aumenta a expressão deste fator nos animais DS (muito provavelmente observaríamos este aumento no grupo ND com o aumento do "n" do grupo. Este resultado é muito importante, pois mostra que apesar de o HIF-1α ser um fator estimulador da expressão do GLUT4, e ter sua atividade de ligação aumentada no estado diabético, ocorre uma redução da expressão do co-ativador p300, o que provavelmente contribuiu para não aumentar a expressão do GLUT4.

A figura 25 mostra a expressão do mRNA da isoforma do receptor do hormônio Tireoidiano TRα1 sob a atividade contrátil em animais não diabéticos (ND), diabéticos (DS) e diabéticos tratados com insulina (DI).

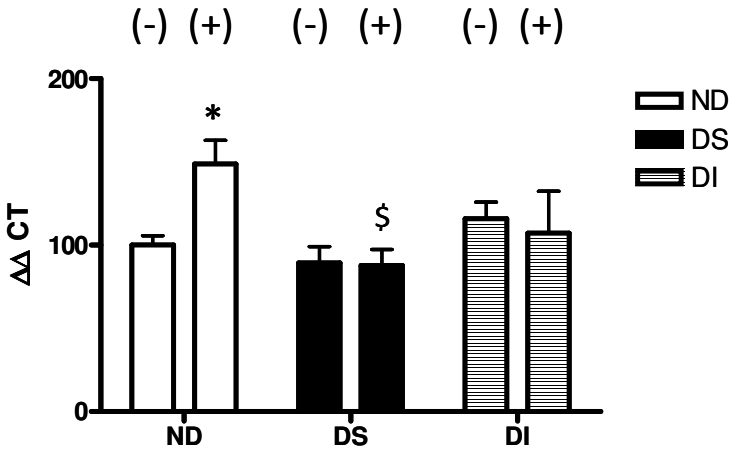

FIGURA 25: Expressão do mRNA do TRα1 em músculos sóleos de animais: Não Diabéticos (ND), Diabéticos tratados com solução Salina (DS) e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. ANOVA de duas vias com Pós teste Bonferroni: $P<0,05 vs ND(+). Teste "t" de Student: *P<0.05 vs ND(-). n=4 em todos os grupos.

O resultado da figura 25 mostra que a expressão do mRNA do TRα1, que é descrito como ativador da expressão do GLUT4, aumenta pela atividade contrátil só nos animais ND, e que o Diabetes não altera a sua expressão.

A figura 26 mostra a atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio do elemento responsivo ao TR (TRE), no qual se ligam os TRs.

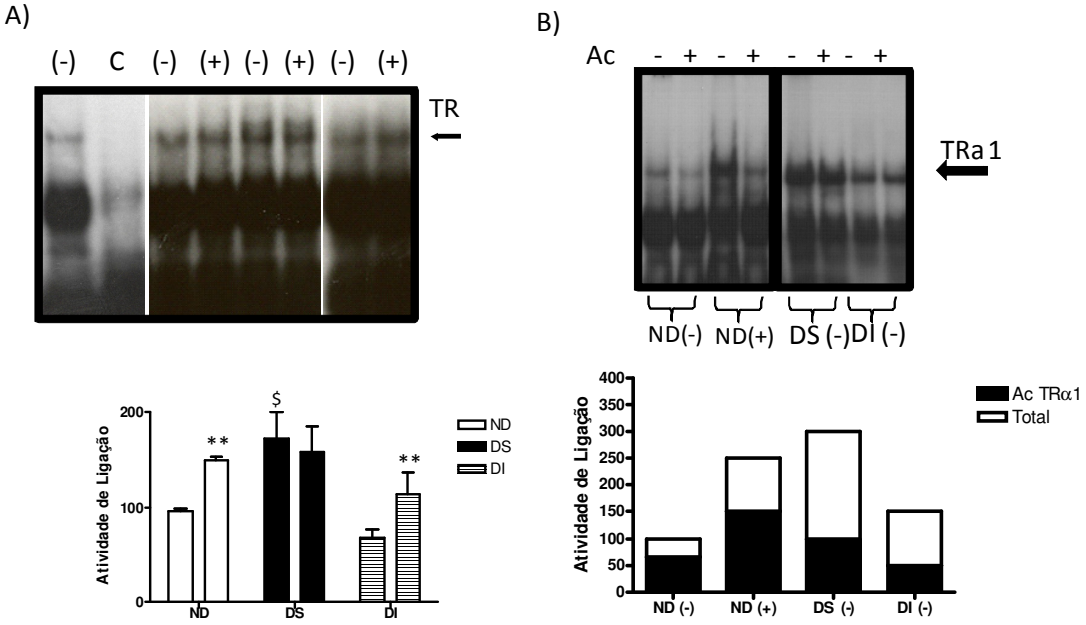

FIGURA 26: Atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio TRE em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND), Diabéticos tratados com solução Salina (DS) e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. **A)** A letra C indica a competição com a sonda fria. ANOVA de duas vias: Diferença significativa no Tratamento (P<0,01). Pós teste Bonferroni: $P<0,05 vs ND e DI na respectiva condição. Teste "t" de Student: **P<0,01 vs respectivos (-). N=5 em todos os grupos. **B)** Ensaio *Supershift*. Acima a legenda indicando a ausência "-" ou presença "+" de anticorpo anti TRα em contato com as amostras antes da eletroforese. Abaixo gráfico representativo. aonde a caixa preta representa a participação da isoforma MEF2D, e a soma das caixas preta e branca representa a ligação de todas as isoformas neste sítio.

Os resultados da figura 26 mostram que há aumento de ligação do TRα1 pela atividade contrátil em músculo de animais ND. Também observa-se um aumento nesta ligação no estado diabético, independentemente de contração, o deve estar relacionado a outros fatores transcricionais que não o TRα, como por exemplo, o TRβ e o RXR (receptor de ácido retinóico), os quais não estão descritos como ativadores da expressão do GLUT4. Quanto ao efeito da contração, observa-se que o mesmo desparece em animais diabéticos não tratados, e é recuperado pelo tratamento com insulina.

A figura 27 mostra a atividade de ligação das proteínas nucleares no sítio de Ligação para o NF-κB.

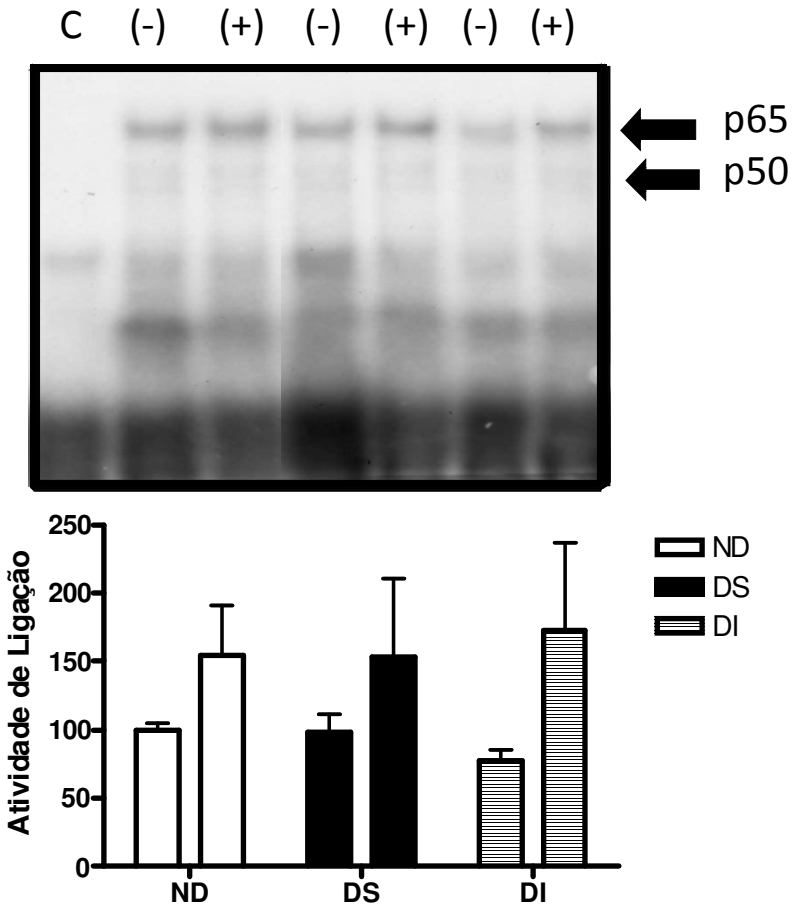

FIGURA 27: Atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio NF-κB em músculo sóleo de animais: Não Diabéticos (ND), Diabéticos tratados com solução Salina (DS) e Diabéticos tratados com Insulina (DI). Os símbolos (-) e (+) representam respectivamente os tecidos controles e estimulados eletricamente para contração. A letra C indica a competição com a sonda fria. A análise foi feita encima da soma das duas subunidades (p50 e p65) do NF-κB ANOVA de duas vias: Diferença significativa apenas na Contração ($P<0,05$). N=5 em todos os grupos.

Estes resultados mostram que a atividade de ligação do NF-κB não sofre alteração significativa nem do estado diabético, nem da contração muscular.

5 DISCUSSÃO

5.1 Expressão do gene SLC2A4

No presente estudo, o diabetes promoveu uma diminuição significativa no conteúdo de mRNA e de proteína GLUT4 no músculo sóleo de animais diabéticos, o que já foi descrito na literatura (HWANG et al., 2005). O tratamento dos animais diabéticos com insulina restaurou o conteúdo de mRNA e proteína GLUT4, indicando que, pelo menos nesta condição experimental, o efeito do diabetes é reversível.

A literatura já revelou que exercícios agudos podem melhorar a homeostasia glicêmica, por melhorar a captação de glicose pelo tecido muscular esquelético (DE FRONZO et al., 1981), o que envolve aumento da proteína GLUT4 (HOLLOSZY, 1976; GOODYEAR; KAHAN, 1998). É importante destacar que a grande maioria dos trabalhos envolvendo exercício mostra aumento da expressão do gene SLC2A4 após estímulo crônico (KRANIOU; CAMERON-SMITH; HARGREAVES, 2006; NEWFER; DOHM, 1993). A prática regular de exercício induz uma série de alterações metabólico-hormonais que poderiam estar relacionadas diretamente com o aumento da expressão do GLUT4, e assim, o efeito sobre o gene SLC2A4 não seria específico da contração muscular. Entretanto, nossos resultados mostram que a contração muscular aguda, *per se*, aumenta a expressão do GLUT4, o que já fora demonstrado em nosso laboratório, (SILVA et al., 2005; LIMA et al., 2009), ressaltando a importância da atividade contrátil em determinar a participação da musculatura esquelética no controle da homeostasia glicêmica.

Sabe-se que o treinamento físico é capaz de aumentar o conteúdo de GLUT4 em músculos tanto de humanos como de ratos diabéticos do tipo 2, que apresentavam uma boa secreção de insulina (O'GORMAN et al., 2006; TANG et al., 2005). Entretanto, no presente estudo, a contração muscular aguda não foi capaz de aumentar a expressão do gene SLC2A4 em músculo de animais diabéticos descompensados. Então, ainda conjeturamos duas hipóteses para a ausência de efeito sobre o GLUT4 em músculo de animais: 1) os animais diabéticos poderiam estar com os tecidos em condição transcricional alterada, tendo resposta mais lenta, mas ainda preservada; e 2) o estímulo supra-máximo aplicado em um tecido debilitado poderia ter sido excessivamente injuriante, podendo causar danos morfo-funcionais à fibra que impediram a resposta positiva. Baseados nestas 2 hipóteses, realizamos experimentos adicionais aumentando o

tempo de incubação dos tecidos (1 hora em lugar de 30 minutos) e reduzindo a intensidade do estímulo elétrico (estímulo a 70 Hz por 20 minutos em lugar de estímulo a 100 Hz por 10 minutos). Em ambos os experimentos nenhum aumento de expressão do SLC2A4 foi observado, confirmando que músculo de ratos com diabetes induzido respondem à contração muscular aguda.

Atualmente, existe uma discussão muito grande em relação a qual tipo e intensidade de exercício é melhor para o controle glicêmico. Egan et al. (2010), submeteram indivíduos sedentários saudáveis a uma simples série de exercício aeróbico em cicloergômero, com duas intensidades diferentes, baixa (40% do VO_2 máx) ou moderada/alta (80% VO_2 máx), e observaram o aumento de fosforilação de AMPK, ACC, p38 MAPK e CAMKII apenas nos indivíduos que realizaram a atividade de intensidade moderada/alta. Estas proteínas estão relacionadas com a translocação de GLUT4, e provavelmente também com expressão de GLUT4, e portanto sugerem que apenas a atividade moderada/alta seria capaz de aumentar a expressão do SLC2A4. Vale salientar que em ambos os grupos do estudo acima citado, o gasto energético (400 kcal, por medida indireta) foi exatamente o mesmo, ou seja, os indivíduos que realizaram a atividade de intensidade moderada/alta terminaram o exercício antes, e mesmo assim tiveram maiores benefícios.

Importante resultado do presente estudo foi a resposta de músculos de animais diabéticos tratados com insulina por 7 dias, nos quais a contração muscular induziu aumento da expressão de SLC2A4 exatamente como em músculo de animais não diabéticos. É importante chamar a atenção que no meio de incubação não havia insulina, e, portanto, o resultado obtido é totalmente relacionado a um ajuste adquirido durante o período de tratamento. Esta resposta indica que o tecido muscular adquiriu características de tecido de animais saudáveis.

A literatura nos traz dados mostrando que a insulina está relacionada com a melhora do processo de tradução de mRNA em proteína. Miranda et al. (2008), incubaram músculos *epitrochlearis* de ratos Wistar com insulina por apenas 30 minutos, e verificaram um aumento de 50% na taxa basal de síntese protéica. Os autores associaram estes resultados ao aumento de EF2 e EF4e, que são dois "fatores de alongamento" muito importantes no processo traducional, envolvidos no direcionamento e fixação do mRNA na estrutura ribossomal. No nosso estudo, o tratamento com insulina dos diabéticos muito provavelmente estimulou a atividade estes fatores, facilitando a tradução do mRNA em proteína.

Uma observação importante a fazer, é que os animais DI apresentaram uma insulinemia muito elevada (cerca de 3x maior que a dos ND), e apesar disso a glicemia não retornou aos níveis normais, o que nos sugere um estado de resistência periférica à insulina. Entretanto, nesta condição, apesar da glicemia não ter se normalizado completamente (160 mg/dl), foi recuperada a capacidade da contração muscular *per se* aumentar a expressão do SLC2A4 em músculo sóleo. Isto indica que uma compensação do estado diabético, pelo parcial, é necessária para recuperar o efeito contração muscular, o que pode estar relacionado com níveis normais/elevados de insulina. Mais do que isto, esses resultados indicam que o indivíduo diabético não pode estar descompensado para obter os benefícios da atividade física.

5.2 Vias de sinalização ativadas pela contração muscular e expressão do gene SLC2A4

Nossos resultados indicam que ativação da via do cálcio (pela Cafeína) ou da AMPK (pelo AICAR) levam ao aumento da expressão do mRNA de GLUT4 em células C2C12, e que ambos os estimuladores regulam ativadores transcricionais que agem na região *enhancer* (região que compreende o sítio de ligação do MEF2, o E-Box e o elemento responsivo aos TRs). Entretanto, a magnitude do efeito do AICAR foi maior quando o promotor do SLC2A4 estava integro (fato observado pelo grande aumento do mRNA de GLUT4 em células tratadas com AICAR), comparando com o efeito observado apenas na presença da região *enhancer*. Estes dados nos levam a pensar que enquanto a cafeína atua no aumento expressão do gene SLC2A4 por ativar fortemente a região enhancer, a AMPK, além de também atuar nessa região, deve estar agindo em outro sítio, como por exemplo, no Domínio 1 (sítio em que se liga o fator de aumento do GLUT4 – GEF).

Já foi mostrado (SMITH et al., 2008) em músculo de ratos wistar submetidos a um protocolo de natação agudo (5 séries de 17 minutos com intervalo de 3 minutos entre as séries), ativação da proteína CAMKII, acetilação da histona H3, e aumento da ligação do MEF2A ao promotor do GLUT4, efeitos que foram revertidos quando os animais foram tratados com KN93 (inibidor específico de CAMKII). Também já foi verificado (HOLMES et al., 2005) que ratos tratados com AICAR aumentam a fosforilação do GEF e não de MEF2, assim como o aumento da atividade de ligação destes 2 fatores transcricionais aos seus sítios específicos (que foram os mesmos oligos que nós utilizamos no presente estudo). Apesar de não fosforilar o MEF2

diretamente, a AMPK pode estar envolvida na sua ativação, pois fosforila HDAC5 (Histona Deacetilase; normalmente associada ao MEF2), induzindo a dissociação do complexo, e assim liberando a atividade transcricional do MEF2 (MC GEE; HARGREAVES, 2006). Em conjunto, estes estudos explicam os nossos resultados que embasam a hipótese de que a cafeína ativa as proteínas MEF2 e que a AMPK ativa diretamente o GEF e indiretamente o MEF2, todos levando a aumento da expressão do SLC2A4.

Nossos resultados ainda mostraram que a mutação em qualquer um dos domínios de ligação dos 3 fatores que se ligam na região *enhancer* induzu ma drástica redução da atividade basal da CAT (que representa a expressão do SLC2A4). Este dado já era esperado, pois como elucidamos na introdução, os ligantes destes domínios (MEF2, HIF-1α e TRα) estão diretamente relacionados ao aumento da expressão do gene SLC2A4 (LIMA et al., 2009; SANTALUCIA et al., 2001). Entretanto, a participação da via da AMPK e CAMCKII nesta regulação ainda não havia sido claramente evidenciada em estudos de gene repórter. Neste sentido observamos que apesar da drástica redução da atividade da CAT basal com a mutação dos domínios TRE e E-Box, a cafeína ainda promoveu um aumento significativo da atividade CAT, sugerindo que os domínios que se mantiveram íntegros foram suficientes para garantir o efeito. Nesta resposta, provavelmente o domínio do MEF2 exerce um papel chave. Por outro lado, o efeito da AMPK (avaliado pelo emprego do AICAR), se mostrou menos efetivo quando a região enhancer está integra, porém qualquer uma das mutações aboliu esse efeito.

É importante relembrar que o tratamento com cafeína ativa não só a CAMKII, mas também a calcineurina e a PKC. A PKC parece estar mais relacionada com o transporte de glicose, e não com a expressão do GLUT4 (IMAMURA et al., 2003). Quanto à calcineurina, foi observado que o emprego de um bloqueador específico, a ciclosporina A, não afeta o aumento do GLUT4 induzido pelo exercício (GARCIA-ROVES et al., 2005).

A participação dessas vias ainda foi investigada pelo emprego de seus bloqueadores. Na presença de KN93 (inibidor de CAMKII) ou *Compound C* (inibidor de AMPK), a contração muscular foi incapaz de aumentar a expressão do gene SLC2A4, reiterando o papel dessas cinases no estímulo transcricional do SLC2A4 induzido pela contração muscular.

Pouco se conhece dessas vias em músculo de diabéticos. A partir deste ponto iniciamos a investigação da expressão e da atividade da AMPK, bem como a expressão de CAMKII nos animais diabéticos, para tentar explicar por que o músculo sóleo de animais diabéticos não

responde positivamente à atividade contrátil. Verificamos que no diabetes há uma redução (discreta, mas significativa) da expressão da isoforma CAMKIIδ. Sabe-se que o exercício agudo de intensidade moderada induz uma rápida fosforilação da CAMKIIδ em músculo de humanos, a qual é maior em exercício de alta intensidade (ROSE; KIENS; RICHTER, 2006). Não há nenhum dado na literatura mostrando o aumento da expressão de CAMKII pelo exercício, nem pela contração muscular "in vitro", assim como não há dados sobre o efeito do diabetes. Em relação ao efeito da contração muscular em nosso estudo, é interessante destacar que se observou aumento da expressão do mRNA da CAMKII em músculos tanto de animais ND quanto de animais DS. Estes resultados nos surpreenderam, pois não esperávamos resposta, especialmente em músculo de animais diabéticos.

Quanto à AMPK, observamos que no estado diabético houve uma diminuição na expressão do seu mRNA, mas não da proteína AMPK (subunidade α2). A AMPK já foi descrita em ratos diabéticos como tendo fosforilação reduzida com conteúdo inalterado (ZOU et al., 2009), e em camundongos diabéticos como tendo fosforilação inalterada com conteúdo reduzido (LI; LI; REN, 2009). Ainda que não haja um consenso em relação à expressão e à atividade da AMPK no diabetes, estes resultados, somados aos nossos, sugerem que o diabetes compromete a via da AMPK.

Independentemente do efeito do diabetes sobre a atividade basal da AMPK, o presente estudo evidenciou que no estado diabético a contração muscular não aumentou a fosforilação dessa enzima, como ocorre em músculo de animais normais. Esta observação sugere fortemente que a perda do estímulo transcricional do SLC2A4 em músculo de animais diabéticos envolva um prejuízo na atividade da via da AMPK. Semelhantemente ao aqui observado, a ativação da AMPK em resposta ao exercício físico já foi vista prejudicada em músculo de indivíduos obesos diabéticos (FILIPPIS et al., 2008), embora o mesmo efeito não tenha sido observado com AICAR (KOISTINEN et al., 2003). Esta aparente contradição pode estar relacionada a uma alteração na metabolização do ATP, necessária para gerar 5'AMP e ativar a AMPK, e não ao conteúdo/atividade da proteína em si.

Portanto, nossos resultados sugerem que no diabetes descompensado ocorra uma disfunção na atividade das vias da CAMKII e AMPK, a qual estaria envolvida na perda de estímulo transcricional do gene SLC2A4 induzido pela contração muscular.

5.3 Expressão e atividade de fatores de transcrição relacionados ao gene SLC2A4

Para investigar a participação dos fatores transcricionais relacionados à atividade transcricional do gene SLC2A4 selecionados utilizamos duas abordagens. A primeira, baseada na avaliação da expressão do mRNA do fator transcricional em resposta à contração muscular, o que já foi observado ocorrer rapidamente (30 min) em músculo de animais não diabéticos (SILVA et al., 2005; LIMA et al., 2009). A segunda abordagem baseou-se em ensaios de mobilidade eletroforética (*gel shift e supershfit*), por meio dos quais é possível avaliar a atividade de ligação do fator transcricional ao seu domínio de ligação específico do promotor do gene do SLC2A4. O presente estudo evidenciou alterações importantes tanto no efeito do diabetes sobre a expressão/atividade basal de alguns fatores transcricionais, como alterações na resposta ao estímulo contrátil em músculo de animais diabéticos. Estes últimos serão discutidos com mais profundidade, pois representam o foco do presente estudo.

Os resultados mostraram que no estado diabético, há redução da expressão dos fatores MEF2A e MEF2D, assim como redução na atividade de ligação de MEF2 ao promotor do SLC2A4. Resultados semelhantes já foram descritos para o MEF2A em músculo de camundongo diabético (THAI et al., 1998). A contração muscular, em músculo de ratos normais, aumenta mRNA do MEF2A, mas não do MEF2D, embora aumento MEF2D em resposta à contração já tenha sido observado em animais previamente jejuados por 24 hs (SILVA et al., 2005), sugerindo que o estado metabólico-hormonal deve modular o efeito da contração muscular sobre MEF2D. Importante dado funcional, foi a observação de que a contração muscular aumentou a atividade de ligação de MEF2 no promotor do SLC2A4 em músculo de rato normal, o que não foi observado em músculo de rato diabético. Redução da atividade de ligação de MEF2 já foi observada em músculo de camundongos diabéticos (THAI et al., 1998) porém a resposta à contração muscular nunca havia sido investigada. Todas essas alterações induzidas pelo diabetes foram revertidas pelo tratamento com insulina, indicando que a perda de atividade MEF2 ocorre no diabetes descompensado. O ensaio de *supershift* confirmou a participação do MEF2D, e considerando que a principal forma de atuação desse fator é como heterodímero MEF2A/MEF2D (MORA; PESSIN, 2000), a verificação da alteração de uma isoforma nos permite extrapolar o efeito para o heterodímero. Destaque-se que não há no mercado anticorpo específico e eficiente para MEF2A.

A atividade de ligação do GEF aumenta em resposta à contração muscular em músculo de ratos normais. O diabetes, embora não tenha alterado a atividade de ligação basal, aboliu completamente a resposta à contração muscular, efeito este revertido pelo tratamento com insulina. O aumento da ligação do GEF em resposta a exercício físico já foi observado em músculo de humanos saudáveis (MC GEE et al., 2005). A participação do GEF na regulação do gene SLC2A4 ganha destaque, pelo fato de que este fator tem efeito cooperativo com o MEF2 (KNIGHT et al., 2003). Os nossos resultados são os primeiros a demonstrar a ativação do GEF pela atividade contrátil *per se*.

Sabe-se que a histona deacetilase (HDAC) é uma proteína que quando ligada ao MEF2 promove a sua inibição (MC KINSEY et al., 2000). Sparling et al. (2008), mostraram que em células adiposas 3T3, na ausência de MEF2, as HDAC5 se ligam ao GEF também promovendo inibição de sua atividade transcricional sobre o SLC2A4. Uma vez que isto ocorra também em músculo esquelético, este fato poderia explicar a não ativação das proteínas GEF pela atividade contrátil em animais diabéticos, em que a expressão de MEF2 estaria reduzida, e assim, as HDAC estariam inibindo o GEF.

Finalmente, é importante destacar que o emprego de inibidores da AMPK e da CAMKII impediu o aumento da ligação dos fatores transcricionais MEF2 e GEF aos seus sítios específicos, reforçando a importância dessas vias na ativação destes fatores transcricionais. Nós somos os primeiros a demonstrar esta ação direta da inibição das vias e perda da atividade de ligação destes fatores.

Os resultados de transfecção em células C2C12 nos mostram que com a mutação dos domínios E-Box e TRE também há uma redução da atividade transcricional, revelando que os ligantes dessas regiões também têm um papel importante na expressão do gene SLC2A4. Partindo deste princípio, investigamos a expressão e a atividade de ligação dos fatores transcricionais HIF-1α (ligante do E-Box) e do TRα1 (ligante do TRE).

Alguns autores sugeriram que o HIF-1α esteja envolvido na ativação dos genes do GLUT1 e GLUT3, e nós fomos os primeiros a mostrar fortes indícios de que o HIF-1α esteja envolvido na ativação do GLUT4 em músculo esquelético sob a atividade contrátil (LIMA et al., 2009). No presente estudo confirmamos em animais ND que a atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio E-Box aumenta em resposta à contração. Surpreendentemente, no estado diabético, observamos um grande aumento na atividade de ligação no estado basal, a qual não se

alterou em resposta à contração muscular. Essa regulação foi paralela ao observado na expressão do mRNA do HIF-1α, um dos ligantes do E-Box. Para tentarmos esclarecer a participação do HIF-1α, realizamos ensaio de *supershift*, confirmando que o HIF-1α participa desta ativação.

Sabe-se que em condição de normóxia, o HIF-1α é rapidamente degradado pela via proteossomal da ubiquitina, sendo praticamente inexistente na célula (HUANG et al., 1998). Entretanto, quando a concentração de O2 diminui, ocorre inibição de sua degradação, levando ao aumento do conteúdo e da ativação do HIF1-a (LEE et al., 2003). Sabe-se também que o diabetes desenvolve complicações microvasculares, que podem comprometer perfusão dos tecidos, e que, quando descompensado, graus variados de acidose metabólica podem se instalar, ambos contribuindo para menor oxigenação tecidual. Essas complicações poderiam justificar o aumento basal da ativação do HIF-1α nos músculos dos animais diabéticos, o qual nem se alterou com a contração muscular.

Este resultado, a princípio, é controverso, uma vez que o HIF-1α é tido como estimulador da expressão de GLUT4, que se encontra reduzida no diabetes, e somente poderia ser compreendido a partir de um balanço de forças repressoras superando o efeito estimulador do HIF-1α sobre o gene SLC2A4. Neste sentido fomos avaliar o p300, um co-ativador importante da atividade trancricional do HIF-1α (NCBI., 2011). A observação de que o diabetes compromete de forma importante a expressão do p300 indica que o aumento do HIF-1α não deve ter efetividade transcricional. Não há nenhum dado na literatura mostrando a diminuição da expressão deste gene em estado diabético, assim como aumento rápido em resposta à contração muscular.

Ainda, explicando este aumento de HIF-1α concomitante a redução de GLUT4, foi descrito (THANGARAJAH et al., 2010) que altas taxas de glicose promovem um defeito na transativação do HIF-1α, fruto de espécies reativas de oxigênio que atuam na modificação do co-ativador p300, dificultando a sua associação ao HIF-1α. O uso de *iron chelator-antioxidant deferoxamine* (DFO), que neutraliza estas espécies reativas de oxigênio, reverte estes efeitos. Deste modo, os autores apontam que a atividade HIF-1α é prejudicada em alta concentração de glicose, e isto persiste até em casos de hiperexpressão de HIF-1α. É interessante observar que quando tratamos os animais diabéticos com insulina (grupo DI), há o retorno da atividade de ligação no sítio E-Box para os níveis dos controles (grupo ND), o que pode estar relacionado com a queda da glicemia. Estes dados nos indicam que o HIF-1α é importante no aumento da

expressão do gene do GLUT4 apenas em condições normais, e que no estado diabético este efeito estimulador está abolido, provavelmente por defeito em seu co-ativador p300.

Sabe-se que os hormônios tireoidianos promovem o aumento da expressão do GLUT4 em músculo esquelético de ratos (WEISTEIN; O'BOYLE; HABER, 1994). Os TRs (receptores de hormônio tireoidiano) são proteínas codificadas por dois genes distintos, do TRα e do TRβ, que apresentam múltiplas isoformas (α1, α2, β1, β2, β3). No tecido muscular esquelético as isoformas α1 e β1 são as mais abundantes (WILLIAMS, 1995). Uma vez ligados ao TRE, os TRs recrutam uma série de proteínas co-repressoras como as SMRT (mediador de silenciamento de receptores de ácido retinóico e de hormônio tireoidiano) e NCOR (co-repressor de receptores nucleares), que formam um complexo protéico associado às HDACs. Assim, promove uma repressão no gene por deacetilação, que consiste na condensação da cromatina, dificultando o acesso de outros fatores transcricionais ao gene. Com a ligação do T3 ao TR, este fator sofre uma alteração conformacional que induz o desligamento do complexo co-repressor e promove a ligação de complexos co-ativadores, como o P/Caf p160 e CPB/p300. Estes complexos apresentam as HAT (histonas acetilases), que promovem o afrouxamento da cromatina, tornando-a mais acessível a diversos fatores de transcrição. Esse modelo de acetilação e deacetilação é o mais descrito para ativação gênica envolvendo os TRs (YEN, 2001). Santalucia et al. (2001), demonstraram que célula co-transfectada com plasmídeos que expressam o GLUT4 *enhancer* (o mesmo utilizado neste trabalho) e o TRα1, ocorre um aumento de 20,9 vezes na atividade CAT, mesmo na ausência de hormônio tireoidiano, mostrando que esta isoforma TR atua como um fator transcricional ativador do GLUT4 independente do hormônio. Vale relembrar que o TRE encontrado no gene SLC2A4 apresenta uma seqüência diferente da seqüência consenso (encontrada em outros genes), e tem uma baixa afinidade de ligação aos TRs. Especula-se que no TRE do GLUT4 somente liguem heterodímeros TR (α1 ou β1)-RXR (receptor de ácido retinóico) (TORRANCE et al., 1997).

Nossos resultados revelaram que a contração muscular promove aumento da ligação do TR no gene SLC2A4 em animais ND. Entretanto, aumento desta ligação em tecidos de ratos grupo DS foi observado, o que a princípio parece controverso. Porém, o ensaio *supershift*, nos mostrou que, ainda que tenha ocorrido um grande aumento da ligação de fatores ao sítio TRE no grupo DS(-), a isoforma TRα1 não participou de forma significativa em grande quantidade. Portanto, podemos afirmar que o aumento da ligação observado no grupo DS não se dá pela

participação da isoforma TRα1, podendo ser atribuída ao heterodímero TRβ1/RXR, que não foi descrito como ativador do gene SLC2A4. Deste modo, o aumento da ligação de TRβ1 ao TRE ocuparia este sítio, podendo até inibir a ligação de TRα1, e assim reprimindo a expressão do gene SLC2A4.

No que diz respeito ao aumento da expressão de TRα1 no exercício, Sugizaki et al. (2011), evidenciaram que após treinamento de 12 semanas não foi observada alteração na expressão de TRα1 e apenas um discreto aumento na expressão de TRβ1, isto em cardiomiócitos de ratos. Por outro lado, Dieli-Conwright et al. (2010), mostraram que uma série de exercício agudo e intenso reduz a expressão do co-repressor de TR, SMRT, em músculo vasto lateral. Estes dados fortalecem nossos resultados, pois o aumento de ligação do TRα1 ao TRE, somado com a redução da expressão de um co-inibidor, resultaria no aumento da expressão gênica.

Ainda, é importante destacar que no exercício há uma queda na secreção dos hormônios tireoidianos (ROSOLOWSKA-HUSZCZ, 1998), mas ainda assim os fenômenos discutidos acima estariam favorecendo o momento pós-exercício, quando a circulação de T3 retorna ao normal, ativando os seus receptores já ligados no TRE.

Quando tratamos os animais com insulina, a atividade de ligação do TR retornou aos níveis dos controles e a atividade contrátil volta a exercer um aumento na ligação dos TRs ao TRE. Estes resultados mostram que a alteração observada é restrita ao quadro de diabetes descompensado.

Resumindo, o nosso estudo indica que o TRα1 é muito importante na ativação do gene SLC2A4 em músculo sóleo de ratos normais, em resposta a contração muscular, mesmo na ausência do hormônio tireoidiano. Este efeito é abolido em músculo de animais diabéticos, apesar de encontrarmos uma maior ligação de fatores ao TRE no estado não estimulado.

Finalmente, investigamos a participação do fator transcricional NF-κB, importante mediador de resposta inflamatória. Em todos os grupos experimentais observou-se aumento na atividade de ligação do NF-κB em resposta à contração muscular. Aumento da ligação do NF-κB em seu sítio específico após uma série de exercício já foi descrito (HO et al., 2005). Uma vez que o NF-κB é tido como um inibidor da expressão do GLUT4 (REN et al., 1994), e que na contração muscular há um aumento da expressão do gene do GLUT4, estes resultados merecem estudos adicionais para serem melhor compreendidos. De qualquer forma, sabe-se que a contração

muscular gera um processo inflamatório que poderia justificar essa ativação do NF-κB (BARNES; KARIN, 1997).

Os resultados referentes aos fatores transcricionais demonstram que a atividade de ligação do MEF2 e do GEF se comporta da mesma maneira que o mRNA e a proteína GLUT4, o que sugere fortemente que estes fatores estejam diretamente envolvidos na resposta ao estímulo contrátil nos estados ND e DI. O TRα também parece estar envolvido no aumento do GLUT4 nos animais ND, e os ensaios *supershift* deixam claro que este fator não participa no aumento de ligação no TRE encontrado no estado diabético, reforçando seu papel ativador de GLUT4. O papel do TRα na ativação do gene do GLUT4 em animais DI segue obscuro.

Já a atividade de ligação dos fatores HIF-1α só aumenta sob o estímulo contrátil nos animais ND. Porém, em ambos, há um aumento da ligação no estado DS (-), e não sofrem alteração sob a atividade contrátil neste mesmo grupo. O resultado da expressão do mRNA do co-ativador p300 ajuda a entender o aumento da ligação do HIF-1α no estado diabético, pois ainda que ligado ao sítio E-Box, parece que há uma dificuldade em ativá-lo, por conta da queda de expressão de seu co-ativador neste estado patofisiológico.

Em resumo, nossos resultados destacam a participação do MEF2, GEF e TRα1 na ativação do gene SLC2A4 induzida pela contração muscular em músculo sóleo. Este efeito é completamente abolido em músculo de animais diabéticos descompensado, e recuperado após tratamento com insulina. Esses resultados destacam que o benefício do exercício físico para aumentar o clerance muscular de glicose está abolido em diabetes descompensado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

O presente trabalho é o primeiro a investigar os problemas na ativação do gene SCL2A4 em resposta a contração musuclar, causados pelo diabetes mellitus.

Nossos resultados podem ser assim resumidos:

- Em músculo sóleo de ratos o estímulo contrátil "in vitro" supra-máximo promove o aumento da expressão do gene SLC2A4.
- As proteínas ativadas pela contração muscular, AMPK e CAMKII, aumentam a expressão do gene SLC2A4, alterando atividade transcricional relacionada à região *enhancer* do promotor do GLUT4.
- A mutação de qualquer um dos 3 domínios da região *enhancer* (MEF2, E-Box e TRE) leva a uma drástica redução da expressão basal do SLC2A4, mostrando que os 3 domínios são de extrema importância para a expressão deste gene.
- A mutação do sítio de ligação do MEF2 abole totalmente as respostas positivas causadas pela AMPK e principalmente pela CAMKII.
- Estimuladas pelo estímulo contrátil, a AMPK e a CAMKII estão diretamente relacionadas ao aumento de ligação dos fatores transcricionais GEF e MEF2D no promotor do gene SLC2A4.
- A contração muscular "in vitro" promove o aumento da atividade de ligação de fatores transcricionais nos sítio de ligação do MEF2, no E-Box, no Domínio 1 e no TRE, assim como o aumento da atividade da enzima AMPK.
- O estado diabético promove um déficit na expressão do mRNA e da proteína GLUT4, que se correlaciona: com diminuição da atividade de ligação da proteína MEF2 ao promotor do GLUT4; com a diminuição da expressão do mRNA de MEF2A, MEF2D, α2AMPK, CAMKII e do p300; e com o deficiência na ativação da AMPK e na ativação dos fatores transcricionais MEF2D, GEF e TRα1 .
- Apesar de aumento de expressão e de atividade de ligação no estado diabético, o HIF-1α não deve estar ativando transcrição do SLC2A4 por diminuição da expressão do seu co-ativador p300 nesse estado.
- O tratamento com insulina recupera os níveis basais de GLUT4, e a capacidade do tecido muscular em responder positivamente à atividade contrátil. Recupera também a atividade de ligação dos fatores MEF2, GEF e TRα1 pela atividade contrátil.

- Apesar de ter sua atividade de ligação regulada pela contração muscular, o fator transcricional NF-κB não atua de maneira importante na expressão do gene SLC2A4 sob a atividade contrátil.

Com base nos resultados obtidos conclui-se que em músculo sóleo de ratos diabéticos a contração muscular não aumenta a expressão do gene SLC2A4, o que envolve redução na atividade dos fatores transcricionais MEF2D, GEF e TRα1. Em células C2C12, a AMPK e a CAMKII aumentam a transcrição do SLC2A4, o que depende das regiões de ligação do MEF2D e do TRα1. No diabetes, a contração muscular não aumenta a atividade da AMPK, reforçando a participação do MEF2D e TRα1 na perda do efeito da contração sobre o gene SLC2A4.

Este estudo embasa a idéia de que o indivíduo diabético descompensado não obtém benefícios de uma série de exercício.

REFERÊNCIAS*

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care,** v. 29, p. S43–S48, 2006. Suppl. 1.

ANDREWS, N. C.; FALLER, D. A rapid micropeparation technique for extraction of DNA-Binding proteins for limiting numbers of mammalian cells. **Nucleic. Acids. Res,** v. 19, p. 2499, 1991.

ARAD, M.; BENSON, D. W.; ATAYDE, A. R. P.; McKENNA, W. J.; SPARKS, E. A.; KANTER, R. J.; McGARRY, K.; SEIDMAN, J. D.; SEIDMAN, C. E. Constitutively active AMP Kinase mutations cause glicogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopaty. **J. Clin. Invest**, v. 109, p. 357-362, 2002.

ARNOLD, M. A., KIM, Y.; CZUBRYT, M. P.; PHAN, D.; MCANALLY, J.; QI, X.; SHELTON, J. M.; RICHARDSON, J. A.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. **Dev. Cell.,** v. 12, p. 377-389, 2007.

ASSUNÇÃO, M. C. F.; SANTOS, I. S.; COSTA, J. S. D. Avaliação do processo da atenção médica: adequação do tratamento de pacientes com diabetes mellitus, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p. 205-211, 2002.

BARNES, P. J.; KARIN, M. NF Kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases**. N. Engl. J. Med,** v. 336, p. 1066-1071, 1997.

BARRA, G. B.; VELASCO, L. F. R.; PESSANHA, R. P.; CAMPOS, A. M.; MOURA, F. N.; DIAS, F. M. G.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R. C. J.; SIMEONI, R. A.; NEVER, F. A. R. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.,** v. 48, n.1, p. 23-38, 2004.

BLACK, B. L.; OLSON, E. N. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.,** v. 14, p. 167-196, 1998.

BLAU, H. M.; PAVLATH, G. K.; HARDEMAN, E. C.; CHIU, C. P.; SILBERSTEIN, L.; WEBSTER, S. G.; MILLER, S. C.; WEBSTER, C. Plasticity of the differentiated state. **Science,** v. 15, n. 4727,p. 758-766, 1985.

BLOCK, N. E.; MENICK, D. R.; ROBINSON, K. A.; BUSE, M. G. Effect of desenervation on the expression of two glucose transport isoforms in rat hinlimb muscle. **J. Clin. Invest.,** v. 88, n.5, p. 1546-1552, 1991.

BRAUN, A. P.; SCHULMAN, H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. **Annual Review of Physiology,** v. 57, p. 417–445, 1995.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração: Rio de Janeioro, 2002

BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L. **Principles of Internal Medicine**, 15th ed. New York: McGraw-Hill. Diabetes Mellitus, p. 2109–2137, 2001.

BRIAVANOU, A. H.; DARNELL JR, J. E. Signal Transduction and the control of gene expression. **Science,** v. 295, p. 813-818, 2002.

BROZINICK Jr, J. T.; ETGEN Jr, G. T.; YASPELKIS 3rd, B. B.; IVY, J. L. The effects of muscle contraction and insulin on glucose-transporter translocation in rat skeletal muscle. **Biocherm. J.,** v. 297, p.539-545, 1994.

BRUSS, M. D.; ARIAS, E. B.; LINHARD, G. E.; CARTEE, G. D. Increased phosphorylation of AKT substrate of 160 kDa (AS 160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. **Diabetes,** v. 54, p. 41-50, 2005.

CHEUNG, P. C. F.; SALT, I. P.; DAVIES, S. P.; HARDIE, D. G.; CARLING, D. Characterization of AMPK gamma subunit isoform and their role in AMP binding. **Biochem. J.,** v. 346, p. 659-669, 2000.

CHIN, E. R. The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. **PNAS**, v. 63, p. 279 – 286, 2004.

COOKE, D. W.; LANE, M. D. The transcription factor nuclear factor I mediates repression of the GLUT4 promoter of insulin. **J. Biol. Chem**., v. 274, p. 12917-12924, 1999.

CORTON, J. M.; GILLESPIE, J. G.; HARDIE, D. G. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. **Current. Biol.,** v. 4, p. 315-324, 1994.

CORTRIGHT, R. N.; and DOHM, G. L. Mecanism by which by insulin and muscle contraction stimulate glucose transport. **Can. J. Appl. Physiol.,** v. 22, p. 519-530, 1997.

DEFRONZO, R. A.; JACOT, E.; JEQUIER, E.; MAEDRE, E.; WAHREN, J.; FELBER, J. P**.** The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. **Diabetes**, v. 30, p. 1000–1007, 1981.

DESHMUKH, A.; COFFEY, V. G.; ZHONG, Z.; CHIBALIN, A. V.; HAWLEY, J. A.; ZIERATH, J. R. Exercise-induce phosphorylation of the novel AKT substrate AS160 and filamin A in human skeletal muscle. **Diabetes,** v. 55, p. 1776-1782, 2006.

DIELI-CONWRIGHT, C. M.; SPEKTOR, T. M.; RICE, J. C.; SATTLER, F. R.; SCHROEDER, E. T. Hormone replacement therapy and messenger RNA expression of estrogen receptor coregulators after exercise in postmenopausal women. **Med. Sci. Sports. Exerc.,** v. 42, n. 3, p. 422-449, 2010.

DOWELL, P.; COOKE, D. W. OLf –1/ EarlB cell factor is a regulator of GLUT4 gene expression in 3t3-L1 Adipocytes. **J. Biol. Chem**., v. 277, p. 1712-1718, 2002.

DUGANI, C. B.; CLIP, A. Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. **EMBO**, v. 6, p. 1137-1142, 2005.

EBERT, B. L.; GLEADLE, J. M.; O'ROURKE, J.; BARTLETT, S. M.; POUTON, J.; RATCLIFFE, P. J. Isoenzime specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypóxia: similarities with the regulation of erytropoietin. **Biochem. J.,** v. 313, p. 809-8147, 1996.

EDMONDSON, D. G., LYONS, G. E., MARTIN, J. F. AND OLSON, E. N. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. **Development,** v.120. p. 1251-1263, 1994.

EGAN, B.; CARSON, B. P.; GARCIA-ROVES, P. M.;CHIBALIN, A. V.;SARSFIELD, F. M.; BARRON, N.; McCAFFREY, N.; MOYNA, M. N.; ZIERATH, J. R.; O'GORMAN, D. J. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α Mrna abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. **J. Physiol**., v. 588, p. 1779–1790, 2010.

FILIPPIS, E., ALVAREZ, G., BERRIA, R., CUSI, K., EVERMAN, S., MEYER, C. AND MANDARINO, L. J. Insulin-resistant muscle is exercise resistant: evidence for reduced response of nuclear-encoded mitochondrial genes to exercise. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**., v. 294, p. E607–E614, 2008.

FRIEDMAN, J. E.; SHERMAN, W. N.; REED, M. J.; ELTON, C. W.; DOHM, G. L. Exercise training increases glucose transporter protein GLUT-4 in skeletal muscle of obese Zucker (fa/fa) rats. **FEBS. lett**., v. 268, p. 13-16, 1990.

FRYER, L. G. D.; FOUFELLE, F.; BARNES, K.; BALDWIN, S. A.; WOODS, A.; CARLING, D. Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation glucose transporrt in skeletal muscle cells. **Biochem. J.,** v. 363, p. 167-174, 2002.

GARCIA-ROVES, P. M.; JONES, T. E.; OTANI, K.; HAN, D. H.; HOLLOSZY, J. O. Calcineurin does not mediate exercise-induced increase in muscle *GLUT4*. **Diabetes.,** v. 54, p. 624–628, 2005

GARFIN, D. E. One-dimensional gel eletrophoresis. **Methods Enzimol.**, v. 182, p. 425-441, 1990.

GARVEY, W. T.; HUECKSTEADT, T. P.; BIRNBAUN, M. J. Pretranslational suppressional of insulin-responsive glucose transporter in rats with diabetes mellitus. **Science**, v. 245, n. 4913, p. 60-63, 1989.

GIBBS, E. M.; STOCK, J. L.; Mc COID, S. C.; STUCKENBROCK, H. A.; PESSIN, J. E.; SETENSON, R. W.; MILICI, A. J.; Mc NEISH, J. D. Wole body GLUT4 overexpression in diabetic db/db mice. **J. Clin. Invest.,** v. 95, p. 11346-11350, 1993.

GOODYEAR, L. J.; KAHN, B. B. Exercise, glucose transport,and insulin sensitivity. **Annu. Rev. Med**., v. 49, p. 235–261, 1998.

GRAY, S.; FEINBERG, M. W.; HULL, S.; KUO, C. T.; WATANABE, M.; SEN, S.; DE PINA, A.; HASPEL, R.; JAIN, M. K. The KLF 15 regulates the insulin sensitive glucose transporter GLUT4. **J. Biol. Chem**., v. 277, p. 34322-34328, 2002.

HARDIE, D. G. Metabolic control: A new solution to an old problem. **Current. Biol.,** v.10, p. R757-R759, 2000.

HARDIE, D. G.; CARLING, P. The AMP-activated protein Kinase-fuel gauge of the mammalian cell? **Eur. J. Biocherm.,** v. 246, p. 259-273, 1997.

HAYASHI, T.; HIRSHMAN, M. F.; KURTH, E. J.; WINDER, W. W.; GOODYEAR, L. J. Evidence o 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**, v. 47, p. 1369-1373, 1998.

HAYASHI, T.; WOJTASZEWSKI, J. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **Am. J. Physiol.,** v. 273, p. E1039-E1051, 1997.

HAWLEY, S. A.; DAVISON, M. A.; WOODS, S. P.; DAVIES, R. K.; BERI, D.; CARLING, D.; HARDIE, D. G. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver, and identification of threonine-172 as the major site at which it phosphorylates and activates AMP-activated protein kinase. **J. Biol. Chem.,** v. 271, p. 27879-27887, 1996.

HENRIKSEN, E. J.; RODNICK, K. J.; MONDON, C. E.; JAMES, D. E.; HOLLOSZY, J. O. Effect of denervation or unweighting on GLUT4 protein in rat soleus muscle**. J. Appl. Physiol**., v. 70, p. 2322-2327, 1991.

HIGAKI, Y., HIRSHMAN, M. F., FUJII, N.; GOODYEAR, L. J. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. **Diabetes**, v. 50, p. 241–247, 2001.

HO, R. C.; ALCAZAR, O.; FUGII, N.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J. p38 gamma MAPK regulation of glucose transporter expression and glucose uptake in L6 myotubes and mouse skeletal muscle. **Am. Physiol. Soc.,** v. 286, p. R342-R349, 2003.

HO, R. C.; HIRSHMAN, M. F.; LI, Y.; CAI, D.; FARMER, J. R.; ASCHENBACH, W. G.; WITCZAK, C. A.; SHOELSON, S. E.; GOODYEAR, L. J. Regulation of IκB kinase and NF-κB in contracting adult rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.,** v.289, p. C794–C801, 2005.

HOFFMAN, E. C.; REYES, H.; SANDER, F.; CONLEY, L. H.; BROOKS, B. A.; HANKISON, O. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. **Science,** v. 252, p. 954-958, 1991.

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle: effects ofexercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory activity inskeletal muscle. **J. Biol. Chem**., v. 242, p. 2278–2282, 1976.

HOLMES, B. F.; KURTH-KRACZEC, E. J.; WINDER, W. W. Chronic ativation of 5' AMP activated protein kinase increases GLUT4, hexokinases and glycogen in muscle. **J. Appl. Physiol.** v. 87, p. 1990-1995, 1999.

HOLMES, B. F.; SPARLING, D. P.; OLSON, A. L.; WINDER, W. W.; DOHM, L. G. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**., v. 289, p. E1071–E1076, 2005.

HWANG, L. E.; GU, J.; SCHAU, M.; BUNN, H. F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1α is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin proteasome Pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v. 95, p. 7987-7992, 1998.

HWANG, S. L.; LIU, I. M.; TZENG, T. F.; CHENG, J. T. Activation of imidazoline receptors in adrenal gland to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetologia,** v. 48, p. 767–775, 2005.

IHLEMANN J, GALBO H,; PLOUG, T**.** Calphostin C is an inhibitor of contraction, but not insulin-stimulated glucose transport, in skeletal muscle. **Acta. Physiol. Scand.,** v. 167, p. 69–75, 1999.

IMAMURA, T.; HUANG, J.; USSUI, I.; SATOH, H.; BEVER, J.; OLEFSKY, J. M. Insulin-induced GLUT4 involves protein kinase C-lambada-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein Kinesin. **Mol. Cel. Biol.,** v. 23, p. 69-75, 2003.

JESSEN, N.; GOODYEAR, L. J. Contraction sinaling to glucose transport in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.,** v. 99, p. 330-337, 2005.

KANZAKI, M.; MORA, S.; HWANG, J. B.; SALTIER, A. R.; PESSIN, J. E. Atypical protein Kinase C is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidyilinusitol 3-kinase and TC10 signaling patways. **J. Cell. Biol.,** v. 164, p. 279-290, 2004.

KEMP, B. E.; MITCHELHILL, K. I.; STAPLETON, D.; MICHELL, B. J.; CHEN, Z. P.; WITTERS, L. A. Dealing With energi demand: The AMP protein Kinase. **Trends Biochem. Sci**., v. 24, p. 22-25, 1999.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995 – 2025. **Diabetes Care,** v. 21, p. 1414-31, 1998.

KNIGHT, J. B.; EYSTER, C. A.; GRIESEL, B. A.; OLSON, A. L. Regulation of the human GLUT4 gene promoter: interaction between a transcriptional activator and myocyte enhancer factor 2A. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,** v. 100, n. 25, p. 14725-14730, 2003.

KOISTINEN, H. A.; GALUSKA, D.; CHIBALIN, A. V.; YANG, J.; ZIERATH, J. R.; HOLMAN, D.G.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. 5-Amino-Imidazole Carboxamide Riboside Increases Glucose Transport and Cell-Surface GLUT4 Content in Skeletal Muscle From Subjects With Type 2 Diabetes. **Diabetes,** v. 52, p. 1066–1072, 2003.

KRANIOU, G. N.; CAMERON-SMITH, D.; HARGREAVES, M. Acute exercise and GLUT4 expression in human skeletal muscle: influence of exercise intensity. **J. Appl. Physiol.,** v. 101, p. 934–937, 2006.

LEE, M.; HWANG, J. T.; LEE, H. J.; JUNG, S. N.; KANG, I.; CHI, S. G.; KIM, S. S.; HA, J. AMP activated protein kinase activity is critical for hypóxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. **J. Biol. Chem.,** v. 278, p. 39653-39661, 2003.

LI, Q.; LI, J.; REN, J. UCF-101 mitigates streptozotocin-induced cardiomyocyte dysfunction: role of AMPK. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.,** v. 297, p. E965–E973, 2009.

LIMA, G. A.; ANHÊ, G. F.; GIANNOCCO, G.; NUNES, M. T.; CORREA-GIANNELLA, M. L.; MACHADO, U. F. Contractile activity per se induces transcriptional activation of SLC2A4 gene in soleus muscle: involvement of MEF2D, HIF-1a, and TR alpha transcriptional factors. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**., v. 296, n. 1, p. E132-8, 2009.

LIU, M. L.; OLSON, A. L.; EDGINGTON, N. P.; MOYE-ROWLEY, W. S.; PESSIN, J. E. Mef 2 binding site is essencial forc2c12 myotubes –specifoc expression of the rat GLUT4/Muscle-adipose facilitative glucose transport gene**. J. Biol. Chem.,** v. 269, p. 28514-28521, 1994.

LU, J.; MC KINSEY, T. A.; NICOL, R. L.; OLSON, E. N. Signal-dependent activation of MEF2 trascription factor by dissociation from the histone deacetylase. **PNAS,** v. 97, p. 4070-4075, 2000.

MACHADO, U. F.; SHIMIZU, I.; SAITO, M. Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT4) in white adipose tissue of obese mice. **Physiol. Behav.,** v. 55, n.4, p. 621-625, 1994.

MAHLAPUU, M.; JOHANSSON, C.; LINDGREN, K.; HJALM, G.; BARNES, B. R.; KROOK, A.; ZIERATH, J. R.; ANDERSSON, L.; MARKLUND, S. Expression profiling of the gamma sub unit isoform of AMP-activated protein kinase suggests a role of gamma 3 in the with skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.,** v. 286, p. E194-E200, 2004.

MARETTE, A.; RICHARDSON, J. M.; RAMLAL, T.; BALON, T. W.; VRANIC, M.; PESSIN, J. E.; KLIP, A. Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. **Am. J. Physiol.,** v. 273, p. C443-C452, 1992.

MARTIN, J. F., SCHWARZ, J. J.; OLSON, E. N. Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: a tissue-restricted member of the MEF-2 family of transcription factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v. 90, p. 5282-5286, 1993.

MC GEE, S.; SPARLING, D.; OLSON, A. L.; HARGREAVES, M. Exercise increases MEF2- and GEF DNA-binding activities in human skeletal muscle**. FASEB Journal express article,** v. 20, n. 2, p. 348-349, 2006.

MC GEE, S. L.; HARGREAVES, M. Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: Molecular mecanisms. **Clin. Exp. Pharmacol. Phisiol.,** v. 33, p. 395-399, 2006.

MC KINSEY, T. A.; ZHANG, C. L.; LU, J.; OLSON, E. N. Signal-dependent nuclear export of a histone diacetylase regulates muscle differentiation. **Nature**, v. 408, p. 106-110, 2000.

MC KINSEY, T. A.; ZHANG, C. L.; OLSON, E. N. Activation of Miocite Enhancer Factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. **PNAS,** v. 97, p.14400-14405, 2000.

MERRIL, G. F.; KURTH, E. J.; HARDIE, D. G.; WINDER, W. W. AICA Riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. **Am. J. Physiol.,** v. 273, p. E1107-E1112, 1997.

MIRANDA, L.; HORMAN, S.; DE POTTER, I.; HUE, L.; JENSEN, J.; RIDER, M. H. Effects of contraction and insulin on protein synthesis, AMP-activated protein kinase and phosphorylation state of translation factors in rat skeletal muscle. **Eur. J. Physiol.,** v. 455, p. 1129–1140, 2008.

MOLKETIN, J. D.; FIRULLI, A. B.; BLACK, B. L.; MARTIN, J. F.; HUSTAD, C. M.; COPELAND, N.; JENKINS, N.; LYONS, G.; OLSON, E. N. MEF2B is a potent transactivator expressed in early myogenic lineages. **Mol. Cell. Biol**., v. 16, p. 3814-3824, 1996.

MOLLER, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome**. Nature,** v. 13, n. 414, p. 821-827, 2001.

MORA, S.; PESSIN, J. E. The MEF2A isoform is requered for striated muscle-specific expression of the insuline-responsive GLUT4 glucose transporter. **J. Biol. Chem.,** v .275, p. 16323-16328, 2000.

MORENO, H.; SERRANO, A. L.; SANTALUCIA, T.; GUMMÁ, A.; CANTO, C.; BRAND, N. J.; PALCÍN, M.; SCHIAFFINO, S.; ZORZANO, A. Differential regulation of the muscle specific GLUT4 enhancer in regenerating and adult skeletal muscle. **J. Biol. Chem**., v. 278, p. 40557-40564, 2003.

MU, J.; BROZINICK J. T. Jr.; VALLADARES, O.; BUCAN, M.; BIRNBAUN, M. J. A role of AMP-Activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. **Mol. Cell.,** v. 7, p. 1085-1094, 2001.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). GENE ID: 2033. (2011) Disponível em: <www. ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=2033>. Acesso em 26 jun. 2011.

NESHER, R.; KARL, I. E.; KIPNIS, D. M. Dissocation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. **Am. J. Physiol. Cell.Physiol.,** v. 249, p. C 226-C232, 1985.

NEWFER, P. D.; DOHM, G. L. Exercise induces a transient increase in transcription of the GLUT-4 gene in skeletal muscle. **Am. J. Physiol.,** v. 265, p. 1597-1603, 1993.

O'GORMAN, D. J.; KARLSSON, H. K. R.; MC QUAID, S.;YOUSIF, O.; RAHMAN, Y.; GASPARRO, D.; GLUND, S.; CHIBALIN, A. V.; ZIERATH, J. R.; NOLAN, J. J. Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes. **Diabetologia,** v. 49, p. 2983–2992, 2006.

OJUKA, E. O.; JONES, T. E.; NOLTE, L. A.; CHEN, M.; WANHOFF, B. R.; STUREK, M.; HOLLOSZY, J. O. Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence of involvement of AMPK and Ca2+. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**., v. 282, p. E1008-E1013, 2002.

OKADA, T.; KAWANO, Y.; SAKAKIBARA, T.; HAZEKI, O.; UI, M. Essential role of phosphatidylinusitol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. **J. Biol. Chem.,** v. 269, p. 3568-3573, 1994.

POTTHOFF, M. J.; OLSON, E. N. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. **Development.,** v. 134, p. 4131-4140, 2007.

RASMUSSEN, B. B.; HANCOCK, C. R; WINDER, W. W. Post exercise recovery of skeletal musclemalonyl Co-A, Acetyl Co-A carboxylase, and AMP-activated protein Kinase. **J. Appl. Physiol.,** v.85, p. 1629-1634, 1998.

REN, J. M.; SEMENKOVICH, C. F.; GULVE, E. A.; GAO, J.; HOLLOSZY, J. O. Exercise induces rapid increase in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 14396-14401, 1994.

RICHTER E. A., CLELAND P. J., RATTIGAN S.;CLARK M. G**.** Contractionassociated translocation of protein kinase C in rat skeletal muscle. **FEBS Letter,** v. 217, p. 232–236, 1987.

ROSE, A. J.; KIENS, B.; RICHTER, E. A. Ca2+–calmodulin-dependent protein kinase expressionand signalling in skeletal muscle during exercise. **J. of physiol**., v.574, n. 3, p. 889-903, 2006.

ROSOLOWSKA-HUSZCZ, D. The effect of exercise training intensity on thyroid activity at rest. **J. Physiol. Pharmacol.,** v. 49, n. 3, p. 457-466, 1998.

ROYER, C.; LACHER, J.; CROUZOULON, G.; ROUX, J. C.; PEYRONNET, J.; MAMET, J.; PEQUIBNOT, J. M.; DALMAZ, Y. Effects of gestacional hypoxia on mRNA levels of GLUT3 and GLUT4 transporters, hypoxia inducible factor I and thyroid hormone receptors in developing rat brain. **Brain Research,** v. 856, p. 119-128, 2000.

RUAN, H.; HACOHEN, N.; GOLUB, T.R.; VAN PARIJS, L.; LODISH, H. F. Tumor necrosis factor-_ suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes. Nuclear factor-κB activation by TNF-α is obligatory. **Diabetes,** v. 51, p. 1319–1336, 2002.

SALT, I.; CELLER, J. W.; HAWLEY, S. A.; PRESCOTT, A.; WOODS, A.; CARLING, D.; HARDIE, G. AMP-activated protein Kinase: grater AMP dependence and preferencial nuclear localization, of complex containing the alpha 2 isoform. **Biochem. J.,** v. 334, p. 117-187, 1998.

SANTALUCIA, T.; MORENO, H.; PALACÍN, M.; YACOUB, M. H.; BRAND, N. J.; ZORZANO, A. A novel funcion Co-operacion between MyoD, MEF2 and TR alpha 1 is sufficient to induction of GLUT4 gene Transcription. **J. Mol. Biol.,** v. 314, p. 195-204, 2001.

SATO, Y.; OSHIDA, Y.; OHSAWA, I.; NAKAI, N.; OHSAKI, N.; YAMANOUCHI, K.; SATO, J.; SHIMOMURA, Y.; OHNO, H. The role of glucose transport in the regulation of glucose utilization by muscle. In: MAUGHAN, R.J. &SHIRREFFS, S.M. **Biochemistry of exercise IX**. USA. Human Kinetics, p. 37-50, 1996.

SILVA, J. L. T.; GIANOCCO, G.; FURUYA, D. T.; LIMA, G. A; MORAES, P. A. C.; NACHEF, S.; BORDIN, S.; BRITTO, L. R. G.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. NF-kB, MEF2A, MEF2D and HIF1-a involvemet on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleous muscle. **Mol. Cell. Endoc.,** v. 240, p. 82-93, 2005.

SMITH, J. A.; KOHN, T. A.; CHETTY, A. K.; OJUKA, E. O. CAMK activation during exercise is required for histone hyperacetylation and MEF2A binding at the MEF2 site on the Glut4 gene. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.,** v. 295, p. E698–E704, 2008.

SPARLING, D. P.; GRIESEL, B. A.;WEEMS, J.; OLSON, A. L. GLUT4 Enhancer Factor (GEF) interacts with MEF2A and HDAC5 to regulate the GLUT4 promoter in adipocytes. **J. Biol. Chem.,** v. 21, n. 283 P..7429-7437, 2008.

SUGIZAKI, M. M.; LEOPOLDO, A. P. L.; CONDE, S. J.; CAMPOS, D. S.; DAMATO, R.; LEOPOLDO, A. S.; NASCIMENTO, A. F.; OLIVEIRA JUNIOR, S. S.; CICOGNA, A. C. Upregulation of mRNA Myocardium calcium handling in rats submitted to exercise and food restriction. **Arq. Bras. Cardiol.,** 2011. No prelo.

TANG, Z.; YUAN, L.; GU, C.; LIU, Y.; ZHU, L. Effect of exercise on the expression of adiponectin mRNA and GLUT4 mRNA in type 2 diabetic rats. **Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.,** v. 25, n. 2, p.191-193, 2005.

TERADA, S.; MURAOKA, I.; TABATA, I. Changes in {Ca2+} induced by several glucose transport-ehancing stimuli in rat epitrochlearis muscle. **J. Appl. Phisiol.,** v. 94, p. 1813-1820, 2003.

THAI, M. V.; GURUSWAMY, S.; CAO, K. T.; PESSIN, J. E.; OLSON, A. L. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. Regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin-deficient diabetes. **J.Biol.Chem.,** v. 273, p. 14285-14292, 1998.

THANGARAJAH, H.; VIAL, I. N.; GROGAN, R. H.; YAO, D.; SHI, Y.; JANUSZYK, M.; GALIANO, R. D.; CHANG, E. I.; GALVEZ, M. G.; GLOTZBACH, J. P.; WONG, V. W.; BROWNLEE, M.; GURTNER, G. C. HIF-1α dysfunction in diabetes. **Cell Cycle,** v. 9, n. 1, p.75-79, 2010.

THONG, F. S.; BILAN, P. J.; KLIP, A. The Rab GTPase-activating protein AS160 integrates AKT, PKC and AMPK signals regulating GLUT4 traffic. **Diabetes,** v. 56, p. 414-423, 2007.

TOMBES, R. M.; FAISON, M. O.; TURBEVILLE, J. M. Organization and evolution of multifuncional Ca 2+/CAM-dependent protein kinase genes. **Gene**, v. 322, p. 17-31, 2003.

TORRANCE, C. J.; USALA, S. J.; PESSIN, J. E.; DOHM, G. L. Characterization of a low affinity thyroid hormone receptor binding site withing the rat GLUT4 gene promoter. **Endocrnology,** v. 138, p. 1215-1223, 1997.

WALBERG-HENRIKSSON, H.; CONSTABLE, S. H.; YOUNG, D. A.; HOLLOSZY, J. O. Glucose transport into rat skeletal muscle: interaction between exercise and insulin. **J. app. Physiol.,** v. 65, p. 909-913, 1988.

WANG, Q.; SOMWAR, R.; BILAN, P. J.; LIU, Z.; JIN, J.; WOODGETT, J.R.; KLIP, A. Protein Kinase B/ AKT participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblast. **Mol. Cell. Biol.,** v. 19, p. 4008-4018, 1999.

WEINSTEIN, S. P.; O'BOYLE, E.; HABER, R. S. Thyroid hormone increases basal and insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle. The role of GLUT4 glucose transporter expression. **Diabetes,** p.43, n. 10, v. 1185-1189, 1994.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047–1053, 2004.

WILLIAMS, G. R. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. **Mol. Cell. Biol.,** v. 20, p.8329-8342, 1995.

WRIGHT, D. C.; HUCKER, K. A; HOLLOSZY, J. O; HAN, D. H. Ca2+ and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. **Diabetes,** v.53, p. 330-335, 2004.

WOJTASZEWSKI, J. F.; HANSEN, B. F.; URSØ, B,; RICHTER, E. A. Wortmannin inhibits both insulin- and contraction-stimulated glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.,** v. 81, n. 4, p. 1501–1509, 1996.

YAFFE, D.; SAXEL, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. **Nature,** v. 270, n. 5639, p. 725-727, 1977

YANG, C. C.; ORNATSKY, O. I.; MCDERMOTT, J. C.; CRUZ, T. F.; PRODY, C. A. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogenactivated protein kinase, ERK5/BMK1. **Nucleic Acids Res**.,v. 26, p. 4771-4777, 1998.

YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiol. Rev**., v. 81, p. 1097-142, 2001.

YU, M.; STEPTO, N. K.; CHIBALIN, A. V.; FRYER, L. G. D.; CARLING, D.; KROOK, K.; HAWLEY, J. A.; ZIERATH, J. R. Metabolic and mitogenic signaltransduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise. **J. Physiol.,** v. 546, p. 327-335, 2003.

YU, Y. T.; BREITBART, R. E.; SMOOT, L. B.; LEE, Y.; MAHDAVI, V.; NADAL-GINARD, B**.** Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors**. Genes Dev.,** v. 6, p. 1783-1798, 1992.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature,** v. 414, p. 782–787, 2001.

ZORZANO, A.; FANDOS, C.; PALACÍN, N. Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism. **Biochem. J.,** v. 349, p. 667-688, 2000.

ZOU, F.; MAO, X.; WANG, N.; LIU, J.; OU-YANG, J. *Astragalus* polysaccharides alleviates glucose toxicity and restores glucose homeostasis in diabetic states via activation of AMPK. **Acta. Pharmacologica Sinica.,** v. 30, p. 1607–1615, 2009.